REVOLUÇÃO GENÉTICA: EXPLORANDO OS AVANÇOS DA TERAPIA GÊNICA COM DESTAQUE PARA A TECNOLOGIA CRISPR – Uma revisão narrativa

GENETIC REVOLUTION: EXPLORING THE ADVANCES OF GENE THERAPY WITH EMPHASIS ON CRISPR TECHNOLOGY – A narrative review

1. Izabella Marchioni Navarro

1. Julia Paes Minitti

2. Orientadora: Ma. Patrícia Lius Melo Alves

3. Orientador: Dr. Lourival Antunes de Oliveira Filho

Afiliação: 1. Acadêmicas do Curso de Biomedicina da Universidade de Sorocaba

2. Professora assistente da Universidade de Sorocaba

3. Professor adjunto da Universidade de Sorocaba

Resumo: A terapia gênica é um campo promissor da medicina que busca corrigir ou substituir genes defeituosos para tratar doenças graves e hereditárias. O objetivo do presente trabalho é abordar e discutir a terapia gênica, com ênfase em seus desafios éticos, além de explorar os avanços técnicos e metodológicos dessa área, que oferece novas alternativas para condições complexas e muitas vezes incuráveis, como certos tipos de câncer, doenças hepáticas e problemas cardiovasculares. Nos últimos anos, a tecnologia CRISPR-Cas9 destacou-se como uma ferramenta essencial na edição do genoma, devido à sua precisão e eficiência superiores em comparação com métodos anteriores, como meganucleases, ZFNs e TALENs. O uso de CRISPR-Cas9 tem possibilitado avanços importantes na pesquisa e no desenvolvimento de terapias gênicas, mostrando resultados promissores em modelos pré-clínicos e até em alguns ensaios clínicos iniciais. No entanto, há desafios técnicos, como a entrega segura e precisa dos genes corrigidos, além de questões éticas, como o impacto das modificações genéticas a longo prazo, que ainda precisam ser resolvidos. Em resumo, a terapia gênica, especialmente com o uso do CRISPR-Cas9, representa uma esperança real para a medicina moderna, com o potencial de transformar o tratamento de diversas doenças e melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes, embora exija cautela e avanços adicionais.

Palavras-chave: Terapia genética; CRISPR-Cas9; Edição genética; Meganucleases; ZFNs; TALENs.

Abstract: Gene therapy is a promising field of medicine that seeks to correct or replace defective genes to treat serious and hereditary diseases. The objective of this work is to address and discuss gene therapy, with emphasis on its ethical challenges, in addition to exploring the technical and methodological advances in this area, which offers new alternatives to complex and often incurable conditions, such as certain types of cancer, liver diseases and cardiovascular problems. In recent years, CRISPR-Cas9 technology has stood out as an essential tool in genome editing, due to its superior precision and efficiency compared to previous methods, such as meganucleases, ZFNs and TALENs. The use of CRISPR-Cas9 has enabled important advances in the research and development of gene therapies, showing promising results in preclinical

models and even in some initial clinical trials. However, there are technical challenges, such as the safe and accurate delivery of corrected genes, as well as ethical issues, such as the impact of long-term genetic modifications, which still need to be resolved. In summary, gene therapy, especially with the use of CRISPR-Cas9, represents a real hope for modern medicine, with the potential to transform the treatment of various diseases and significantly improve the quality of life of patients, although it requires caution and additional advances.

Keywords: Gene therapy; CRISPR-Cas9; Genetic editing; Meganucleases; ZFNs; TALENs.

1 INTRODUÇÃO

A terapia genética, cujo objetivo primordial é corrigir ou substituir genes desarranjados em células específicas do corpo, representa uma abordagem promissora no tratamento de doenças genéticas graves. Em contraste com a terapia celular, onde as células são manipuladas externamente e reintroduzidas no organismo após a manipulação, a terapia genética envolve a modificação direta ou substituição de genes através da introdução de ácidos nucleicos em células-alvo. Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) é um sistema de edição gênica, que utiliza a proteína associada CRISPR 9 (Cas9) para realizar alterações precisas no genoma. A capacidade do sistema CRISPR-Cas9 de atingir sequências-alvo de forma altamente específica é atribuída a uma molécula de RNA, em contraste com outras técnicas de edição genômica que requerem proteínas projetadas para cada edição específica, tornando a menos complicada.[1]

Uma etapa crucial nesse processo é a inserção do gene corretivo em um vetor, que pode assumir diferentes formas, como plasmidial, nanoestruturado ou viral. Destes, os vetores virais são os mais prevalentes devido à sua alta eficácia em invadir células e entregar material genético com taxas de sucesso de até 90% in vitro. No entanto, os vetores virais apresentam algumas limitações significativas, incluindo preocupações relacionadas à mutagênese e imunogenicidade, bem como uma capacidade de empacotamento limitada, o que restringe a quantidade de material genético transportado. Além disso, enfrentam desafios consideráveis na produção e são associados a custos elevados. Apesar dessas limitações, a terapia genética oferece uma fonte renovada de esperança para pacientes enfrentando doenças genéticas graves. Ao superar as restrições dos tratamentos convencionais, a terapia

genética visa melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes afetados, promovendo avanços notáveis no campo da medicina molecular.[2, 3, 4]

O CRISPR-Cas9, conhecido como uma ferramenta revolucionária na edição genética, tem suas origens na descoberta do sistema imunológico adaptativo das bactérias contra invasões virais e de plasmídeos. Sua aplicação como uma ferramenta de edição gênica foi possibilitada pela pesquisa pioneira de Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier, marcando um avanço significativo na engenharia genética. Caracterizado por sua eficácia, precisão e custo acessível, o CRISPR-Cas9 tem sido amplamente adotado e sua popularidade cresce exponencialmente na comunidade científica. Embora a pesquisa sobre a aplicação terapêutica do CRISPR em células somáticas esteja em andamento, a edição genética da linhagem germinativa humana apresenta desafios éticos e práticos significativos. A capacidade de realizar alterações genéticas transmitidas para as gerações futuras levanta preocupações sobre segurança e responsabilidade, destacando a necessidade de um debate cuidadoso sobre os riscos e benefícios associados. Alguns cientistas argumentam que o surgimento do CRISPR-Cas9 marca uma nova era na história humana, onde os seres humanos assumem uma responsabilidade sem precedentes pelas mudanças genômicas e ambientais. No entanto, o uso potencial do CRISPR-Cas9 também levanta incertezas significativas em relação às implicações éticas e práticas. É fundamental promover estudos adicionais para ampliar o conhecimento técnico e abordar os desafios normativos associados à manipulação genética de embriões humanos, garantindo uma abordagem ética e responsável em sua aplicação.[5, 6]

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 O AVANÇO DA TERAPIA GÊNICA

A partir da década de 1940, a genética começou a ganhar destaque, levando a descobertas sobre o material genético e suas propriedades. Na década de 1960, surgiu a especulação sobre terapia gênica, utilizando vírus para transferir genes a humanos doentes, mas as tentativas iniciais falharam. Em 1989, um novo teste de terapia gênica foi realizado com sucesso em uma criança com uma doença genética chamada SCID-ADA, causada pela deficiência da enzima adenosina desaminase. As células T da paciente foram retiradas, o gene da ADA foi inserido nelas em laboratório e então reinseridas em seu sangue. Após o tratamento, houve melhora clínica e os

níveis de enzima no sangue aumentaram progressivamente. Embora haja questões técnicas a serem esclarecidas, esse estudo foi um marco na história da terapia gênica e inspirou pesquisas subsequentes.[7]

No âmbito das nucleases direcionadas e seu potencial para aplicação em modelos e organismos não-modelo, existem quatro principais mecanismos de edição de genoma específicos do local que têm contribuído significativamente para avanços tanto na área médica quanto na agrícola. Esses incluem meganucleases (MegNs), nucleases de dedo de zinco (ZFNs), nucleases efetoras tipo ativador de transcrição (TALENs) e os sistemas CRISPR. Embora já existam diferentes proteínas associadas ao CRISPR, como Cas12 e Cas13, que têm propriedades distintas de edição, no presente trabalho, o foco está exclusivamente no uso do sistema CRISPR/Cas9, amplamente utilizado devido à sua eficácia e precisão na edição de DNA.[8]

2.2 MEGANUCLEASES (MegNs)

As meganucleases (MegNs) são enzimas endonucleases encontradas naturalmente em diversas formas de vida microbiana, além de mitocôndrias e cloroplastos. Elas possuem alta especificidade de reconhecimento de sequência de DNA e são capazes de clivar o DNA em locais específicos, geralmente entre 14 a 40 pares de bases. MegNs facilitam a mobilidade lateral de elementos genéticos dentro dos organismos, processo conhecido como "homing". Essas enzimas têm sido usadas como modelos para projetar ferramentas de edição de genes com alta especificidade. Existem cinco famílias de MegNs, cada uma com diferentes motivos de sequência e estrutura: LAGLIDADG, GIY-YIG, HNH, His-Cys box e PD-(D/E)XK. A família mais estudada é a LAGLIDADG, encontrada em todos os reinos da vida, muitas vezes codificada dentro de introns ou inteins. Embora tenham várias aplicações promissoras, incluindo o desenvolvimento de terapias para doenças genéticas, a engenharia de MegNs personalizadas é complexa e altamente ineficiente, limitando suas aplicações rotineiras na edição do genoma. [9, 10]

2.3 NUCLEASES DE DEDO DE ZINCO (ZFNs)

As nucleases de dedo de zinco (ZFNs) foram as pioneiras na tecnologia de edição genômica, sendo enzimas de restrição artificialmente projetadas para editar o

genoma de forma específica. Cada dedo de zinco reconhece 3-4 bases de DNA, e as ZFNs são proteínas heterodiméricas compostas por domínios de dedo de zinco e um domínio de endonuclease Fok1 para induzir a quebra de fita dupla (DSB). Essas "tesouras genômicas" permitem a segmentação precisa do DNA em qualquer organismo. Embora promissores, os ZFNs têm limitações, como a especificidade dependente do contexto e a toxicidade às células devido a cortes fora do alvo. No entanto, eles continuam sendo uma ferramenta importante na edição genômica. [9, 11]

2.4 NUCLEASES EFETORAS TIPO ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO (TALENs)

As nucleases efetoras tipo ativador de transcrição (TALENs) surgiram como alternativas aos ZFNs e MegNs, oferecendo maior eficiência e capacidade de atingir regiões específicas do genoma. Os TALENs têm uma estrutura modular mais simples, com cada módulo reconhecendo apenas um nucleotídeo em sua sequência de ligação ao DNA, tornando-os mais específicos e eficientes na indução de quebras de DNA. Eles são amplamente utilizados na edição do genoma de diversas espécies, mas enfrentam desafios como tamanho e complexidade, dificultando sua adoção por pesquisadores menos familiarizados com biologia molecular. A descoberta do código modular de reconhecimento de DNA por TALENs oferece uma nova abordagem promissora para direcionar locais específicos no genoma.[11]

2.5 CRISPR-CAS9

O sistema CRISPR/Cas9, composto por repetições curtas palindrômicas regularmente agrupadas e interespaçadas (CRISPR) e genes associados (Cas), revolucionou a edição do genoma. Originalmente um mecanismo de defesa bacteriana contra elementos genéticos invasores, este sistema foi adaptado para a edição genômica em diversos organismos, incluindo humanos. O tipo II, envolvendo a endonuclease Cas9, é o mais estudado e utilizado.[12]

A edição genética com CRISPR/Cas9 ocorre através da criação de quebras de fita dupla no DNA, reparadas por mecanismos celulares como a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ou reparo dirigido por homologia (HDR). Esta tecnologia é destacada pela sua facilidade e rapidez no design de nucleases guiadas por RNA, comparada a métodos anteriores, como nucleases de dedos de zinco.[12]

2.6 TRATAMENTOS COM CRISPR

2.6.1 Câncer

O câncer, tratado tradicionalmente com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, frequentemente apresenta efeitos colaterais graves. A evolução do câncer envolve expressão anormal de genes como P53 e PD-L1, e alterações no microambiente tumoral. A utilização de nanopartículas para entrega direcionada de medicamentos genéticos permite silenciar ou superexpressar genes aberrantes com CRISPR. Por exemplo, nanopartículas de ouro carregadas com CRISPR/Cas9 foram usadas para silenciar o gene HSP90α em células tumorais, reduzindo a tolerância ao calor e facilitando a destruição do tumor por terapia fototérmica.[13]

Linfócitos T desempenham um papel crucial na imunoterapia do câncer. Terapias como TCR-T e CAR-T, que utilizam CRISPR para modificar células T e atacar células tumorais, mostraram eficácia em ensaios clínicos. Ambas as terapias são eficazes, mas a CAR-T enfrenta desafios no tratamento de tumores sólidos. Outras características das células tumorais, como receptores de superfície, também são alvos potenciais para novas terapias direcionadas.[13]

2.6.2 Doenças Hepáticas

O fígado metaboliza lipídios e as nanopartículas lipídicas, sem modificações especiais, tendem a se acumular nele. Exossomos derivados de hepatócitos são usados para entrega de terapias genéticas, apresentando menor risco de eliminação pelo sistema imunológico. A encapsulação do sistema CRISPR-dCas9-VP64 em exossomos mostrou eficácia na ativação do fator nuclear hepatocitário 4α (HNF4α), reduzindo a fibrose hepática.[13]

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença hepática recessiva causada pela deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). A edição de bases única para converter pares de bases C-G para T-A restaurou a expressão de PAH em modelos de camundongos, mostrando a eficácia dessa abordagem para tratamento da PKU.

O vírus da hepatite B (HBV) é um grave problema de saúde. Tratamentos prolongados com interferon podem levar a resistência viral e não eliminam o DNA circular fechado covalentemente (cccDNA) do HBV. A destruição do cccDNA usando

Cas9 tem sido eficaz, e nanopartículas bioativas responsivas à luz infravermelha foram projetadas para entregar CRISPR/Cas9 a células infectadas por HBV, inativando efetivamente o cccDNA.[13]

2.6.3 Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, hipertrofia miocárdica, infarto do miocárdio e dissecção da aorta, são uma das principais causas de morte globalmente. A entrega de nanopartículas em áreas afetadas é desafiadora devido à alta velocidade do fluxo sanguíneo e pressão arterial elevada. Durante o desenvolvimento fetal, cardiomiócitos proliferam rapidamente, mas essa capacidade diminui com a idade. Restaurar a expressão de genes relacionados à proliferação de cardiomiócitos, como Mef2d e Klf15, pode auxiliar no tratamento de doenças cardíacas. Foi desenvolvido um sistema de ativação de expressão específico para cardiomiócitos usando um camundongo transgênico dCas9/VPR inserido no promotor Myh6, com a entrega de sgRNA via AAV9 ativando genes de proliferação miocárdica.[13]

3 CONCLUSÃO

Desde os primeiros experimentos com terapia gênica na década de 1960, houve um progresso notável na capacidade de editar o genoma humano. O sistema CRISPR/Cas9 revolucionou a área ao permitir edições genéticas precisas e eficientes, superando as limitações das tecnologias anteriores, como meganucleases, ZFNs e TALENs. Esse avanço não só viabilizou tratamentos para uma variedade de doenças genéticas, como câncer, doenças hepáticas e cardiovasculares, mas também melhorou as técnicas de diagnóstico, como a detecção de SARS-CoV-2.

Embora o CRISPR/Cas9 tenha mostrado resultados promissores e proporcionado novas oportunidades terapêuticas, ainda existem desafios técnicos e éticos a serem enfrentados. A inovação contínua e o refinamento das tecnologias de edição genética são essenciais para maximizar seu potencial e garantir tratamentos seguros e eficazes. Assim, a terapia gênica permanece uma fronteira empolgante da medicina moderna, com a capacidade de transformar significativamente o tratamento de doenças genéticas.

REFERÊNCIAS

1. Gaj Thomas, Gersbach Charles, Barbas Carlos. ZFN, TALEN, and CRISPR/CAS – based methods for genome ngineering. Trends Biotechnol [Internet]. 2013 [cited 2024 May 8]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23664777/.

2. Silva Adriana. Edição genética: Técnica CRISPR/CAS9. Unipac [Internet]. 2020 [cited 2024 Apr 10]. Available from: https://ri.unipac.br/repositorio/wpcontent/uploads/tainacanitems/282/206099/ADRIANA-SEQUETO-SILVAEDICAO-GENETICAtecnica-CRISPRCAS9-BIOMEDICINA-2020.pdf.

3. Hupffer Haide, Berwig Juliane. A tecnologia CRISPR-CAS9: da sua compreensão aos desafios éticos, jurídicos e de governança. Pensar [Internet]. 2020 [cited 2024 Apr 10]. Available from: https://ojs.unifor.br/rpen/article/download/9722/pdf/43111.

4. Bernardes Vinicius, Rodrigues Gabriele, Cabral Mara, et al. A utilização da técnica de CRISPR-CAS9 na terapia gênica. Research, Society and Development [Internet]. 2021 [cited 2024 Apr 11]. Available from: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/21778/19358.

5. Charpentier Emmanuelle, Doudna Jennifer, Hauer Michael, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science [Internet].2012 [cited 2024 May 08];337(6096):816-821. Available from: https://www.science.org/doi/10.1126/science.1225829

6. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park S-W, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. Nature. 2017; [cited 2024 May 08] 548(7668):413-419. Available from: https://doi.org/10.1038/nature23305.

7. Linden Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. Scielo [Internet]. 2010 [cited 2024 May 8]. Available from: https://www.scielo.br/j/ea/a/nmhVC8mrYSr9v68gRYRsPBS/.

8. Kansal R. The CRISPR-Cas system and clinical applications of CRISPR-based gene editing in hematology with a focus on inherited germline predisposition to hematologic malignancies. Genes. 2024;15(7):863. [cited 2024 May 8]. Avaiable from: https://doi.org/10.3390/genes15070863.

9. Khalil Ahmad. The genome editing revolution: review. J Genet Eng Biotechnol [Internet] 2020 [cited 2024 May 7]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33123803/.

10. Silva George, Poirot Laurent, Galetto Roman, et al. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. Curr Gene Ther [Internet]. 2011 [cited 2024 May 8]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21182466/.

11. D. Carroll. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. Gene Ther [Internet]. 2008 [cited 2024 May 8]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18784746/.

12. Savic Natasa, Schwank Gerald. Advances in therapeutic CRISPR/CAS9 genome editing. Translational Research [Internet]. 2015 [cited 2024 Sep 1]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26470680/.

13. Li Tianxiang, Yang Yanyan, Qi Hongzhao, et al. CRISPR/CAS9 therapeutics: progress and prospects. Signal Transduct Target Ther [Internet]. 2023 [cited 2024 Sep 1]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36646687/.