

TÉCNICA CRISPR-CAS9 E SUA UTILIZAÇÃO NA ÁREA LABORATORIAL

CRISPR-CAS9's TECHNICAL AND ITS USE IN THE LABORATORY AREA

GISDENILTON CARLOS GONZAGA CAETANO¹, HIGOR DE OLIVEIRA SANTOS MATOS¹, PALOMA CAROLINE RAMOS SIMÃO¹, RAYANNE VINDILINO DUARTE¹, SABRINA ANTUNES BARRETO¹, IVAN SALES HENRIQUES^{2*}

1. Acadêmicos(as) do curso de graduação do curso de Biomedicina da Universidade Única; 2. Professor do curso de Biomedicina da Universidade Única.

Rua Dom Pedro 1, Número 68, Apartamento 302, Cidade nobre, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. CEP 35162398 jsaleshenriques@gmail.com

Recebido em 30/10/2018. Aceito para publicação em 22/11/2018

RESUMO

O conceito de modificação genética, muito discutido e de muito interesse na área laboratorial e da pesquisa aborda até então técnicas de alto custo que inviabilizam sua aplicação na rotina diária de um laboratório. Acredita-se que a técnica de CRISPR, descoberta através de alguns estudos com bactérias e arqueobactéria, possa ser utilizada em atividades laboratoriais, pois se trata de uma técnica mais simples e de menor custo. Seu funcionamento fornece uma maneira de cortar e editar com precisão uma sequência de DNA através de deleção ou substituição de bases. O sistema CRISPR está associado a algumas enzimas denominadas Cas. Essas são responsáveis por cortar o DNA com uma precisão nunca observada antes pelos pesquisadores. O que ainda limita o avanço com os estudos e uso da técnica são as questões éticas envolvidas em relação ao seu uso na edição gênica.

PALAVRAS-CHAVE: Sistemas CRISPR-Cas, Edição de Genes, Endonucleases, DNA Helicases.

ABSTRACT

The concept of genetic modifications has been discussed by researchers and had always been used very expensive techniques that can't be applied in the daily routine of a laboratory. Through some research about bacteria and archeobacteria, it is believed that the CRISPR can be used in laboratory activities due it's been a simple method with a low price. Its operation allow cutting and editing with high precision a sequence of DNA using base's deletion or allocation. The CRISPR's system is associated with some enzymes calls Cas. This enzyme is responsible to cut the DNA with a precision that never has been saw before by the researchers. What is bounding the advancement of the research and it use has been the ethical matters that involve the use in genetic modification.

KEYWORDS: CRISPR-Cas Systems, Gene Editing, Endonucleases, DNA Helicases

1. INTRODUÇÃO

Estudos recentes apontam para uma nova técnica de edição de genomas, CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) do termo em inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*. Esse método mostrou-se uma

ferramenta muito eficiente para a edição do genoma¹.

Esta técnica foi descrita pela primeira vez em meados dos anos 80 pela professora Emmanuelle Charpentier, da Hannover Medical School, na Alemanha, e por sua colega de trabalho Jennifer Doudna, da universidade de Berkeley na Califórnia, que foi a co-descobridora do processo de edição genética. Porém apenas em 2013, Feng Zhang do MIT e do Broad Institute, conseguiu fazer com que CRISPR trabalhe-se em células humanas, e com isso recebeu a primeira patente norte americana sobre a técnica. Isto demonstrou que o CRISPR é uma técnica que tem um potencial muito grande a ser explorado, devido a ser um método muito preciso, eficiente e possui um custo relativamente menor em comparação as outras técnicas².

Nesta técnica os locais de atuação consistem basicamente em várias repetições diretas, separadas por extensões de sequências variadas, chamadas de espaçadores, que correspondem principalmente ao seguimento de sequências virais e plasmídicas frequentemente adjacentes a genes Cas, os quais podem codificar uma família de proteínas que apresentam domínios funcionais típicos de nucleases, helicases, polimerases e proteínas de ligação a polinucleotídeos. Estas proteínas atuam no processo e são as responsáveis pela precisão do método¹.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão sistemática sobre as estratégias utilizadas para o sistema CRISPR/Cas9 para a biologia molecular. As bases de dados usadas na seleção dos artigos foram: LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde, SCIELO - Scientific Electronic Library on-line, MEDLINE - Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line, BVS - Biblioteca Virtual em Saúde, Science Direct, PubMed - National Library of Medicine. Para a busca dos artigos foram utilizadas palavras-chaves em português, espanhol e inglês, selecionadas mediante consulta aos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme: sistemas CRISPR-Cas; Edições Genéticas, Endonucleases, Helicases. Incluíram-se estudos de casos completos publicados entre 2010 e 2017 em

periódicos nacionais e internacionais e que apresentaram informações sobre utilização do sistema CRISPR/Cas no âmbito da genética molecular.

3. DESENVOLVIMENTO

Descoberta da CRISPR

O sistema CRISPR, se tornou ao longo dos anos uma ferramenta promissora para a edição genética. Sua descoberta ocorreu na década de 80, onde pesquisadores perceberam que alguns genomas bacterianos se apresentavam com um padrão diferenciado. Nestes, uma sequência de DNA se repetia várias vezes, com sequências únicas entre as repetições, e estas combinavam com os DNA virais².

As pesquisadoras, Emmanuelle Charpentier (professora da Hannover Medical School, na Alemanha) e sua colega de trabalho Jennifer Doudna (professora na Universidade de Berkeley na Califórnia). Iniciaram um projeto de pesquisa básico, destinado a desvendar como as bactérias atacam as infecções virais. Observaram que as bactérias possuem um sistema imunológico adaptativo, chamado CRISPR que lhes permite detectar o DNA viral e destruí-lo. Junto a esse sistema foi descoberta uma proteína denominada Cas9, capaz de procurar, clivar e degradar o DNA do vírus. Essa proteína é encontrada na *Streptococcus Pyogenes*, uma bactéria conhecida por causar infecção na garganta. E através do estudo dessa proteína, Cas9, perceberam que poderiam usá-la como ferramenta para edição de genomas. Porém, apenas em 2013, Feng Zhang do MIT e do BroadInstitute, conseguiu fazer com que CRISPR trabalhe-se em células humanas, e com isso recebeu a primeira patente norte americana sobre a técnica¹.

Apesar de a técnica ser promissora, ainda se encontra em processo de estudo. A equipe de pesquisadores, tanto de Doudna quanto de Feng Zhang, mantém sigilo sobre suas pesquisas. É um marco na história, pois CRISPR pode levar a descoberta de tratamentos e até mesmo a cura de doenças genéticas. No entanto, apesar da técnica trazer benefícios ela envolve assuntos éticos e morais, assim como a edição de genomas em fetos humanos (bebês projetados). Portanto, o assunto encontrasse ainda em discussão na comunidade científica⁴.

Enzima CAS9 na técnica CRISPR

Cas9 é uma enzima que possui dois domínios de nucleases, sendo que cada um destes é responsável por clivar uma das fitas do DNA detectado pelo sistema CRISPR-Cas. Com o auxílio dessa enzima é possível gerar mutação em um dos domínios para inativá-lo e produzir proteínas que clivem somente uma das fitas de DNA. Nesse caso a enzima funciona como uma helicase⁵.

Cas9 possui um domínio chamado HNH o qual possui a função de clivar a fita complementar a sequência do RNA guia (sequência alvo), e um domínio RuvC, necessário para clivar a fita não complementar, a sequência não alvo. Esses dois domínios serão

responsáveis pela clivagem da cadeia dupla do DNA alvo. Cas9 possui uma região rica em arginina, altamente conservada, como função mediar a ligação de ácidos nucleicos¹.

Funcionamento Do Sistema CRISPR/CAS9

O sistema CRISPR/Cas9 tem como base o mecanismo de defesa bacteriano contra o vírus invasor, que ao detectar um DNA viral já conhecido, produz duas fitas de RNAs curtos, onde uma delas terá a sequência correspondente a do vírus invasor (Figura 1). CRISPR/Cas9 depende de sistemas endógenos de reparo e recombinação para completar o processo de clivagem, como introns de auto-emenda, nucleases de dedo de zinco e nucleases efetoras⁶.

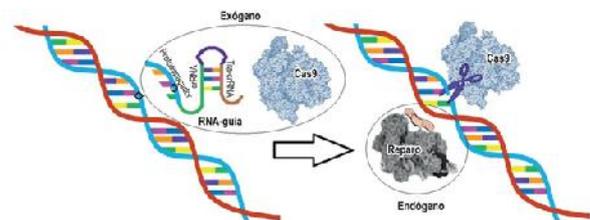


Figura 1: Sistema CRISPR/Cas9 - mecanismo de reconhecimento do alvo. **Fonte:** AREND *et al.*, 2017

O sistema CRISPR/Cas9 atua quando um bacteriófago invade, mas não destrói a célula bacteriana, onde parte de seu DNA possa ser inserido no genoma do hospedeiro, sendo intercalado com sequências repetidas⁷.

As endonucleases Cas1 e Cas2 formam um complexo que promove a clivagem de uma porção do DNA viral, e estes fragmentos são direcionados e introduzidos no genoma bacteriano. Durante a transcrição este fragmento de DNA origina um RNA mensageiro ao qual várias moléculas de tracrRNA (trans ativador RNA) se ligam. Esta ligação auxilia a clivagem do RNA mensageiro originando fragmento de crRNA (RNA CRISPR), este complexo tracrRNA e crRNA se associa a endonuclease Cas9 a qual é responsável por promover a clivagem de um DNA invasor⁸.

O complexo de tracrRNA e crRNA é responsável por direcionar a Cas9 até o DNA invasor. Ao se ligarem a sequência complementar presente no DNA viral e reconhecer o domínio PAM (protospaceradjacentmotif), a endonuclease Cas9, cliva a dupla fita e desta forma impossibilita a progressão da infecção. Esse processo representa importante mecanismo do sistema imune existente em bactérias⁹.

O crRNA foi projetado como um RNA guia único (sgRNA) com duas características, a sequência de 20 nucleotídeos na extremidade 5' do sgRNA que determina o local alvo do DNA pelo pareamento Watson-Crick, e estrutura de cadeia dupla no lado 3' da sequência que se liga a Cas9. Isso criou um sistema simples de dois componentes, no qual alterações na sequência guia do sgRNA podem ser usadas para programar CRISPR-Cas9 para atingir sequência do DNA de interesse, desde que seja adjacente a um PAM.

Na ausência da PAM o DNA alvo não é reconhecido pela Cas9 mesmo que a sequência de nucleotídeos do sgRNA seja totalmente complementar³.

A imunidade adaptativa ocorre em três estágios sendo a inserção de uma sequência curta do DNA invasor como uma sequência espaçadora, a transcrição do precursor crRNA que sofre maturação para gerar crRNAs individuais, cada um composto por uma porção de repetição, e a porção espaçadora de ataque invasor e clivagem dirigida por crRNA de ácido nucléico por enzimas CAS em locais complementares à sequência espaçadora de crRNA¹⁰.

Existem três tipos de sistemas CRISPR/Cas (I, II e III) que usam mecanismos moleculares distintos para obter reconhecimento e clivagem de ácido nucléico. O PAM desempenha um papel essencial nas etapas de adaptação e interferência nos sistemas tipo I e tipo II¹¹.

Os sistemas tipo I e III são muito semelhantes, sendo que suas interferências envolvem o direcionamento orientado por crRNA (complexo de proteínas ribonucléicas) e usam um grande complexo de proteínas Cas. No entanto o tipo II é mais específico para um crRNA duplo adicional, chamado tracrRNA formando um complexo de DNA que requer apenas uma única proteína para reconhecimento e clivagem de DNA guiado por RNA².

Após elucidado o mecanismo pelo qual o sistema CRISPR/Cas9 atua em procariotos, pesquisadores viram nesse sistema um alto potencial para ser empregado na edição e manipulação gênica. Devido ao fato dos eucariotos não possuírem a maquinaria necessária para ligação do tracrRNA e crRNA, um gRNA (RNA guia) foi desenvolvido e direcionado para uma sequência alvo específica e então este é inserido na célula alvo juntamente com a Cas9. Desta forma, o gRNA realiza o reconhecimento da sequência presente no DNA alvo e permite que a cas9 clive o sítio de interesse, possibilitando a inserção da sequência desejada através de recombinação homóloga⁵.

Para se realizar o knockout (inativação) de um gene a técnica fica ainda mais simples dispensando a necessidade de um DNA doador, mas envolvendo apenas a atuação do sistema CRISPR/ Cas9, podendo realizar a clivagem em um sítio específico ou em mais regiões contando que haja complementaridade com RNA guia. A inserção aleatória de mutações no DNA em decorrência da maquinaria de reparação após a clivagem da CRISPR/ Cas9 altera a matriz de leitura do gene e consequentemente sua transcrição⁸.

4. DISCUSSÃO

Aplicações na área laboratorial

Devido a várias funções da técnica CRISPR/Cas9, é possível alterar a informação genética de diversas espécies. Tal alteração inclui a capacidade de corrigir mutações genéticas responsáveis por doenças hereditárias. A edição de genes tornou o campo muito acelerado, no qual laboratórios em todo mundo usaram CRISPR/Cas9 para editar genomas de uma ampla gama

de tipos de células e organismos, já que muitas das doenças que acometem seres humanos são de origem genética, e algumas atribuídas à ocorrência de mutação única no genoma. Por estes motivos, CRISPR/Cas9 passou a ser encarada como um método capaz de promover o reparo de um gene mutado, causador de uma doença, eliminando a mutação no genoma e impedindo a transmissão da doença às próximas gerações⁴.

De acordo com os estudos realizados, a técnica de CRISPR/ Cas9 poderá ser usada na área laboratorial para fazer alterações precisas nos genes de organismos como moscas de frutas, peixes, ratos, plantas e células humanas. Outra possibilidade é reverter os sintomas da doença em um animal vivo. A técnica de CRISPR permite modificar genes específicos, sem alterar outros. Além de tratar doenças hereditárias, a CRISPR pode ser utilizada no domínio das doenças infecciosas, possivelmente fornecendo uma forma de produzir antibióticos mais específicos¹².

Vantagens da técnica

A ferramenta mostrou-se muito promissora para uso em humanos, pois através dessa técnica podem ser introduzidas mudanças no genoma para curar mutações genéticas responsáveis por diversas doenças, tais como imunodeficiências, hemoglobinopatias, fibrose cística entre outras. Outra provável aplicação da técnica será no combate a infecção causada por vírus que permanecem latentes no organismo ou que se integram ao DNA do hospedeiro⁵.

As vantagens do sistema CRISPR/Cas9 estão relacionadas com a alta versatilidade, eficácia, especificidade e a facilidade de uso da técnica, onde essa proporciona uma oportunidade única para realizar a aplicação da mesma em terapia de células humanas, sendo possível fazer a correção de defeitos em células progenitoras, doenças genéticas e vários outros tratamentos. Esse sistema tem se mostrado bastante eficaz na eliminação dos vírus de células infectadas, tumores, e em tratamentos de doenças monogênicas hereditárias².

Outras vantagens podem ser observadas no fato que após induzir uma quebra de cadeia dupla (DBS), a proteína Cas9 se mantém inalterada. De certo modo essa facilidade de manipular o CRISPR/Cas9 demonstrou uma grande vantagem na produção de vetores para atingir locais alvo ou mesmo genomas extensos. Esse sistema ainda pode ser capaz de modificar múltiplos locais genômicos simultaneamente, ou seja, utilizar vários RNAs guia em paralelo dentro de uma mesma célula³.

A simplicidade do CRISPR/Cas9, juntamente com um exclusivo mecanismo de clivagem de DNA, a capacidade de reconhecimento de alvos multiplexados e a existência de muitas variantes do sistema CRISPR-Cas9 tipo II, permite o desenvolvimento de notáveis avanços usando esta técnica econômica e de fácil utilização. Tornando possível utilização desta tecnologia para direcionar, editar, modificar, regular e marcar de maneira precisa e eficiente os locos genômicos de uma

ampla variedade de células e organismos³.

Desvantagens da técnica

Diante dos estudos anteriores, pesquisadores já haviam previsto a possibilidade de que a técnica CRISPR/Cas acabasse atacando, por acaso, trechos de DNA fora da sequência alvo. Por isso, a maioria usa algoritmos de computador para varrer toda a extensão do material genético que está sendo submetido aos testes e identificar trechos incorretos que vão acabar danificados ou “deletados” por acidente após a intervenção¹².

Pesquisadores das universidades de Stanford e Iowa relataram que diante de um teste conseguiram corrigir um gene responsável pela cegueira em ratos, porém, vieram mutações acidentais em nucleotídeos únicos (que contém uma única base nitrogenada) e exclusões ou inserções de maior porte, envolvendo trechos com mais de uma letra¹³.

Outro risco inesperado da técnica de edição de DNA é a mutação, na sua maioria ocorrem em regiões não codificantes, ou seja, fora do alvo desejado. Sendo assim gera preocupação com a terapia gênica, relacionada a sua aplicabilidade terapêutica¹⁴.

4 CONCLUSÃO

O sistema CRISPR/Cas9 sem dúvida é uma grande descoberta para área genética. As possibilidades da sua utilização fazem com que desperte grande interesse de pesquisadores e cientistas. Devido a sua facilidade de manuseamento e o baixo custo, a técnica está se tornando muito promissora em todos os campos que englobam a ciência, seja em áreas laboratoriais ou até mesmo na agricultura. Por se tratar de uma técnica mais simples e prática, necessita de mais estudos à fim de avaliar com maior precisão e rigor a sua veracidade e riscos – como possíveis erros capazes de gerarem mutações genéticas. Outra questão muito importante é o fato da técnica envolver conceitos éticos e morais uma vez que pode ser usada para determinar, ou alterar características em fetos humanos. Portanto, o tema se encontra em discussão na comunidade científica, onde há diversos grupos de pesquisas interessados na utilização da técnica de CRISPR para o tratamento e cura de várias doenças congênitas. Existe, portanto a perspectiva de que através de CRISPR o que antes era considerado oneroso e dispendioso na área laboratorial no que se refere à edição de genomas, tratamento e cura de doenças genéticas, se torne mais acessível.

REFERÊNCIAS

- [1] Oliveira TC. Metodologias para a geração de mutantes funcionais em *Metarhiziumanisopliae*: CRISPR/Cas9e RNAi; Programa de pos graduação em Biologia celular e molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2016.
- [2] Santos SLF, Alves HHS, Prado RMS, Barros KBNT. CRISPR uma nova era na Biologia molecular; Revista Biotecnologia & Ciência. 2016; 5(2):40-48.
- [3] Doudna JÁ, Charpentier E. The new frontier of genome

engineering with CRISPR-Cas9. Science . 2014; 3469(213). DOI: 10.1126/science.1258096.

- [4] [Bergel S. Darío; O impacto ético das novas tecnologias de edição genética. Rev. bioét. (Impr.). 2017; 25(3):454-61.
- [5] Castrignano SB. Enzimas em biologia molecular. III. Tecnologia CRISPR-Cas9. Núcleo de Doenças Respiratórias - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz. BollInst Adolfo Lutz. 2017; 27(U): art.3.
- [6] Augusta GR, Gonçalves R de MAP. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil. DOI: 10.1590/S1679-45082017RB4024. Einstein. 2017; 15(3):369-75.
- [7] Arend MC, Jessica OP, Melissa MM. O Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia. ArqBrasCardiol. 2017; 108(1):81-83.
- [8] Rufino AD. Ramos. CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 5 de julho 2016 [Acesso em 28 de set. 2018]. Disponível em <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/42065/1/MO-NO-DAVID.pdf> Coimbra.
- [9] Guimarães M. Uma ferramenta para editar o DNA. Pesquisa FAPESP 240. FEVEREIRO DE 2016 [Acesso em 14/07/2018]. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/02/19/uma-ferramenta-para-editar-o-dna/>
- [10] Makarova KSDH, Haft R, Barrangou SJ, Brouns E, Charpentier P, Horvath S, Moineau FJ, Mojica YI, Wolf AF, Yakunin J, van der Oost, E, V. Koonin, Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat. Rev. Microbiol. 2011; 9:467–477. 10.1038/nrmicro2577pmid:2155286doi: 10.1038/nrmicro2577.
- [11] Shah S. A., S. Erdmann, F. J. M. Mojica, R. A. Garrett, Protospacer recognition motifs: Mixed identities and functional diversity. RNA Biol. 2013; 10:891-899. 10.4161/rna.23764pmid:23403393doi:10.4161/rna.23764 [Acesso dia 28 de out. 2018] Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/rna.23764>.
- [12] Tonelli FCP, Resende RR. CRISPR: a técnica de engenharia genética que pode mudar o mundo! 2016. 3(7). DOI: [Acesso em 01 de out. 2018]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2016.02.26.002>
- [13] Schafer Kellie A, WenHsuan Wu, Colgan Diana; CRISPR gene editing can cause hundreds of unintended mutations; CRISPR-Cas9 editing in vivo, Nature Methods. [Acesso em 20 de out. 2018]. Disponível em: <https://phys.org/news/2017-05-crispr-gene-hundreds-unintendedmutations.html>.
- [14] Listik, E, Carmo ACV. AS Características dos mecanismos e sistemas de edição genômica. Centro de Pós-Graduação Oswaldo Cruz. 2017.