

Uma ferramenta para editar o

DNA

Sistema copiado de bactérias, CRISPR-Cas9 pode catalisar descobertas em biologia e medicina e suscita temores éticos

Maria Guimarães

Um sistema que permite a bactérias reconhecer e combater invasões virais promete uma novidade significativa na genética. Trata-se de uma proteína guiada por uma molécula de RNA que corta as fitas de DNA em pontos específicos e ativa vias de reparo. No Brasil, vários pesquisadores já se preparam para incorporar às suas linhas de pesquisa a técnica criada em 2012. É uma história que está no início e por enquanto rendeu poucos resultados palpáveis. Vale a pena ficar de olho, tanto pelo que o sistema tem de promissor quanto pelo potencial de alterar genes humanos e produzir bebês sob medida, o que suscita cautela a ponto de se discutir uma moratória ao seu uso.

“É um grande equalizador, até nós conseguimos fazer”, brinca o médico José Xavier Neto, do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas, sobre o sistema que ficou conhecido como CRISPR-Cas9. A sigla significa



Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas, que funciona com uma proteína associada, a Cas. A CRISPR-Cas9 pode ser inserida em células usando vírus ou por meio de injeções de DNA nas fases iniciais de um embrião. Uma molécula de RNA sintetizada especialmente serve de guia para atingir o gene que se pretende alterar (*ver infográfico ao lado*). São procedimentos ao alcance da maior parte dos laboratórios de genética, o que confere autonomia aos pesquisadores.

No laboratório de Xavier tudo começou com Ângela Saito, que à época fazia doutorado sob orientação do biólogo Jörg Kobarg, na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), e precisava produzir um roedor com deficiência na produção de uma determinada proteína (nocaute) para estudar seu papel na leucemia. Nas bancadas de Xavier, ela começou o tedioso processo tradicional, em que é preciso gerar e rastrear as



manipulações genéticas em centenas de clones de células-tronco embrionárias. Para aprender a fazer esse trabalho de escala quase industrial ela foi, ainda durante o doutorado, ao Centro de Câncer MD Anderson da Universidade do Texas, onde acabou aprendendo a nova técnica com o geneticista norte-americano Richard Behringer. Voltou ao laboratório paulista trazendo na bagagem os vetores que injetaria nos embriões de camundongos para produzir os nocautes que necessitava. Deu certo: Ângela ensinou os colegas e, em pouco mais de um ano, o laboratório já produziu nocautes para quatro genes diferentes.

COMBATE A DOENÇAS

O potencial da CRISPR-Cas9 na pesquisa de agentes causadores de doenças também atraiu os parasitologistas venezuelanos Noelia Lander e Miguel Chiurillo, interessados em estudar o parasita *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de



1 TESOURA EXATA

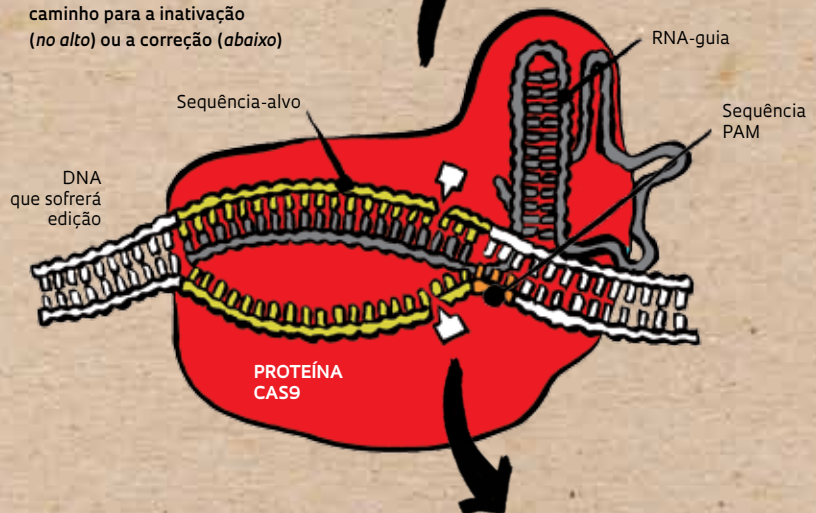
Usando como referência um trecho do DNA, o RNA-guia se liga à proteína Cas9, que faz o corte próximo à sequência PAM, abrindo caminho para a inativação (no alto) ou a correção (abaixo)

2 INATIVAÇÃO

Feito o corte, entra em ação o mecanismo natural de reparo, que pode alterar o gene a ponto de eliminar sua função



Pequenos trechos são deletados ou inseridos



3 CORREÇÃO

O acréscimo de fragmentos de tamanhos variados pode corrigir ou inserir genes

Mutação de ponto



Trecho doador

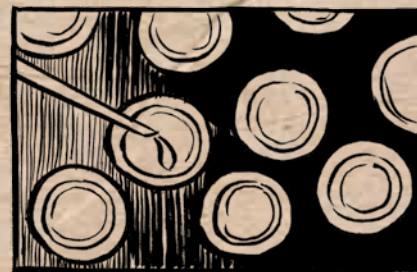


Chagas, e quem sabe contribuir para o desenvolvimento de terapias alternativas. Atualmente em estágio de pós-doutorado na Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp em colaboração com os bioquímicos Aníbal Vercesi e Roberto Docampo, argentino que é professor na Universidade da Geórgia, nos Estados Unidos, e atua como professor visitante na universidade do interior paulista, Noelia já mostrou que consegue alterar genes em artigo de 2015 na revista *mBio*. Ela avariou genes ligados ao flagelo dos parasitas – a estrutura semelhante a uma cauda que lhes permite locomover-se. “É um fenótipo muito fácil de enxergar, porque o flagelo se separa do corpo celular e o parasita fica depositado no fundo da garrafa”, explica. A prova de conceito é uma vitória porque os tripanossomos têm se mostrado muito eficazes em resistir a qualquer tentativa de manipulação genética. Agora, nos estudos com genes envolvidos na sinalização celular



Mutação do albinismo: para efeito homogêneo, é preciso injetar no início da fase embrionária

As aplicações são tantas que a possibilidade de editar genes humanos tem causado temores



por cálcio, vem a parte que pode ajudar no combate a essa doença que carece de tratamento eficaz na fase crônica. “Os níveis de cálcio mudam muito quando o parasita infecta o hospedeiro”, explica. “Se conseguirmos mexer nessas proteínas, que são diferentes entre o parasita e o hospedeiro vertebrado, pode ser o caminho para uma terapia alternativa.”

O combate à transmissão da dengue é o objetivo do biólogo Jayme de Souza-Neto, do *campus* de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (Unesp). No mosquito *Aedes aegypti*, ele comparou os RNAs transcritos de mosquitos infectados e resistentes ao vírus em populações naturais em Botucatu, interior paulista, e Neópolis, em Sergipe, e identificou genes que podem estar ligados à resistência. “Estamos começando a fazer as mutações nos genes dos mosquitos”, relata. Até julho, ele pretende ter no laboratório populações nas quais poderá verificar se a suscetibilidade ao vírus foi alterada. Ainda longe no horizonte, a ideia é produzir mosquitos resistentes, que por não serem infectados também não transmitem a doença aos seres humanos. O projeto tem avançado no âmbito da colaboração estabelecida entre a FAPESP, a Unesp e a Universidade de Keele, no Reino Unido (ver Pesquisa FAPESP n°

230). Souza-Neto passou três meses no laboratório de Julien Pelletier, que esteve em Botucatu por quatro meses. “Em abril ele deve voltar para começarmos as injeções nos embriões de mosquitos”, planeja o pesquisador.

A bióloga Natália Gonçalves está lidando com sujeitos maiores: cães da raça *golden retriever* usados como modelo para estudos da distrofia muscular de Duchenne, uma doença degenerativa que acaba impedindo os pacientes de andar e comer (ver Pesquisa FAPESP n° 237). Durante o doutorado ela estabeleceu linhagens de células reprogramadas (células-tronco de pluripotência induzida, ou iPSCs) a partir de células da pele dos cães. Agora, no estágio de pós-doutorado sob supervisão de Carlos Eduardo Ambrósio, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP), pretende estabelecer a linhagem com células de cães distróficos e corrigir o gene defeituoso para produção da proteína distrofina em parceria com o geneticista francês Jean-Paul Concordet, do Museu Nacional de História Natural, em Paris. “Já sabemos qual região do gene está faltando, então a ideia é produzir esse pedacinho e inseri-lo”, planeja. Ela tem muito trabalho pela frente: enquanto a técnica

para inativar genes com CRISPR-Cas9 já está razoavelmente dominada, o sucesso na inserção de trechos específicos ainda é baixo.

A geneticista Maria Rita Passos Bueno, do Instituto de Biociências da USP (IB-USP), também aposta na edição do DNA para estudar doenças humanas com a ajuda da pesquisadora Erika Kague, que aprendeu a técnica no final do estágio de pós-doutorado na Universidade da Pensilvânia, nos Estados Unidos. O doutorando Luciano Abreu Brito estabeleceu uma linhagem de peixe-paulistinha, o zebrafish (ver Pesquisa FAPESP n° 209), para estudar fissura de lábio palatino. “Encontramos a mutação por sequenciamento em pacientes, agora posso inserir no peixe para testar se é mesmo relevante para a doença”, conta. Em células humanas isoladas, a doutoranda Danielle Moreira inseriu mutações ligadas ao autismo. No futuro, ela pretende usar iPSCs que possam dar origem a neurônios, para verificar se as alterações genéticas identificadas em pacientes alteram o funcionamento de células nervosas.

Lygia da Veiga Pereira, geneticista do IB-USP, também está começando a alterar diretamente células humanas. Sua aluna de mestrado Juliana Sant’Ana es-

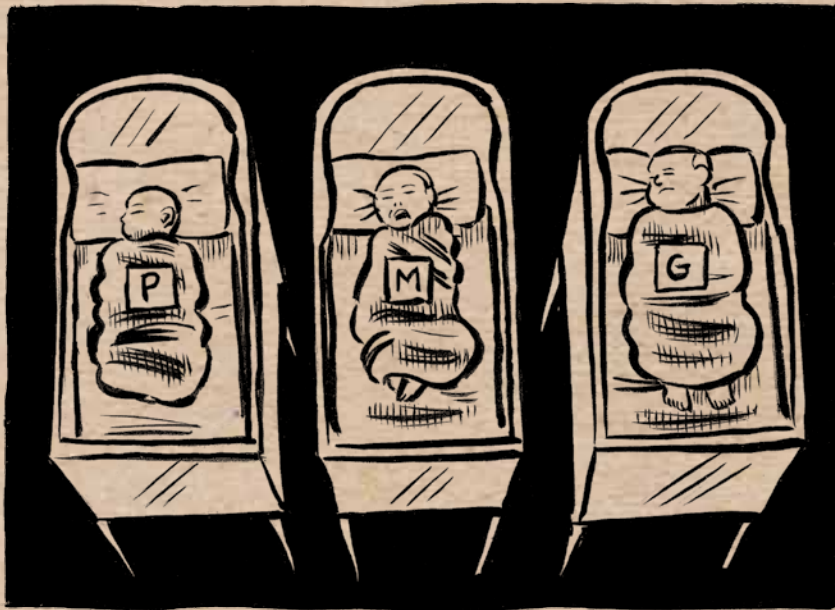


FOTO CAROLINA CLEMENTE / LNBIO ILUSTRAÇÃO CAETO

tá em contato com o geneticista Chad Cowan, da Universidade Harvard, nos Estados Unidos, para aprender como utilizar o CRISPR-Cas9. A ideia é provocar no gene da proteína fibrilina a mutação típica da síndrome de Marfan. Uma vez bem-sucedida em células de fácil cultivo, Lygia pretende passar à linhagem de células-tronco desenvolvida em seu laboratório, a BR-1 (ver Pesquisa FAPESP nº 153). “Quero produzir células cardíacas e células de osso com a mutação”, planeja. A facilidade de trabalhar com a CRISPR-Cas9 permite passar por essa fase com relativa rapidez e chegar ao que interessa: o estudo de como a doença se comporta em diferentes tecidos. “A ciência vai começar quando pudermos comparar essas células.”

ESTRUTURA PROTEICA

Maria Rita explica que o conhecimento sobre o sistema CRISPR-Cas9 está avançando rapidamente na busca por uma exatidão cada vez maior na edição. Uma das frentes agora exploradas por Jennifer Doudna, da Universidade da Califórnia em Berkeley, uma das protagonistas no desenvolvimento da técnica, é desvendar como a estrutura da proteína permite que ela se encaixe no DNA e o corte em um ponto específico, conforme mostra artigo publicado em janeiro na revista *Science*.

O bioquímico teuto-chileno Martin Würtele, da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), já se dedicava a desvendar a estrutura tridimensional dessas

proteínas antes mesmo da descoberta de Jennifer e sua colega francesa Emmanuelle Charpentier, do Instituto Max Planck de Biologia da Infecção, Alemanha, em 2012. “Começamos a trabalhar há uns cinco anos com diversas proteínas CRISPR-Cas por sua contribuição para a proteção das bactérias contra os seus principais inimigos naturais, os fagos, e pela possibilidade de se fazer edição no DNA”, conta. “Mas de lá pra cá descobriram a Cas9, que, ao contrário dos sistemas CRISPR-Cas com que trabalhamos, faz praticamente todo o processo com uma única proteína e é um candidato sério ao Prêmio Nobel.” Ele revelou que uma proteína chamada Csm2, retirada de uma bactéria, é formada por uma longa cadeia de aminoácidos em hélice, circundada por três hélices mais curtas. “A proteína Csm2 é completamente diferente das descritas em outros complexos”, conta Würtele. Para ele, essa proteína é parte de uma defesa importante da bactéria e o conhecimento de como funciona pode vir a ser usado contra as próprias bactérias. “Há um interesse muito grande de usar fagos como potenciais substitutos de antibióticos.”

As aplicações são tantas que a possibilidade de editar genes humanos gera temores. Por enquanto está garantida a continuidade das pesquisas, com a proposta de se proibir a implantação de embriões humanos alterados. Muitos pesquisadores revelam preocupação, mas José Xavier Neto não acredita em um risco real. “Os malefícios de se sobrepor

à evolução podem ser muito maiores que os benefícios”, alerta. “A possibilidade de efeitos *off target* [não previstos] pode fazer com que se atire no que se viu e acerte o que não se viu, produzindo bebês ‘programados’ para aparência ou desempenho, mas com leucemia ou problemas piores.” Contra isso existem mecanismos de controle como comitês de ética e, no Brasil, a Lei de Biossegurança, que proíbe a engenharia genética em embriões humanos. O Reino Unido decidiu: em 1º de fevereiro autorizou a edição de genes em células humanas no âmbito de pesquisa científica. ■

Projetos

1. Geração de camundongo nocaute para o receptor nuclear órfão Coup-TFII: Investigação dos mecanismos moleculares que determinam a expressão atrial-específica do promotor do gene *SMyHC3* (nº 2015/10166-9); **Modalidade** Bolsa no País – Pós-doutorado; **Pesquisador responsável** José Xavier Neto (CNPEM); **Bolsista** Ângela Saito (CNPEM); **Investimento** R\$ 169.558,00.
2. Sinalização por íons de cálcio em tripanossomatídeos (nº 2013/50624-0); **Modalidade** Auxílio à Pesquisa – Programa SPEC; **Pesquisador responsável** Roberto Docampo (Unicamp); **Investimento** R\$ 1.955.088,00.
3. Edição gênica por CRISPR-Cas9 na correção da Distrofia Muscular de Duchenne no modelo canino (GRMD) a partir de células de pluripotência induzidas (nº 2015/09575-1); **Modalidade** Bolsa no País – Pós-doutorado; **Pesquisador responsável** Carlos Eduardo Ambrósio (USP); **Bolsista** Natália Juliana Nardelli Gonçalves (USP); **Investimento** R\$ 169.558,00.
4. Caracterização dos mecanismos de ação antígeno mediados pela microbiota intestinal de populações naturais do mosquito *Aedes aegypti* (nº 2013/11343-6) **Modalidade** Auxílio à Pesquisa – Jovens Pesquisadores; **Pesquisador responsável** Jayme Augusto de Souza-Neto (Unesp); **Investimento** R\$ 2.209.619,50.
5. Geração de mutações no gene *FBN1* em Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (iPSCs) utilizando o sistema CRISPR-Cas9 (nº 2015/01339-7); **Modalidade** Bolsa no País – Mestrado / Capes; **Pesquisadora responsável** Lygia da Veiga Pereira Carramaschi (USP); **Bolsista** Juliana Borsoi Sant’Ana (USP); **Investimento** R\$ 38.823,80.
6. Análise genômica para a compreensão dos mecanismos genéticos etiológicos das fissuras labiopalatinas na população brasileira (nº 2011/23416-2); **Modalidade** Bolsa no País – Doutorado; **Pesquisadora responsável** Maria Rita dos Santos e Passos Bueno (USP); **Bolsista** Luciano Abreu Brito (USP); **Investimento** R\$ 146.770,80.
7. Biologia estrutural de proteínas processadoras de ácidos nucleicos em bactérias com elevada relevância biomédica (nº 2011/50963-4); **Modalidade** Auxílio à Pesquisa – Regular; **Pesquisador responsável** Martin Rodrigo Alejandro Würtele Alfonso (Unifesp); **Investimento** R\$ 496.766,00.

Artigos científicos

- JIANG, F. *et al.* Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*. on-line. 14 jan. 2016.
- LANDER, N. *et al.* CRISPR-Cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. *mBio*. v. 6, n. 4, e01012-15. jul-ago. 2015.
- GALLO, G. *et al.* Structural basis for dimer formation of the CRISPR-associated protein Csm2 of *Thermotoga maritima*. *FEBS Journal*. on-line. 10 dez. 2015.
- GALLO, G. *et al.* Purification, crystallization, crystallographic analysis and phasing of the CRISPR-associated protein Csm2 from *Thermotoga maritima*. *Structural Biology Communications*. F71, p. 1223-27. out. 2015.