

CAPA

# A TESOURA DOS GENES





## Testes em seres humanos avaliam segurança de técnica que corta e edita o DNA para tratar doenças

**Ricardo Zorzetto**

**C**onsiderada revolucionária, a técnica de edição de genes conhecida pela sigla CRISPR-Cas9 começa a tornar mais próxima da realidade a alteração ou substituição de genes para tratar ou evitar doenças. O resultado de seu primeiro uso em seres humanos foi descrito em setembro de 2019 em um artigo na revista *New England Journal of Medicine*. No trabalho, o imunologista Deng Hongkui e sua equipe na Universidade de Pequim, na China, relataram um teste pioneiro com um homem de 27 anos que tinha leucemia, câncer causado pela proliferação de células de defesa imaturas, e era portador de HIV, o vírus da Aids. Após controlar as enfermidades com medicamentos, em 2017, os pesquisadores submeteram o paciente a um tratamento inovador. Tanto a leucemia como a infecção por HIV afetam as mesmas células de defesa, os linfócitos, que atacam organismos invasores e células doentes. Como a solução envolvia restaurar a produção de linfócitos saudáveis, os médicos decidiram combater os dois problemas com um transplante especial. Retiraram células da medula óssea de um doador e, antes de transferi-las para o paciente, utilizaram a CRISPR para desativar o gene contendo a receita de uma proteína usada pelo HIV para invadir os linfócitos. Assim, esperavam res-

tabelecer a produção de células de defesa saudáveis e imunes ao vírus, como ocorreu em 2008 com Timothy Ray Brown, o chamado paciente de Berlim, após receber a medula de um doador que naturalmente não produzia a proteína.

O sucesso foi parcial. Os pesquisadores transplantaram uma mistura de células editadas e não editadas (não foi possível fazer a modificação em todas). Um ano e meio mais tarde, a leucemia permanecia em remissão e a nova medula continuava a produzir linfócitos saudáveis, embora só 5% deles apresentassem a alteração protetora. “O teste foi idealizado para avaliar a segurança e a viabilidade do transplante”, afirmou Deng por e-mail a *Pesquisa FAPESP*. A experiência funcionou como prova de princípio e indicou que é possível realizar o procedimento, aparentemente sem danos. Antes de avaliar a eficácia da estratégia para debelar a infecção por HIV, porém, será preciso aumentar a eficiência da edição e aprimorar o protocolo de transplante – o ideal é que todos os linfócitos se tornem imunes ao vírus. “Decidimos melhorar a técnica antes de tratar outros pacientes”, contou o imunologista.

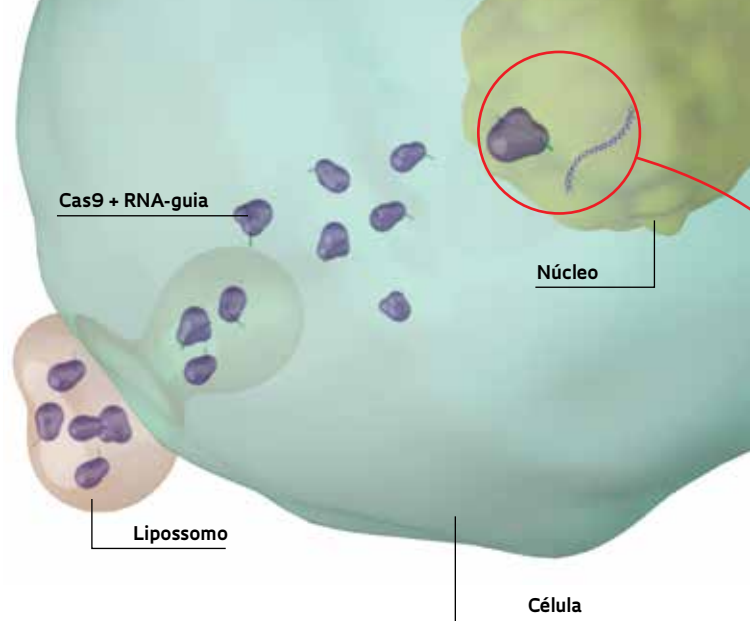
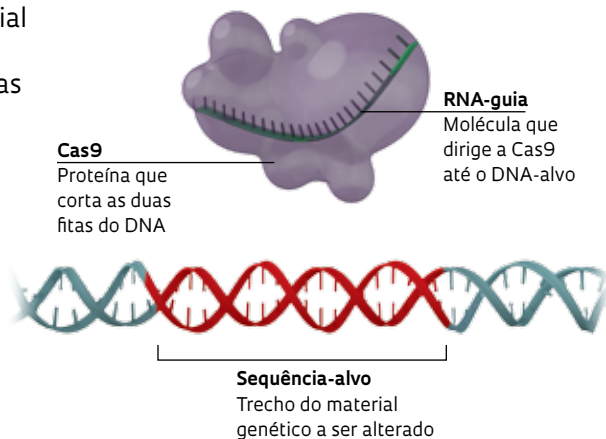
A CRISPR não é a primeira nem a única forma de modificar ou inativar genes testada em seres humanos. A ideia de que era possível cortar o material genético das células em pontos espe-

# CRISPR EM AÇÃO

Ferramenta molecular reconhece e corta região específica do material genético das células

## A CRISPR-Cas9

O sistema CRISPR-Cas9 é formado por uma molécula de RNA acoplada a uma proteína Cas, que funciona como tesoura molecular



## Transporte

Em laboratório, os pesquisadores desenham uma molécula de RNA capaz de reconhecer apenas o trecho do DNA a ser modificado. O RNA e a proteína Cas são introduzidos na célula por um sistema de transporte, que pode ser um vírus ou vesículas de gordura (lipossomo), e migram até o núcleo, onde está o material genético (DNA)

cíficos e alterá-lo – inserindo um gene novo ou desativando outro com ação indesejada – nasceu com a descoberta de um sistema de defesa de bactérias. Nos anos 1960, os pesquisadores norte-americanos Hamilton Smith e Daniel Nathans (1928-1999) e o suíço Werner Arber identificaram nesses organismos proteínas chamadas nucleases, que funcionam como tesouras moleculares e cortam em pontos específicos o material genético (DNA) de vírus invasores. A descoberta rendeu ao trio o Nobel de Medicina de 1978 e levou ao desenvolvimento de estratégias para modificar o DNA das células.

**D**uas técnicas propostas nos anos 1990 e 2000 se aproveitavam desse princípio: a edição com nucleases dedo de zinco (*zinc finger nucleases*, ou ZFN) e a com nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (*transcription activator-like effector nucleases*, a Talen). Ambas usam uma proteína artificial, formada da junção de duas outras: uma que reconhece o trecho do material genético e outra que o corta. Elas funcionam de modo preciso e estão sendo avaliadas em animais e seres humanos – há uma dúzia de ensaios clínicos com a ZFN e metade disso com a Talen (*ver reportagem na página 20*). Existe, porém, um entrave. Proteínas são moléculas grandes, complexas e difíceis de se produzir em laboratório. Outra complicação é que é preciso desenhar uma nova proteína para cada trecho-alvo do DNA.

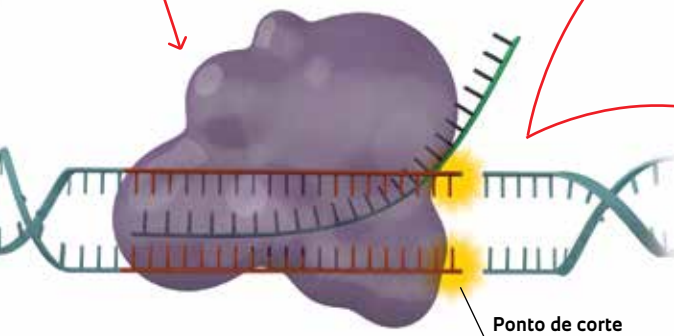
Aí a CRISPR leva vantagem. Ela também usa uma molécula híbrida, mas formada por uma proteína (a Cas) e um RNA, que é bem menor e mais simples de ser desenhado em laboratório (*ver infográfico acima*). Em 2012, a bioquímica norte-americana Jennifer Doudna, da Universidade da Califórnia em Berkeley, Estados Unidos, e a geneticista francesa Emmanuelle Charpentier, hoje no Instituto Max Planck, Alemanha, criaram uma versão simplificada do sistema CRISPR-Cas e mostraram que funcionava em testes com DNA. No ano seguinte, o bioquímico sino-americano Feng Zhang, do Instituto Broad, nos Estados Unidos, usou a estratégia para manipular o DNA de células humanas. Publicados na revista *Science*, esses resultados dispararam uma corrida mundial para dominar a técnica – e uma disputa por direitos de propriedade intelectual entre Berkeley e o Broad (*ver Pesquisa FAPESP nº 269*).

“Produzir sequências curtas de RNA em laboratório é banal e barato, o que torna a CRISPR mais versátil e acessível do que qualquer outra técnica de edição gênica”, afirma o geneticista Carlos Menck, da Universidade de São Paulo (USP). Em parceria com a pesquisadora Clarissa Rocha, da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), ele usa a CRISPR para identificar genes que tornam as células tumorais resistentes aos medicamentos.

Por causa da facilidade e da versatilidade, em pouco tempo pesquisadores no mundo todo passaram a testar a CRISPR em plantas e animais com os mais variados objetivos, de aprimorar a pro-

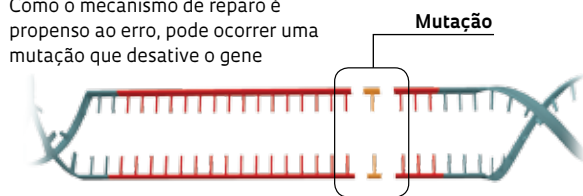
## Localização e corte

No núcleo, quando o RNA-guia identifica o trecho-alvo do material genético, a Cas9 desenrola a molécula de DNA e faz um corte em um ponto específico de cada fita. Dois efeitos podem ocorrer: a inativação **a** ou a correção **b** do gene

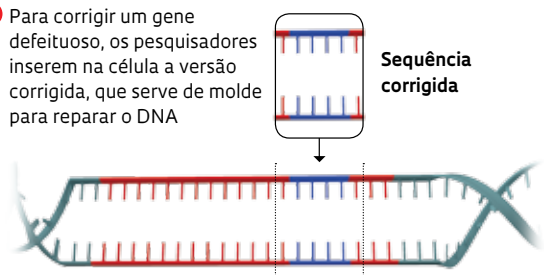


## Efeitos

**a** A maquinaria de reparo celular remenda o corte copiando o mesmo trecho de outra molécula de DNA (nas células o DNA está duplicado). Como o mecanismo de reparo é propenso ao erro, pode ocorrer uma mutação que desative o gene



**b** Para corrigir um gene defeituoso, os pesquisadores inserem na célula a versão corrigida, que serve de molde para reparar o DNA



dução de alimentos a criar modelos para estudar doenças humanas. Camundongos, ratos, coelhos, porcos, cães e macacos já foram alterados geneticamente com a CRISPR, muitos de modo pioneiro por pesquisadores na China. Menos de cinco anos após a publicação dos artigos na *Science*, surgiram trabalhos mostrando ser possível corrigir genes defeituosos em embriões humanos e começaram os tratamentos experimentais em pessoas.

### TESTES EM HUMANOS

Além do caso tratado na China, o primeiro teste em seres humanos com dados apresentados em uma publicação científica, outros cinco foram relatados mais recentemente. No início de novembro passado, a equipe do médico Edward Stadtmauer, da Universidade da Pensilvânia, nos Estados Unidos, apresentou dados iniciais do uso de células de defesa que, por meio da CRISPR, haviam recebido um gene que as direcionava para atacar dois tipos de tumores (mieloma múltiplo e sarcoma) ao mesmo tempo que haviam sido desativados outros que freiam a ação dessas células. Seis meses após o tratamento, os pacientes não haviam apresentado efeitos colaterais graves. Uma mulher com mieloma havia melhorado e o sarcoma do segundo paciente tinha parado de avançar. Do terceiro, não havia resultados, relataram os pesquisadores no encontro anual da Sociedade Americana de Hematologia de 2019.

Também em novembro, a empresa farmacêutica norte-americana Vertex Pharmaceuticals e

a suíça CRISPR Therapeutics anunciaram o sucesso inicial do uso da CRISPR para tratar uma paciente com talassemia-beta e outra com anemia falciforme, doenças genéticas que levam à produção de uma forma alterada de hemoglobina, a proteína que transporta oxigênio no sangue. Elas integram ensaios clínicos nos quais 45 participantes devem receber células de sua própria medula editadas para tratar a doença. Meses após o tratamento, a paciente com talassemia-beta não precisava mais de transfusões sanguíneas e a mulher com anemia falciforme deixou de apresentar lesões em órgãos provocadas pelo bloqueio dos vasos sanguíneos, consequência da agregação das hemácias deformadas. “Esses dados reforçam nossa crença de que essas terapias poderão proporcionar um benefício significativo para os pacientes após uma única intervenção”, afirmou à época Samarth Kulkarni, presidente da CRISPR Therapeutics, em um comunicado à imprensa.

Nesse tratamento, os pesquisadores usaram a CRISPR para introduzir um defeito no gene BLC11A e desligá-lo. Desse modo, reativaram a produção de hemoglobina fetal, sintetizada na vida intrauterina. Mesmo em quantidade moderada, a hemoglobina fetal reduz o efeito deletério da hemoglobina defeituosa. No Brasil, a equipe do hematologista Fernando Costa, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), tenta reproduzir esse tratamento com uma alteração. Em vez de induzir mutações desconhecidas no BLC11A, como as empresas, ele e a bióloga Priscila Mar-



tin optaram por usar alteração identificada nos anos 1980 na população brasileira. Essa mutação eleva a produção de hemoglobina fetal na vida adulta, sem afetar outros genes. Costa e Martin já introduziram a alteração em linhagem de células humanas, que passaram a produzir hemoglobina fetal em maior quantidade. O grupo agora repete o procedimento em camundongos com anemia falciforme. “Se a quantidade de hemoglobina fetal alcançar níveis próximos a 25% do total de hemoglobina, é possível que deixem de ocorrer lesões por obstrução dos vasos”, relata Costa.

**A**té o início deste ano, 16 ensaios clínicos se encontravam em andamento – entre eles os dois da Vertex e da CRISPR Therapeutics. São testes iniciais, destinados a avaliar a segurança e, até certo ponto, a eficiência da edição gênica com a CRISPR. A maior parte deles (11) usa a técnica para alterar o funcionamento das células de defesa e liberá-las para atacar diferentes tipos de câncer (linfoma, leucemia, esôfago, estômago e pulmão). Os demais tentam amenizar ou corrigir prejuízos causados por doenças hereditárias decorrentes de defeito em um gene, como a talassemia-beta e a anemia falciforme.

Dez testes estão em curso em hospitais e institutos de pesquisa da China e cinco em instituições norte-americanas. Esse número sinaliza um avanço na capacidade do gigante asiático de fazer ciência na área biotecnológica e médica e já levou especialistas a dizer, talvez com exagero,

que a disputa entre americanos e chineses seria semelhante à travada entre Estados Unidos e União Soviética na Guerra Fria. De 2013 para cá, as publicações sobre a CRISPR aumentaram 100 vezes. O Pubmed, a maior base mundial de artigos e livros da área médica, registrava 29 artigos sobre CRISPR-Cas9 em 2013 e 3.221 em 2019. Dos 9,7 mil trabalhos publicados entre 2013 e 2019, 27% têm um autor da China e 29% ao menos um dos Estados Unidos.

Apesar do crescimento das pesquisas, é cedo para saber se a técnica funcionará em seres humanos. Por ora, só se conhecem dados preliminares de cinco dos seis casos noticiados. O único teste com pessoas já concluído envolveu 16 participantes com câncer de esôfago e foi feito no Hospital de Câncer de Hangzhou, na China. Os resultados, no entanto, não foram divulgados. Mesmo assim, há quem diga que a CRISPR deve tornar a terapia gênica uma realidade em poucos anos.

“A CRISPR já está sendo usada para tratar doenças em seres humanos. Esse não é um cenário hipotético”, afirma o biólogo molecular Graham Dellaire, da Universidade Dalhousie, no Canadá, que estuda mecanismos de combate às células tumorais e a CRISPR. Nos últimos anos, ele e colaboradores escreveram comentários sobre questões éticas ligadas à edição gênica, mais prementes desde que o biofísico chinês He Jiankui declarou, em novembro de 2018, ter criado os primeiros bebês editados pela CRISPR (ver página 19). Em dezembro de 2019, He foi condenado a três anos de prisão por prática médica ilegal.

## A CONSTRUÇÃO DE UMA FERRAMENTA

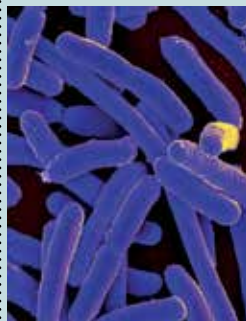
Em menos de 30 anos, sistema de defesa de bactérias será adaptado para manipular genes humanos

**1987**

Yoshizumi Ishino e outros pesquisadores da Universidade de Osaka, Japão, identificam no genoma de bactérias

*Escherichia coli*

sequências de DNA repetidas, hoje chamadas de CRISPR, sigla de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas



**1993**

**Francisco Mojica**

e colaboradores da Universidade de Alicante, Espanha, encontram sequências CRISPR no genoma da arqueia *Haloferax mediterranei*. Sequências CRISPR são depois achadas no genoma de outras bactérias e arqueias, sugerindo que tivessem um papel evolutivo

**2002**

Na Universidade de Utrecht, Holanda, Ruud Jansen e equipe identificam genes adjacentes às sequências CRISPR, os Cas (Crispr associated). Esses genes codificam proteínas que atuam com a CRISPR

**2005**

Quase simultaneamente, as equipes de Mojica, na Espanha, de Christine Pourcel, na Universidade de Paris, e de Alexander Bolotin, do Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica, ambos na França, percebem que trechos de DNA entre

as sequências CRISPR são semelhantes aos de vírus que atacam bactérias. É uma indicação de que a CRISPR seria um sistema de defesa contra vírus. Na bactéria *Streptococcus thermophilus*, Bolotin identifica o gene Cas9, que codifica uma proteína que corta as duas fitas do DNA em um trecho específico

**2007**

Philippe Horvath e outros pesquisadores da indústria de alimentos Danisco demonstram que a CRISPR é parte do sistema de defesa das bactérias. Ela integra o material genético dos

## PRIMEIROS PASSOS

No Brasil, grupos na área da saúde já testam a CRISPR com diferentes fins, do tratamento de câncer ao combate de parasitas como *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Os resultados mais avançados são do fisiologista Guilherme Baldo, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). No Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Baldo e seu grupo usaram a técnica para desenvolver um tratamento experimental para mucopolissacaridose, doença genética rara que afeta uma em cada 100 mil pessoas e danifica vários órgãos, além de prejudicar o desenvolvimento cerebral.

Alterações no gene da enzima alfa-L-iduronidase levam ao acúmulo de açúcares chamados mucopolissacarídeos, tóxicos para as células. O tratamento mais eficaz é o transplante de medula óssea, que exige a destruição do sistema de defesa e deve ser feito antes dos 2 anos de idade para reduzir o risco de deficiência intelectual. Uma alternativa é a reposição da enzima, que não impede os danos neurológicos e pode custar até R\$ 1 milhão por ano.

Usando a CRISPR, os pesquisadores gaúchos já corrigiram a alteração em células humanas em cultura e em camundongos. O tratamento restaurou a função do gene em 4% das células do pulmão e do coração. Um mês mais tarde, os animais produziam de 7% a 8% da quantidade de enzima sintetizada por um organismo saudável, segundo artigo publicado em 2018 no *Journal of Controlled Release*. “Embora a eficiência ainda

seja baixa, é provável que a quantidade já seja suficiente para evitar a progressão da doença. Crianças que sintetizam até 2% da enzima não apresentam deficiência intelectual”, conta Baldo. Ele busca uma forma de aumentar a disponibilidade da enzima no cérebro e planeja novos experimentos com animais, antes que o tratamento se mostre seguro para ser avaliado em pessoas.

## XENOTRANSPLANTE

A CRISPR também pode colaborar para suprir a falta de órgãos para transplante. Uma possível fonte são os porcos, que têm órgãos com dimensão semelhante aos dos seres humanos. Para que o transplante entre espécies (xenotransplante) se torne realidade, é preciso eliminar o risco de transmissão de doenças e de rejeição. Em 2015, o geneticista George Church, da Universidade Harvard, neutralizou 62 retrovírus do genoma dos suínos que poderiam causar problemas aos seres humanos, tarefa inimaginável antes da CRISPR.

No Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) da USP, a equipe coordenada pelo cirurgião Silvano Raia e pela geneticista Mayana Zatz trabalha para desativar os três principais genes que acionam o sistema de defesa do hospedeiro, provocando a rejeição do órgão transplantado. O biólogo Luiz Caires e outros membros do grupo já nocautearam um desses genes em células de fetos suínos. “A eficiência ainda é baixa, mas estamos aprimorando a técnica”, afirma. A expectativa é de até setembro obter células com os três genes desligados.

vírus ao da bactéria e funciona como uma memória do invasor

## 2008

John van der Oost e sua equipe na Universidade de Wageningen, Holanda, mostram que os trechos separando as sequências CRISPR geram uma pequena molécula de RNA, material genético de fita simples, que guia a proteína Cas até o material genético invasor. Na Universidade Northwestern, Estados Unidos, Luciano Marraffini e Erik Sontheimer descobrem que o alvo do RNA é o DNA do invasor

## 2010

Com sua equipe, o microbiólogo Sylvain Moineau, da Universidade de Laval, Canadá, verifica que o sistema CRISPR-Cas9 quebra as duas fitas do DNA em um ponto específico

## 2011

À época na Universidade de Umea, Suécia, a geneticista francesa **Emmanuelle Charpentier** verifica que o RNA que guia a proteína Cas9 contra o alvo é de fita dupla, formado por duas moléculas de RNA.

Na Universidade de Vilnius, Lituânia, o grupo de Virginijus Siksnys copia o trecho do DNA de *Streptococcus thermophilus* que codifica o sistema CRISPR-Cas e o insere no genoma da bactéria *Escherichia coli*. O sistema continua ativo e destrói o DNA de vírus invasores



## 2012

O grupo de Siksnys detalha o funcionamento da Cas9 e mostra que o RNA-guia pode ser manipulado para direcionar a Cas9 contra alvos previamente escolhidos. Em parceria com **Jennifer Doudna**, da Universidade da Califórnia em Berkeley, Estados Unidos, Charpentier, agora no Instituto Max Planck, Alemanha, chega a resultados semelhantes aos de Siksnys. Os grupos de Doudna e Charpentier mostram ainda que é possível criar um RNA sintético de fita única



para guiar a Cas9, simplificando o método. Em maio, o grupo da Califórnia entra com pedido de patente nos Estados Unidos para o uso da CRISPR-Cas9 para editar genomas. Em dezembro, Feng Zhang, do Instituto Broad, e George Church, da Universidade Harvard, também pedem patente da técnica, iniciando uma disputa ainda não resolvida

O passo seguinte será extrair o DNA dessas células e transferir para um óvulo cujo núcleo foi esvaziado. “Os óvulos serão implantados em fêmeas para gerar animais geneticamente modificados”, conta Zatz. Implantado no abdômen, o rim suíno geneticamente modificado pode tirar da hemodiálise pacientes que aguardam para receber um rim de outra pessoa (transplante homólogo). “No Brasil, 126 mil pessoas aguardam um transplante de rim e fazem hemodiálise, consumindo R\$ 2,8 bilhões do sistema público de saúde por ano”, conta Raia, primeiro médico a realizar transplante de fígado com doador vivo no mundo.

**E**m outro laboratório do CEGH-CEL-USP, a geneticista Maria Rita Passos Bueno e sua equipe usam a CRISPR para investigar as causas da fenda lábio-palatal. Sabe-se que alterações em quase uma dúzia de genes podem provocar esse defeito congênito, que impede a formação completa da face. Há casos, porém, em que os genes estão íntegros e o bebê nasce com o lábio fendido. Em um estágio supervisionado por Passos Bueno, o biólogo Lucas Alvizi empregou uma versão da CRISPR para identificar uma possível nova causa do problema. Em testes com o peixe paulistinha, o grupo constatou que o defeito congênito pode resultar da hiperativação do gene MIR152. Esse efeito, eles descrevem em artigo depositado no repositório BiorXiv, pode ser causado por baixa oxigenação na gestação.

Na USP em Ribeirão Preto, interior de São Paulo, as equipes do biólogo molecular Geraldo

Aleixo Passos e do imunologista Eduardo Donadi empregam a CRISPR com uma estratégia diferente. Em vez de corrigir alterações em um gene, eles as provocam. O objetivo é conhecer como os defeitos que inativam o gene regulador autoimune (Aire) levam ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como o diabetes tipo 1.

No organismo dos mamíferos, esse gene é mais ativo no timo, glândula localizada no tórax que elimina células de defesa (linfócitos T imaturos) capazes de atacar o próprio corpo. Ao gerar mutações que desligaram o Aire, os pesquisadores observaram que as células do timo mudaram o perfil de ativação dos genes e deixaram de interagir fisicamente com os linfócitos imaturos, o que dificulta a eliminação daqueles que poderiam atacar o próprio organismo, conforme relataram em 2018 na *Frontiers in Immunology*. “A técnica da CRISPR”, afirma Passos, “está nos ajudando a compreender melhor como o funcionamento do gene Aire ajuda a prevenir doenças autoimunes”. ■

#### Projetos

1. Produção nacional de suínos geneticamente modificados voltados para xenotransplante de órgãos humanos (nº 18/14275-5); **Modalidade** Parceria para Inovação Tecnológica (Pite); **Pesquisador responsável** Silvano Mario Attilio Raia (USP); **Investimento** R\$ 3.748.623,36.
2. CEGH-CEL – Centro de Estudos do Genoma Humano e de Células-Tronco (nº 13/08028-1); **Modalidade** Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão (Cepid); **Pesquisadora responsável** Mayana Zatz (USP); **Investimento** R\$ 43.461.955,95.

Os demais projetos e os artigos mencionados estão listados na versão on-line.



**2013**

**Feng Zhang** adaptou a CRISPR-Cas9 para editar o genoma de mamíferos e testou em células humanas

**2014**

Na Universidade Médica de Nanjing, China, a equipe de Jiahao Sha gera macacos com genes editados pela CRISPR

**2015**

Em um passo rumo à obtenção de órgão de suínos para transplante em humanos, Church e sua equipe em Harvard desativam 62 retrovírus do **genoma de porcos**

**2016**

Na Universidade de Sichuan, China, You Lu e equipe testam o sistema CRISPR-Cas em humanos: desativam um gene para

estimular as células de defesa a combaterem câncer de pulmão

**2017**

Ha Youn Shin e colaboradores nos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos identificam alterações causadas pela CRISPR fora do alvo. Na Universidade de Saúde e Ciência de Oregon, nos Estados Unidos, Shoukhrat Mitalipov e equipe usam a técnica para corrigir em **embriões humanos** uma mutação que causa doença cardíaca

**2018**

**He Jiankui**, da Universidade de Ciência e Tecnologia do Sul, na China, anuncia ter gerado os primeiros bebês humanos com genoma alterado usando a CRISPR. Ele foi banido da universidade e, em dezembro de 2019, condenado a três anos de prisão



FONTES BROAD INSTITUTE; YSHINO, I., ET AL. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 2018; NATURE BIOTECHNOLOGY. 2019.