

O Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia

The CRISPR/Cas9 System and the Possibility of Genomic Edition for Cardiology

Marcela Corso Arend,^{1,2} Jessica Olivaes Pereira,^{1,3} Melissa Medeiros Markoski¹

Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Cardiologia) - Instituto de Cardiologia/ Fundação Universitária de Cardiologia - IC/FUC,¹ Porto Alegre, RS; Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS,² São Leopoldo, RS; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA,³ Porto Alegre, RS - Brasil

Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) e suas patologias associadas encontram-se entre as maiores causas de morbidade e mortalidade, acarretando cerca de 17,3 milhões de mortes por ano.¹ Como um todo, essa classe patológica apresenta etiologia multifatorial. Seus possíveis prognósticos levam a problemas de saúde pública, estando sua incidência relacionada a fatores de risco comportamentais, metabólicos e genéticos.² Apesar dos tratamentos preconizados para as DCV e seus possíveis prognósticos diminuírem o ritmo de progressão da doença, cresce a necessidade de se desenvolver abordagens terapêuticas capazes de reverter a patologia e suas complicações.

Os avanços no campo da biologia molecular e celular vêm possibilitando a elucidação de vias moleculares e causas genéticas envolvidas no estabelecimento e progressão das DCV, traçando um novo ponto de vista sobre a prevenção, tratamento e possíveis desfechos dessa classe patológica. Recentes descobertas, tanto experimentais quanto obtidas por ferramentas de bioinformática, a respeito das bases moleculares das disfunções cardiovasculares, vêm apontando alvos terapêuticos consideráveis.³ Entretanto, a maioria destes alvos não pode ser farmacologicamente manipulada, o que os torna candidatos potenciais para a terapia gênica, como é o caso dos fatores envolvidos, por exemplo, com angiogênese, apoptose e disfunção endotelial.⁴ Dentro desse contexto, a manipulação de genes pode auxiliar na supressão de fatores genéticos relacionados à incidência das DCV, bem como na minimização das complicações clínicas causadas por eventos isquêmicos e oclusivos. Assim, o desenvolvimento e o aprimoramento de ferramentas de edição de genomas possibilitam o surgimento de terapias focadas nos fatores de risco genéticos ao dano cardiovascular e nos problemas morfofisiológicos fundamentais causados pelas DCV. Nesse contexto, o sistema formado por repetições palindrômicas curtas, interespçadas e regularmente agrupadas (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR), e sua

proteína associada-9 (do inglês, *CRISPR associated protein-9*, Cas9), destaca-se devido ao seu fácil uso, alta especificidade, fácil manipulação *in vitro* e *in vivo*, além da possibilidade da edição de múltiplos alvos simultaneamente. Considerando-se a complexidade genômica que intervém nas DCV, indicaremos aqui algumas possibilidades de aplicação da ferramenta CRISPR/Cas9 no âmbito da Cardiologia.

Desvendando o sistema CRISPR/Cas9

Desenvolvido a partir de mecanismos moleculares do sistema imunológico bacteriano, o sistema CRISPR possibilita a edição do genoma através de clivagem do DNA por uma endonuclease (Cas9), guiada a partir de uma sequência de RNA, que é capaz de se parear com as bases de uma sequência-alvo (Figura 1).⁵ A estrutura genética do CRISPR, no sistema bacteriano, é constituída de repetições palindrômicas curtas, agrupadas e regularmente interespçadas. As repetições e os espaçadores (que podem conter sequências virais intercalantes), quando transcritos, formam o RNA *transativador* (ou RNA guia), que serve para direcionar a enzima Cas9, uma nucleasse, ao alvo (neste caso, a sequência do vírus parasita). Aproveitando-se desta estratégia, tanto a proteína Cas9 quanto o RNA guia, podem ser introduzidos *in vitro* em outras células e direcionados a locais específicos do genoma, para que provoquem quebras na fita dupla. Após esta clivagem, a maquinaria molecular intrínseca do organismo, responsável pela correção de erros no genoma, é utilizada para alterar a sequência de DNA, adotando a modificação. Desta forma, o sistema pode ser utilizado tanto para reparar mutações (restaurando a função gênica) quanto para introduzir mutações novas (causando o “nocaute” gênico). Assim, conciliando sofisticadas técnicas moleculares e biotecnológicas, o sistema CRISPR/Cas9 foi proposto para aplicação em edição genômica e hoje já se encontra comercialmente disponível para milhares de alvos.⁶ Ambos, RNA guia e proteína Cas9, produzidos *in vitro*, podem ser entregues às células usando diferentes mecanismos, tais como uso de vetores ou agentes químicos.

A aplicabilidade mais simples do sistema CRISPR está relacionada à modificação de únicas ou poucas bases em genes com relação alélica bem definida. É importante salientar que esta relação de dominância mendeliana deve ser considerada para que se atinja a função gênica, tanto para ativá-la quanto para inibi-la. Entretanto, modificações bialélicas também têm sido obtidas com sucesso.⁷ Além disso, o uso do CRISPR/Cas9 também tem sido proposto para estágio embrionário em modelos animais, onde a prole pode gerar organismos “fundadores” (por recombinação), contendo mutações alélicas que levam ao efeito “nocaute” ou de expressão diminuída.⁸ Nesse contexto,

Palavras-chave

Doenças Cardiovasculares / mortalidade; Morbidade; Fatores de Risco; Prevenção e Controle; Biologia Molecular; Genômica.

Correspondência: Melissa Medeiros Markoski •

Av. Princesa Isabel, 370. CEP 90620-001, Santana, Porto Alegre, RS – Brasil
E-mail: melissa.markoski@cardiologia.org.br

Artigo recebido em 15/07/16, revisado em 13/10/16, aprovado em 13/10/16.

DOI: 10.5935/abc.20160200

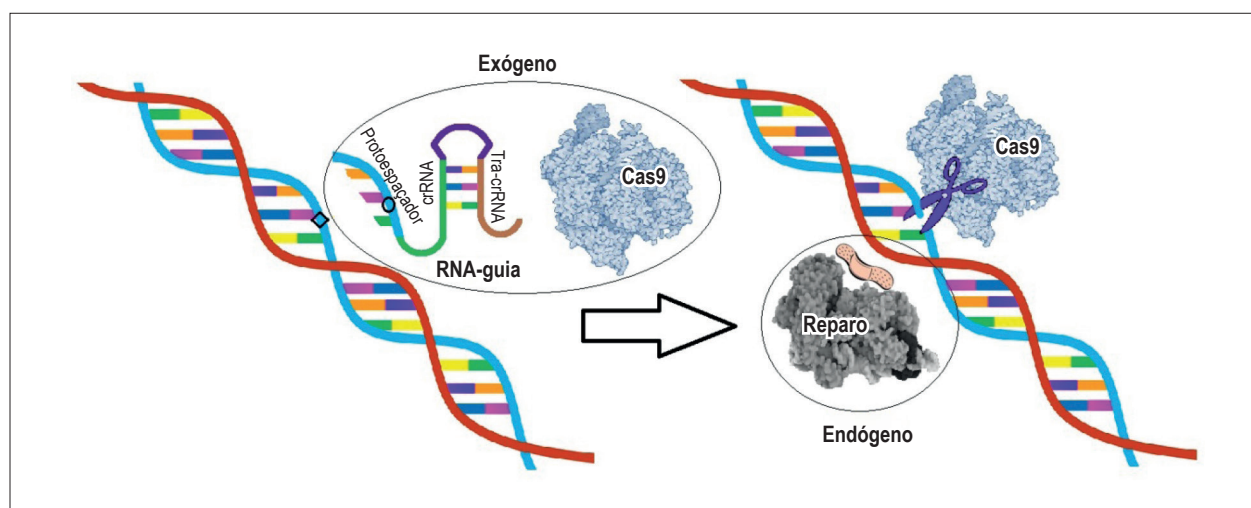


Figura 1 – Sistema CRISPR/Cas9 - mecanismo de reconhecimento do alvo. O RNA guia é projetado para reconhecer a sequência-alvo a ser modificada no DNA e introduzir modificações. Quando o pareamento de bases nitrogenadas ocorre (em função do anelamento da sequência-alvo com a região do protoespaçador do RNA guia), algumas modificações são adicionadas (aqui, representadas pelo círculo) e a enzima Cas9 é acionada, causando quebras na dupla-fita de DNA (onde há falhas de pareamento em razão das mutações introduzidas). As quebras ativam os sistemas de reparo intracelulares que refazem a dupla-fita, aceitando as modificações oriundas do RNA guia. As novas mutações, de forma geral, causam falhas na sequência e geram proteínas não-funcionais. Mas o mecanismo pode ser utilizado também para corrigir mutações originalmente presentes no DNA e gerar proteínas funcionais.

o sistema CRISPR/Cas9 está sendo rapidamente adotado para a edição e modificação de genomas em vários tipos celulares, incluindo células-tronco,⁹ e mostrando bons resultados na edição de genes humanos.¹⁰ Recentemente, a imprensa reportou que pesquisadores da Universidade da Pensilvânia receberam aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) para conduzir um estudo clínico a ser iniciado em 2017, tendo como alvo 3 genes envolvidos em câncer. Assim, surge o questionamento sobre a possibilidade de aplicação do sistema CRISPR/Cas9 para uma situação tão biologicamente complexa como a da doença cardiovascular.

Como utilizar o sistema CRISPR/Cas9 na Cardiologia

O primeiro passo para se sugerir o uso do sistema CRISPR/Cas9 para uma determinada DCV deve basear-se em um estudo aprofundado sobre os potenciais alvos moleculares envolvidos com a doença. Neste cenário, a utilização de ferramentas de bioinformática e bancos de sequências gênicas disponíveis na internet (como o *National Center for Biotechnology Information*, NCBI; e *DNA Data Bank of Japan*, DBDJ) e de proteínas preditas (como o *Universal Protein Resource*, UniProt, alocado no *European Molecular Biology Laboratory*, EMBL), além de bancos de polimorfismos únicos, *SNP* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), podem auxiliar no processo. Uma vez que os alvos tenham sido escolhidos, uma análise detalhada sobre a função dos exons (sequências codificadoras dos genes) também deverá ser realizada. De posse de todas as informações necessárias, os RNA guia podem ser projetados e adquiridos comercialmente. Atualmente, já existem muitos laboratórios de pesquisa que estão utilizando a ferramenta CRISPR/Cas9 para editar genes envolvidos com DCV e testando em sistemas celulares, realizando ensaios pré-clínicos e projetando estudos clínicos. Embora o contexto cardiovascular seja complexo, algumas patologias estão mais ou menos relacionadas a determinados produtos gênicos,

cujas interações com outras moléculas já é conhecida, conforme descrito a seguir, facilitando a viabilidade de utilização do sistema CRISPR/Cas9.

Um dos grandes problemas na manutenção da doença arterial coronariana (DAC) é a elevação dos níveis de LDL, em que a intervenção farmacológica busca sua redução através do uso de estatinas. Uma vez que alguns pacientes são intolerantes ou refratários a este fármaco, estão sendo conduzidas muitas pesquisas com foco na inibição da pró-proteína convertase subtilisina tipo 9 (PCSK9), que auxilia na degradação de receptores do LDL, o que causa aumento do nível da lipoproteína na corrente sanguínea. Através do sistema CRISPR/Cas9, Ding e colaboradores (2014) introduziram perda de função para o gene da PCSK9 no fígado de camundongos, utilizando adenovírus como “veículos”, e mostraram diminuição dos níveis de colesterol em mais de 40%.¹¹ Em um estudo com coelhos, também focado na diminuição da progressão da placa aterosclerótica, foram desenvolvidos animais “nocautes”, por edição genômica, através da inibição de diversos genes, como a Apolipoproteína E (ApoE), CD36, o receptor de LDL, leptina, o receptor rianodínico tipo 2 (RyR2), entre outros.¹² Estes estudos apontam que o sistema CRISPR/Cas9 é viável para alterar a função de genes relacionados a DCV. Isto favorece a exploração do uso da ferramenta molecular para outros mecanismos que concernem à DCV.

Um bom alvo de estudo para possível utilização do CRISPR/Cas9 é o sistema β -adrenérgico, um dos responsáveis pela vasoconstrição/vasodilatação e manutenção da pressão arterial e do ritmo cardíaco. Somado a isto, o sistema renina-angiotensina-aldosterona também possui papel primordial na manutenção da estabilidade hemodinâmica. Ambos os sistemas são regulados por uma extensa rede de efetores, como hormônios e peptídeos, receptores, proteínas quinases e outras enzimas, tanto atuantes no meio extracelular como

no interior das células. Neste sentido, seria muito interessante testar e avaliar a ferramenta de edição genômica para auxiliar no tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

Nosso grupo, em concomitância à aplicação de terapias alternativas, como a celular e gênica, para tratamento de DCV, desenvolveu o primeiro estudo clínico do país para promoção de angiogênese, por expressão exógena, através da administração de um plasmídeo contendo o cDNA relativo ao gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em pacientes portadores de angina refratária, mostrando que a técnica é segura e melhora a fração de ejeção ventricular.¹³ Atualmente, temos concentrado nossos esforços no entendimento de mecanismos que possam auxiliar nas intervenções (cirúrgicas, farmacológicas, dietéticas, etc.) para DCV, principalmente para cardiomiopatia dilatada (CMD) e cardiopatias isquêmicas.¹⁴ Em colaboração com pesquisadores do Instituto do Câncer, estamos utilizando o sistema CRISPR/Cas9 para alcançar a inativação da função de uma MAP quinase tecido-específica, codificada pelo gene *TNNI3K*, que interage com a troponina I cardíaca e, quando exacerbada, causa progressão da CMD levando à insuficiência cardíaca e aumentando o risco de morte.¹⁵

Não apenas o contexto inibitório, mas a possibilidade de edição para ativação de genes de maneira a estimular funções relacionadas, por exemplo, à sobrevivência de cardiomiócitos no pós-infarto, indução de *homing* (migração, proliferação e diferenciação de células-tronco), aumento do nível de citocinas anti-inflamatórias e de proteínas inibidoras de metaloproteinases (que levam ao remodelamento ventricular patológico), além de outros mecanismos, pode vir a ser explorada no âmbito das DCV. Entretanto, devido às condições multifatoriais atribuídas à etiologia e prognóstico dessa classe de patologias, a transposição clínica de resultados obtidos por análises moleculares em sistemas celulares *in vitro* ou em

modelos animais, assim como ocorre para outras abordagens mais inovadoras, ainda é um desafio.

Na maioria dos casos, fatores genéticos, ambientais e comportamentais atuam em conjunto para o estabelecimento de DCV. Embora, em alguns casos, sejam observados prováveis fatores preditores dos desfechos, ainda não é possível prever com exatidão a influência da ativação/inativação de genes em relação aos quadros clínicos. Finalmente, como para qualquer nova tecnologia, os riscos, as adaptações fisiológicas, as implicações com a resposta imune, a manutenção da homeostasia, que venham a ser modulados pelo sistema CRISPR/Cas9, precisam ser muito bem avaliados. Mas a possibilidade de uso da nova ferramenta molecular na Cardiologia pode ser vislumbrada e talvez, em um futuro próximo, vir a beneficiar a saúde da população.

Contribuição dos autores

Redação do manuscrito e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Arend MC, Pereira JO, Markoski M

Potencial conflito de interesse

Declaramos não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação acadêmica

M. M. M. é professora e orientadora junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Cardiologia do IC/FUC.

Referências

1. Laslett LJ, Alagona P Jr, Clark BA 3rd, Drozda JP Jr, Saldivar F, Wilson SR, et al. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(25 Suppl):S1-49.
2. Gus I, Ribeiro RA, Kato S, Bastos J, Medina C, Zaslavsky C, et al. Variations in the prevalence of risk factors for coronary artery disease in Rio Grande do Sul-Brazil: a comparative analysis between 2002 and 2014. *Arq Bras Cardiol*. 2015;105(6):573-9.
3. Sarajlić A, Janjić V, Stojković N, Radak D, Pržulj N. Network topology reveals key cardiovascular disease genes. *PLoS One*. 2013;8(8):e71537.
4. Lavu M, Gundewar S, Lefer DJ. Gene therapy for ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(5):742-50.
5. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulation and targeting genomes. *Nature Biotechnol*. 2014;32(4):347-55.
6. Richter H, Randau L, Plagens A. Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):14518-31.
7. Jao LE, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(34):13904-9.
8. Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li XJ. CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*. 2015;10:35.
9. Kim HS, Bernitz JM, Lee DF, Lemischka IR. Genomic editing tools to model human diseases with isogenic pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2014;23(22):2673-86.
10. Osborn MJ, Gabriel R, Webber BR, DeFeo AP, McElroy AN, Jarjour J, et al. Fanconi anemia gene editing by the CRISPR/Cas9 system. *Hum Gene Ther*. 2015; 26(2):114-26.
11. Ding Q, Strong A, Patel KM, Ng SL, Gosis BS, Regan SN, et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res*. 2014;115(5):488-92.
12. Yang D, Xu J, Zhu T, Fan J, Lai L, Zhang J, et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases. *J Mol Cell Biol*. 2014; 6(1):97-9.
13. Kalil RA, Salles FB, Giusti II, Rodrigues CG, Han SW, Sant'Anna RT, et al. VEGF gene therapy for angiogenesis in refractory angina: phase I/II clinical trial. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2010;25(3):311-21.
14. Schaun MI, Eibel B, Kristocheck M, Sausen G, Machado L, Koche A, et al. Cell therapy in ischemic heart disease: interventions that modulate cardiac regeneration. *Stem Cells Int*. 2016;2016:2171035.
15. Wheeler FC, Tang H, Marks OA, Hadnott TN, Chu PL, Mao L, et al. Tnni3k modifies disease progression in murine models of cardiomyopathy. *PLoS Genet*. 2009;5(9):e1000647.