

ENGENHARIA GENÉTICA, CRISPR E DOENÇAS CARDIOVASCULARES: A EDIÇÃO DE GENOMAS ROMPENDO FRONTEIRAS

GENETIC ENGINEERING, CRISPR AND CARDIOVASCULAR DISEASES: THE EDITION OF GENOMES BREAKING FRONTIERS

¹Nayane Soares de Lima, ¹Rômulo Morais Azevedo, ²Aline Helena da Silva Cruz, ^{1,3}Angela Adamski da Silva Reis, ^{1,4*}Rodrigo da Silva Santos

¹Laboratório de Patologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil *rdssantos@gmail.com
²Colegiado de Ciências Biológicas, Sociedade de Educação e Cultura de Goiás, Sociedade de Educação e Cultura de Goiás, Faculdade Araguaia, Goiânia, GO
³Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO
⁴Colegiado de Ciências da Natureza (LEdoC), Unidade Acadêmica Especial de Ciências Humanas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, GO

RESUMO

As Doenças Cardiovasculares (DCVs) representam um conjunto de patologias que acometem o coração e os vasos sanguíneos, estas são consideradas como uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo, contribuindo para o aumento significativo de gastos dos sistemas de saúde. As DCVs são definidas como a incapacidade do coração em bombear sangue, oxigênio e nutrientes para os órgãos e tecidos. São patologias de etiologia multifatorial e seu desenvolvimento é relacionado, principalmente, aos fatores genéticos. Atualmente, sabe-se que determinadas variações gênicas podem implicar na susceptibilidade e progressão da doença. Toda via, ainda não existem métodos de prevenção e diminuição do ritmo de progressão das DCVs com base nos fatores genéticos. Assim, este estudo visa correlacionar a técnica CRISPR/Cas9 às DCVs. O CRISPR/Cas9 é um sistema que se mostra útil na modulação do genoma e edição dos fatores genéticos, este pode ser aplicado na correção das variantes genéticas predizentes à doença, através da inserção ou deleção de bases nitrogenadas do genoma, bem como ser utilizado na diferenciação de células-tronco em cardiomiócitos para a correção de DCVs. O CRISPR/Cas9 é a mais recente e notável ferramenta capaz de editar o DNA, possibilitando a terapia gênica para o controle de inúmeras patologias, incluindo as cardiovasculares.

Palavras-chave: doenças crônicas, edição gênica, biologia molecular, medicina genômica.



ABSTRACT

Cardiovascular Diseases (CVDs) represent a set of pathologies that affect the heart and blood vessels, which are considered as one of the main causes of mortality and morbidity worldwide, contributing to the significant increase in health system spending. CVDs are defined as the inability of the heart to pump blood, oxygen, and nutrients to organs and tissues. They are pathologies of multifactorial etiology and their development is mainly related to genetic factors. It is currently known that certain gene variations may imply in susceptibility and disease progression. But there are no methods to prevent and slow the progression of CVD based on genetic factors. Thus, this study aims to correlate the CRISPR/Cas9 technique to CVDs. CRISPR/Cas9 is a system that is useful in genome modulation and editing of genetic factors. It can be applied to correct genetic variants that predict the disease through the insertion or deletion of nitrogenous bases of the genome, and it can be used in the differentiation of stem cells into cardiomyocytes for the correction of CVDs. CRISPR/Cas9 is the latest and most remarkable DNA-editing tool, enabling gene therapy to control numerous pathologies, including CVDs.

Keywords: chronic diseases, gene edition, molecular biology, genomic medicine.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) afetam indivíduos em qualquer idade. Elas representam um conjunto de patologias que acometem os vasos sanguíneos e o coração. Essas são caracterizadas pela incapacidade do sistema circulatório, comprometendo o fluxo de oxigênio e nutrientes para os tecidos e órgãos⁽¹⁾. As DCVs mais comuns são: aterosclerose, acidente vascular encefálico (AVE), hipertensão arterial sistêmica (HAS), infarto agudo do miocárdio (IAM) e insuficiência cardíaca (IC)⁽²⁾. Destas patologias, as formas mais preocupantes são as que acometem as artérias coronárias e as artérias cerebrais⁽³⁾.

As DCVs são de etiologia multifatorial, compreendendo fatores comportamentais, metabólicos ou genéticos na sua predisposição⁽³⁾. Os fatores comportamentais, considerados também como modificáveis, incluem o tabagismo, consumo de álcool, dislipidemias, obesidade, sedentarismo, uso de anticoncepcionais hormonais e o estresse emocional⁽⁴⁾. Entre os fatores não modificáveis, ou seja, não susceptíveis à eliminação, estão aqueles que englobam fatores genéticos, gênero, histórico familiar de DCVs, idade e etnia⁽¹⁾. Além disso, existem outros fatores associados às complicações por DCVs, as quais são



entidades mórbidas como aterosclerose, diabetes *mellitus* (DM), hipertensão arterial e hipercolesterolemia⁽¹⁾.

Dentre os fatores não modificáveis, os genéticos apresentam-se como a principal causa no desenvolvimento das DCVs. Alguns polimorfismos genéticos e mutações em determinados genes, já estão descritos na literatura através de diversos processos de implicação para o desenvolvimento das DCVs, ou das entidades mórbidas que contribuem para a progressão dessas patologias⁽⁵⁾. Alguns dos principais genes associados ao desenvolvimento das DCVs são apresentados na Tabela 1.

Tais genes estão associados aos mecanismos patogênicos para o desenvolvimento das DCVs que incluem fibrose, desequilíbrio de íons de sódio, comprometimento de fatores de transcrição, diferenciação de células/calcificação celular, processos de hipertrofia cardíaca, grave hipercolesterolemia, disfunção septal atrial e ventricular, entre outros⁽⁷⁾.

As DCVs causam o aumento da taxa de mortalidade e morbidade, além de custos elevados para os sistemas de saúde⁽²⁴⁾. Mais pessoas vêm a óbito em consequência de DCVs do que por qualquer outra causa conhecida. Estima-se que no ano de 2015, 17,7 milhões de pessoas vieram a óbito devido ao acometimento dessas patologias, sendo considerada como a principal causa de morte a nível global⁽²⁵⁾.

A distribuição da incidência das DCVs é predominantemente maior na população de idosos. Todavia, a população mais jovem tem sido frequentemente afetada por essas enfermidades, o que tem gerado grande impacto socioeconômico, dado ao aumento no índice de mortalidade e morbidade na fase mais ativa desta população⁽²⁶⁾.

As sintomatologias das DCVs são bem variadas, podem ser assintomáticas ou manifestarem-se por meio de desconforto no peito, dores nos braços, ombro esquerdo, cotovelos, mandíbula ou costas, dificuldade na respiração, sensação de enjôo, tontura, suor frio e palidez. Entre as mulheres predominam sintomas como náuseas, falta de ar, vômitos e dores nas costas ou mandíbula⁽²⁵⁾.

Tabela 1. Alguns dos principais genes associados no desenvolvimento das DCVs.

Gene	Nome	Ref.
<i>APOE</i>	Apolipoproteína E	Huang et al., 2017 ⁽⁶⁾
<i>LDLR</i>	Receptor de lipoproteína de baixa densidade	Kathiresan; Srivastava, 2012 ⁽⁷⁾
<i>APOB</i>	Apolipoproteína B-100	Manson; Bassuk, 2015 ⁽⁸⁾ ; Dittrich et al., 2019 ⁽⁹⁾
<i>ABCG5, ABCG8</i>	Subfamília de cassete de ligação ao ATP	Schumacher; Benndorf, 2017 ⁽¹⁰⁾ ; Yu et al., 2014 ⁽¹¹⁾
<i>PCSK9</i>	Proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9	Iacocca et al., 2018 ⁽¹²⁾
<i>MYH7</i>	Miosina 7	Marian; Braunwald, 2017 ⁽¹³⁾ ; Molina et al., 2017 ⁽¹⁴⁾
<i>TNNT2</i>	Troponina T	Marsiglia et al., 2013 ⁽¹⁵⁾
<i>MYBPC3</i>	Proteína C de ligação à miosina do tipo cardíaco	Marian; Braunwald, 2017 ⁽¹³⁾ ; Hamedani et al., 2017 ⁽¹⁶⁾
<i>ACTC1</i>	Actina, músculo cardíaco alfa 1	Wang et al., 2016 ⁽¹⁷⁾ ; Despond; Dawson, 2018 ⁽¹⁸⁾
<i>TPM1</i>	Cadeia de tropomiosina alfa-1	Nijak et al., 2018 ⁽¹⁹⁾
<i>NKX2-5</i>	Proteína homeobox Nkx-2.5	Lu et al., 2016 ⁽²⁰⁾
<i>GATA-4</i>	Fator de transcrição GATA-4	Berlo; Aronow; Molquentin, 2013 ⁽²¹⁾ ; Dixit et al., 2018 ⁽²²⁾
<i>TBX5</i>	Fator de transcrição T-box TBX5	Steimle; Moskowitz, 2017 ⁽²³⁾

Considerando todos os fatores apresentados, o risco das DCVs e o alto custo no tratamento de tais doenças, medidas preventivas para o controle dos fatores modificáveis e não modificáveis devem ser analisadas para a prevenção e contenção da incidência por essas patologias. Assim, avaliando medidas para os fatores não modificáveis, especialmente os fatores genéticos, tido como não susceptíveis à eliminação, no ano de 2012 surgiu uma técnica de edição genética denominada

CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas Regularmente Interespaçadas), que pode auxiliar no controle e supressão de tais fatores⁽³⁾.

A CRISPR/Cas9, também conhecida como CRISPR/Cas tipo II, é a mais nova e proeminente técnica de edição do genoma, muito promissora nos estudos genéticos⁽²⁷⁾. É originária do sistema imune adaptativo de bactérias e arqueas, onde exerce um papel protetor contra a ação de elementos invasores, como os bacteriófagos e plasmídeos, atuando na proteção do genoma desses microrganismos contra uma possível reinfecção⁽²⁸⁾. A técnica tem sido aplicada a diversos estudos na edição gênica de doenças crônicas, como câncer⁽²⁹⁾, leucemias⁽³⁰⁾, HIV⁽³¹⁾, diabetes^(32,33), bem como em experimentos de imunoterapias⁽²⁹⁾, regeneração de tecidos⁽³⁴⁾ e doenças virais⁽³⁵⁾.

O sistema CRISPR/Cas9 também é aplicado com êxito na edição gênica em DCVs. A técnica foi utilizada por Pan et al.(2017)⁽³⁶⁾, na realização de uma abordagem *knockout* (*KO*) mediante a utilização de plasmídeos como vetores de expressão da Cas9. Esse mecanismo *KO* foi desenvolvido para explorar o efeito da proteína dedo de zinco ZNF418 na hipertrofia cardíaca patológica. A proteína ZNF418, por sua vez, pertence a uma classe de proteínas de ligação ao DNA eucariótico, que atuam no processo de ativação ou repressão da expressão gênica. Essa proteína é altamente expressa no coração, e já tem sido relatada como um fator preditivo às DCVs, devido a repressão de atividades transcricionais essenciais de vários genes no tecido cardíaco^(36,37).

No estudo de Marczenke et al. (2017)⁽³⁸⁾, foi utilizada a técnica para o controle da fibrilação atrial (FA), na qual realizaram a abordagem *KO*, nocauteando o gene da subfamília de canais controlada por voltagem para potássio membro 5 (*KCNA5*). Sabe-se que esse gene, no tecido cardíaco, atua na fase de rápida repolarização do potencial de ação, e variantes gênicas tem sido associadas a mecanismos de arritmogênese⁽³⁹⁾.

A tecnologia CRISPR/Cas9 também foi aplicada na modulação de células-tronco embrionárias humanas em diferentes tipos de células vasculares, com deficiência do fator de transcrição p65 (*RelA*) para inibir a atividade do gene *NF-*

kB e avaliar como o *NF-kB/RelA* regula células vasculares sob condições inflamatórias⁽⁴⁰⁾.

Deste modo, a técnica CRISPR/Cas9 se destaca dado ao grande potencial no estudo genético, especialmente, na edição gênica, imprescindível para supressão ou edição de genes associados ao desenvolvimento das DCVs⁽³⁾. Além disso, a técnica pode ser aplicada na farmacogenética, através da edição de genes pertencentes às famílias CYP, ABC, SLC, os quais estão envolvidos nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de drogas alvos para as DCVs, a fim do controle e tratamento mais efetivo aos portadores da doença⁽⁴¹⁾.

Nesse sentido, a presente pesquisa realizou um compilado de informações de grande relevância a respeito do uso do sistema CRISPR/Cas9 e sua aplicabilidade em DCVs, trazendo uma revisão das evidências científicas sobre essa técnica inovadora e promissora no tratamento e controle epidemiológico de tais patologias.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão bibliográfica sobre a correlação entre CRISPR/Cas9 e seus benefícios no controle das doenças cardiovasculares. Para o desenvolvimento do trabalho, foram analisados artigos em inglês e português publicados entre os anos 2003 a 2019, disponíveis nos bancos de dados *NCBI –PubMed* (www.https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) e *SciELO - Scientific Electronic Library Online* (www.scielo.org/). Para a busca dos manuscritos, foram utilizados os termos: CRISPR, Doença Cardiovascular, Engenharia Genética, Biologia Molecular, combinadas e individualmente. Após as análises dos artigos, foram selecionados 63 estudos que se adequavam à proposta da revisão, os quais foram incluídos na pesquisa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

SISTEMA CRISPR/CAS9

Em meados da década de 80, pesquisadores identificaram uma região com um padrão incomum nas bactérias *Escherichia coli*, uma sequência altamente variada e intercalada por outra sequência repetida sem função conhecida⁽⁴²⁾. No ano de 2005, sabia-se que as sequências antes observadas, eram de origem extracromossomais, fazendo parte de uma memória imunológica contra invasores como fagos e plasmídeos^(43,44). Posteriormente, no ano de 2012, essas sequências ficaram conhecidas como CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* / Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas Regularmente Interespçadas), um sistema altamente eficaz, o qual vem acompanhado das proteínas do complexo Cas⁽⁴⁵⁾.

O sistema CRISPR/Cas9 é um participante ativo que age em defesa do genoma de organismos procariotos, os *locus* CRISPR já foram descritos em quase todos os genomas de arqueas e bactérias já sequenciadas, estes consistem em várias cópias de uma sequência de repetição curta, geralmente de 25 a 40 nucleotídeos. O mecanismo utilizado por esse sistema atua no reconhecimento do material genético de um invasor, seja de fagos ou plasmídeos, clivando-os em pequenos fragmentos e os integrando ao DNA bacteriano⁽⁴⁶⁾.

No caso de uma reinfecção pelo mesmo agente invasor, a maquinaria celular realiza a transcrição do *locus* CRISPR, em pequenos RNAs, denominados crisp RNA (crRNA), que agem em conjunto com as proteínas do complexo Cas, para reconhecer o DNA exógeno e degradá-lo, mediante ao reconhecimento por complementaridade de bases e clivagem pela ação das proteínas Cas^(47,44).

Atualmente existem seis tipos de sistemas CRISPR, os quais estão agrupados em duas classes diferentes⁽⁴⁸⁾. Os mais estudados são os tipos I, II e III, sendo, os tipos IV, V e VI identificados recentemente⁽⁴⁹⁾. Os sistemas CRISPR tipo I e III, utilizam um conjunto de diversas proteínas Cas, enquanto, o sistema CRISPR tipo II, necessita apenas de uma proteína do complexo Cas, a endonuclease Cas9⁽⁵⁰⁾.

Dentre os sistemas identificados, o CRISPR/Cas9 é um dos mais promissores nas pesquisas genéticas. Ele foi descoberto no ano de 2012 na bactéria *Streptococcus pyogenes*, verificando então, que esse procarionto apresentava um sistema de defesa que poderia ser adaptado e utilizado como um sistema programável para a edição gênica⁽⁴⁵⁾.

Sabe-se que o CRISPR/Cas9 é um mecanismo capaz de induzir DSBs (do inglês, “*Double Strand Breaks*” que significa “quebras de fita dupla”) no DNA⁽⁵¹⁾, permitindo a edição do genoma por meio de clivagem, mediada pela endonuclease Cas9, guiada por uma sequência de sgRNA. Esse RNA guia é capaz de emparelhar-se com as bases nitrogenadas de uma sequência-alvo, permitindo a modificação ou remoção de bases nitrogenadas específicas no genoma. As repetições palindrômicas e os espaçadores do sistema CRISPR/Cas9, quando transcritos, formam o RNA transativador (tracrRNA), que atua em auxílio no direcionamento da Cas9 para a clivagem da sequência de interesse no genoma⁽³⁾.

Posteriormente a descoberta do CRISPR/Cas9, cientistas observaram que poderiam manipular a molécula de RNA CRISPR em um único RNA guia (sgRNA), e assim poderiam direcioná-lo a sequências específicas em áreas de interesse no genoma. Todavia, o sgRNA deve reconhecer uma sequência de pelo menos 17 a 22pb, seguida por uma sequência de Motivo Adjacente ao Protoespaçador 5-NGG-3 (PAM). As DSBs induzidas pela endonuclease Cas9 podem ser reparadas por processos celulares, como a NHEJ (do inglês, “*Non-homologous end joining*” que significa “união de extremidade não homóloga”) ou HDR (do inglês “*homology directed repair*” que significa “reparo direcionado por homologia”)⁽⁵¹⁾. Mecanismo representado na Figura 1.

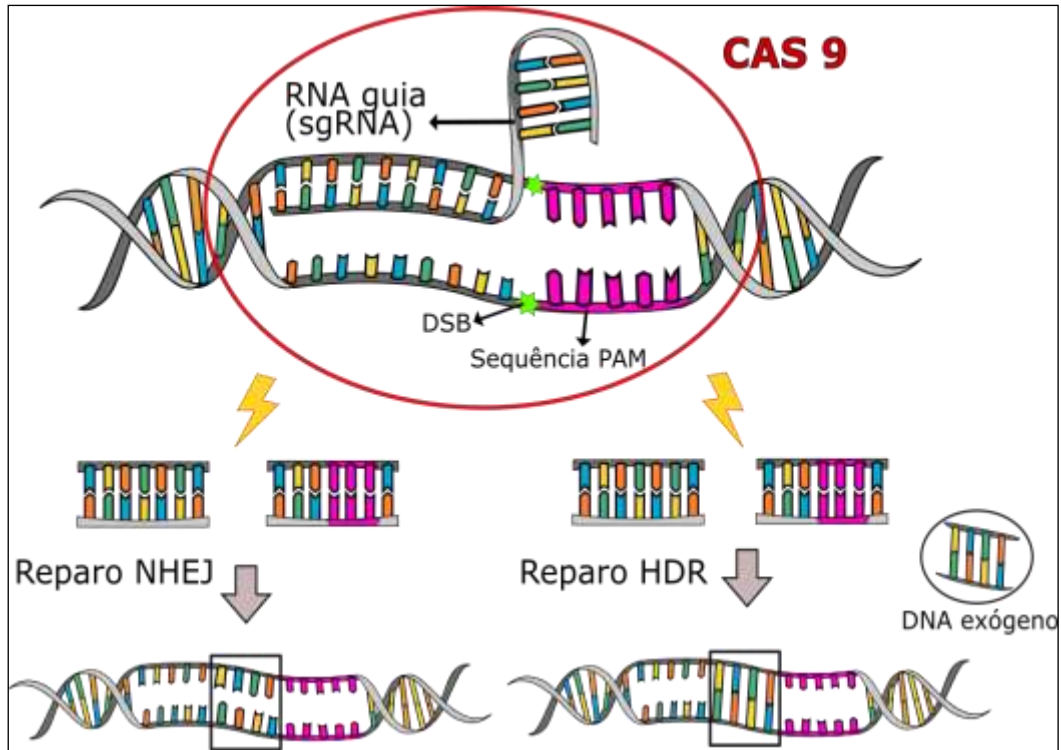


Figura 1. Mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas9 na edição do genoma.

Sugerida como uma técnica de fácil utilização, alta especificidade, além de fácil manipulação *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, o mecanismo CRISPR/Cas9 permite a edição simultânea de múltiplos alvos no genoma⁽³⁾. A partir da manipulação de bases do DNA, esse sistema pode ser utilizado na correção de mutações, inserção ou deleção de bases nitrogenadas específicas no DNA, restauração da função gênica, tanto em abordagens *knock-in* (inserção de genes) ou na introdução de novas mutações mediadas pelo *knockout* (remoção de sequência gênica – “KO”)⁽³⁾.

A flexibilidade e simplicidade da técnica CRISPR/Cas9 favoreceu a sua utilização em diversas áreas de pesquisas biológicas, incluindo o desenvolvimento de modelos de linhagens celulares, auxílio para desvendar mecanismos patológicos, identificação de alvos conectados a doenças, o desenvolvimento de animais e plantas transgênicos, e modulação transcricional⁽⁴⁶⁾. Esquematisados na Figura 2.

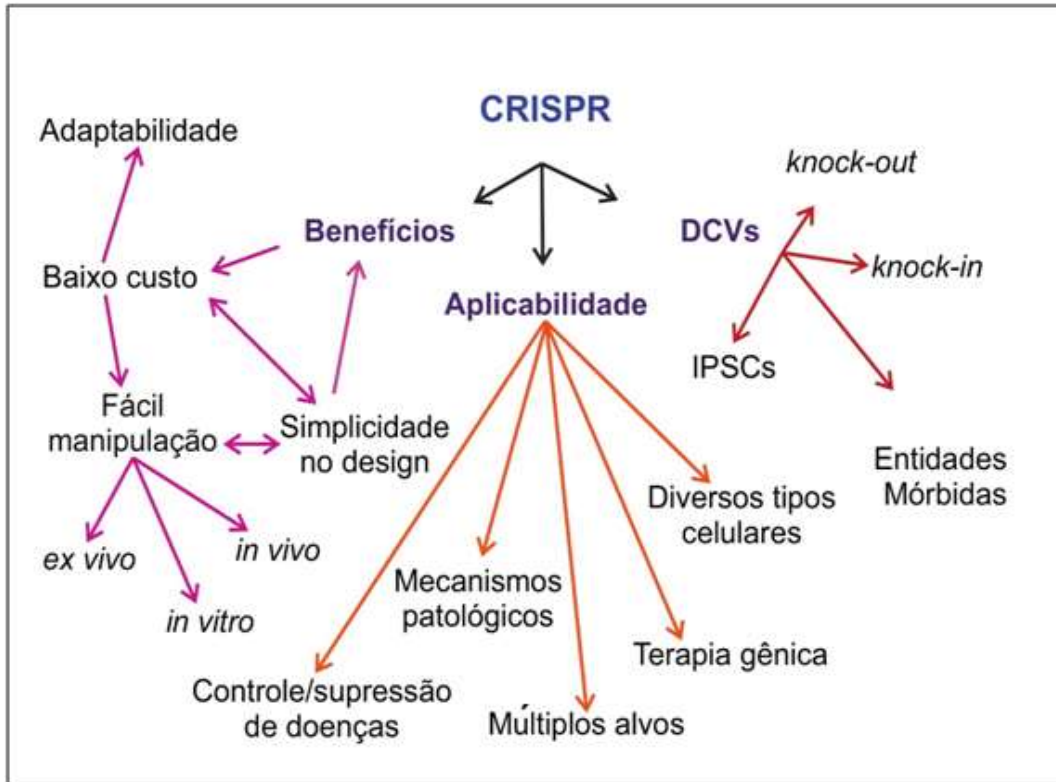


Figura 2. Representação esquemática do sistema CRISPR, segundo benefícios, aplicabilidade e direcionamento às DCVs.

Existem diversas aplicabilidades ao CRISPR, sendo a mais simples ligada à mudança de bases nitrogenadas únicas ou bases específicas em genes com uma relação alélica bem definida, permitindo a modificação ou a remoção desses nucleotídeos. Além disso, outros estudos mostram que modificações bi-alélicas também foram obtidas com sucesso⁽³⁾.

SISTEMA CRISPR/CAS9 EM CÉLULAS HUMANAS E EM MODELO ANIMAL PARA DOENÇAS CARDÍACAS

Mesmo com toda a complexidade do contexto cardiovascular, os fatores genéticos se apresentam como um dos principais riscos predizentes à doença. Nesse contexto, o uso do sistema CRISPR/Cas9 é visto como uma potencial ferramenta molecular na supressão desses fatores, considerados como não modificáveis, devido a fácil aplicabilidade, uma vez que o CRISPR/Cas9 produzido *in vitro* pode ser

introduzidos nas células mediante diferentes mecanismos, seja por vetores ou agentes químicos⁽⁵¹⁾.

Dados da literatura mostram que o CRISPR/Cas9 pode ser aplicado às DCVs, como no estudo de Marczenke et al. (2017)⁽³⁸⁾, no qual foram utilizados métodos para a diferenciação específica de subtipo de células tronco pluripotentes humanas induzidas (HIPSC's) para explorar os canais para potássio (*KCNA5*) em cardiomiócitos. O método CRISPR/Cas9 foi utilizado para simulação de um modelo de FA, através da mutação de HIPSC's sem integração e foi empregada para gerar um *KO* no gene *KCNA5* funcional. Sabe-se que mutações nesse gene implicam na FA, devido a alterações nos mecanismos de repolarização do cardiomiócito.

No estudo realizado por Arend, Pereira e Markoski (2016)⁽³⁾, utilizando coelhos, focado na diminuição da progressão da placa aterosclerótica, foram desenvolvidos “animais *KO*”. O nocaute nos genes: Apolipoproteína E (*ApoE*), *CD36*, receptor LDL, leptina, receptor rianodínico tipo 2 (*RyR2*), teve como premissa a inibição de possíveis associações no desenvolvimento da doença.

A revisão realizada por Motta et al. (2017)⁽⁵²⁾ explicita abordagens de engenharia genética em organismos: mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), peixe-zebra (*Danio rerio*) e camundongo (*Mus musculus*), organismos os quais vem apresentando sucesso no estudo de doenças cardíacas. Tal êxito é devido à especificidade da ferramenta CRISPR/Cas9 na edição de mutagênese, possibilitando futuras triagens genéticas de alto rendimento no coração.

A edição do genoma embrionário tem sido promissora na geração de modelos de camundongos. Tal feito tornou possível gerar animais geneticamente modificados de uma variedade de espécies, nas quais a modelagem de doenças havia sido anteriormente difícil ou inatingível, o que possibilita um grande avanço na pesquisa cardiovascular diante do estudo de fenotipagem, comparações e descobertas de mecanismos patológicos de tais doenças⁽⁵³⁾.

Em abordagens *in vivo* e *in vitro*, o sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado no estudo de Pan et al., (2017)⁽³⁶⁾ para realizar o *KO* na proteína ZNF418 em ratos e

em células cardíacas humanas. Em tal estudo foi possível observar a proteína ZNF418 como um importante fator na regulação e proteção do coração contra sobrecarga de pressão e estimulação de angiotensina II. Além disso, o estudo evidenciou a superexpressão de ZNF418 associado à fibrose e hipertrofia cardíaca, devido à desregulação no processo de transcrição celular pela fosforilação da proteína c-jun/proteína ativadora 1 (AP-1).

A capacidade de introdução de genes do sistema CRISPR/Cas9, pode proporcionar grandes benefícios para a população em questões de métodos inovadores na área da medicina e da saúde. Por ser considerada uma técnica de menor custo, fácil utilização, eficaz na edição do genoma e grande benefício, o sistema CRISPR/Cas9 tem sido indicado para estudos em busca da cura e tratamento de doenças genéticas e crônicas, incluindo a alteração da função dos genes associados às DCVs^(3,54).

O potencial terapêutico da edição genômica em DCVs ainda é reduzido por problemas biológicos e técnicos. Embora exista a possibilidade teórica de isolar ou gerar células-tronco de um paciente, editando as mesmas, convertendo-as no tipo de célula cardiovascular relevante e transplantando novamente ao corpo com enxerto no órgão-alvo (por exemplo, coração), ainda não está claro se isso será uma abordagem viável e prática. Em um futuro próximo, estima-se que as terapias de edição genômica possam ser aplicadas na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, visando à manipulação de cardiomiócitos⁽⁵³⁾.

O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO SISTEMA CRISPR/CAS9

A engenharia genética pela técnica de CRISPR/Cas9 possibilita a edição gênica ao induzir DSBs em *loci* específicos no DNA e possibilita a realização da manipulação gênica com melhor precisão. As DSBs envolvem a atuação dos mecanismos de reparo endógeno celular, como a NHEJ, um mecanismo propenso a erros que geralmente induz mutações do tipo *indels* (termo utilizado em casos de inserção ou deleção de nucleotídeos do genoma) na junção de reparo⁽⁵⁵⁾.

Outro mecanismo de junção pode ser realizado pelo HDR, que permite a



edição genômica em modelos animais *knock-in* mediante a utilização de um DNA doador⁽⁵⁵⁾. Os *indels* que ocorrem devido à ação da NHEJ dentro de éxons codificadores permitem a geração eficiente de animais *KO*, pois podem levar a mutações do tipo *frameshift*, ou seja, a formação de uma matriz de leitura diferente quando as deleções ou inserções dizem respeito a um número de nucleotídeos não múltiplos de 3, assim gerando uma nova sequência de códons a partir do local mutado, bem como códons de parada prematuros⁽⁵⁶⁾.

Os avanços observados recentemente com o uso de técnicas precisas de edição de genes e as aplicações bem-sucedidas em modelos animais proporcionam meios para correção de mutações germinativas humanas. O CRISPR/Cas9, em sua particularidade, é uma ferramenta capaz de reconhecer sequências genômicas específicas e promover DSBs nas mesmas^(57,58), ativando os mecanismos de reparo em seguida.

O CRISPR/Cas9, por ser uma ferramenta de fácil acesso, trouxe oportunidades para a ciência em relação à modelagem de doenças humanas. Estudos de associação ampla do genoma (*GWAS*) permitem análises com mutações pontuais específicas, mutações em genes codificadores e genes não codificadores, e mutações regulatórias, sendo viáveis em quase todos os fundos genéticos, assim como em quase todas as espécies⁽⁵⁹⁾.

A humanização de fragmentos genômicos, ou seja, quando há adição de fragmentos naturais do genoma humano em organismos de outras espécies, no intuito de substituir sequências gênicas de determinados indivíduos por sequências humanas, tem se tornado uma prática acessível. A adição e substituição de segmentos gênicos de ratos em sequências humanas por meio de injeção direta em óvulos fertilizados, foi uma das realizações em um estudo por Yoshimi et al. (2016)⁽⁵⁵⁾. Nesse estudo, os pesquisadores estabeleceram abordagens de *knock-in* em ratos, que foram mediadas por oligodesoxinucleotídeos de cadeia simples (ssODN) utilizando a técnica de edição gênica CRISPR/Cas9. Portanto, essa tecnologia facilita a produção de animais com genes específicos, bem como animais transgênicos, e/ou animais “humanizados”^(55,60).

Os mecanismos de “entrega” do sistema CRISPR/Cas9 às células, se baseiam em usos de reagentes de transfecção que inserem simultaneamente o sgRNA e a Cas9 em células alvo. A utilização desse mecanismo em laboratório vem provando sua eficácia em diversas linhagens celulares. Conforme a aplicação desejada, os sgRNAs podem ser introduzidos nas células na forma de amplicons de PCR contendo cassetes de expressão, DNA, RNA ou proteínas plasmídicas^(34,61). Todavia, a utilização de plasmídeos é frequentemente associada à integração total ou partes dos mesmos, no genoma do hospedeiro. Avaliando o modo de entrega do sistema CRISPR/Cas9 a célula, alguns mecanismos de entrega foram observados, como o uso de sistemas de entrega viral, onde os vetores virais podem atingir diversas células com grande eficiência, tanto *in vitro* quanto *in vivo*⁽⁵¹⁾.

De acordo com a literatura, o uso de vetores virais vem começando a apresentar alguns resultados que podem beneficiar sua utilização na clínica⁽⁶²⁾. Deste modo, para a utilização do sistema CRISPR/Cas9 na edição em DCVs faz-se necessário avaliações dos potenciais alvos moleculares intrínsecos à doença, considerando que se trata de um grupo de patologias heterogêneas, relacionadas a um conjunto de fatores genéticos, ambientais e comportamentais.

No entanto, apesar das recentes descobertas sobre a eficácia da técnica CRISPR/Cas9, ainda não é possível prever com exatidão a influência da ativação ou inativação de genes em relação ao prognóstico da doença. Todavia, a possibilidade de utilizar uma nova ferramenta molecular em DCVs pode ser estimada e, possivelmente no futuro não distante, beneficiar a população⁽³⁾.

VANTAGENS E DESVANTAGENS DO SISTEMA CRISPR/CAS9

Ensaio clínico envolvendo células hematopoiéticas têm sido anunciados. Esses envolvem a edição genômica *ex vivo* das células de um paciente seguida do transplante dessas células de volta ao corpo do paciente. As aplicações terapêuticas *ex vivo* têm algumas vantagens sobre as aplicações terapêuticas *in vivo*: a entrega de ferramentas de edição de genoma nas células é muito mais simples, há menos risco na edição do genoma em tipos de células não-alvo, e

existe o potencial de separar ou selecionar apenas as células apropriadamente editadas para transplante e, assim, melhorar a eficiência e a segurança da terapia⁽⁵³⁾.

Apesar do avanço alcançado através da técnica CRISPR/Ca9, alguns levantamentos sobre suas vantagens e desvantagens ainda permanecem não elucidados. A respeito das vantagens da técnica, esta consiste na simplicidade do design do alvo, reconhecimento de alvos multiplexados, eficiência em editar diferentes células humanas, além de triagem de regiões não codificadas do DNA⁽⁵²⁾.

Mesmo com a supervalorização da engenharia genética CRISPR/Cas9, essa não possui apenas vantagens, fazendo-se necessária a avaliação das limitações que acompanham esse sistema, como o número limitado de sequências PAM, os efeitos fora do alvo, quando atinge outras áreas do genoma que são sensíveis à indução de DSBs⁽⁶³⁾, bem como o mosaicismos e a presença de alelos múltiplos⁽⁵²⁾.

A endonuclease Cas9 presente na técnica CRISPR/Cas9, assim como outras tecnologias de nucleases programadas, como as ZNFs e TALENs, facilitam a indução de DSBs no DNA alvo em *loci* específicos, e estimulam os mecanismos de reparo endógeno celular, via NHEJ ou HDR. Todavia, a endonuclease Cas9 apresenta vantagens potenciais sobre as demais nucleases, incluindo facilidade de personalização, maior eficiência no direcionamento e capacidade de facilitar a edição do genoma⁽⁵²⁾.

A Cas9 também pode ser utilizada na edição de múltiplos alvos no genoma simultaneamente, utilizando combinação de sgRNAs às células de interesse⁽⁶¹⁾. Em contrapartida, uma das principais limitações com o sistema CRISPR/Cas9 é a necessidade de sequências PAM para direcionar e ligar a nuclease para que ocorram as DSBs⁽⁵²⁾.

CONCLUSÃO

As DCVs são consideradas a principal causa de mortalidade e morbidade no mundo, as quais possuem fatores genéticos intrínsecos ao seu desenvolvimento. Tais fatores vêm sendo editados e suprimidos através do mecanismo de edição genética CRISPR/Cas9. O CRISPR tem revolucionado as áreas de medicina e biologia molecular, proporcionando estudos na edição gênica. A tecnologia tornou possível o estudo em diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas (IPSC's) em cardiomiócitos para análise da compreensão de mecanismos envolvidos em DCVs, assim como proporciona a possibilidade de realizar abordagens *knockout* em genes específicos, a fim de explorar os mecanismos patológicos envolvidos no desenvolvimento dessas patologias.

Embora as descobertas científicas sejam o gerador que impulsiona os pesquisadores, todos devem estar cientes da necessidade de compreender as inviabilidades e riscos de cada técnica utilizada, observando a necessidade de aprimoramentos e adequações metodológicas em pesquisa científica, tendo como pilar a ética e o respeito à vida.

Todavia, o sistema CRISPR se apresenta como uma ferramenta promissora na edição de fatores genéticos associados a diversas doenças, especialmente as DCVs e as entidades mórbidas que contribuem para o seu desenvolvimento. Por ser uma técnica de fácil manipulação, alta especificidade e baixo custo, seu uso possibilita o estudo e controle das doenças crônicas humanas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Grupo de Pesquisa em Patologia Molecular (LPM) da Universidade Federal de Goiás (UFG), por todo apoio e suporte na realização deste estudo.



REFERÊNCIAS

- (1) Pirani N, Khiavi F. 2017. Population Attributable Fraction for Cardiovascular Diseases Risk Factors in Selected Countries: A comparative study. *Mater Socio Medica*. 29 (1): 35.
- (2) Rocha RM, Martins W de A. 2017. Manual de prevenção cardiovascular. 1 ed. Ricardo Mourilhe Rocha W de AM, editor. Rio de Janeiro: SOCERJ - Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro; 5 – 93 p.
- (3) Arend MC, Pereira JO, Markoski MM. 2016. The CRISPR/Cas9 System and the Possibility of Genomic Edition for Cardiology. *Arq Bras Cardiol*. 108 (1): 81–3.
- (4) Organization WH. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. Shanthi Mendis PP and BN. 2011. editor. Vol. 1, World Health Organization. Geneva. 3–155 p.
- (5) Nordestgaard BG. 2016. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 118 (4): 547–63.
- (6) Huang L, Hua Z, Xiao H, Cheng Y, Xu K, Gao Q, et al. 2017. CRISPR/Cas9-mediated *ApoE*^{-/-} and *LDLR*^{-/-} double gene knockout in pigs elevates serum LDL-C and TC levels. *Oncotarget*. 8 (23): 37751–60.
- (7) Kathiresan S, Srivastava D. 2012. Genetics of Human Cardiovascular Disease. *Cell*. 148 (6): 1242–57.
- (8) Manson JE, Bassuk SS. 2015. Biomarkers of cardiovascular disease risk in women. *Metabolism*. 64 (3): S33–9.
- (9) Dittrich J, Beutner F, Teren A, Thiery J, Burkhardt R, Scholz M, et al. 2019. Plasma levels of apolipoproteins C-III, A-IV, and E are independently associated with stable atherosclerotic cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 281: 17–24.
- (10) Schumacher T, Benndorf RA. 2017. ABC Transport Proteins in Cardiovascular Disease—A Brief Summary. *Molecules*. 22 (4): 589.
- (11) Yu X, Qian K, Jiang N, Zheng X, Cayabyab FS, Tang C. 2014. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 428: 82–8.

- (12) Iacocca MA, Wang J, Sarkar S, Dron JS, Lagace T, McIntyre AD, et al. 2018. Whole-Genome Duplication of PCSK9 as a Novel Genetic Mechanism for Severe Familial Hypercholesterolemia. *Can J Cardiol.* 34 (10): 1316–24.
- (13) Marian AJ, Braunwald E. 2017. Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res.* 121 (7): 749–70.
- (14) Sabater-Molina M, Pérez-Sánchez I, Hernández del Rincón JP, Gimeno JR. 2018. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: A review of current state. *Clin Gene.* 93 (1): 3–14.
- (15) Marsiglia JDC, Credidio FL, de Oliveira TGM, Reis RF, Antunes M de O, de Araujo AQ, et al. 2013. Screening of MYH7, MYBPC3, and TNNT2 genes in Brazilian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J.* 166 (4): 775–82.
- (16) Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, Tugrul OF, Lai A, Amr A, Haas J, et al. 2018. Clinical outcomes associated with sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a meta-analysis on 7675 individuals. *Clin Res Cardiol.* 107 (1): 30–41.
- (17) Wang Y, Du X, Zhou Z, Jiang J, Zhang Z, Ye L, et al. 2016. A gain-of-function ACTC1 3'UTR mutation that introduces a miR-139-5p target site may be associated with a dominant familial atrial septal defect. *Sci Rep.* 6 (1): 25404.
- (18) Despond EA, Dawson JF. 2018. Classifying Cardiac Actin Mutations Associated With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Front Physiol.* 9 (April): 1–6.
- (19) Nijak A, Alaerts M, Kuiperi C, Corveleyn A, Suys B, Paelinck B, et al. 2018. Left ventricular non-compaction with Ebstein anomaly attributed to a TPM1 mutation. *Eur J Med Genet.* 61 (1): 8–10.
- (20) Lu X-L, Yao X-L, Yan C-Y, Wan Q-L, Li Y-M. 2016. Functional role of NKX2-5 and Smad6 expression in developing rheumatic heart disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 20 (4): 715–20.
- (21) Van Berlo JH, Aronow BJ, Molkenin JD. 2013. Parsing the Roles of the Transcription Factors GATA-4 and GATA-6 in the Adult Cardiac Hypertrophic Response. Sadayappan S, editor. *PLoS One.* 8 (12): e84591.
- (22) Dixit R, Narasimhan C, Balekundri VI, Agrawal D, Kumar A, Mohapatra B. 2018. Functionally significant, novel GATA4 variants are frequently associated with Tetralogy of Fallot. *Hum Mutat.* 39 (12): 1957–72.
- (23) Steimle JD, Moskowitz IP. 2017. TBX5. In: *Current Topics in Developmental Biology.* p. 195–221.

- (24) Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, Berra K, Bushnell C, Dolor RJ, et al. 2007. Evidence-Based Guidelines for Cardiovascular Disease Prevention in Women: 2007 Update. *Circulation*. 115 (11): 1481–501.
- (25) Organização Mundial de Saúde. OPAS/OMS Brasil - Doenças cardiovasculares. [cited 2018 May 22]. Available from: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839
- (26) Brant LCC, Nascimento BR, Passos VMA, Duncan BB, Bensenõr IJM, Malta DC, et al. 2017. Variações e diferenciais da mortalidade por doença cardiovascular no Brasil e em seus estados, em 1990 e 2015: estimativas do Estudo Carga Global de Doença. *Rev Bras Epidemiol*. 20 (suppl 1): 116–28.
- (27) Sander JD, Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 32 (4): 347–55.
- (28) Doudna JA, Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-). 346 (6213): 1258096–1258096.
- (29) Salsman J, Dellaire G. 2017. Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochem Cell Biol*. 95 (2): 187–201.
- (30) García-Tuñón I, Hernández-Sánchez M, Ordoñez JL, Alonso-Pérez V, Álamo-Quijada M, Benito R, et al. 2017. The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget*. 8 (16): 26027–40.
- (31) Kang H, Minder P, Park MA, Mesquitta W-T, Torbett BE, Slukvin II. 2015. CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective Resistance of Immune Cells to CCR5-tropic HIV-1 Virus. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 4 (12): e268.
- (32) Yin Z, Cai M, Weng X, Liu Z, Zhang G. 2019. Porcine insulin receptor substrate 2 : molecular cloning , tissues distribution , and functions in hepatocyte and aortic endothelial cells. *Pol J Vet Sci*. 22 (3): 589–98.
- (33) Chung JY, Ain QU, Song Y, Yong S-B, Kim Y-H. 2019. Targeted delivery of CRISPR interference system against Fabp4 to white adipocytes ameliorates obesity, inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Genome Res*. 29 (9): 1442–52.
- (34) Nguyen AH, Marsh P, Schmiess-heine L, Burke PJ, Lee A, Lee J. 2019. Cardiac tissue engineering : state-of-the-art methods and outlook 0: 57.

- (35) Martinez-Lage M, Torres-Ruiz R, Rodriguez-Perales S. 2017. CRISPR/Cas9 Technology: Applications and Human Disease Modeling. In: Progress in Molecular Biology and Translational Science. p. 23–48.
- (36) Pan L, Sheng M, Huang Z, Zhu Z, Xu C, Teng L, et al. 2017. Zinc-finger protein 418 overexpression protects against cardiac hypertrophy and fibrosis. Bader M, editor. PLoS One. 12 (10): e0186635.
- (37) Li Y, Yang D, Bai Y, Mo X, Huang W, Yuan W, et al. 2008. ZNF418, a novel human KRAB/C2H2 zinc finger protein, suppresses MAPK signaling pathway. Mol Cell Biochem. 310 (1–2): 141–51.
- (38) Marczenke M, Piccini I, Mengarelli I, Fell J, Röpke A, Seebohm G, et al. 2017. Cardiac subtype-specific modeling of Kv1.5 ion channel deficiency using human pluripotent stem cells. Front Physiol. 8 (Jul): 1–11.
- (39) Dehghani-Samani A, Madreseh-Ghahfarokhi S, Dehghani-Samani. 2019. A. Mutations of voltage-gated ionic channels and risk of severe cardiac arrhythmias. Acta Cardiol Sin. 35 (2): 99–110.
- (40) Wang P, Liu Z, Zhang X, Li J, Sun L, Ju Z, et al. 2018. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout reveals a guardian role of NF- κ B/RelA in maintaining the homeostasis of human vascular cells. Protein Cell. 9 (11): 945–65.
- (41) Karlgren M, Simoff I, Keiser M, Oswald S, Artursson P. 2018. CRISPR-Cas9: A New Addition to the Drug Metabolism and Disposition Tool Box. Drug Metab Dispos. 46 (11): 1776–86.
- (42) Gonçalves GAR, Paiva R de MA. 2017. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. Einstein (São Paulo). 15 (3): 369–75.
- (43) Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol. 60 (2): 174–82.
- (44) Marraffini LA, Sontheimer EJ. 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. Nat Rev Genet. 11 (3): 181–90.
- (45) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science. 337 (6096): 816–21.
- (46) Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. 2018. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. Drug Deliv. 25 (1): 1234–57.

- (47) Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, et al. 2008. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*. 321 (5891): 960–4.
- (48) Wright A V., Nuñez JK, Doudna JA. 2016. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering. *Cell*. 164 (1–2): 29–44.
- (49) Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 13 (11): 722–36.
- (50) Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. 2011. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 9 (6): 467–77.
- (51) Cribbs AP, Perera SMW. 2017. Science and bioethics of CRISPR-CAS9 gene editing: An analysis towards separating facts and fiction. *Yale J Biol Med*. 90 (4): 625–34.
- (52) Motta BM, Pramstaller PP, Hicks AA, Rossini A. 2017. The Impact of CRISPR/Cas9 Technology on Cardiac Research: From Disease Modelling to Therapeutic Approaches. *Stem Cells Int*. 2017: 1–13.
- (53) Musunuru K. 2017. Genome Editing. *J Am Coll Cardiol*. 70 (22): 2808–21.
- (54) Carlos G, Caetano G, Matos HDEOS, Simão CR, Duarte RV, Barreto SA, et al. 2019. Técnica crispr-cas9 e sua utilização na área laboratorial. *Brazilian J Surg Clin Res*. 25 (1): 96–9.
- (55) Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, Nagahora H, Voigt B, Mashimo T. 2016. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun*. 7 (1): 10431.
- (56) Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, et al. 2008. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 26 (7): 808–16.
- (57) Hsu PD, Lander ES, Zhang F. 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 157 (6): 1262–78.
- (58) Ma H, Marti-Gutierrez N, Park S-W, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. 2017. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 548 (7668): 413–9.

- (59) Birling M-C, Herault Y, Pavlovic G. 2017. Modeling human disease in rodents by CRISPR/Cas9 genome editing. *Mamm Genome*. 28 (7–8): 291–301.
- (60) Boel A, De Saffel H, Steyaert W, Callewaert B, De Paepe A, Coucke PJ, et al. 2018. CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair by ssODNs in zebrafish induces complex mutational patterns resulting from genomic integration of repair-template fragments. *Dis Model Mech*. 11 (10): dmm035352.
- (61) Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 8 (11): 2281–308.
- (62) Finer M, Glorioso J. 2017. A brief account of viral vectors and their promise for gene therapy. *Gene Ther*. 24 (1): 1–2.
- (63) Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. 2014. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*. 24 (1): 132–41.