****

**FACULDADES INTEGRADAS DE JAHU**

**CURSO DE BIOMEDICINA**

**O IMPACTO DA TERAPIA GÊNICA NA MEDICINA ATUAL**

**JAÚ**

**2021**

**GABRIELA GRANDESO**

**O IMPACTO DA TERAPIA GÊNICA NA MEDICINA ATUAL**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), apresentado ao curso de Biomedicina, das Faculdades Integradas de Jaú - FIJ, para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação do Prof. Dr. André Luiz Ventura Sávio.

Jaú, 13 de Dezembro de 2021

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. André Luiz Ventura Sávio – Faculdade Integradas de Jaú – Orientador

Prof. Dr. Bruno Evaristo Fantinatti – Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Tanize Faulin – Faculdade Integradas de Jaú

Jaú, 13 de Dezembro de 2021

Dedico esse trabalho a minha mãe, Juliana Rodrigues Grandeso por sempre me apoiar e não medir esforços em minha educação.

 **AGRADECIMENTOS**

 Agradeço a minha família, em particular minha avó, Ana Maria, meus tios, tias e primas.

 Ao meu orientador, por proporcionar conhecimento para a realização deste trabalho.

 Aos laboratórios que me forneceram estágio gerando conhecimento em minha atuação profissional, em especial ao Laboratório de Análises Clínicas André Luís Miotto, por me dar a oportunidade de serviço na área e aos meus colegas de trabalho que me agregaram muita informação.

 Agradeço ao meu namorado e melhor amigo, por dar determinada força para a realização desse trabalho e me apoiar desde o ensino médio até o término dessa graduação.

 Aos meus amigos que nunca mediram esforços em acreditar em meu potencial.

Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!

([Mário Sérgio Cortella](https://www.pensador.com/autor/mario_sergio_cortella/))

**RESUMO**

A biologia molecular obteve grandes avanços no âmbito das modificações no DNA, fato que proporcionou tecnologias inovadoras na atualidade, como: prevenção e tratamento de doenças. A descoberta da possibilidade de fazer modificações no DNA despertou a esperança em encontrar métodos para revolucionar tratamentos. No entanto, questões éticas estão cada vez mais presentes no dia a dia, como: até que ponto é benéfico fazer modificações no DNA humano? O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica com artigos publicados entre 2000 e 2021, nas plataformas Google Scholar, Scielo e Pubmed. Em conclusão, pesquisas envolvendo terapia gênica têm revolucionado tratamentos de doenças (como por exemplo: anemia falciforme, doença cardiovascular e atrofia muscular espinhal), o que melhora a qualidade de vida das pessoas. No entanto, deve haver intenso investimento em Ciência, Tecnologia e Inovação para que sejam desenvolvidas técnicas eficazes, seguras, éticas e financeiramente acessíveis à população.

**Palavras-chave:** edição gênica, terapia gênica, Crispr/Cas9, anemia falciforme, genoma, Zolgensma, AME, ZFN, TALENs, nucleasses

**ABSTRACT**

Molecular biology has made great advances in relation to DNA editing, bringing several innovative technologies to the present, such as the prevention and treatment of disease. The discovery of the possibility of making changes in DNA sparked hope in finding methods to revolutionize treatments. However, ethical questions are increasingly present in everyday life, such as: to what extent is it beneficial to make changes in human DNA? Aiming to investigate the role of gene therapy in medicine, a literature review with articles published between 2000 and 2021, on Google Scholar, Scielo and Pubmed platforms was carried out. In conclusion, research involving gene therapy is revolutionizing disease treatments (such as sickle cell anemia, cardiovascular disease, and spinal muscular atrophy), which improves people's quality of life. However, there must be intense investment in Science, Technology and Innovation in order to develop effective, safe, ethical and financially accessible techniques for the population.

**Keywords:** DNA, gene editing, gene therapy, Crispr/Cas9, sickle cell, genome, Zolgensma, AME, ZFN, TALENs, nucleases

#

# 1. INTRODUÇÃO

A genética compreende toda a diversidade humana, sendo a origem de várias das nossas características pessoais. Interessantemente, toda essa diversidade surge de alterações/mutações no código genético (COSTA, 2019).

Nas últimas décadas houve um aumento em pesquisas no campo científico com isso, gerando novas descobertas para diagnóstico e terapias revolucionárias. Nesse sentido, grande destaque se deve a técnica de edição gênica, a qual consiste, basicamente, em um procedimento em que trechos específicos do DNA são clivados, permitindo sua substituição por novas sequências de genes. O termo “edição” se refere à metáfora da produção de um texto, na qual letras são apagadas para então serem reescritas, pode-se editar o DNA de seres vivos com finalidades diversas: para tratar doenças, criar alimentos transgênicos, melhorar características humanas não patológicas, entre outras finalidades (FURTADO, 2019).

Portanto, a terapia gênica consiste em utilizar de genes que estão alterados ou inativos, para a substituição por genes funcionais, dentre algumas possibilidades de edição estão a recente descoberta do método CRISPR/Cas9 e a técnica muito utilizada, do DNA recombinante (LINDEN, 2010).

O consagrado conceito de “copiar e colar” no DNA vem sendo citado na literatura científica desde a década de 90, esta denominação está diretamente ligada à sua capacidade de alterar o material genético de células germinativas (formadoras dos órgãos reprodutivos) e somáticas (todas as células com exceção das reprodutivas) (LINDEN, 2010).

O processo de edição de DNA ocorre em basicamente em três etapas:

1) Inicialmente é necessário o reconhecimento da área de interesse;

2) Em seguida, ocorre a clivagem do ácido nucleico; e

3) Posteriormente, o mecanismo de reparo celular é ativado para corrigir a clivagem realizada (na etapa 2), com o fragmento de DNA modificado.

Os cinco últimos anos foram importantes no mundo da genética, onde várias terapias que estavam esperando décadas para aprovação foram liberadas, dentre elas estão muitas que envolvem inúmeros tratamentos, salientando que, muitas dessas terapias facilitaram o acesso e desenvolvimento a outros tratamentos (BULAKLAK; GERSBACH, 2020).

Por outro lado, é de suma importância destacar os debates éticos que envolvem a manipulação de material genético humano. Um dos principais pontos levantados se refere aos eventuais danos causados em consequência da manipulação de DNA, o que faz com que essa tecnologia seja utilizada com cautela ou até mesmo não seja utilizada (embriões humanos) (BULAKLAK; GERSBACH, 2020).

Algumas doenças já utilizam a terapia gênica como modo de tratamento, inclusive, testes estão sendo realizados para o tratamento genético da doença anemia falciforme (AF). Essa doença tem como consequência a formação de hemácias em forma de foice, assim, acarretando alguns sintomas como, fadiga, palidez e dores. A hemácia sofre uma mutação do gene beta da globina, fazendo com que o ácido glutâmico seja substituído pela valina, dando a morfologia de foice no eritrócito (IMAGA, 2013).

# 2. OBJETIVOS

## 2.1. Geral

Identificar novas tecnologias de edição genômica, determinar suas aplicações clínicas no uso terapêutico da anemia falciforme a partir de revisão bibliográfica.

## 2.2. Específicos

* Abranger a evolução da edição gênica durante o século XX.
* Dissertar sobre as diversas técnicas de edição já feitas e técnicas que possuem uma melhor qualidade de desempenho
* Evidenciar as terapias gênicas em prol da melhoria de recursos em tratamentos de doenças que ainda não temos determinada solução
* Demonstrar aplicações clínicas da terapia gênica na anemia falciforme
* Demonstrar diversidades na atrofia muscular espinhal e seus tratamentos

# 3. METODOLOGIA

De forma a integrar diversos artigos com relação direta à edição genômica, foram coletados dados de artigos científicos e livros publicados nos últimos 21 anos (2000 a 2021).

O material foi obtido a partir das plataformas, Google Scholar, Scielo e Pubmed e somente foram selecionados para o presente estudo artigos que possuíam as palavras-chaves: edição gênica, terapia gênica, DNA, CRISPR/Cas9, DNA e anemia falciforme. Ao total foram utilizados 29 artigos que atenderam aos critérios de adesão sobre terapia gênica, e anemia falciforme.

# 4. REVISÃO DE LITERATURA

## *4.1. O que é genética?*

A genética é a ciência que abrange o único sentido da biologia molecular, o DNA, que é responsável por alojar dentre várias, a variabilidade dos seres vivos (ARIAS, 2004).

Gregor Johann Mendel é considerado o pai da genética devido sua elucidação de como as características são transmitidas de forma hereditária a partir de ervilhas na década de 60, fazendo diversos experimentos com ervilhas cultivadas em seu próprio jardim. Mendel obteve sucesso com várias ervilhas “puras”, ao perceber as características individuais de cada *Pisum sativum* começou a cruzar as plantas e observar sua hereditariedade, e assim, chegando a conclusão de qual individualidade seria mais relevante, tendo então a primeira lei de Mendel, sobre a dominância, onde um alelo pode cobrir a presença de outro (PEREIRA et al., 2009).

Portanto, Mendel foi a primeira pessoa a descobrir fatos sobre a hereditariedade, dando possibilidades para maiores estudos e pesquisas, tendo um dos principais impactos no mundo genético (ARIAS, 2004).

 Quando falamos sobre genética, falamos de modo subliminar a diversidade humana, sobre quem somos, nossa cor da pele, cor do cabelo e várias outras características pessoais. De modo geral, o mundo é composto de uma ampla gama de culturas e etnias que se misturam e formam diferentes padrões de indivíduos. O entendimento que temos é que, de fato, essa distinção de raças se dá por consequência da genética e suas variações e as mesmas são consequências das mutações, que ocorrem pelas diferentes combinações de alelos provindos da mitose (COSTA, 2019).

Charles Robert Darwin também fez sua tentativa de entender determinada sucessão, reunindo diversas informações de plantas e animais, para sugerir que a seleção artificial poderia explicar sobre a hereditariedade, Darwin afirmou que o organismo produz algumas pequenas unidades de reprodução que tem a capacidade de viajar pelo corpo, visando os órgãos reprodutores que teriam essas pequenas unidades com ampla variedade, assim se juntando e se reproduzindo, formando organismos diferentes (MATHÉ, MATTA, MORENO, 2010).

Enfim, na década de 50, os cientistas Watson, Crick, Wilkins e Franklin obtiveram um grande marco histórico, a descoberta da estrutura do ácido nucleico, conhecido como DNA, utilizando a difração de raios-x para visualizar a estrutura do DNA (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

*4.2. A descoberta do ácido nucleico*

Hoje conhecemos o formato do DNA com suas estruturas adeptas ao mesmo. Em meados de 1969, Johann Friedrich Miescher, indagou uma substância ácida encontrada em uma amostra de pus, que a nomeou de nucleína, por provinda do núcleo dos glóbulos brancos que estavam presentes no pus, e logo, Richard Altmann, em 1889 sustentou a tese de Johann sobre a matéria ácida, assim classificou como ácido nucleico. (O modelo de DNA e a Biologia Molecular: inserção histórica para o ensino de Biologia, 2009).

De fato, o grande interesse em aprofundar o conhecimento sobre o material genético começou logo após a segunda guerra mundial, principalmente em um congresso organizado pela Sociedade Experimental de Biologia, em Cambridge (1946). Durante o evento grandes dúvidas foram desencadeadas o que fez despertar a necessidade de novos estudos. (O modelo de DNA e a Biologia Molecular: inserção histórica para o ensino de Biologia, 2009).

Naquela ocasião, Astbury (1898-1961), que era físico e também biólogo, já apresentava suas ideias de que as sequências das bases do DNA eram determinadas por arranjos químicos, ou geométricos ou, ainda, a combinação de ambos. Ele utilizava a difração de Raios-X para obter as imagens de moléculas de DNA e, por meio dessa técnica, propôs como seria a estrutura dos nucleotídeos com suas distâncias e ângulos. Watson, Crick, Wilkins e Franklin também tiveram suas colaborações para a descoberta da estrutura do DNA. Apesar de seu trabalho não ter sido suficiente para elaborar um modelo, Astbury apresentou diagramas construídos que mostravam um empilhamento de nucleotídeos, contribuindo para que outros cientistas trabalhassem em seus modelos tridimensionais do DNA (O modelo de DNA e a Biologia Molecular: inserção histórica para o ensino de Biologia, 2009).

A descoberta da estrutura do DNA, no entanto, veio por meio de James D. Watson e Francis H. Crick, publicado na revista *Nature* em 25 de abril de 1953, apesar de sua publicação a sociedade do ter ocorrido na década de 50, existem relatos que descrevem o DNA como material genético surgiram um tanto antes, em 1880 já se ouvia falar sobre o núcleo como sucessão da cromatina que era responsável por constituir o material genético. (SCHEID; FERRARI; DELIZOICOV, 2005)

A descoberta da estrutura foi indicada como uma das mais significantes descobertas científicas, ficando atrás apenas para o livro de Darwin e estudos de Mendel. Dessa forma, James e Francis foram prestigiados com o prêmio Nobel de medicina junto com seu parceiro Maurice H. F. Wilkins, em 1962. É importante destacar as contribuições Rosalind E. Franklin, que exercia seu cargo profissionalmente no mesmo instituto que Wilkins, e apenas foi citada no prêmio Nobel. Atualmente, todos os três reconhecem a importância de Rosalind em seus livros, porém ela obteve muito pouco reconhecimento na época, provavelmente pelos preconceitos que eram maiores do que a atualidade, muitos outros fatores podem ter influenciado também na pouca autenticação de Rosalind, que fez uma enorme contribuição (ARIAS, 2004).

## *4.3. A estrutura do DNA*

O DNA é constituído de diversos monômeros designados como nucleotídeos, estes nucleotídeos são formados por um açúcar, um ácido fosfórico que é agregado de forma covalente e uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas podem ser divididas em dois subtipos, as pirimidinas, citosina (C), timina (T) e as purinas, adenina (A) e guanina (G), (RIBEIRO, 2009).

O açúcar é titulado como uma pentose, a 2-desoxirribose estipula uma ligação glicosídica entre o carbono 1’ e o nitrogênio 1’ das pirimidinas ou o nitrogênio 9’ das purinas, portanto uma ligação, o ácido fosfórico quando se liga ao carbono 5’ da pentose através de uma ligação éster, uma ligação entre o grupo hidroxila e o hidrogênio, devido a várias ligações químicas que ocorrem, temos então os nucleotídeos. Todavia o código genético é universal, o que faz com que o DNA seja equivalente entre suas sequências de base, sendo que sua sequência de códons composta por aminoácidos, juntos em suas trincas, seja correspondente a suas proteínas (RIBEIRO, 2009).



Figura 1. Estrutura do DNA. Fonte: (SANTOS, 2021)

## *4.4. O que são doenças genéticas?*

Doenças genéticas são alterações que ocorrem em alguns *locus* do DNA, elas podem ser herdadas de outras gerações ou podem também serem desenvolvidas ao longo da vida do indivíduo por algum gatilho desencadeado, como, a exposição a luz solar, substâncias químicas, tabagismo, radiação. Nossos genes determinam quem somos, nossa forma de crescimento e desenvolvimento e até mesmo algumas características que carregamos de nossos pais (NAOUM, 2009).

Existem, basicamente, várias maneiras de apresentar alterações nos cromossomos. Alguns desses defeitos podem ser provindos de doenças genéticas autossômicas recessivas, que dependem de duas cópias do gene defeituoso para ocorrer o desencadeamento da doença, diferente das autossômicas dominantes, que apenas uma cópia danificada, sendo o suficiente para causar a doença. Há também as doenças ligadas ao cromossomo sexual X, onde a maior parte dos afetados são homens, devido a apenas seu único cromossomo X ser defeituoso e também as doenças referentes ao cromossomo sexual Y, como a síndrome do duplo Y, afetando apenas os homens, citando também as mutações que ocorrem por fatores externos do meio ambiente e entre outros acometimentos, e são denominadas como poligênicas ou também multifatoriais. (NAOUM, 2009)

Observando diversas situações referentes a doenças genéticas, temos a anemia falciforme, uma doença de caráter hereditário, ou seja, levada de geração a geração. Sua alteração se baseia no formato do eritrócito, sendo semelhante a uma foice, isso se dá pela alteração na hemoglobina, um eritrócito normal é chamado de hemoglobina A (HbA), pessoas que são acometidas pela anemia falciforme possuem a hemoglobina s (HbS) (IMAGA, 2013).

## *4.5. Tratamentos de doenças genéticas*

Doenças de origem genética podem interferir diretamente na qualidade de vida do próprio indivíduo e dos seus familiares, os quais possuem diversas dúvidas sobre essa condição. Nesse contexto, há diversos incentivos para a integração das doenças genéticas raras no Sistema Único de Saúde (SUS), porém determinado incentivo ainda é insuficiente, principalmente pelo fato de que a clínica médica em genética é recente no Brasil. De fato, essa abordagem foi instaurada pela primeira vez na Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto (Hospital das clínicas de Ribeirão Preto), em 1977 (IRIART et al., 2019).

Recentemente, em meados de 2014 houve um grande avanço nessa área, pois esse tema foi integrado ao SUS, a partir da publicação da Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras (PNAIPDR). Com isso, houve investimento destinado a centros de referência que realizam testes genéticos, melhoria no fornecimento de medicamentos e ajuda no acompanhamento de tratamentos genéticos (IRIART et al., 2019).

Portanto, a terapia gênica se tornou um tratamento inovador para as doenças de caráter genético, outros métodos são utilizados para a melhoria na qualidade de vida dos indivíduos que são afetados por doenças genéticas como a anemia falciforme, que seu tratamento inclui medicamentos e transfusões sanguíneas, a hemofilia que tem seu tratamento baseado em aplicações para manter a hemostasia sanguínea, a fibrose cística onde o paciente necessita de fisioterapia respiratória e também o uso de medicamentos (MENCK, VENTURA, 2007)

## *4.6 Surgimento da terapia gênica*

Em meados de 1944 um trabalho publicado já insinuava que era plausível a mutação dos genes fazendo a transferência de cepas bacterianas, feito por Oswald T. Avery, levando em consideração que essa observação veio logo após a teoria da dupla hélice. Quando ocorreu o progresso do isolamento do primeiro gene feito por Jon Beckwith em 1969, consequentemente trouxe junto com a evolução questões éticas sobre a edição do DNA e sua segurança em prática resultando nas determinadas leis que temos hoje em relação a manipulação de genes (MENCK; VENTURA, 2007).

O conceito de terapia gênica surgiu na década de 60 e 70, após a publicação do artigo “Terapia genética chamada ciência para a doença genética humana?” Pelos cientistas Theodore Friedmann e Richard Roblin em 1972. Esses autores citaram a recomendação de Stanfield Roger em 1970, sobre a possibilidade de um DNA com sequência saudável ser substituído por um DNA defeituoso (SGANZERLA; PESSINI, 2020).

Anos depois, uma paciente de quatro anos foi a primeira pessoa a ser tratada com a terapia gênica no centro de NIH em 1990 que era portadora da Deficiência de adenosina deaminase (ADA), doença ligada ao sistema imunológico. Esse avanço foi possível porque 1985 o Dr. W. Francês Anderson e colaboradores começaram a estudar terapias para tratar portadores de ADA por meio de retrovírus (SCOLLAY, 2001).

## *4.7. Terapia gênica*

Ao longo do século XX, a possibilidade de se manipular o DNA humano causou amplo espanto e medo. Um fato que contribuiu para essa sensação foi, o trabalho de pesquisa Ian Wilmut e Keith Campbel, o qual originou o primeiro clone genético, a ovelha Dolly, e em paralelo os questionamentos sobre a ética na manipulação do DNA (SGANZERLA; PESSINI, 2020).

LINDEN (2010) se referiu a terapia gênica como uma introdução de genes saudáveis em locais do DNA onde estão danificados, utilizando a técnica do DNA recombinante. Determinados estudos já apresentam a grande capacidade de tratamento por meio dessa medida terapêutica, fato que permitiu evidenciar riscos e prever fatores que favorecem a segurança do uso terapêutico. É importante destacar que como qualquer novo estudo são realizados testes pré-clínicos, começando com a fase 1, testando a segurança para o determinado uso e subsequentemente, toda a questão da segurança é abordada em todas as demais fases.

Para exercer determinada terapia, envolvendo seres vivos, quaisquer estudos são necessários a apresentação ao comitê de ética local e logo seu aval, no Brasil a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) é responsável por todos os projetos de terapia gênica que são desenvolvidos em solo brasileiro, infelizmente o Brasil não possui posse de uma regulamentação voltada para terapia gênica, diferente de outros países que possuem um, compreendendo a urgência para a elaboração de uma regulamentação  evitando o uso inadequado da terapia gênica (LINDEN, 2010).

A seguir serão apresentadas as principais técnicas de terapia gênica utilizadas: ZFN, TALENS, Crispr/Cas9.

### *4.7.1. Zinc-finger nucleases (ZFN)*

A tecnologia ZFN (*zinc-finger nucleases*) é composta com personalizações de proteínas que reconhecem e clivam a dupla fita de DNA nos locais específicos, as ZFNs são proteínas quiméricas que se combinam com proteínas denominadas ZFP (*zinc finger proteins*) com endonucleases e com o domínio de clivagem de uma enzima de restrição FokI (Figura 2). As ZFNs compreendem uma estrutura que é composta por um domínio que rompe o DNA, a atividade de nuclease, e uma propriedade de ligação ao DNA com a presença de átomos de zinco (LAITY; LEE; WRIGHT, 2001).

Para ocorrer a devida ligação ao DNA, é necessário a utilização de 3 a 6 proteínas ZFP que são ligadas em sequência, assim as ZFNs são alteradas, assim reconhecendo uma sequência específica da fita de DNA alvo e logo esbarrando nessa sequência se ligam e a porção nucleases faz clivagem da região. Tem muita eficácia na realização do silenciamento genético, também conhecido pelo nome de *knockout*, que é determinado a partir do reparo da união terminal não homologada, como pelo reparo na direcionado na homologia e pela introdução ou correção de genes modificados (LAITY; LEE; WRIGHT, 2001).



Figura 2. Mecanismo zinc-finger nucleases. Fonte: (VIEGAS, [2015-2021])

### *4.7.2. TALENs*

*Transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) tem seu método realizado devido ao reconhecimento da região do DNA que é feito pelas proteínas TALE, uma família de proteínas do tipo III efetoras, provindas da bactéria *Xanthomonas*sp (Figura 3) (VIEGAS, [2015-2021).

Os efetores de transcrição que são do tipo ativadores, são simples de manusear, inseridos em vetores plasmidiais, ao entrar no núcleo se ligam em sequências específicas nos agentes da célula hospedeira, e começam a transcrição, a sua direção é estipulada no domínio do centro, onde originam 32 a 35 aminoácidos iguais (CERMAK et al., 2011).

A TALEN pode proporcionar como a forma de união terminal e não homologa, e o reparo direcionado por homologia, podendo gerar alterações por sua parada instantânea devido a edição de códons de parada, que podem ocasionar inserções e deleções de sequências amplas do DNA (CERMAK et al., 2011).



Figura 3. Mecanismo transcription activador-like effecter nucleases. Fonte: (VIEGAS, [2015-2021])

### *4.7.3. CRISPR/Cas9*

Em tempos de evolução tecnológica, ocorreu a descoberta do sistema CRISPR/Cas9 que trouxe um grande entusiasmo ao mundo científico, dando grandes esperanças de inovações para os pesquisadores e de outro lado, trazendo à tona questões éticas sobre a manipulação em DNA humano (SGANZERLA; PESSINI, 2020).

Tudo começou em meados dos anos 80, quando Yoshizumi Ishino e alguns colaboradores da Universidade de Osaka, encontraram uma região *genômica* comum padrão incomum e função desconhecida no material genético da bactéria *Escherichia coli*. Essa região era composta por *sequências de DNA repetidas, intercaladas e espaçadas*. Posteriormente essa região foi denominada de acordo com essa característica: *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats Associated*, ou seja, na sigla *CRISPR* (SGANZERLA; PESSINI, 2020).

Os estudos mostraram que essa região genômica das bactérias (como na *E. coli*) vieram de vírus, ou seja, tinham origem extracromossômica. Curiosamente, bactérias com essas sequências extracromossômicas não eram infectadas por vírus (BOLOTIN et al., 2005). Concluiu-se então que, as bactérias que sobreviviam a uma invasão viral “guardavam” parte do material genético do vírus em seu próprio genoma para que em uma nova invasão elas pudessem cortar o DNA viral invasor antes que ela morresse. Esse mecanismo pode ser entendido com uma resposta imunológica primitiva (BOLOTIN et al., 2005).

Na prática, após uma nova invasão, essas regiões chamadas CRISPR transcrevem o RNA CRISPR (crRNA), o qual se liga a sequências específicas do material genético do invasor (por ex: vírus), e em seguida, guia a proteína Cas para clivagem do material genético impedindo a sua replicação (SOKOLOWSKEI, 2019).

No caso da edição de DNA, essa técnica ocorre da seguinte forma: o RNA transcrito possui a sequência exata do gene de interesse, por exemplo, um gene defeituoso. Após o reconhecimento do alvo, a proteína Cas9 realiza o corte, o organismo humano dá início ao processo de reparo fisiológico, para fazer a correção. Além disso, pode ser inserido uma nova sequência de DNA para gerar uma nova característica genética (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2016).



Figura 4. Mecanismo sistema crispr/cas9. Fonte: (FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2020)

Portanto, estudos já apresentam a utilização da técnica CRISPR, como na doença cardiovascular (DCV), que é baseada em estudos aprofundados sobre potenciais alvos moleculares que são envolvidos com a doença, laboratórios já praticam a pesquisa para modificar genes que estão envolvidos com a DCV (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2016).

Um grupo de pesquisadores, em concomitância à aplicação de terapias

alternativas, como a celular e gênica, para tratamento de DCV, está desenvolvendo um estudo pré-clínico que visa a promoção da angiogênese, por meio da expressão exógena (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2016).

 Nesse cenário, um plasmídeo portador do cDNA pertinente ao fator de crescimento endotelial vascular em pacientes portadores da angina refratária, que é uma condição crônica causada pela presença de uma angina causada por insuficiência coronariana na presença de doença arterial coronária (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2016). Esses pontos apresentam que a técnica é segura e aprimora a fração de ejeção ventricular, a concentração no estudo para a DCV, cardiomiopatía dilatada (CMD) e cardiopatías isquêmicas, em parceria com pesquisadores do instituto do câncer utilizando o método CRISPR/Cas9 para a inativação da função de uma quinase tecido-específica, que é codificada pelo gene TNNI3K, interagindo com a troponina cardíaca e quando aumentada, levando o processo da CMD e por consequência a insuficiência cardíaca (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2016).

## 4.8. Atrofia muscular espinhal e terapia gênica

A atrofia muscular espinhal (AME) é uma doença neurológica que quebra os neurônios motores, ou seja, células são responsáveis pelas atividades motoras dos músculos, como andar, respirar, falar e engolir (RIERA; BAGATTINI; PACHITO, 2019).

O novo medicamento Zolgensma, é utilizado para o tratamento da AME, promovido em 2019 pela farmacêutica Novartis, que comprou o laboratório AveXis, o real criador do medicamento. Grandes debates surgiram ao redor do valor atual do medicamento que ficou conhecido no país por originar grandes campanhas de arrecadação na internet, outro fundamento para o preço alto é por estar diretamente relacionado com o tratamento de uma doença rara (RIERA; BAGATTINI; PACHITO, 2019).

O princípio ativo do medicamento Zolgensma é a substância chamada onasemnogene abeparvovec, a ação desse composto é possível pois ele contém uma cópia do gene SMN1 (gene que desencadeia a AME) em sua formulação, quando o medicamento entra em contato com o organismo do indivíduo e atinge sua musculatura, assim fornecendo o gene necessário para produzir a proteína SMN, a mesma proteína é responsável por garantir a conservação dos neurônios motores, que executam os impulsos nervosos para os órgãos efetores, dando respostas aos estímulos(RIERA; BAGATTINI; PACHITO, 2019). O medicamento é baseado na terapia genética de vírus adeno-associado (AAV) substituindo o gene SMN1 defeituoso ou ausente para interromper a progressão da doença (RIERA; BAGATTINI; PACHITO, 2019).

De forma geral o medicamento reconstitui a função nervosa do indivíduo que foi afetado pela AME, uma vez que fornecendo a cópia do gene que está com defeito ou ausente, desencadeando a atrofia muscular espinhal, porém o mesmo não consegue reverter os danos já causados nos neurônios, sendo apenas um tratamento para que não ocorra mais degeneração ou corte os danos que estão sendo causados (RIERA; BAGATTINI; PACHITO, 2019).

## 4.9. Anemia falciforme

A anemia falciforme (AF) é originada por uma mutação no gene da betaglobina (*HBB*), assim o ácido glutâmico é deslocado pela valina na posição seis da extremidade N-terminal da cadeia beta a qual resulta na formação de uma hemoglobina mutante (HbS) capaz de alterar a forma da hemácia(SOUZA; ROSA; SOUZA, 2016).A alteração morfológica para o formato de foice (também chamado de drepanócito), ocorre, no entanto, quando a hemácia com hemoglobina mutante está na etapa de desoxigenação, assim as mesmas não conseguem ter a capacidade de cumprir suas funções no organismo, estas não conseguem fluir na circulação sanguínea normalmente, acarretando em oclusão do fluxo ou sua própria destruição prévia (SOUZA; ROSA; SOUZA, 2016).

A AF é uma doença de origem genética que tem uma alta incidência na sociedade brasileira, ocorrendo predominantemente em afrodescendentes, devido sua desoxigenação ocorrem algumas consequências que podem acarretar complicações na qualidade de vida, resultando também em menor expectativa de vida, algumas terapias curativas para anemia falciforme, como o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico tendem a aumentar a qualidade de vida (IMAGA, 2013).

Para diagnosticar a AF é feita análise da hemoglobina pelo método de cromatografia líquida, eletroforese ou focalização isoelétrica, foi incorporado em 2001 no brasil a triagem neonatal pela busca hemoglobinopatias tem sido uma das maiores causas de detecção precoce da presença de AF (HOBAN; ORKIN; BAUER, 2016).

### 4.9.1 Aplicações da terapia gênica na anemia falciforme

Em tempos atuais o único tratamento para a AF são doações de células troncos hematopoiéticas, que são feitas por um doador saudável. A busca por meios alternativos para a cura da AF é constante, pois a compatibilidade dos doadores de células troncos é escassa (SOUZA; ROSA; SOUZA, 2016).

No Brasil, o hospital Albert Einstein conta com um projeto que visa um tratamento de terapia gênica para a anemia falciforme, que utiliza o método CRISPR/Cas9, tendo em vista que o único tratamento hoje disponível é o transplante halogênico de células-tronco hematopoiéticas, porém, a escassez de doadores compatíveis e os riscos do transplante halogênico colocam limites em seu uso, sendo necessário necessárias novas alternativas para a cura de pacientes com anemia falciforme (Hospitais PROADI-SUS, [ 2018 – 2020]).

“Edição gênica com CRISPR/Cas9: utilizaremos um single guide RNA sintético que tem como alvo a região da mutação pontual no éxon 1 do gene *HBB* em complexo com uma ribonucleoproteína (RNP) Cas9 de alta fidelidade. O complexo RNP Cas9-sgRNA será nucleoporado em células tronco hematopoiéticas (CTPH), e a sequência contendo a região de homologia para reparo será inserida via transdução de um vírus adeno-associado (AAV).” (Hospitais PROADI-SUS, [ 2018 – 2020])”

Um dos pontos importantes a citar é a utilização das células tronco do próprio paciente, que exclui problemas relacionados ao transplante halogênico, segundo definição do hospital, os próximos passos para o projeto são o aperfeiçoamento da técnica e disponibilizar seu manuseio em ambientes de boas práticas em manufatura, e que consequentemente permitirá a aplicação em pacientes afetados pela AF, o projeto visa colaborar com o sistema único de saúde (SUS), visando que a anemia falciforme atinge populações mais vulneráveis e dependentes do SUS, aprimorando a técnica de terapia gênica portas para a implementação eficiente no país a custos mais baixos vão se abrir, permitindo que diversas pessoas com problemas econômicos tenham acesso a terapia. (Hospitais PROADI-SUS, [ 2018 – 2020]).

# 5. CONCLUSÃO

 A edição gênica junto com a terapia genética, vem nas últimas décadas avançando de forma crescente em prol da humanidade e de tratamentos precoces para doenças, de toda forma, é um método ainda muito restrito que pode trazer também muitos malefícios quando usado de forma a não cumprir segmentos éticos, e de outro lado, em que pode ser muito bem desenvolvida e significativa, diversas técnicas de terapia gênica estão sendo desenvolvidas com prol da melhoria de tratamentos, como a CRISPR/Cas9, recém descoberta e que vem sendo umas das principais técnicas no mundo da edição gênica.

 A AF é uma doença que acomete principalmente indivíduos afrodescendentes, muito comum no Brasil, não existe uma cura para a AF por hora, mas alguns tratamentos que melhoram a qualidade de vida dos portadores, estudos estão sendo realizados a partir da técnica CRISPR/Cas9 para corrigir a mutação que se dá pela anemia falciforme para descobrir uma possível cura.

 A AME é uma doença neurodegenerativa que acomete o sistema nervoso. Os avanços genéticos dos últimos anos trouxeram possibilidade tratamento melhoria da qualidade de vida do portador da atrofia muscular espinhal, o Zolgensma é um medicamento no qual possibilita o tratamento do indivíduo afetado, entretanto seu alto custo que chega aproximadamente em 2 bilhões de reais, delimita seu acesso a famílias mais carentes.

 Diante de determinados fatores é benéfico a pesquisa de novos métodos de terapia gênica em prol de tratamentos, todavia muitos anos de pesquisa serão necessários para a criação de um método que seja acessível a toda população.

# 6. REFERÊNCIAS

AREND, M. C.; PEREIRA, J. O.; MARKOSKI, M. M. The CRISPR/Cas9 System and the Possibility of Genomic Edition for Cardiology. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2016.

ARIAS, G. Etapas de um grande avanço científico. p. 38, 2004.

BOLOTIN, A. et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 1 ago. 2005.

BULAKLAK, K.; GERSBACH, C. A. The once and future gene therapy. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5820, dez. 2020.

CERMAK, T. et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Research, v. 39, n. 12, p. e82–e82, jul. 2011.

COSTA, C. P. F. ENSINO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO PARA ENTENDIMENTO DA DIVERSIDADE. p. 101, 2019.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. EDIÇÃO DE GENES – Crispr-Cas9. Disponível em: <https://spdbcfmusp.wordpress.com/2020/02/11/edicao-de-genes-crispr-cas9/> Acesso em: Nov/2021

FURTADO, R. N. Edição genética: riscos e benefícios da modificação do DNA humano. **Revista Bioética**, v. 27, n. 2, p. 223–233, jun. 2019.

GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. DE M. A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (São Paulo)**, v. 15, n. 3, p. 369–375, set. 2017.

HOBAN MD, Orkin SH, Bauer DE. **Tratamento genético de uma doença molecular: abordagens da terapia gênica na doença falciforme**. *Sangue* . 2016; 127 (7): 839-848. doi: 10.1182 / blood-2015-09-618587

Hospitais PROADI-SUS- **Tratamento inovador para Anemia Falciforme - uma doença negligenciada de alta relevância social**, 2018-*2020*. Disponível em: < https://hospitais.proadi-sus.org.br/projetos/17/anemia-falciforme>. Acesso em: Jul/2021.

IMAGA, N. A. Phytomedicines and Nutraceuticals: Alternative Therapeutics for Sickle Cell Anemia. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

IRIART, J. A. B. et al. Da busca pelo diagnóstico às incertezas do tratamento: desafios do cuidado para as doenças genéticas raras no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 10, p. 3637–3650, out. 2019.

LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 1, p. 39–46, fev. 2001.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 31–69, 2010.

MATHÉ, B.C.B. MATTA, B. P. MORENO, P.G. **Genética Básica**. 2 eds. Rio de Janeiro, Mangueira, 2010

MENCK, C. F. M.; VENTURA, A. M. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. **Revista USP**, v. 0, n. 75, p. 50, 1 nov. 2007.

NAOUM, P. C. O DNA DAS DOENÇAS HEREDITÁRIAS. p. 17, 2009.

O modelo de DNA e a Biologia Molecular: inserção histórica para o ensino de Biologia. v. 4, p. 27, 2009.

PEREIRA, J. et al. AS LEIS DA HERANÇA POR GREGOR JOHANN MENDEL, UMA REVOLUÇÃO GENÉTICA. p. 6, 2009.

RIBEIRO, M.C.M. **Genética Molecular**. 1 ed. Santa Catarina, Florianópolis, 2009

RIERA, R.; BAGATTINI, Â. M.; PACHITO, D. Eficácia, segurança e aspectos regulatórios dos medicamentos órfãos para doenças raras: o caso Zolgensma®. **CADERNOS IBERO-AMERICANOS DE DIREITO SANITÁRIO**, v. 8, n. 3, p. 48–59, 24 set. 2019.

SANTOS, Vanessa Sardinha dos. "DNA"; *Brasil Escola*. Disponível em: https://brasilescola.uol.com.br/biologia/dna.htm. Acesso em 05 de outubro de 2021.

SCHEID, N. M. J.; FERRARI, N.; DELIZOICOV, D. A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA. **Ciência & Educação (Bauru)**, v. 11, n. 2, p. 223–233, ago. 2005.

SCOLLAY, R. Gene Therapy. A Brief Overview of the Past, Present, and Future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 953a, n. 1 NEW VISTAS IN, p. 26–30, dez. 2001.

SGANZERLA, A.; PESSINI, L. Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas. **Saúde em Debate**, v. 44, n. 125, p. 527–540, jun. 2020.

SOKOLOWSKEI, D. CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA. p. 29. 2019.

SOUZA, J. M.; ROSA, P. E. L.; SOUZA, R. L. FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME. p. 18, 2016.

VIEGAS, A. C. AS CARACTERÍSTICAS DOS MECANISMOS E SISTEMAS DE EDIÇÃO GENÔMICA. p. 14, ([2015- 2021]).