

# O sistema CRISPR/Cas9 e o potencial para a talassemia beta

## *The CRISPR/Cas9 system and the potential for beta-thalassemia*

Beatriz Bonvicini Serpeloni,<sup>1</sup> Luíza Nayara Monção de Oliveira,<sup>1</sup> Bruno Damiano,<sup>1</sup> Luis Antonio Peroni,<sup>1</sup> Patricia Ucelli Simioni<sup>1</sup>

### RESUMO

A Beta-talassemia *major* é uma hemoglobinopatia caracterizada por herança mendeliana haplo-insuficiente recessiva, sendo considerada a forma mais grave das talassemias. Os portadores dependem de transfusões sanguíneas regulares e podem desenvolver problemas futuros devido ao acúmulo de ferro ocasionado pelas transfusões. O objetivo do estudo é apresentar uma revisão e novos *insights* sobre o sistema CRISPR/Cas9 na edição de sequências genéticas e sua potencial aplicação na terapia gênica para portadores de hemoglobinopatias, em especial a talassemia beta, que é caracterizada por distúrbios moleculares associados à deficiência acentuada da produção de cadeias beta da hemoglobina. Essa alteração reflete em uma síntese reduzida de hemoglobina que é tratada, atualmente, com transfusão sanguínea regular. O CRISPR associado à Cas9 e ao RNA guia formam um complexo capaz de reconhecer uma região específica do DNA e removê-la do genoma. Esse sistema tem sido modelado por pesquisadores para atuar em sítios direcionados no DNA com o intuito de reparar genes mutados. A terapia gênica com o CRISPR/Cas9 para a talassemia beta consiste em silenciar o gene BCL11A e estimular a produção de hemoglobina fetal, resultando em uma independência de transfusão sanguínea pelos portadores.

**Palavras-chave:** Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas; Doenças Genéticas Inatas; Talassemia beta; Terapia Genética; Hemoglobinopatias.

### ABSTRACT

Beta-thalassemia major is a hemoglobinopathy characterized by a recessive haplo-insufficient mendelian inheritance, being considered the most severe form of thalassemias. Carriers depend on regular blood transfusions and may develop future problems due to the subsequent iron accumulation. The aim of this study is to present a review and new insights into the CRISPR/Cas9 system in the editing of genetic sequences and its potential application in gene therapy for patients with hemoglobinopathies, especially beta thalassemia, which is characterized by molecular disorders associated with marked deficiency on the hemoglobin beta chain production. This change reflects in a reduced synthesis of hemoglobin that is currently treated with regular blood transfusion. CRISPR associated with Cas9 and guide-RNA form a complex, which is capable of recognizing a specific region of DNA and of removing it from the genome. This system has been modeled by researchers to act on targeted sites in DNA, in order to repair mutated genes. Gene therapy with CRISPR/Cas9 for beta thalassemia is still under study and analysis, consists of silencing the BCL11A gene and stimulating fetal hemoglobin production, resulting in an independence of blood transfusion by its carriers.

**Keywords:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; Genetic Diseases, Inborn; beta-Thalassemia; Genetic Therapy; Hemoglobinopathies.

### INTRODUÇÃO

O complexo CRISPR, sigla do inglês para repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas, é conhecido inicialmente por promover a imunidade adaptativa contra ácidos nucleicos exógenos nas bactérias.<sup>1</sup>

É constituído por sequências altamente variáveis que captam material genético de plasmídeos invasores e de bacteriófagos, desenvolvendo uma imunidade herdada que passará a ser codificada em DNA no decorrer do tempo.

<sup>1</sup>Faculdade de Americana (FAM) - Americana (SP), Brasil.

Autor correspondente: Luíza Nayara Monção de Oliveira - Faculdade de Americana (FAM) - Av. Joaquim Bôer, 733 - Jardim Luciane, Americana (SP), Brasil. CEP.:13477-360

E-mail: luiza01nayara@gmail.com

Recebido em 19/01/2022 - Aceito para publicação em 25/08/2022.



## INTRODUÇÃO

O complexo CRISPR, sigla em inglês para repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas, é conhecido, inicialmente, por promover a imunidade adaptativa contra ácidos nucleicos exógenos nas bactérias.<sup>1</sup> É constituído por sequências altamente variáveis que captam material genético de plasmídeos invasores e de bacteriófagos, desenvolvendo uma imunidade herdada que pasará a ser codificada em DNA no decorrer do tempo.<sup>1</sup>

Mediante estudos envolvendo as bactérias *Streptococcus pyogenes*, houve a descoberta do CRISPR/Cas9 do tipo II que, posteriormente, foi adaptado para editar sequências genéticas. A Cas9 possui uma região rica em arginina, responsável por mediar a ligação dos ácidos nucleicos.<sup>2</sup>

O RNA guia atua direcionando a sequência alvo após ser inserido na célula desejada junto à Cas9 que, em seguida, faz o reconhecimento da sequência específica do DNA. E, só então, permite que a Cas9 clive o sítio de interesse no genoma, proporcionando também a inserção de uma nova sequência desejada através da recombinação homóloga.<sup>3</sup>

Equiparado aos mecanismos convencionais de edição gênica, que aplicam vírus como fonte do material genético a ser inserido no genoma, o CRISPR/Cas9 pode realizar alterações direcionadas e precisas no DNA de células vivas; e tem sido promissor para atuar como terapia gênica em indivíduos portadores de hemoglobinopatias.<sup>4</sup>

A fim de que a sobrevida de pacientes portadores de talassemia beta seja garantida, são necessárias transfusões sanguíneas regulares, com a finalidade de manter os níveis de hemoglobina adequados e reduzir as deformidades ósseas.<sup>5</sup>

O propósito da terapia gênica é expandir a produção de hemoglobina fetal, isolando as células-tronco dos pacientes a partir do sangue periférico. Em seguida, o CRISPR/Cas9 atua silenciando o gene BCL11A, modificando as células e causando o aumento da produção de hemoglobina fetal.

As células que foram editadas são, então, transfundidas para o paciente após passarem pelo condicionamento mieloablativo da medula óssea, promovendo a reposição das hemoglobinas funcionais e a substituição das hemoglobinas defeituosas.<sup>4</sup>

A hemoglobina fetal é produzida no período pré-natal, cerca de dois a seis meses do período de gestação, e tende a ter uma maior afinidade com o oxigênio quando comparada à hemoglobina adulta. Durante os primeiros meses de vida após o nascimento essa produção cessa, prevalecendo a síntese de hemoglobina beta-globina.

A Beta-talassemia *major* é a forma mais grave das talassemias, provoca uma anemia intensa e causa uma dependência regular de transfusões sanguíneas, a cada duas ou quatro semanas desde os primeiros meses de vida, levando a complicações devido à sobrecarga de ferro.<sup>6,7</sup>

A partir dessas informações e associado ao conhecimento sobre a severidade da talassemia beta, o objetivo do estudo visa descrever os conhecimentos atuais sobre a participação

do CRISPR/Cas9 como uma possibilidade de terapia gênica para correção gênica e sua aplicação nas edições de sequências genéticas.

## METODOLOGIA

O presente estudo é uma revisão sistemática e, para atingir o objetivo proposto, foram realizadas buscas em três bases de dados: Pubmed, Elsevier e Scielo, entre agosto e janeiro de 2020.

Patrocinada pela *Vertex Pharmaceuticals Incorporated*, a *CRISPR Therapeutics* selecionou 30 participantes de 12 a 35 anos, dos sexos masculino e feminino, com critério chave de inclusão: diagnóstico de talassemia beta, dependente de transfusão definido por talassemia beta homocigótica documentada; ou talassemia beta heterocigótica composta, com confirmação do genótipo pelo laboratório central do estudo, antecedente ao condicionamento de busulfan.<sup>4,8</sup> Um histórico nos últimos dois anos antes da assinatura do consentimento de cerca 100 mL/kg/ano de transfusões de hemácias embaladas e compatível perante o investigador para o transplantante autólogo de células-tronco.<sup>8</sup>

Os critérios chaves de exclusão incluem a existência de um doador compatível com o antígeno leucocitário humano disponível, Alo-HSCT anterior; portadores de talassemia alfa associada com mais de uma deleção de cadeia alfa; portadores de variantes de beta talassemia falciforme; infecção bacteriana, fúngica, viral ou parasitária, clinicamente ativa, analisada pelo investigador; contagem de leucócitos menores que  $3 \times 10^9/L$  ou de plaquetas menores que  $50 \times 10^9/L$  não associados ao hiperesplenismo.<sup>8</sup>

O estudo intervencional de fase 1 de 2, braço único, multilocal e de dose única, teve início nos Estados Unidos em 14 de setembro de 2018, com o intuito de avaliar e assegurar a eficácia de células-tronco humanas de origem hematopoiéticas e progenitoras CD 34+, modificadas pelo método CRISPR-Cas9 autólogas, usando o CTX001 em portadores de talassemia beta dependente de transfusão sanguínea.<sup>8</sup>

### Sobre o complexo CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR descoberto em bactérias foi definido como uma sequência genética variada de origem extracromossomal, que fornecia às bactérias uma memória imunológica contra fagos e plasmídeos.<sup>9</sup>

Ele proporciona um registro genético que poderá combater, futuramente, o organismo contra novas invasões do mesmo patógeno.<sup>10</sup>

A nuclease Cas9 se mostrou muito importante na manipulação genética, pois apresenta alta capacidade de deslizar pelas células, identificar o material genético alvo e clivá-lo, o que impede sua reprodução.<sup>11</sup>

Sua especificidade se dá pelo fato da necessidade de uma sequência reconhecível Motivo Protoespaçador Adjacente (PAM) próximo à sequência alvo, entretanto, esse quesito



limita a variante de genes editáveis por essa técnica.<sup>10</sup>

Ela é constituída por DNA e possui uma região altamente conservada e rica em arginina com função de mediar a ligação de ácidos nucleicos.

Os espaçadores e as repetições podem apresentar sequências intercaladas de material genético viral.<sup>5,12</sup> Quando esses são transcritos formam o RNA transativador ou gRNA, que age direcionando a nuclease Cas9 ao alvo, que será clivado e inativado.<sup>12</sup>

### Sobre a talassemia beta

A talassemia beta é uma doença que faz parte de um conjunto de doenças hematológicas hereditárias, que resulta em anemia de graus variáveis, ocasionados pelo ritmo anômalo de produção das cadeias polipeptídicas que compõem a hemoglobina.<sup>13</sup> Sua herança é autossômica e recessiva, sendo necessários os dois genes anormais de globina beta para o indivíduo apresentar os sinais e sintomas.<sup>14</sup>

Os principais tipos são: *minor*, onde a pessoa possui apenas um gene afetado e, normalmente, é assintomática;<sup>7</sup> intermediária, quando o indivíduo possui ambos os genes afetados e anemia de grau leve a moderado;<sup>7</sup> e a *major* é o tipo mais grave e mais característico, quando o doente apresenta anemia severa e se torna dependente de transfusões sanguíneas.<sup>7</sup>

Os sinais e sintomas condizem com qualquer outro tipo de anemia, como cansaço e fraqueza, além de deformidades nos ossos longos que se apresentam desde a infância.<sup>15</sup>

### RESULTADOS

No final de julho de 2019, a *CRISPR Therapeutics* anunciou que o primeiro paciente com hemoglobinopatia do tipo anemia falciforme havia sido tratado por edição de genes com a tecnologia CRISPR/Cas9, em um estudo de fase 1, nos EUA.<sup>4</sup>

O tratamento com CTX001 envolve isolar as células-tronco do sangue periférico de um paciente e, em seguida, editar as células com o CRISPR/Cas9 projetadas para interromper o gene BCL11A, resultando em um aumento na produção de HbF.

As células editadas são, então, devolvidas ao paciente após condicionamento mieloablativo na medula óssea. Com a expressão diminuída do gene BCL11A nesse meio, a função repressiva da HbF é suprimida, levando a uma proporção maior da hemoglobina fetal.

Antes de receber as células editadas, os pacientes passaram por um tratamento em que as células que carregavam o gene defeituoso foram “eliminadas” gradualmente e, logo em seguida, supridas pelas atuais células modificadas.<sup>4</sup>

Os resultados iniciais são promissores, pois um paciente de 20 anos, portador de beta-talassemia dependente de transfusão, permaneceu independente de

transfusão por mais de nove meses após o enxerto das células tratadas com CTX001, impulsionados por um aumento significativo nos níveis de hemoglobina fetal, cerca de 99,8%. Antecedente ao tratamento eram realizadas cerca de 16 transfusões sanguíneas por ano.<sup>4,16</sup> Após o tratamento com CRISPR, o paciente portador de talassemia beta apresentou pneumonia, uma leve diminuição dos glóbulos brancos e um aumento do fígado com icterícia. Esses efeitos colaterais já eram esperados e foram tratados com sucesso.<sup>16</sup>

A paciente portadora de anemia do tipo falciforme também obteve resultados satisfatórios; conseguiu atingir níveis para curar a doença, além de não ter sido relatada nenhuma crise oclusiva desde o início do tratamento. As crises oclusivas são ocasionadas quando os glóbulos vermelhos geram a sensação de entupimento dos vasos sanguíneos, provocando dor intensa. Anteriormente ao tratamento, a paciente tinha cerca de sete crises por ano, que exigiam períodos longos de hospitalização. A paciente apresentou caso clínico de sepse, cálculos biliares e dor abdominal após o tratamento, que também foram tratados com sucesso.<sup>16</sup>

### CONCLUSÃO

A biotecnologia e suas evoluções têm mostrado que doenças geneticamente herdadas podem ser corrigidas e isso tem aumentado as expectativas dos cientistas nesse campo laboratorial. As pesquisas realizadas envolvendo o uso da tecnologia de CRISPR/Cas9 para tratamento da talassemia beta têm se mostrado promissoras até o momento, entretanto, permanecem em estudo devido à ausência de evidências que mostrem que o seu uso não afete bases nitrogenadas fora do alvo, ocasionando efeitos *off-target*. A duração de uma terapia celular hematopoiética autóloga depende da capacidade da modificação permanente das células-tronco, o que será avaliado futuramente. Contudo, essa tecnologia está se destacando das demais por ser extremamente promissora, de fácil manipulação e precisa, não envolvendo a utilização de plasmídeos.

### REFERÊNCIAS

1. Zheng YM, Lin FL, Gao H, Zou G, Zhang JW, Wang GK, et al. Development of a versatile and conventional technique for gene disruption in filamentous fungi based on CRISPR-Cas9 technology. *Sci Rep*. 2017;7:9250. doi: <https://doi.org/1038/s41598-017-10052-3>
2. Schwartz C, Frogue K, Ramesh A, Misa J, Wheeldon I. CRISPRi repression of nonhomologous end-joining for enhanced genome engineering via homologous recombination in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng*. 2017;114(12):2896-906. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.26404>
3. Castrignano SB. Enzimas em biologia molecular. III. Tecnologia CRISPR-Cas9. Núcleo de Doenças Respiratórias - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2017;27(U):art.3
4. The Lancet Haematology. CRISPR-Cas9 gene editing for patients with haemoglobinopathies. *Lancet Haematol*. 2019;6(9):e438. doi: [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(19\)30169-3](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30169-3)



5. Oliveira TC. Metodologias para a geração de mutantes funcionais em *Metarhizium anisopliae*: CRISPR/Cas9 e RNA [dissertação na Internet]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2016. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream//10183/150695/001008111.pdf?sequence=1&isAllow>
6. Gopal S, Jamieson C. Precision medicine approaches in sickle cell disease. *J Precision Med.* 2019;5(3):1-7
7. Antunes L, Cruz TC. Fisiopatogenia e métodos diagnósticos das anemias hemolíticas: uma revisão integrativa. *Rev Saúde Desenv Hum.* 2018;6(2):49-61
8. Vertex Pharmaceuticals Incorporated. A safety and efficacy study evaluating CTX001 in subjects with transfusion-dependent beta-Thalassemia. *ClinicalTrials.gov* [Internet]. 2018. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT03655678?view=record>
9. Gonçalves GAR, Paiva RMA. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. *Rev Ciênc Bás.* 2017;15(3):369-75
10. Franco HS. CRISPR: applications in human pathologies and future prospects [dissertação na Internet]. Faro: Universidade do Algarve; 2018. Disponível em: <https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/12618/1/TES-EM-crispr-hannah.pdf>
11. Richter C, Chang JT, Fineran PC. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) systems. *Viruses.* 2012;4(10):2291-311. doi: <https://doi.org/10.3390/v4102291>.
12. Arend MC, Pereira JOM, Markoski MM. The CRISPR/Cas9 system and the possibility of genomic edition for cardiology. *Arq Bras Cardiol.* 2017;108(1):81-3. doi: <https://doi.org/10.5935/abc.20160200>
13. Freire IA, Deolindo AMR, Sanches MSF, Arcanjo FPN.  $\beta$ -Talassemia major: um relato de caso. *Rev Med UFC.* 2019;2(59):66-70
14. Carvalho LB. Avaliação da expressão da talassemia do tipo beta no Brasil pela co-herança com defeitos de hemocromatose [dissertação na Internet]. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas; 2003. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/92518>
15. Verrastro TL, Wendel Neto S. Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. São Paulo: Atheneu; 2010
16. Begley S, Feustein A. First CRISPR treatment for blood diseases shows early benefits in two patients. *STAT* [Internet]. 2019. Disponível em: <https://www.statnews.com/2019/11/19/first-crispr-treatment-for-blood-diseases-shows-early-benefits/>

#### Como citar este artigo:

Serpeloni BB, Oliveira LMN, Damião B, Peroni LA, Simioni PU. O sistema Crispr/Cas9 e o potencial para a talassemia beta. *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba.* 2021;23(1):2-5. DOI: 10.23925/1984-4840.2021v23i1a2



Todo conteúdo desta revista está licenciado em Creative Commons CC By 4.0