

CRISPR/CAS9: uma novidade na busca do tratamento da Retinose Pigmentar*CRISPR/CAS9: a novelty in the search for the treatment of Retinitis Pigmentosa*Ricardo Tavares Borges¹, Benedito Antônio de Sousa²

RESUMO

Introdução: A Retinose Pigmentar (RP) é considerada uma das formas mais comuns de distrofia retiniana hereditária. Os portadores desta doença apresentam cegueira noturna que evolui com perda visual progressiva. A vasta heterogeneidade da RP impede estratégias terapêuticas uniformes. Em estudos recentes os autores indicam que a terapia genética com as Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) pode corrigir a doença retiniana hereditária, mediante a troca de genes defeituosos por genes saudáveis. **Objetivo:** Avaliar o CRISPR/CAS9 como uma novidade na busca do tratamento da Retinose Pigmentar mediante a técnica de edição genética. **Método:** Revisão sistemática da literatura com artigos pesquisados na base de dados Pubmed, Scielo, Lilacs e Cochrane com referências publicadas na língua inglesa até 2017. **Resultados/Discussão:** A reposição celular autóloga para doença degenerativa da retina depende da capacidade de correção da mutação patogênica em um paciente antes do transplante. Para criar células saudáveis a partir de células doentes, as mutações podem ser reparadas com a tecnologia de extração de genes CRISPR / CAS9, a qual produz enxertos que não demandam imunossupressão do paciente. **Conclusão:** Em estudos recentes os autores indicam que a ablação específica de alelos com mutações usando CRISPR/CAS9 pode, no futuro, prevenir e mesmo tratar degenerações da retina herdada geneticamente, como a RP.

Palavras-chave: Retinose Pigmentar, CRISPR/CAS9

ABSTRACT

Introduction: Retinitis Pigmentosa (RP) is considered one of the most common forms of hereditary retinal dystrophy. The patients with this disease present nocturnal blindness that evolves with progressive visual loss. The vast heterogeneity of RP prevents uniform therapeutic strategies. More recent studies indicate that gene therapy with Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) can correct hereditary retinal disease by switching defective genes to good genes.

¹ Acadêmico do Curso de Medicina da Universidade Católica de Brasília. E-mail do primeiro autor: ricardotb302@gmail.com

² Especialista em Oftalmologia, Mestre, Docente do Curso de Medicina da Universidade Católica de Brasília.

Objective: To evaluate CRISPR / CAS9 as a novelty in the search for the treatment of Retinitis Pigmentosa through the genetic editing technique. **Method:** Systematic review of the literature with articles searched in the Pubmed, Scielo, Lilacs and Cochrane database with references published in the English language until 2017. **Results/Discussion:** Autologous cell replacement for degenerative retinal disease depends on the ability to correct the pathogenic mutation in a patient before transplantation. To create healthy cells from diseased cells, the variations can be repaired with the CRISPR / CAS9 gene extraction technology, which produces grafts that do not require immunosuppression from the patient. **Conclusion:** Recent studies indicate that specific ablation of alleles with mutations using CRISPR / CAS9 may in the future prevent and even treat genetically inherited retinal degenerations, such as RP.

Keywords: Retinitis Pigmentosa, CRISPR/CAS9

INTRODUÇÃO

As doenças degenerativas da retina são uma das principais causas de cegueira irreversível e estão presentes em distúrbios genéticos, como: retinose pigmentar, doença de Stargardt, amaurose congênita de Leber.^{1,2} A Retinose Pigmentar (RP) é o tipo mais frequente de distrofia retiniana hereditária,² cuja incidência é de cerca de 1 para 4000 indivíduos.^{3,4} A RP apresenta padrões de herança autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao cromossomo X e seus genes codificam proteínas que estão envolvidas nas funções da retina neural, incluindo o desenvolvimento de fotorreceptores.³ A retina por conter baixo potencial regenerativo torna-se um amplo desafio no que concerne à terapêutica, visto que nenhum tratamento para doença retiniana hereditária dispõe da competência de reverter a cegueira, mas de retardar sua progressão, como observado com os suplementos alimentares.⁴ Os pacientes com RP manifestam cegueira noturna que evolui com perda visual progressiva, isto é, visão de túnel. Isso ocorre devido à degeneração do complexo fotorreceptor.⁴ A imensa heterogeneidade da RP (por aparecer de forma isolada ou associada a outras doenças sistêmicas, como síndrome de Usher, síndrome de Bardet-Biedl) impede estratégias terapêuticas uniformes.^{2,5} Entretanto, estudos recentes mostraram que a terapia genética com as Repetições Palindrômicas Curtas

Agrupadas e Regularmente Inter espaçadas (CRISPR) pode reparar essas doenças retinianas hereditárias por meio da troca de genes defeituosos por genes saudáveis, ou seja, mediante recorte de partes precisas do ácido desoxirribonucleico (DNA) e inserção de outras combinações de genes; desse modo, reparam-se sequências danificadas.⁵⁻⁷ Nessa linha, o presente artigo tem por objetivo avaliar se os dados da literatura científica apresentam evidências de que a RP pode ser tratada através da técnica de edição genética CRISPR/CAS9

MÉTODO

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura baseada em artigos disponíveis na base de dados eletrônica Pubmed, Scielo, Lilacs e Cochrane Library. Utilizaram-se os descritores: Retinitis Pigmentosa, CRISPR/CAS9; e o operador booleano: AND, com referências publicadas na língua inglesa até 2017. A revisão baseou em dez artigos publicados na língua inglesa até 2017.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reposição celular autóloga para doença degenerativa da retina necessita da eficácia de correção da mutação patogênica em paciente antes do transplante.^{2,8} Para conceber células saudáveis a partir de células doentes, as mutações podem ser corrigidas com a tecnologia de edição de genes CRISPR / CAS9, a qual produz enxertos que não

requerem imunossupressão do paciente.^{8,9} O CAS9 é uma nuclease - carrega uma fita de ácido ribonucléico (RNA) com o intuito de encontrar o trecho de DNA a ser editado - que corta as duas fitas da dupla hélice do DNA, elimina partes indesejadas e caso seja necessário insere novas sequências no local.⁸ Bassuk et al (2016) avaliaram se CRISPR/CAS9 poderia ser utilizada em células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), provenientes de fibroblastos captados de biopsia de pele e específicas do paciente, para consertar mutação existente em um gene que causava retinose pigmentar ligada ao cromossomo X (XLRP). Os pesquisadores evidenciaram que 13% das cópias desse gene exibiram retificação da mutação e apontaram que a remoção de genes pela CRISPR pode ser parte de tratamento de transplante autólogo para degenerações de fotorreceptores no futuro. Wiley et al (2015) empregaram células precursoras de fotorreceptores procedentes de iPSC específicas de pacientes com doenças degenerativas da retina para revelar que inserção homozigótica de Alu segue-se da perda de transcrição e da incapacidade de produzir proteínas funcionais MAK. Essa perda gerou paralisação da atividade celular típica de fotorreceptores e os conduziram à falência. Isso possibilitou ratificar a patogenicidade de MAK na fisiopatologia da doença. Diante disso, Wiley et al. (2015) atestam que células fotorreceptoras derivadas de iPSC específicas

de pacientes podem ser utilizadas para confirmar a eficácia terapêutica in vitro e sobrepor às células perdidas in vivo. Arno et al (2016) detectaram mutações bi alélicas no Receptor Expression Enhancer Protein 6 (REEP6) em sete indivíduos com Retinose Pigmentar autossômicos recessivos (arRP) de cinco famílias não relacionadas (Figura 1).

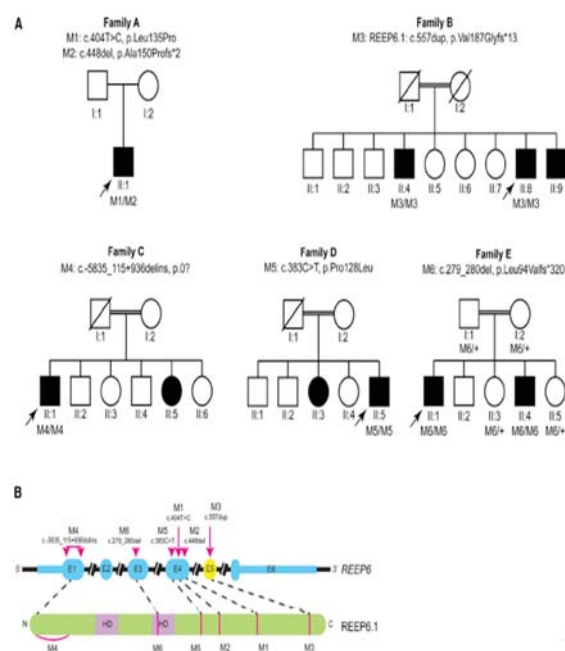


Figura 1- A. Heredograma das famílias com RP (famílias A a E). O indivíduo II.1 da família A é heterozigoto para as variantes da REEP6 (M1/M2). Todos os outros indivíduos eram homozigotos para as respectivas variantes da REEP6 indicadas (M3, M4, M5, M6). M3 c.-5835_115+936delinsAC027307.5:79083_79240inv está abreviado para c. 5835_115+936delins. B. Estrutura do gene REEP6 com posições de nucleotídeos de M1 a M6 mapeados nos éxons (E1-E6). O éxon 5 está presente apenas na isoforma REEP6.1. Estrutura protéica de REEP6.1 com posição das mutações correspondentes indicadas.

REEP6 é responsável pela regulação da membrana do retículo endoplasmático (RE) das células fotorreceptoras e importante para a homeostase da retina. E sua isoforma – REEP6.1 – é a que predomina no desenvolvimento de fotorreceptores humanos.

A partir disso, Arno et al. (2016) hipotetizaram que a interrupção na função de REEP6 pelas mutações pode levar à distrofia retiniana. E, com base nessas informações, destacaram a utilidade de editar genes com a técnica CRISPR/CAS9. Por fim, Xu et al. (2017) alegaram que defeitos na proteína CWC27 do *Spliceosome* – complexo ribonucleoproteico responsável por catalisar o splicing do pré-acidoribonucleico mensageiro (pré-mRNA) - estão vinculados a um espectro de fenótipos da RP: degeneração da retina, defeitos neurológicos, anormalidades craniofaciais, baixa estatura e braquidactilia; o qual varia desde a forma de RP isolada até formas sindrômicas graves. E a partir do sequenciamento completo foram encontradas mutações recessivas na proteína CWC27 em dez indivíduos de sete famílias não relacionadas (Figura 2).

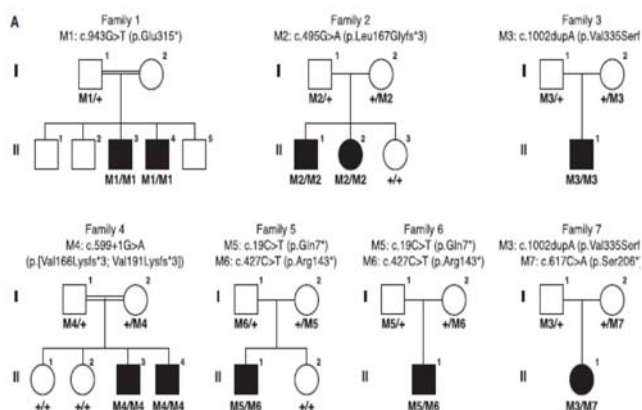


Figura 2 – A. Os pedigrees de sete famílias com mutações recessivas CWC27. As anotações foram baseadas no GenBank: NM_005869.3.

Apoiado nessas informações observa-se que o splicing do pré-mRNA desempenha um papel fundamental na regulação das transcrições e

qualquer defeito genético no *spliceosome* pode levar a um conjunto de fenótipos relacionados à RP.

CONCLUSÃO

Os estudos fornecem indicativos de que a ablação específica de alelos com mutações usando CRISPR/CAS9 podem no futuro prevenir e tratar degenerações herdadas da retina, tais como a RP, uma vez que os pesquisadores apontam que 13% das células defeituosas foram corrigidas. Além disso, são necessários outros estudos para testar a segurança do uso da técnica CRISPR/CAS9 em humanos com observações em longo prazo dos resultados pós-tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dalkara D, Goureau O, Marazova K, Sahel J-A. Let There Be Light: Gene and Cell Therapy for Blindness. *Human Gene Therapy*. 2016;27(2):134-147.
2. Wiley LA, Burnight ER, Songstad AE, Drack AV, Mullins RF, Stone EM, et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study and treatment of retinal degenerative diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2015 Jan;44:15-35.
3. Arno G, Agrawal SA, Eblimit A, Bellingham J, Xu M, Wang F, et al. Mutations in *REEP6* Cause Autosomal-Recessive Retinitis Pigmentosa. *American Journal of Human Genetics*. 2016;99(6):1305-1315.

4. Sengillo JD, Justus S, Tsai Y-T, Cabral T, Tsang SH. 2016. Gene and cell-based therapies for inherited retinal disorders: An update. *AmJ Med Genet Part C SeminMed Genet* 9999C:1–18.
5. Zheng A, Li Y, Tsang SH. Personalized therapeutic strategies for patients with retinitis pigmentosa. *Expert opinion on biological therapy*. 2015;15(3):391-402.
6. Bakondi B, Lv W, Lu B, Jones MK, Tsai Y, Kim KJ, et al. *In Vivo* CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Molecular Therapy*. 2016;24(3):556-563.
7. Tucker BA, Mullins RF, Stone EM. Stem cells for investigation and treatment of inherited retinal disease. *Human Molecular Genetics*. 2014;23(R1):R9-R16.
8. Bassuk AG, Zheng A, Li Y, Tsang SH, Mahajan VB. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci. Rep.* 6, 19969; doi: 10.1038/srep19969 (2016).
9. Howden SE, Maufort JP, Duffin BM, Elefanty AG, Stanley EG, Thomson JA. Simultaneous Reprogramming and Gene Correction of Patient Fibroblasts. *Stem Cell Reports*. 2015;5(6):1109-1118.
10. Xu M, Xie Y (Angela), Abouzeid H, Gordon CT, Fiorentino A, Sun Z, et al. Mutations in the Spliceosome Component CWC27 Cause Retinal Degeneration with or without Additional Developmental Anomalies. *American Journal of Human Genetics*. 2017;100(4):592-604.