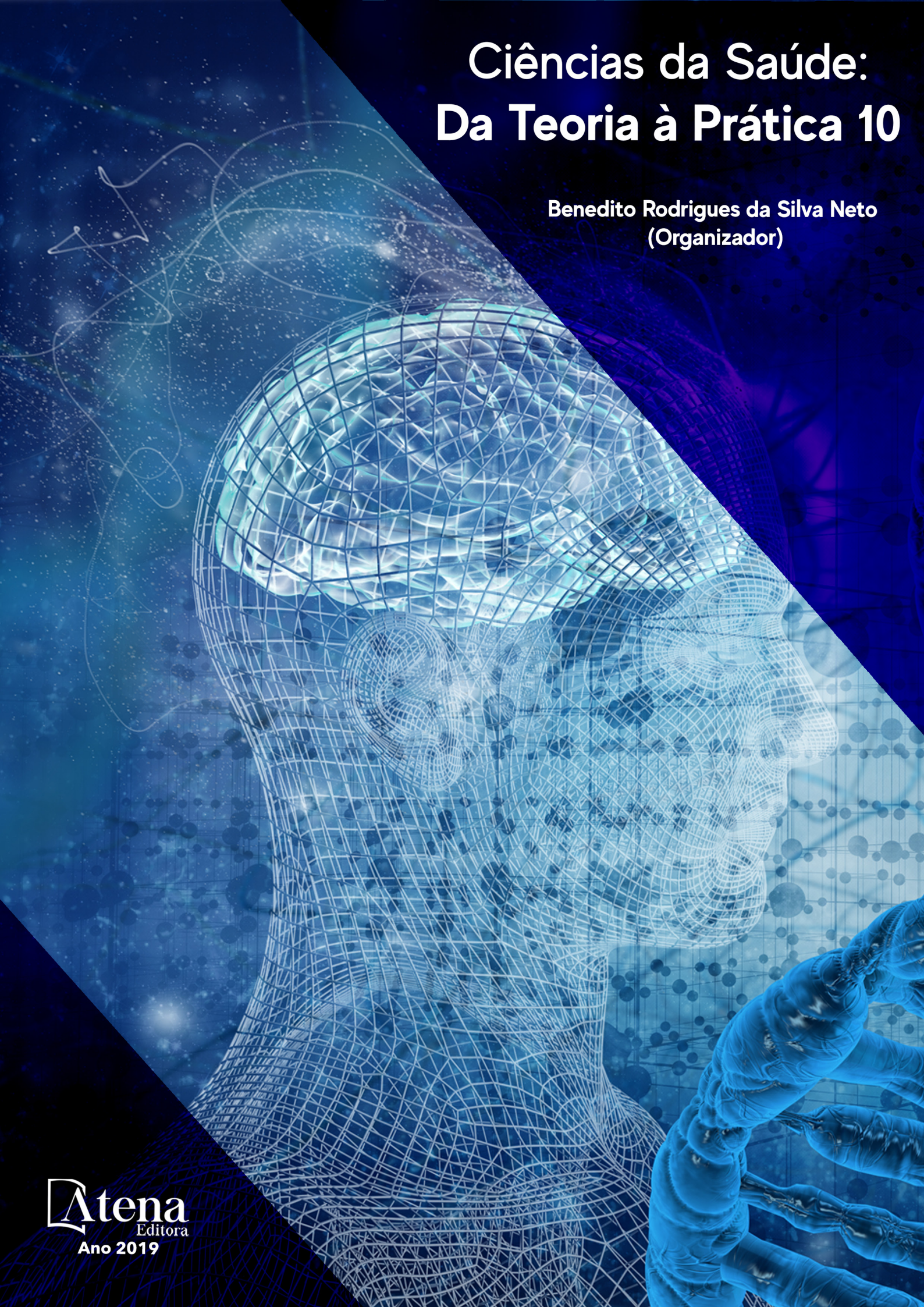


# Ciências da Saúde: Da Teoria à Prática 10

Benedito Rodrigues da Silva Neto  
(Organizador)

**Atena**  
Editora  
Ano 2019





Benedito Rodrigues da Silva Neto  
(Organizador)

# Ciências da Saúde: Da Teoria à Prática 10

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Executiva: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Natália Sandrini  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

#### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
C569	Ciências da saúde [recurso eletrônico] : da teoria à prática 10 / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Ciências da Saúde. Da Teoria à Prática; v. 10)  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-402-3 DOI 10.22533/at.ed.023191306  1. Saúde – Aspectos sociais. 2. Saúde – Políticas públicas. 3. Saúde – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da. II.Série.  CDD 362.10981
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

A coleção “Ciências da Saúde: da teoria à prática” é uma obra composta de onze volumes abordará de forma categorizada e interdisciplinar trabalhos, pesquisas, relatos de casos, revisões e inferências sobre esse amplo e vasto contexto do conhecimento relativo à saúde. Além disso, todo o conteúdo reúne atividades de ensino, pesquisa e extensão desenvolvidas em diversas regiões do país, que analisam a saúde em diversos dos seus aspectos, percorrendo o caminho que parte do conhecimento bibliográfico e alcança o conhecimento empírico e prático.

O décimo volume apresenta informações fundamentadas e categorizadas abordando o eixo central da coleção que é da teoria à prática. O leitor poderá encontrar capítulos com explanação teórica geral sobre temas específicos assim como capítulos aplicados e exemplificados por relatos. A progressão exponencial dos avanços tecnológicos tem contribuído de forma especial nos últimos anos com as novas metodologias práticas de estudo das desordens genéticas humanas, microbianas além de oferecer metodologias novas e extremamente sensíveis.

Deste modo, esse volume se destaca por congrega temas atuais e que poderão nortear novas ideias e direcionar o leitor em novos estudos específicos, haja vista que temas como câncer, autoimunidade, ancoramento molecular, tecnologias modernas, leucemia, epigenética, CRISPR, neuropatias, serão amplamente discutidos, além dos diversos relatos de caso, durante todo o livro.

Assim o décimo volume apresenta uma teoria bem fundamentada exemplificada nos resultados práticos obtidos pelos diversos pesquisadores que arduamente desenvolveram seus trabalhos que aqui serão apresentados. Do mesmo modo é de fundamental importância uma estrutura como a Atena Editora capaz de oferecer uma plataforma consolidada e confiável para estes pesquisadores exporem seus resultados. Portanto, nosso profundo desejo é que este contexto possa ser transformado a cada dia, e o trabalho aqui presente pode ser um agente transformador por gerar conhecimento em uma área fundamental do desenvolvimento como a saúde.

Benedito Rodrigues da Silva Neto

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
“RESOLUBILIDADE DO PROCESSO DE RASTREAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA NA ATENÇÃO BÁSICA À SAÚDE”	
Dayliz Quinto Pereira Erick de Carvalho Machado	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0231913061</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>10</b>
8 ANOS DA LIGA ACADÊMICA DE AUTOIMUNIDADE (LAAI): ALIANDO PRÁTICA MÉDICA À TEORIA	
Luiz Gustavo Rachid Fernandes Andrey Biff Sarris Fernando José Leopoldino Fernandes Candido Gabriela Benassi Cristiano Antonio do Nascimento Fabiana Postiglione Mansani	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0231913062</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>15</b>
AÇÕES DE EDUCAÇÃO EM SAÚDE NO TRATAMENTO ONCOLÓGICO: MANEJO DOS EFEITOS ADVERSOS E PREVENÇÃO DOS AGRAVOS	
Janaina Baptista Machado Taniely da Costa Bório Michele Rodrigues Fonseca Aline da Costa Viegas Luiz Guilherme Lindemann Franciele Budziareck das Neves Manoela Cunha Nicoletti	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0231913063</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>19</b>
ANÁLISE DO ANCORAMENTO MOLECULAR DO HERBICIDA GLIFOSATO A PROTEÍNA GLUTATIONA S-TRANSFERASE DA CLASSE PHI 3 EM <i>Oryza sativa L.</i> (ARROZ)	
Vinícius Costa Amador Ravenna Lins Rodrigues Luana Camilla Cordeiro Braz Felipe França de Oliveira Rafael Trindade Maia	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0231913064</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>31</b>
ANÁLISE DO CONHECIMENTO DOS CÂNCERES DE MAMA E COLO UTERINO NO SUL DE MINAS GERAIS	
Cíntia Aline Martins Bruno Bonfim Foresti Flavia Regina Ferreira Alves Renata Cristina Martins da Silva Vieira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0231913065</b>	

**CAPÍTULO 6 ..... 44**

AS PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO ONCOLÓGICO FRENTE AS TECNOLOGIAS MODERNAS

Raimunda Vieira Machado  
Luís Paulo Teixeira da Silva  
Nayara Carvalho Lima  
Nádia Caroline Cruz Andrade  
Keilane da Silva Hipólito  
Maria Márcia da Silva Melo Fernandes  
Patrícia de Azeve-do Lemos Cavalcanti

**DOI 10.22533/at.ed.0231913066**

**CAPÍTULO 7 ..... 47**

ASPECTOS DA LEUCEMIA EM CRIANÇAS E A PARTICIPAÇÃO DO ENFERMEIRO NA MINIMIZAÇÃO DOS TRANSTORNOS CAUSADOS PELA DOENÇA

Dariely de Oliveira Silva  
Antonio Evanildo Bandeira de Oliveira  
Maria dos Remédios Magalhães Santos

**DOI 10.22533/at.ed.0231913067**

**CAPÍTULO 8 ..... 54**

AVANÇOS NA TERAPIA MOLECULAR: FARMACOGENÉTICA E FARMACOGENÔMICA

Júlia Naelly Machado Silva  
Alexya Maria Leonardo de Oliveira  
Cleane da Silva Machado  
João Vitor Brito Oliveira  
Mayara Sousa dos Santos  
Sandyelle Souza do Nascimento  
Williana Silva de Oliveira  
Elenice Monte Alvarenga

**DOI 10.22533/at.ed.0231913068**

**CAPÍTULO 9 ..... 65**

BIOTECHNOLOGY PATENT AS A TOOL FOR PREVENTION AND CONTROL OF THE MOSQUITO

*Aedes Aegypti*

Jânio Rodrigo de Jesus Santos  
Angela Machado Rocha  
Michele Medeiros de Jesus  
Fabrícia Oliveira Oliveira

**DOI 10.22533/at.ed.0231913069**

**CAPÍTULO 10 ..... 79**

CONTRIBUIÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS NO RASTREAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

Sonia Pantoja Nascimento  
Rosalba Maria Costa Pessoa  
Monyka Brito Lima dos Santos  
Glauto Tuquarre Melo do Nascimento  
Bianca Liguori de Souza  
Naura Lúcia da Silva Feitosa  
Alba Caroline Lopes  
Renata Hanna Pessoa Sampaio  
Camila Leanne Teixeira Coêlho de Sousa  
Giuvan Dias de Sá Junior  
Edivania Silva de Sá  
Thaismária Alves de Sousa

**DOI 10.22533/at.ed.02319130610**

**CAPÍTULO 11 ..... 88**

**CONTROLE DO CÂNCER DE MAMA ATRAVÉS DO RASTREAMENTO ORGANIZADO NA ESTRATÉGIA DE SAÚDE DA FAMÍLIA**

Sonia Pantoja Nascimento  
Rosalba Maria Costa Pessoa  
Monyka Brito Lima dos Santos  
Glauto Tuquarre Melo do Nascimento  
Bianca Liguori de Souza  
Naura Lúcia da Silva Feitosa  
Alba Caroline Lopes  
Renata Hanna Pessoa Sampaio  
Camila Leanne Teixeira Coêlho de Sousa  
Giuvan Dias de Sá Junior  
Edivania Silva de Sá  
Thaismaria Alves de Sousa

**DOI 10.22533/at.ed.02319130611**

**CAPÍTULO 12 ..... 100**

**CRISPR, A NOVA FERRAMENTA PARA MODIFICAÇÃO DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO**

Emiliano Miguel Esteves dos Santos  
Valécia Natália Carvalho da Silva  
Marcello de Alencar Silva  
Jacks Renan Neves Fernandes  
Marcos Aurélio Ayres da Silva  
Artur Frota Guimarães  
Kelma Regina Galeno Pinheiro  
Samaritana Barros do Nascimento  
Ana Cláudia Mota de Freitas  
Victor Hugo do Vale Bastos  
Marco Antonio Orsini Neves  
Nélio Silva de Souza

**DOI 10.22533/at.ed.02319130612**

**CAPÍTULO 13 ..... 105**

**DETERMINANTES DA QUALIDADE NA RADIOLOGIA ONCOLÓGICA**

Patrícia Fernanda Dorow  
Andrea Huhn  
Juliana Fernandes da Nóbrega  
Carolina Neis Machado  
Laurete Medeiros Borges  
Gerusa Ribeiro

**DOI 10.22533/at.ed.02319130613**

**CAPÍTULO 14 ..... 121**

**EPIGENÉTICA BÁSICA**

Júlia Naelly Machado Silva  
Alexya Maria Leonardo de Oliveira  
Cleane da Silva Machado  
João Vitor Brito Oliveira  
Mayara Sousa dos Santos  
Sandyelle Souza do Nascimento  
Williana Silva de Oliveira  
Elenice Monte Alvarenga

**DOI 10.22533/at.ed.02319130614**



<b>CAPÍTULO 15</b> .....	<b>133</b>
ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E MANEJO DO BURNOUT NOS CUIDADOS PALIATIVOS	
Manuela Samir Maciel Salman Debora Genezini Costa	
<b>DOI 10.22533/at.ed.02319130615</b>	
<b>CAPÍTULO 16</b> .....	<b>145</b>
ESTUDO DOS MONOGENÉTICOS PARASITOS DA TILÁPIA <i>Oreochromis niloticus</i> (LINNAEUS, 1758) COLETADAS NO RIO JACARÉ PEPIRA DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL	
Lúcia do Valle Fragoso Diego Henrique Mirandola Dias Vieira Rodney Kozlowiski de Azevedo Vanessa Doro Abdallah Kozlowiski	
<b>DOI 10.22533/at.ed.02319130616</b>	
<b>CAPÍTULO 17</b> .....	<b>158</b>
FARMÁCIA COLORIDA: TECNOLOGIAS DE SAÚDE PARA A POPULAÇÃO INDÍGENA	
Patrícia da Silva Pantoja Karla Julianne Negreiros de Matos Antonio Edvan Camelo Filho Daysane de Pinho Machado Thamilla Kessia de Oliveira da Silva Tamires Soares Rodrigues Glaydson Diego Negreiros de Matos Maria Erivalda Farias de Aragão	
<b>DOI 10.22533/at.ed.02319130617</b>	
<b>CAPÍTULO 18</b> .....	<b>170</b>
IMUNIDADE BACTERIANA PELAS REPETIÇÕES PALINDRÔMICAS CURTAS AGRUPADAS E REGULARMENTE INTERESPAÇADAS (CRISPR): CLASSE 2 TIPO II	
Lucas Weba Soares Juliana Santana de Curcio Lívia do Carmo Silva Kleber Santiago Freitas e Silva Amanda Alves de Oliveira Thaynara Gonzaga Santos	
<b>DOI 10.22533/at.ed.02319130618</b>	
<b>CAPÍTULO 19</b> .....	<b>185</b>
LIMITES DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO MANGANÊS E O MANGANISMO	
Érica Zurana Pereira Santos Soares Helder Moreira de Oliveira Segundo Tathyanna Kelly de Macedo Furtado Pedro Cândia Neto	
<b>DOI 10.22533/at.ed.02319130619</b>	

**CAPÍTULO 20 ..... 192**

PESQUISA E APLICAÇÕES EM EPIGENÉTICA

Júlia Naelly Machado Silva  
Alexya Maria Leonardo de Oliveira  
Cleane da Silva Machado  
João Vitor Brito Oliveira  
Mayara Sousa dos Santos  
Sandyelle Souza do Nascimento  
Williana Silva de Oliveira  
Elenice Monte Alvarenga

**DOI 10.22533/at.ed.02319130620**

**CAPÍTULO 21 ..... 204**

PREVALÊNCIA DE NEUROPATIA DIABÉTICA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 ATENDIDOS NO CONSÓRCIO INTERMUNICIPAL DE SAÚDE DO OESTE DO PARANÁ (CISOP)

Rubia Karine de Marco Barasuol  
Marise Vilas Boas Pescador

**DOI 10.22533/at.ed.02319130621**

**CAPÍTULO 22 ..... 211**

PREVALÊNCIA DE DEFICIÊNCIA DE ZINCO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA FALCIFORME NA REGIÃO DE FEIRA DE SANTANA-BA

Thaís Macedo de Amorim  
Carina Oliveira Silva Guimarães  
Mateus Andrade Alvaia  
José de Bessa Júnior

**DOI 10.22533/at.ed.02319130622**

**CAPÍTULO 23 ..... 217**

PRODUÇÃO DE GÉIS COM EXTRATO SECO DE CURCUMA LONGA: ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO SENSORIAL

Hellen Martins Barbosa  
Iara Lúcia Tescarollo

**DOI 10.22533/at.ed.02319130623**

**CAPÍTULO 24 ..... 233**

RELAÇÃO ENTRE QUEIXA PROCTOLÓGICA E DIAGNÓSTICO DE PACIENTES REFERENCIADOS A UM AMBULATÓRIO UNIVERSITÁRIO

Camila Furtado Hood  
Isabelle Kristal Grala Souza e Silva  
Bruna Brandão de Farias  
Camila Tlustak Soares  
José Ricardo de Souza Soares Júnior  
Marcelo Alexandre Pinto De Britto

**DOI 10.22533/at.ed.02319130624**

**CAPÍTULO 25 ..... 237**

RELATO DE CASO: SÍNDROME DE CRI DU CHAT

Karlla Susane Costa Monteiro  
Ana Vitória Leite Monte  
Débora Alencar Franco Costa, Enio  
Douglas Amorim Carvalho  
Ravena Cristina Silva De Sousa  
Rodrigo Kelson Pereira Dos Santos

**DOI 10.22533/at.ed.02319130625**

<b>CAPÍTULO 26</b> .....	<b>239</b>
RELATO DE EXPERIÊNCIA: VIVÊNCIA ACADÊMICA EM ATIVIDADE EXTENSIONISTA NA PREVENÇÃO AO CÂNCER DE COLO UTERINO	
Michele Nunes Fenzke	
Fabiane Ferreira Francioni	
<b>DOI 10.22533/at.ed.02319130626</b>	
<b>CAPÍTULO 27</b> .....	<b>242</b>
SÍNDROME DO ROUBO DA SUBCLÁVIA: UM RELATO DE CASO	
Mariana Bezerra Doudement	
Raquel da Conceição Santos Nascimento	
Camila Coelho Nóbrega Riedel	
Rodrigo Santos de Norões Ramos	
<b>DOI 10.22533/at.ed.02319130627</b>	
<b>CAPÍTULO 28</b> .....	<b>250</b>
SÍNDROME DE FOUNIER COMO COMPLICAÇÃO DE POSTECTOMIA: RELATO DE CASO	
Hugo Mendes Alencar Furtado	
Nadedja Lira de Queiroz Rocha	
Letícia Sucupira Cristino	
Lucas Mori de Lima	
Pedro Henrique Matos Grangeiro Cruz	
Harianne Leite de Alencar	
David Sucupira Cristino	
<b>DOI 10.22533/at.ed.02319130628</b>	
<b>CAPÍTULO 29</b> .....	<b>252</b>
SINDROME DE UNHA-PATELA (SINDROME DE FONG) EM GESTANTE, RELATO DE CASO	
Erika Amorim Melo Moreira	
Suellen Leal Pagano	
Michelle Magnago Ribeiro	
<b>DOI 10.22533/at.ed.02319130629</b>	
<b>CAPÍTULO 30</b> .....	<b>255</b>
SISTEMAS DE APOIO À DECISÃO MÉDICA: UMA INOVAÇÃO NA MEDICINA ONCOLÓGICA	
Brenna Lucena Dantas	
Gersica Maria Gomes Almeida Marinho	
Yago Martins Leite	
Débora Costa Marques	
Vanessa Carolinne de Andrade e Albuquerque	
Maria Juliana de Arruda Queiroga	
Renan Gomes Barreto	
<b>DOI 10.22533/at.ed.02319130630</b>	
<b>CAPÍTULO 31</b> .....	<b>263</b>
TUMOR DE WILMS: DO DIAGNÓSTICO AO TRATAMENTO, ATÉ ONDE A MEDICINA PODE AJUDAR?	
Paulo Sérgio da Paz Silva Filho	
Tainá Maria Oliveira Sousa	
Lennara Pereira Mota	
Monaliza Buana Rodrigues	
Tacyana Pires de Carvalho Costa	
Ranyelison Silva Machado	
Amanda Priscila Maia Souza	
Rosana de Oliveira Pereira	



Maria Janaina Oliveira Sousa  
Geísa de Moraes Santana  
Antônio Lucas Farias da Silva  
Sarah Lays Campos da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.02319130631**

**CAPÍTULO 32 ..... 272**

UTILIZANDO REDES NEURAIS ARTIFICIAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE CÂNCER CERVICAL

Renan Gomes Barreto  
Gersica Maria Gomes Almeida Marinho  
Gabriela Ferreira Marinho Barreto  
Renata Gomes Barreto  
Lucas Oliveira Costa Aversari

**DOI 10.22533/at.ed.02319130632**

**SOBRE O ORGANIZADOR..... 281**

## IMUNIDADE BACTERIANA PELAS REPETIÇÕES PALINDRÔMICAS CURTAS AGRUPADAS E REGULARMENTE INTERESPAÇADAS (CRISPR): CLASSE 2 TIPO II

### **Lucas Webá Soares**

Universidade Federal de Goiânia, Laboratório de  
Biologia Molecular  
Goiânia – Goiás

### **Juliana Santana de Curcio**

Universidade Federal de Goiânia, Laboratório de  
Biologia Molecular  
Goiânia – Goiás

### **Lívia do Carmo Silva**

Universidade Federal de Goiânia, Laboratório de  
Biologia Molecular  
Goiânia – Goiás

### **Kleber Santiago Freitas e Silva**

Universidade Federal de Goiânia, Laboratório de  
Biologia Molecular  
Goiânia – Goiás

### **Amanda Alves de Oliveira**

Universidade Federal de Goiânia, Laboratório de  
Biologia Molecular  
Goiânia – Goiás

### **Thaynara Gonzaga Santos**

Universidade Federal de Goiânia, Laboratório de  
Biologia Molecular  
Goiânia – Goiás

lócus CRISPR e as proteínas que atuam envolta destes lócus, batizadas de associadas ao CRISPR (Cas). Em conjunto, esse sistema é utilizado para resguardar a bactéria de ataques subsequentes do mesmo bacteriófago. Apesar de grandes mistérios ainda circundarem etapas de funcionamento do sistema CRISPR, muito já foi se foi estudado e analisado desde a descoberta do seu enorme potencial como ferramenta de modificação genética de baixo custo e alta eficiência em 2012. Formado por uma sequência de nucleotídeos palíndromos repetidos e interespacedados por fragmentos de DNA invasor chamados de espaçadores, obtidos por um conjunto de enzimas atuantes, os Cas. O sistema CRISPR faz uso dessas sequências para rastrear e cortar a sequência complementar ao DNA obtido encontrado no bacteriófago, e assim, anular sua ação sobre a bactéria. Atualmente, o sistema é dividido em 2 classes e separados entre tipos e subtipos, com a classe 1 constituída de mecanismos em que se faz necessário o uso de inúmeras enzimas para apropriadamente clivar o material genético invasor; e a classe 2, formada por somente 1 enzima responsável pelo corte, sendo considerada atualmente a de maior interesse pela comunidade científica devido a sua simplicidade e capacidade de ser reprogramada para cortar qualquer fragmento de DNA desejado, desde que lhe seja dado o

**RESUMO:** O sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas é um mecanismo de defesa adaptativo encontrado em bactérias e archea contra bacteriófagos. Formado pelos

gRNA que corresponda a sequência ao qual se deseja realizar o corte. Neste capítulo, será detalhado o sistema de Classe 2.

**PALAVRAS-CHAVE:** edição gênica, biologia molecular, imunidade microbiana

**ABSTRACT:** The bacterial adaptative immune system consisted of Clustered Short Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR). Formed by the CRISPR locus and the proteins acting involved in these loci, the CRISPR associated proteins (Cas), protect bacteria against bacteriophage attacks. Although great mysteries still surround steps of the CRISPR system, much has been studied and analyzed since the discovery of its enormous potential as a low cost and high efficiency genetic modification tool in 2012. Formed by a sequence of repeated palindromes and interspersed by invasive DNA fragments called spacers, obtained by a set of active enzymes, the Cas, in order to further use those same sequences as a method to track and diminish subsequent invasion. The CRISPR system is currently divided into 2 classes and separated into types and subtypes, with class 1 consisting of mechanisms in which it becomes necessary to use numerous enzymes to appropriately cleave the invading genetic material; and class 2, formed by only 1 enzyme responsible for the cut, and is currently considered to be of most interest by the scientific community due to its simplicity and reprogramming ability to cut off any desired DNA fragment, provided that it is given the corresponding gRNA sequence to which the cut is desired. In this chapter, a broad overview of how CRISPR works, and with class 2 in detail.

**KEYWORDS:** genome engineering, molecular biology, microbe immunity

## 1 | INTRODUÇÃO

Desde o descobrimento da molécula de DNA em 1869, humanidade buscou meios para modificar e controlar a molécula da vida, essa que, somente após séculos de sua descoberta original foi devidamente associada a capacidade de reter informação para a codificação de proteínas (Lemieux, 2016 )

Nos anos 60, cientistas dos Estados Unidos, Europa e países da antiga União Soviética bombardeavam plantas com radiação causando alterações aleatórias com o objetivo de se obter uma variedade útil, buscando usos benéficos para a tecnologia da época (Kaushik, 2013). Com a percepção de que o DNA possui uma estrutura capaz de armazenar informação genética (Watson e Crick, 1953), a capacidade humana de manipular a base de informações de organismos vivos aumentou drasticamente, e o maquinário celular responsável pela manutenção da mesma passou a ser utilizado por seres humanos, dando origem a campo da engenharia genética (Kornberg, 1957; Smith e Wilcox, 1970; Temin e Mizutani, 1970).

Devido a sua grande abrangência e capacidade singular, o ramo da engenharia genética passou a influenciar vários aspectos da vida na Terra de forma tão natural que sua dimensão é de difícil compreensão. Sua presença nos alimentos, gerando frutas e verduras capazes de sobreviver às pestes e assim abastecendo regiões de



carência alimentícia (Davidson, 2012; Davidar *et al.*, 2015); na medicina, com bactérias geradoras de substâncias químicas necessárias para pacientes com as mais diversas doenças, removendo a necessidade de se colher as mesmas de órgãos de animais falecidos, diminuindo conseqüentemente os riscos e custos deste tipo de prática (Zhang *et al.*, 2016); no setor industrial, esforços são realizados para a obtenção de energia por meio de bactérias recombinantes (Sydow *et al.*, 2014). Todas essas pequenas revoluções facilitaram e diferenciaram a forma como a humanidade lida com os mais diversos problemas.

Entretanto, o ramo da engenharia genética até recentemente era exclusivo de grandes empresas e laboratórios capazes de custear as caras e laboriosas técnicas. Além da necessidade de uma grande quantidade de profissionais altamente qualificados para manuseá-las (Guha *et al.*, 2017).

Com a descoberta da possibilidade de se usar o sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR, do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) para a modificação de qualquer organismo vivo (Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013), os custos de desenvolvimento diminuíram em mais de 50%, o tempo para a concretização destes projetos passaram de anos para semanas e capacitação necessária para se conduzir um experimento se reduz a qualquer laboratório com equipamentos básicos. Todas essas qualidades convergiram de forma nunca antes vista para revolucionar o campo da engenharia genética (Gasiunas e Siksnys, 2013). Neste capítulo, trazemos as nuances deste mecanismo como encontrado no organismo de origem.

## 2 | VISÃO GERAL

O sistema CRISPR-Cas é um mecanismo de defesa adaptativo encontrado em bactérias e archea contra bacteriófagos (Deveau *et al.*, 2010; Labrie *et al.*, 2010; Barrangou e Marraffini, 2014). Formado pelos lócus CRISPR e as proteínas que atuam envolta destes lócus, batizadas de associadas ao CRISPR (Cas, do inglês CRISPR associated) (Marraffini, 2015). Além destes, algumas proteínas inerentes de outros sistemas bacterianos também tendem a participar do processo, vezes direta e/ou indiretamente (Zhang *et al.*, 2012; Levy *et al.*, 2015). É possível dividir o método de ação do sistema em 3 momentos: adaptação, biogênese do crRNA e Interferência (Figura 1) (Wright *et al.*, 2016).

A adaptação ocorre após um ataque sem sucesso do bacteriófago (ou fago) a bactéria (Barrangou *et al.*, 2007). O sistema obtém um pequeno fragmento do DNA deste fago para a inserção no lócus CRISPR, formado por uma cadeia de nucleotídeos palindrômicos repetidos batizados de repetições e interespaçados pelo DNA do fago chamados de espaçadores, ambos com quantidades variáveis, porém abrangendo a faixa de 30 a 40 nucleotídeos, dependendo do subtipo (Fineran e Charpentier, 2012; Sternberg *et al.*, 2016).

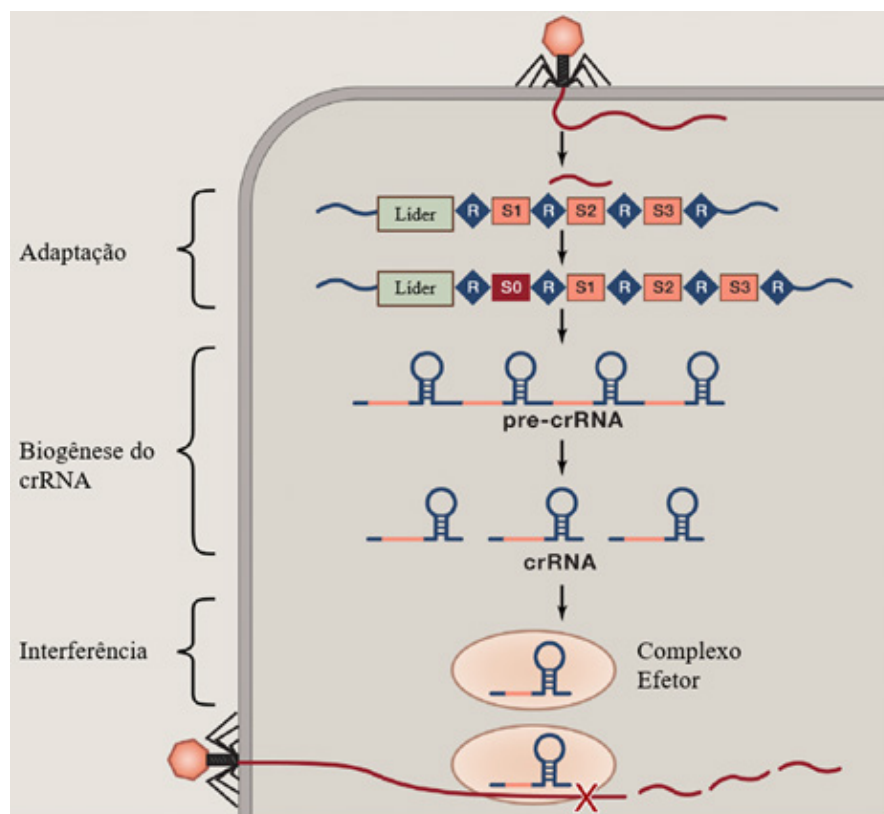


Figura 1 - Esquema geral funcionamento do sistema CRISPR

O sistema CRISPR é dividido em 3 momentos: 1) **Adaptação**: quando a bactéria obtém um pequeno fragmento de DNA do fago invasor (filamento vermelho) e a insere no loci CRISPR entre duas repetições (caixa R em formato de cristal), tornando-se um protoespaçador (caixa SN entre as repetições). 2) **Biogênese do crRNA**: transcrição do loci CRISPR em um longo filamento de pré-crRNA (CRISPR RNA), clivado por Cas específicas gerando pequenos crRNAs formados por repetições e protoespaçadores. 3) **Interferência**: complexo efetor resgata o crRNA e o utiliza para buscar a região complementar ao protoespaçador, e, ao encontrar, degrada o DNA invasor, coibindo a infecção. Fonte: (WRIGHT; NUNEZ; DOUDNA, 2016) Adaptado

Quando o mesmo bacteriófago tenta novamente invadir e fazer uso do metabolismo bacteriano, o sistema é ativado e todo o locus é transcrito, iniciando a segunda etapa: biogênese do crRNA (CRISPR RNA) (Zhang *et al.*, 2013). O produto desta transcrição é um grande pré-crRNA, que passa por um processo de maturação, gerando fragmentos menores de crRNAs formados por repetições e protoespaçadores cada (Brouns *et al.*, 2008; Carte *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). Logo em seguida, durante a interferência, etapa final do processo, o crRNA é ligado a uma proteína ou conjunto de proteínas (dependendo da classe) que irão utilizar o espaçador transcrito como guia e, ao encontrar as bases complementares correspondentes, realizarão a degradação do DNA e/ou RNA invasor, resguardando a bactéria de qualquer atividade prejudicial a ser gerada pelo bacteriófago (Hochstrasser *et al.*, 2014; Barrangou *et al.*, 2015; Numata *et al.*, 2015). O sistema CRISPR é dividido atualmente em 2 classes (divididas de acordo com o funcionamento), 6 tipos e 17 subtipos (divididos seguindo a ordem em que foram descobertos) (Tabela 1) (Makarova *et al.*, 2015), cada uma com suas peculiaridades na forma de atuação.

Classe	1			2		
	I	III	IV	II	V	VI
Subtipos	A, B, C, D, E, F e U	A, B, C e D	S.d.d	A, B e C	A, B, C e U	A, B1/2, C
Marcador	Cas3	Cas10	Csf1	Cas9	Cas12, Cas14 ou CasX	Cas13
Alvo	fdDNA	fsDNA/fsRNA	S.d.d	fdDNA	FdDNA	FsRNA
Exemplo de organismo	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>A. ferrooxidans</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>F. novicida</i>	<i>L. shahii</i>

Tabela 1 - Classificação dos sistemas CRISPR-Cas.

FdDNA: DNA de fita dupla; fsDNA: DNA de fita simples; fsRNA: RNA de fita simples; S.d.d: Sem dados disponíveis.

Os sistemas CRISPR de classe 1 utilizam um conjunto de proteínas, formando um complexo, para efetivamente encontrar o espaçador e assim interromper as atividades do bacteriófago sobre a bactéria (Makarova *et al.*, 2015). Esta classe é formada pelo tipo I, encontrado em *Escherichia coli*, tendo como marcador a proteína Cas3, que degrada por com auxílio do complexo associado a CRISPR para defesa antiviral (Cascade, do inglês *CRISPR-associated complex for antiviral defense*) (Jore *et al.*, 2011); o tipo III, presente na bactéria *Staphylococcus epidermidis*, é marcada pela proteína Cas10, uma das proteínas do complexo de membros da superfamília de Proteínas modificadoras de atividade (Cms, do inglês *Members of the superfamily RAMP*) ou Módulo CRISPR RAMP (Tamulaitis *et al.*, 2017). O último membro da classe 1 é o tipo VI, muito pouco caracterizado, encontrado na bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Makarova *et al.*, 2015).

Os de classe 2 fazem uso de somente uma proteína para efetivamente degradar o DNA e/ou RNA invasor. Esta classe é formada pelo tipo II, tendo como proteína marcadora o conhecido Cas9, presente em *Streptococcus pyogenes* (Shmakov *et al.*, 2017). O tipo V, com o CRISPR derivado de *Prevotella e Francisella* (Cpf1) (Zetsche *et al.*, 2015; Shmakov *et al.*, 2017) atualmente conhecido como Cas12 (Jiang *et al.*, 2017). E o recém descoberto tipo VI, encontrado na bactéria *Leptotrichia shahii*, fazendo uso da proteína inicialmente batizada de Candidato 2 classe 2 (C2c2) (Abudayyeh *et al.*, 2016) e atualmente chamado de Cas13 (Shmakov *et al.*, 2017). Além dos mencionados, existem o Cas14 e o CasX, ambos recentemente descobertos e com poucos estudos relacionados as suas atividades. Devido a isso, eles não serão abordados em detalhes neste capítulo (Harrington *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019).

Subsequentemente, os subtipos encontrados divergem entre si por meio de pequenas mudanças nas proteínas efetoras do sistema (Makarova *et al.*, 2015). Por exemplo, a presença da proteína *csa5* no complexo Cascade do sistema CRISPR classe 1 tipo I-A e ausência nos demais (Reeks *et al.*, 2013; Daume *et al.*, 2014). Essas mudanças são consideráveis e a presença das mesmas auxiliam no entendimento



do padrão evolucionar e diversidade de cada um dos sistemas (Makarova *et al.*, 2015). É importante ressaltar que, o sistema CRISPR é teorizado por evoluir rápida e horizontalmente (Makarova *et al.*, 2015) e, em detrimento disso, regras impostas para sua classificação eventualmente são quebradas a medidas que novos estudos a cerca do sistema são realizados, assim como novas classes, tipos e subtipos são descobertos.

### 3 | SISTEMA CRISPR DE CLASSE 2

Encontrados exclusivamente em bactérias (Makarova *et al.*, 2011). Os CRISPR de classe 2 são considerados relativamente simples se comparados aos de classe 1, geralmente os de menor composição relativa a quantidade de gene codificadores (Wright *et al.*, 2016). Sua característica principal é a participação de 1 nuclease durante o processo de interferência (Shmakov *et al.*, 2017). Graças a tal, seu potencial uso na engenharia genética é consideravelmente maior, tendo em vista que seu tamanho e complexidades reduzidas facilitam a inserção do sistema em organismos distintos por meio de vetores que possuem o tamanho como fator limitante (Higashijima *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2017; Soppe e Lebbink, 2017). Em detrimento disso, os tipos II, V e VI, encontrados no sistema CRISPR de classe 2 possuem o processo de interferência relativamente bem explanados quando comparado as outras etapas (Shmakov *et al.*, 2017).

### 4 | CLASSE 2 TIPO II: VISÃO GERAL

Usado para demonstrar pela primeira vez a forma pela qual CRISPR protegia bactérias contra bacteriófagos (Barrangou *et al.*, 2007). Logo depois, usado novamente para abrir a mente de pesquisadores de todo o mundo para o enorme potencial deste sistema (Jinek *et al.*, 2012)2012. O tipo II é sem dúvida a estrela do sistema CRISPR.

O tipo II-C esquematizado na figura 2, possui os lócus mais simples do tipo II, contendo somente 3 genes Cas: *CAS1* e *CAS2*; o arroz com feijão do processo adaptativo; e a *CAS9*, codificador da nuclease de mesmo nome, atuante no processo de adaptação, biogênese do crRNA e interferência (Shmakov *et al.*, 2017). Além destes genes, o sistema do tipo II possui um gene codificador de um RNA não traduzido em proteína, com sequências semelhantes as repetições do locus CRISPR, o RNA trans ativador (do inglês *trans-activating RNA* – tracrRNA). O tracrRNA tem como papel auxiliar a enzima Cas9 em todas as três etapas do sistema (Chylinski *et al.*, 2013; Karvelis *et al.*, 2013). Demais subtipos possuem proteínas capazes de auxiliar Cas1 e Cas2 durante a aquisição de protoespaçadores (o nome dado as sequências de fagos que serão inseridas no locus CRISPR, e assim passando a se chamar espaçadores) (Wright *et al.*, 2016). Sendo esses a Cas4 no tipo II-B e Csn2 no tipo II-A (Zhang *et al.*,

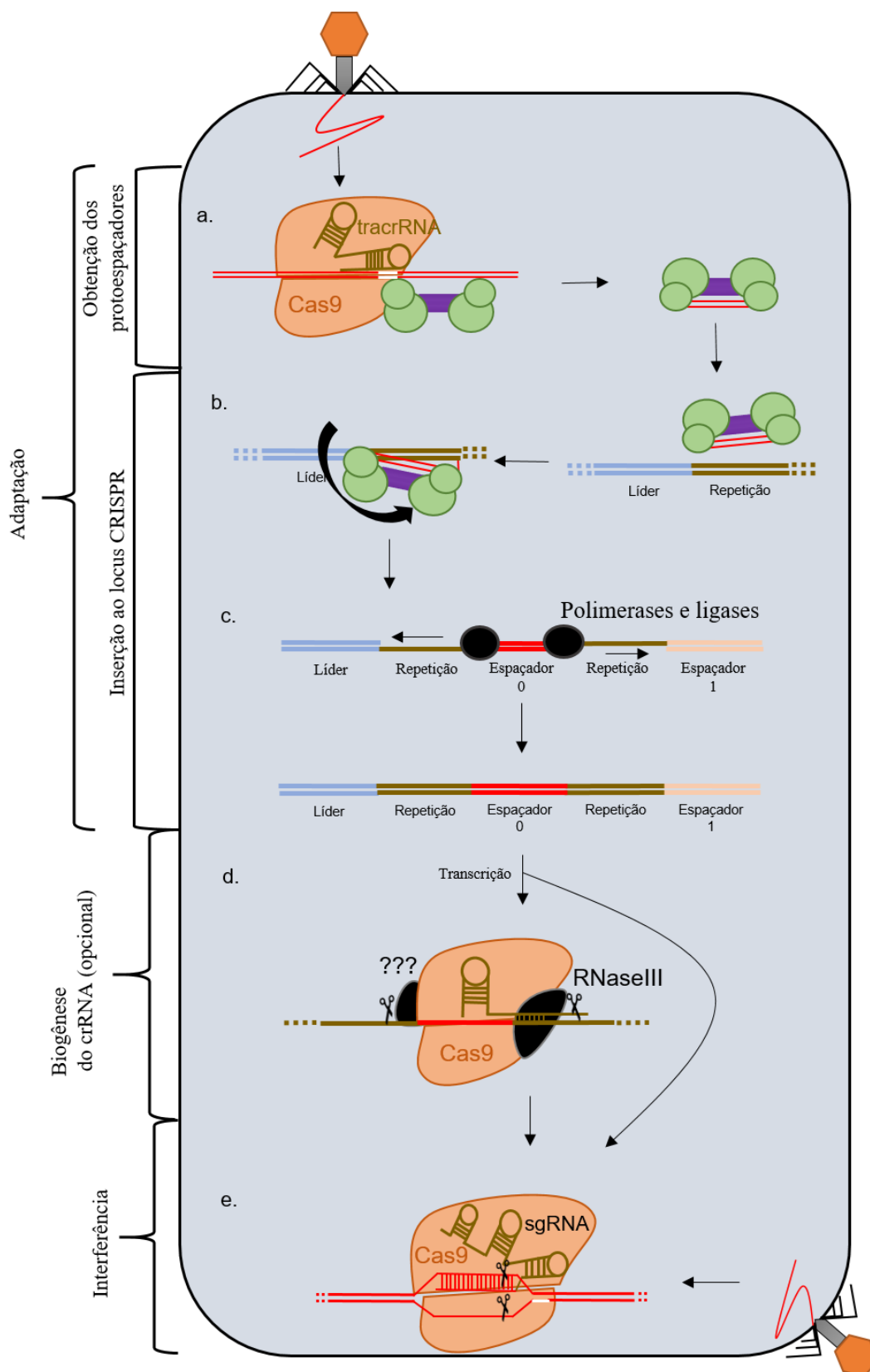


Figura 2 - Esquema mecanismo de ação sistema CRISPR tipo II-C

**a. Obtenção dos protoespaçadores:** O complexo formado pelas proteínas Cas9 (marrom), Cas1 (verde), Cas2 (roxo) e tracrRNA (lima) é responsável por obter o protoespaçador seguido da sequência PAM. As funções destas proteínas nesta etapa são de reconhecimento, nucleases, estrutural e de ativação da Cas9, respectivamente.

**b. Inserção ao locus CRISPR:** Ao reconhecer sequências específicas na região líder, Cas1-Cas2 realizam 2 ataques nucleofílicos: o primeiro na região 5' superior entre a sequência líder e a primeira repetição e o segundo na região 3' entre a primeira repetição e o último espaçador. Desta forma, o novo espaçador se insere entre duas fitas simples de repetições. Posteriormente reparadas por polimerases e ligases (preto).

**d. Biogênese do crRNA**

**(opcional):** Com o auxílio do tracrRNA, Cas9 é capaz de reconhecer a sequência de espaçadores para posterior clivagem pela RNaseIII e outra RNase desconhecida (ambos em preto). Outra opção para este processo e exclusivo do subtipo C é a transcrição de espaçadores separadamente. Desta forma, a maturação não se faz necessário (não ilustrado). Independentemente do caminho tomado, o resultado é o complexo formado pelo gRNA (junção do tracrRNA + crRNA) e a proteína Cas9. **e. Interferência:** o complexo gRNA-Cas9 busca ativamente por uma sequência PAM (branco). Ao encontrar, Cas9 então promove a formação da estrutura gRNA-DNA alvo e, caso formada, procede realizando cortes de fim abrupto em ambas as fitas cerca de 3 nucleótidos anteriores a sequência PAM. Fonte: Autor

## 4.1 Adaptação

Estudos demonstraram que, sem a presença da proteína Cas9 junto com o tracrRNA, o processo de obtenção de protoespaçadores não era realizado (Yoganand *et al.*, 2017). Isso acontece pois o complexo Cas1-Cas2 não é capaz de reconhecer a sequência PAM (5'-NGG-3'), diferente de outros complexos, como os encontrados no tipo I (Yoganand *et al.*, 2017). Na realidade, a presença de todas as proteínas no locus CRISPR se fazem necessárias para este processo. Porém, é importante levar em consideração que o número de Cas encontrados neste tipo é consideravelmente reduzido se compararmos aos demais (Makarova *et al.*, 2015; Shmakov *et al.*, 2017).

Assim, temos um pequeno complexo formado pelas proteínas Cas9-Cas1-Cas2 em conjunto com o tracrRNA para a obtenção dos espaçadores no tipo II-C (Figura 2a) (Shmakov *et al.*, 2017). Dentro deste complexo, Cas9 assume uma conformação onde seus domínios responsáveis pelo corte de DNA estão desativados (Jinek *et al.*, 2014). Sua função no processo adaptativo é exclusivamente de reconhecimento de uma pequena sequência de nucleotídeo batizada de Motivo Adjacente ao Protoespaçador (PAM, do inglês *Protospacer Adjacent Motif*). A sequência PAM é essencial para o reconhecimento do próprio e não próprio durante o processo de interferência (discutido melhor em 3.3) (Chylinski *et al.*, 2013). Cas1-Cas2 realizam o papel de nuclease, obtendo o protoespaçador (Ka *et al.*, 2016). O tracrRNA por fim, tem como papel a ativação da proteína Cas9 para reconhecimento da sequência PAM, alterando sua estrutura (Heler *et al.*, 2015).

Curiosamente, estudos onde Cas9 com funções catalíticas removidas foram inseridos em bactérias (conhecidos como Cas9 mortos {do inglês *dead Cas9* – dCas9}), houve um grande aumento de captação de protoespaçadores advindo da própria bactéria. Com o locus CRISPR chegando a conter 96% DNA próprio contra 4% do plásmidio usado durante a pesquisa (Wei *et al.*, 2015). Com isso, os autores hipotetizaram que bactérias que tendiam a obter protoespaçadores de DNA próprio se auto-destruíam na presença de uma Cas9 funcional, causando um efeito de seleção natural que propagaria somente as bactérias que obtiveram protoespaçadores de DNA estrangeiro, assegurando sua proteção em ataques subsequentes (Wei *et al.*, 2015). Isso demonstra que, apesar de ser mais simples, o sistema CRISPR do tipo II-C é, para a bactéria, uma roleta-russa (Wei *et al.*, 2015). Após a obtenção do protoespaçador, Cas1-Cas2 dirigem-se ao locus CRISPR para inserção (figura 2b) (Yoganand *et al.*, 2017).



Análises em ambientes controlados buscaram elucidar a forma de inserção de espaçadores no locus CRISPR *in vivo*. Demonstrando que, nesta etapa, Cas1-Cas2 realizam primeiramente o reconhecimento do possível locus CRISPR nas regiões distais da possível sequência líder (Wright e Doudna, 2016). Ao reconhecer a sequência, o complexo então usa a conformidade espacial inerente aos locus CRISPR para verificar: 1). Se o tamanho do protoespaçador é adequado 2). Se a região correta de sequência líder foi reconhecida e 3). Se houve o reconhecimento de uma sequência similar a líder por engano. Caso algum a sequência analisada não passa nestes critérios, Cas1-Cas2 cessarão a atividade sobre o gene bacteriano, resultando em uma pequena inserção do protoespaçador ao invés de seu completo anelamento ao gene (Wright e Doudna, 2016). Este fenômeno por si é capaz de comprometer regiões codificadoras essenciais para a manutenção da vida da bactéria. Devido a isso, a pequena inserção de protoespaçador feita na região errada é rapidamente reparada por mecanismo ainda não elucidados (Wright e Doudna, 2016). Este eficiente método de manutenção em caso de erros de inserção fora dos locus contrasta com a grande inespecificidade durante o momento de obtenção dos protoespaçadores, mencionados anteriormente.

## 4.2 Biogênese do crRNA

Existem diferenças marcantes entre os subtipos no que diz respeito a etapa de biogênese do crRNA do sistema CRISPR de classe 2 tipo II (Charpentier *et al.*, 2015). No parágrafo seguinte, consideramos o método de biogênese do crRNA executados pelos subtipos A e B.

Após a transcrição, o complexo Cas9-tracrRNA é recrutado para servir como reconhecedor do pré-crRNA (Charpentier *et al.*, 2015). Cas9 auxilia no reconhecimento por complementariedade de pares de bases existentes entre o tracrRNA e as repetições no pré-crRNA (Chylinski *et al.*, 2013). Entretanto, Cas9 possui apenas capacidade de clivar DNA (Wei *et al.*, 2015). Seus domínios capazes de interagir com o RNA são exclusivamente para reconhecimento e diferenciação entre esses dois tipos de ácidos nucleicos (Anders *et al.*, 2014; Jinek *et al.*, 2014). Para resolver esse impasse, entra em cena a RNase III, enzima comumente encontrada no metabolismo bacteriano (Deltcheva *et al.*, 2011), A RNase III realiza a clivagem da região 3' do pré-crRNA, conseqüentemente, auxiliando na maturação tanto do pré-crRNA quanto do tracrRNA. Outra enzima até o momento desconhecida é supostamente recrutada para o processamento da repetição na região 5' do pré-crRNA (Charpentier *et al.*, 2015; Hochstrasser e Doudna, 2015).

Curiosamente, quanto se tratando do subtipo C, o processamento do crRNA não se faz necessário. Estudos realizados na bactéria *N. meningitidis* demonstraram que mesmo na abstinência da RNase III, Cas9 ainda era capaz de passar pelo processo de interferência de forma eficiente (Zhang *et al.*, 2013). Aparentemente, esta característica

singular é devida as regiões promotoras encontradas em cada repetição. Desta forma, cada espaçador será transcrito separadamente, relativamente maturo para a integração com o tracrRNA e posterior interferência. A figura 2c traz o processo de biogênese de crRNA na presença da RNase III nos tipos II-C.

Independente da maneira de obtenção do crRNA, o fim se dá com a associação do crRNA maduro com o tracrRNA (Charpentier *et al.*, 2015). Formando o complexo efetor único composto por Cas9 e o recém-formado gRNA (do inglês *guided RNA*) (Jiang e Doudna, 2017).

### 4.3 Interferência

Cas9 é uma proteína formada por 2 lóbulos, um de reconhecimento (REC) e outro contendo as nucleases (NUC) (figura 3) (Jinek *et al.*, 2014). Em constante movimentação entre os 2 lóbulos existe o domínio C-terminal, de maior variedade entre os subtipos (Sternberg *et al.*, 2014; Nishimasu, 2015). REC possui a função de reconhecer o tracrRNA para associação (Nishimasu *et al.*, 2015); NUC realiza a clivagem após formação do complexo (descrito abaixo); e o domínio C-terminal é responsável pelo reconhecimento da sequência PAM. Esta sequência é essencial para o reconhecimento próprio do não próprio pois a sequência complementar ao gRNA que a Cas9 carrega não está próxima da sequência PAM no genoma bacteriano, somente no genoma do fago. Como a sequência PAM é essencial para o anelamento da Cas9 no sítio de interesse. Teoricamente, a bactéria não teria nada a temer durante esta etapa do processo. Devido sua diversidade entre espécies, diferentes tipos de Cas9 são capazes de reconhecer sequências PAM diferentes (Sternberg *et al.*, 2014). Além disso, esta estrutura mostrou-se essencial durante os processos de adaptação e interferência (Wright *et al.*, 2016). Os 2 lóbulos da proteína mudam de posição conforme as associações feitas entre tracrRNA, crRNA, sgRNA e o DNA alvo (Jiang e Doudna, 2017).

Inicialmente, no estado apo, Cas9 mantém suas estruturas NUC e C-terminal dispersas e sem qualquer atividade, reforçando a necessidade singular desta proteína de um RNA guia para que qualquer atividade enzimática seja realizada (Jiang *et al.*, 2015). Neste estado, tudo que Cas9 é capaz de realizar é reconhecer tracrRNA por meio da região REC (Jiang e Doudna, 2017). Quando isso acontece, Cas9 passa por grandes mudanças estruturais que rapidamente permitem a liberação da região C-terminal para a investigação de DNA contendo sequências PAM na região não complementar ao gRNA, assim como dispersão dos dois lóbulos, permitindo a associação do sgRNA entre eles (Jiang *et al.*, 2015). Curiosamente, após acoplar-se ao gRNA, pouca mudança conformacional acontece (Nishimasu *et al.*, 2015). Enfatizando ainda mais o papel de RNA dependência existente nesta proteína (Sternberg *et al.*, 2014).

Ao reconhecer a sequência PAM (5'-NGG-3' em *S. Pyogenes*), Cas9 realiza a dissociação da fita dupla, que então passa a reagir com o gRNA exposta a ela (Figura

2e). Caso os nucleotídeos iniciais seguido do PAM não forem capazes de se associar corretamente (região semente), Cas9 interrompe o processo, seguindo para a sequência PAM mais próxima (Jiang e Doudna, 2017). Em caso de complementariedade, Cas9 reconhece a estrutura DNA-RNA formada independente da sequência, o que é capaz de colaborar para o maior nível de aceitação de erros por parte da enzima quando mais distante a não complementariedade for da sequência PAM (Anders *et al.*, 2014)2014. Por fim, Cas9 usa seus domínios catalíticos para realizar um único corte de fim abrupto nas fitas do DNA alvo associada e não associada ao sgRNA. Efetuados pelos domínios HNH e RuvC respectivamente (Jinek *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015).

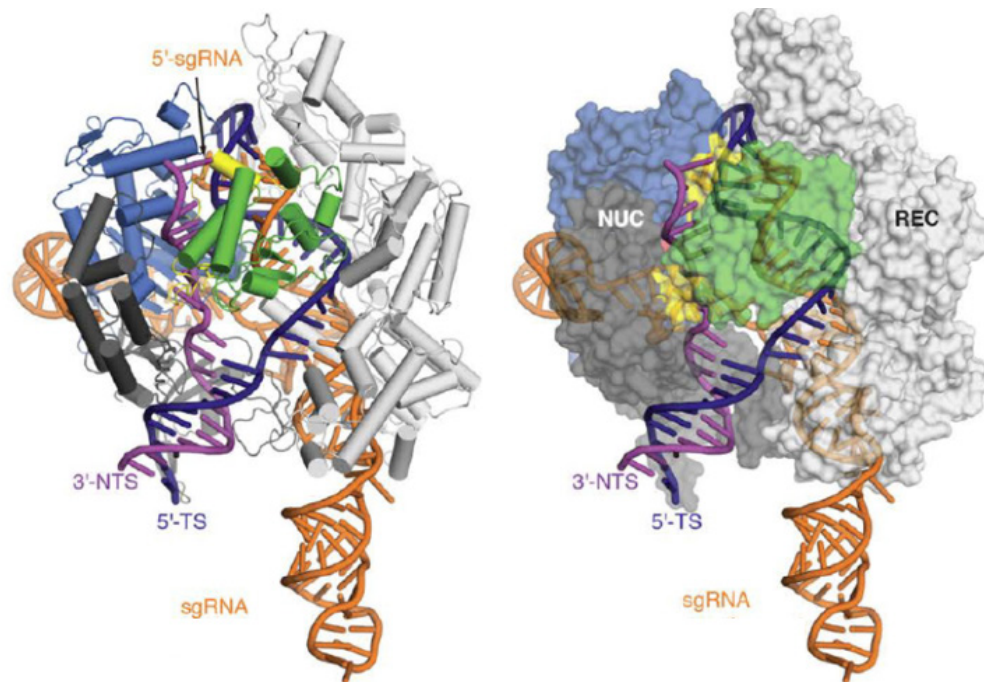


Figura 3 - Estrutura do complexo Cas9-sgRNA-DNA alvo de *S. pyogenes*

Representação em forma de fita (esquerda) e de aspecto exterior (direita) da proteína Cas9 associada ao sgRNA (laranja) e DNA alvo (azul escuro e roxo). O lóbulo NUC é formado pelos domínios CTD (cinza escuro), NHN (verde), RuvC (azul) e L (amarelo). O lóbulo REC (reconhecimento) é formado pelos múltiplos domínios REC (cinza claro). NTS = fita não alvo TS = fita alvo. Fonte: (JIANG, F. et al., 2016) Adaptado

## 5 | CONCLUSÕES

Neste capítulo buscamos explicar os mecanismos de ação do sistema CRISPR de classe 2 tipo II. Apesar de não ter abordado os usos e benefícios advintos dessas descobertas, é possível observar, pelo número de publicações existentes e o interesse crescente da comunidade científica, que a flexibilidade deste sistema é facilmente capaz de proporcionar uma número quase inimaginável de aplicações.

Os estudos realizados até então já foram capazes de desvendar uma gama de aspectos funcionais do sistema CRISPR. Atualmente, é possível dizer que se sabe o suficiente a respeito de alguns dos seus tipos para serem usados em diversos setores da esfera biológica. Porém, não é em detrimento disto que os esforços por meio da

comunidade científica para o melhor entendimento do sistema devam diminuir de intensidade. Ainda existem muitos aspectos nebulosos a respeito do sistema que, ao serem destrinchados, possivelmente extenderão ainda mais a caixa de ferramentas continuamente expansível de proteínas para a manipulação genética.

Perguntas como o funcionamento do processo de adaptação do tipo VI, a segunda RNase atuante no processo de biogênese do crRNA no tipo II, o papel do domínio catalítico existente na Cas2 são apenas alguns das múltiplas dúvidas que pairam sobre o sistema CRISPR. E, somente com o incentivo a cientistas que todos os dias trabalham arduamente para entender aspectos básicos da natureza é que poderemos responder essas perguntas, e, com elas, desenvolver tecnologias capazes de sanar de uma vez por todas o único mal cujo a humanidade não foi capaz de interferir de forma eficiente: as doenças genéticas.

## REFERÊNCIAS

ABUDAYYEH, O. O. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. **Science**, v. 353, n. 6299, p. aaf5573, Aug 05 2016.

ANDERS, C. et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 569-73, Sep 25 2014.

BARRANGO, R. et al. Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. 7, p. 3407-19, Apr 20 2015.

BARRANGO, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709-12, Mar 23 2007.

BARRANGO, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Mol Cell**, v. 54, n. 2, p. 234-44, Apr 24 2014.

BROUNS, S. J. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 960-4, Aug 15 2008.

CARTE, J. et al. Binding and cleavage of CRISPR RNA by Cas6. **RNA**, v. 16, n. 11, p. 2181-8, Nov 2010.

CHARPENTIER, E. et al. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. **FEMS Microbiol Rev**, v. 39, n. 3, p. 428-41, May 2015.

CHYLINSKI, K.; LE RHUN, A.; CHARPENTIER, E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. **RNA Biol**, v. 10, n. 5, p. 726-37, May 2013.

CONG, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819-23, Feb 15 2013.

DAUME, M.; PLAGENS, A.; RANDAU, L. DNA binding properties of the small cascade subunit Csa5. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105716, 2014.

DAVIDAR, P. et al. The potential for crop to wild hybridization in eggplant (*Solanum melongena*; Solanaceae) in southern India. **Am J Bot**, v. 102, n. 1, p. 129-39, Jan 2015.

- DAVIDSON, S. N. Power, progress and prevarication: local knowledge and GE papaya in Thailand. **GM Crops Food**, v. 3, n. 2, p. 104-10, Apr-Jun 2012.
- DELTICHEVA, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602-7, Mar 31 2011.
- DEVEAU, H.; GARNEAU, J. E.; MOINEAU, S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. **Annu Rev Microbiol**, v. 64, p. 475-93, 2010.
- FINERAN, P. C.; CHARPENTIER, E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information. **Virology**, v. 434, n. 2, p. 202-9, Dec 20 2012.
- GASIUNAS, G.; SIKSNYS, V. RNA-dependent DNA endonuclease Cas9 of the CRISPR system: Holy Grail of genome editing? **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 11, p. 562-567, 2013.
- GUHA, T. K.; WAI, A.; HAUSNER, G. Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. **Comput Struct Biotechnol J**, v. 15, p. 146-160, 2017.
- HARRINGTON, L. B. et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. **Science**, v. 362, n. 6416, p. 839-842, Nov 16 2018.
- HELER, R. et al. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. **Nature**, v. 519, n. 7542, p. 199-202, Mar 12 2015.
- HIGASHIJIMA, Y. et al. Applications of the CRISPR-Cas9 system in kidney research. **Kidney Int**, Apr 19 2017.
- HOCHSTRASSER, M. L.; DOUDNA, J. A. Cutting it close: CRISPR-associated endoribonuclease structure and function. **Trends Biochem Sci**, v. 40, n. 1, p. 58-66, Jan 2015.
- HOCHSTRASSER, M. L. et al. CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 18, p. 6618-23, May 06 2014.
- JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. **Annu Rev Biophys**, v. 46, p. 505-529, May 22 2017.
- JIANG, F. et al. STRUCTURAL BIOLOGY. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. **Science**, v. 348, n. 6242, p. 1477-81, Jun 26 2015.
- JIANG, Y. et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. **Nat Commun**, v. 8, p. 15179, May 04 2017.
- JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-21, Aug 17 2012.
- JINEK, M. et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. **Science**, v. 343, n. 6176, p. 1247997, Mar 14 2014.
- JORE, M. M. et al. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. **Nat Struct Mol Biol**, v. 18, n. 5, p. 529-36, May 2011.
- KA, D. et al. Crystal Structure of *Streptococcus pyogenes* Cas1 and Its Interaction with Csn2 in the Type II CRISPR-Cas System. **Structure**, v. 24, n. 1, p. 70-9, Jan 05 2016.



- KARVELIS, T. et al. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. **RNA Biol**, v. 10, n. 5, p. 841-51, May 2013.
- KAUSHIK. **Atomic Gardening: Breeding Plants With Gamma Radiation**. Amusing Planet 2013.
- KORNBERG, A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. **Harvey Lect**, v. 53, p. 83-112, 1957.
- LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 5, p. 317-27, May 2010.
- LEMIEUX, J. Watson and Crick Did Not Discover DNA **American Council on Science and Health** 2016
- LEVY, A. et al. CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. **Nature**, v. 520, n. 7548, p. 505-10, Apr 23 2015.
- LI, M. et al. Characterization of CRISPR RNA biogenesis and Cas6 cleavage-mediated inhibition of a provirus in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. **J Bacteriol**, v. 195, n. 4, p. 867-75, Feb 2013.
- LIU, J. J. et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. **Nature**, v. 566, n. 7743, p. 218-223, Feb 2019.
- MAKAROVA, K. S. et al. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. **Biol Direct**, v. 6, p. 38, Jul 14 2011.
- MAKAROVA, K. S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 11, p. 722-36, Nov 2015.
- MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 55-61, Oct 01 2015.
- NISHIMASU, H. [Structure and function of CRISPR-Cas9]. **Seikagaku**, v. 87, n. 6, p. 686-92, Dec 2015.
- NISHIMASU, H. et al. Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 1113-26, Aug 27 2015.
- NUMATA, T. et al. Crystal structure of the Csm3-Csm4 subcomplex in the type III-A CRISPR-Cas interference complex. **J Mol Biol**, v. 427, n. 2, p. 259-73, Jan 30 2015.
- PENG, Y. Q. et al. Applications of CRISPR/Cas9 in retinal degenerative diseases. **Int J Ophthalmol**, v. 10, n. 4, p. 646-651, 2017.
- REEKS, J. et al. Structure of the archaeal Cascade subunit Csa5: relating the small subunits of CRISPR effector complexes. **RNA Biol**, v. 10, n. 5, p. 762-9, May 2013.
- SHMAKOV, S. et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, n. 3, p. 169-182, Mar 2017.
- SMITH, H. O.; WILCOX, K. W. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. **J Mol Biol**, v. 51, n. 2, p. 379-91, Jul 28 1970.
- SOPPE, J. A.; LEBBINK, R. J. Antiviral Goes Viral: Harnessing CRISPR/Cas9 to Combat Viruses in Humans. **Trends Microbiol**, May 15 2017.

- STERNBERG, S. H. et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 62-7, Mar 06 2014.
- STERNBERG, S. H. et al. Adaptation in CRISPR-Cas Systems. **Mol Cell**, v. 61, n. 6, p. 797-808, Mar 17 2016.
- SYDOW, A. et al. Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8481-8495, 2014.
- TAMULAITIS, G.; VENCLOVAS, C.; SIKSNYS, V. Type III CRISPR-Cas Immunity: Major Differences Brushed Aside. **Trends Microbiol**, v. 25, n. 1, p. 49-61, Jan 2017.
- TEMIN, H. M.; MIZUTANI, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. **Nature**, v. 226, n. 5252, p. 1211-3, Jun 27 1970.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. The structure of DNA. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 18, p. 123-31, 1953.
- WEI, Y.; TERNS, R. M.; TERNS, M. P. Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR-Cas adaptation. **Genes Dev**, v. 29, n. 4, p. 356-61, Feb 15 2015.
- WRIGHT, A. V.; DOUDNA, J. A. Protecting genome integrity during CRISPR immune adaptation. **Nat Struct Mol Biol**, v. 23, n. 10, p. 876-883, Oct 2016.
- WRIGHT, A. V.; NUNEZ, J. K.; DOUDNA, J. A. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. **Cell**, v. 164, n. 1-2, p. 29-44, Jan 14 2016.
- YOGANAND, K. N. et al. Asymmetric positioning of Cas1-2 complex and Integration Host Factor induced DNA bending guide the unidirectional homing of protospacer in CRISPR-Cas type I-E system. **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. 1, p. 367-381, Jan 09 2017.
- ZETSCH, B. et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. **Cell**, v. 163, n. 3, p. 759-71, Oct 22 2015.
- ZHANG, J.; KASCIUKOVIC, T.; WHITE, M. F. The CRISPR associated protein Cas4 Is a 5' to 3' DNA exonuclease with an iron-sulfur cluster. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47232, 2012.
- ZHANG, Y. et al. Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. **Mol Cell**, v. 50, n. 4, p. 488-503, May 23 2013.
- ZHANG, Y. P.; SUN, J.; MA, Y. Biomanufacturing: history and perspective. **J Ind Microbiol Biotechnol**, Nov 11 2016.

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

**BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO** Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia. Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática. Também possui seu segundo Pós doutoramento pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com Análise Global da Genômica Funcional e aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Palestrante internacional nas áreas de inovações em saúde com experiência nas áreas de Microbiologia, Micologia Médica, Biotecnologia aplicada a Genômica, Engenharia Genética e Proteômica, Bioinformática Funcional, Biologia Molecular, Genética de microrganismos. É Sócio fundador da “Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde” (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Como pesquisador, ligado ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG), o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-402-3

