

Atena
Editora
Ano 2021



AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

Anderson Barros Archanjo
Aline Ribeiro Borçoi
Suzanny Oliveira Mendes
Adriana Madeira Álvares-da-Silva
(Organizadores)

Atena
Editora
Ano 2021



AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

Anderson Barros Archanjo
Aline Ribeiro Borçoi
Suzanny Oliveira Mendes
Adriana Madeira Álvares-da-Silva
(Organizadores)

Editora Chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Assistentes Editoriais

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto Gráfico e Diagramação

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremona

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

Imagens da Capa

Shutterstock

Edição de Arte

Luiza Alves Batista

Revisão

Os Autores

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2021 Os autores

Copyright da Edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. 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.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná

Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
 Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense
 Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
 Prof. Dr. Daniel Richard Sant'Ana – Universidade de Brasília
 Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
 Prof^a Dr^a Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo
 Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
 Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará
 Prof. Dr. Elói Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
 Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros
 Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
 Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador
 Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
 Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
 Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros
 Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas
 Prof^a Dr^a Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
 Prof. Dr. Pablo Ricardo de Lima Falcão – Universidade de Pernambuco
 Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Prof^a Dr^a Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
 Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares – Universidade Federal do Piauí
 Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
 Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof^a Dr^a Vanessa Ribeiro Simon Cavalcanti – Universidade Católica do Salvador
 Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
 Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
 Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
 Prof^a Dr^a Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria
 Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof^a Dr^a Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
 Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
 Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
 Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
 Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
 Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
 Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
 Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof^a Dr^a Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
 Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
 Prof^a Dr^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
 Prof^a Dr^a Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
 Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federacl do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emídio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Profª Drª Ana Grasielle Dionísio Corrêa – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande

Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora
 Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
 Prof. Dr. Sidney Gonçalves de Lima – Universidade Federal do Piauí
 Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Linguística, Letras e Artes

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
 Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
 Profª Drª Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
 Profª Drª Edna Alencar da Silva Rivera – Instituto Federal de São Paulo
 Profª Drª Fernanda Tonelli – Instituto Federal de São Paulo,
 Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
 Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
 Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
 Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
 Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Conselho Técnico Científico

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
 Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
 Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
 Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí
 Profª Ma. Adriana Regina Vettorazzi Schmitt – Instituto Federal de Santa Catarina
 Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais
 Prof. Me. Alexsandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional
 Profª Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás
 Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras
 Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
 Profª Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa
 Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
 Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia
 Profª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá
 Profª Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
 Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco
 Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
 Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
 Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Me. Carlos Augusto Zilli – Instituto Federal de Santa Catarina
 Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná
 Profª Drª Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
 Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
 Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
 Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
 Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa

Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
 Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
 Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia
 Prof. Me. Edson Ribeiro de Britto de Almeida Junior – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
 Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina
 Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
 Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
 Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
 Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
 Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein
 Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás
 Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
 Prof. Me. Fabiano Eloy Atilio Batista – Universidade Federal de Viçosa
 Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
 Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará
 Prof. Me. Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos Filho – Universidade Federal do Cariri
 Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
 Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
 Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás
 Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
 Prof. Me. Gustavo Krahll – Universidade do Oeste de Santa Catarina
 Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro
 Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza
 Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
 Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College
 Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
 Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social
 Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe
 Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay
 Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
 Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
 Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFGA
 Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia
 Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis
 Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR
 Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
 Profª Ma. Lilian de Souza – Faculdade de Tecnologia de Itu
 Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
 Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
 Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
 Profª Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz
 Profª Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa
 Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof. Me. Luiz Renato da Silva Rocha – Faculdade de Música do Espírito Santo
 Profª Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas
 Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos

Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
Profª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Dr. Pedro Henrique Abreu Moura – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie
Profª Drª Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Rafael Cunha Ferro – Universidade Anhembí Morumbi
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Renan Monteiro do Nascimento – Universidade de Brasília
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco
Profª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Profª Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Profª Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Avanços metodológicos em biologia molecular e biotecnologia

Bibliotecária: Janaina Ramos
Diagramação: Natália Sandrini de Azevedo
Correção: Giovanna Sandrini de Azevedo
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os Autores
Organizadores: Anderson Barros Archanjo
Aline Ribeiro Borçoi
Suzanny Oliveira Mendes
Adriana Madeira Álvares-da-Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A946 Avanços metodológicos em biologia molecular e biotecnologia / Organizadores Anderson Barros Archanjo, Aline Ribeiro Borçoi, Suzanny Oliveira Mendes, et al. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Outra organizadora
Adriana Madeira Álvares-da-Silva

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5983-175-3
DOI 10.22533/at.ed.753210406

1. Biologia Molecular. 2. Biotecnologia. 3. DNA. I. Archanjo, Anderson Barros (Organizador). II. Borçoi, Aline Ribeiro (Organizadora). III. Mendes, Suzanny Oliveira (Organizadora). IV. Título.

CDD 572.8

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

APRESENTAÇÃO

O livro “Avanços Metodológicos em Biologia Molecular e Biotecnologia” é uma obra com o foco principal na valorização acerca do conhecimento aprofundado em Biologia Molecular e Biotecnologia, assim como do histórico e das técnicas recentes mais aplicadas para o estudo do tema.

A obra é fruto do trabalho dos professores e alunos da disciplina “Tópicos Especiais em Biotecnologia II: Avanços Metodológicos em Biologia Molecular e Biotecnologia (BIOTEC024)”, ofertada pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

Os diversos temas relacionados à Biologia Molecular e à Biotecnologia foram abordados tendo como foco os avanços nas metodologias utilizadas ao longo dos anos. A obra consta de sete capítulos, nos quais foram discutidos a evolução da biologia molecular e das ômicas, assim como os sequenciadores de próxima geração, os métodos de estudo em epigenética, a amplificação do DNA em single-cell, estudo de expressão gênica, ferramentas de edição gênica e expressão heteróloga de proteínas.

Deste modo a obra “Avanços Metodológicos em Biologia Molecular e Biotecnologia” apresenta uma ferramenta de estudo que proporciona aos leitores uma visão ampla das principais metodologias em Biologia Molecular e Biotecnologia, assim como as suas evoluções ao longo dos anos.

Desejamos uma excelente leitura a todos!

Anderson Barros Archanjo

Aline Ribeiro Borçoi

Suzanny Oliveira Mendes

Adriana Madeira Álvares-da-Silva

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATÇÖES E SIGLAS	1
CAPÍTULO 1	3
A EVOLUÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR E AS ÔMICAS	
Tamires dos Santos Vieira	
Suzanny Oliveira Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.7532104061	
CAPÍTULO 2	14
GENÔMICA E OS SEQUENCIADORES DE PRÓXIMA GERAÇÃO	
Paola Cerbino Doblas	
Iuri Drumond Louro	
DOI 10.22533/at.ed.7532104062	
CAPÍTULO 3	26
EPIGENÉTICA E MÉTODOS DE ESTUDOS EPIGENÉTICOS	
Ivana Alece Arantes Moreno	
Suzanny Oliveira Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.7532104063	
CAPÍTULO 4	35
PRÍNCÍPIOS BÁSICOS EM AMPLIFICAÇÃO DO DNA E GENÔMICA DE CÉLULAS ÚNICAS	
Bárbara Risse-Quaioto	
Anderson Barros Archanjo	
DOI 10.22533/at.ed.7532104064	
CAPÍTULO 5	46
RT-qPCR: ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA	
Mayara Mota de Oliveira	
Anderson Barros Archanjo	
DOI 10.22533/at.ed.7532104065	
CAPÍTULO 6	58
FERRAMENTAS DE EDIÇÃO GÊNICA	
Joaquim Gasparini dos Santos	
Aline Ribeiro Borçoi	
DOI 10.22533/at.ed.7532104066	
CAPÍTULO 7	69
EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS	
Karolinni Bianchi Britto	

Greiciane Gaburro Paneto

DOI 10.22533/at.ed.7532104067

SOBRE OS ORGANIZADORES	85
-------------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

2D-PAGE	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
5hmC	5 hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina
AD	Domínio de Ativação
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato
BACs	Cromossomos Artificiais Bacterianos
BiTS-ChiP	Isolamento Descontínuo da Cromatina Específica de Tecido para Imunoprecipitação
cDNA	DNA complementar
ChiP	Imunoprecipitação da Cromatina
ChIP-chip	Imunoprecipitação de Cromatina Ligada a Microarranjos
ChIP-Seq	Imunoprecipitação da Cromatina com Tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas (do inglês <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
DCR	Doença Renal Crônica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	DNA recombinante
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DOP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Iniciada por Oligonucleotídeo Degenerado
dPCR	PCR digital
DSB	Quebra Dupla da Fita de DNA (do inglês <i>Double-Stranded Break</i>)
ESI-MS	Espectrometria de Massa de Eletrospray
FACS	Classificação Celular Ativada por Fluorescência
FDA	Food and Drug Administration
<i>FOK I</i>	<i>Flavobacterium okeanokoites</i>
FRET	Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência
FTIR	Espectroscopia Infravermelha de Transformação Fourier
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GST	Glutathione S-transferase
HATs	Histonas Acetiltransferases
HDACs	Histonas Desacetiltransferases
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
HR	Recombinação Homóloga (do inglês <i>Homologous Recombination</i>)
INTACT	Isolamento de Núcleos Marcados em Tipo Celular Específico
LCM	Microdissecção de Captura a Laser
Lpp	Lipoproteína Mureína
MACS	Classificação de Células Ativadas Magneticamente
MALBAC	Múltiplos Ciclos de Amplificação Baseados em Anelamento e Loop
MBP	Proteína Ligante da Maltose
MDA	Amplificação de Deslocamento Múltiplo
miRNA	microRNA

NGS	Sequenciadores de Próxima Geração
NHEJ	Junções Terminais não Homólogas (do inglês <i>non-homologous end joining</i>)
NLS	Sinal de Localização Nuclear
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
OmpA	Proteína A da membrana externa
OmpT	Protease VII
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGM	Personal Genome Machine
PhoE	Proteína E dos poros da membrana externa
qPCR	Reação Quantitativa em Cadeia da Polimerase (qPCR)
RBS	Sequência Shine-Dalgarno (do inglês <i>Ribosome Binding Site</i>)
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP)
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RT	Transcriptase reversa
RT-PCT	PCR de transcrição reversa
RT-qPCR	PCR de transcrição reversa quantitativa
RVS	Repetições Variáveis Diresíduos
Sars-cov-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SDS-PAGE de	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato Sódio
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
STR	Sequências de Repetições Curtas em Tandem
TALENs	Nucleases com Efetores do tipo Ativador Transcricional (do inglês <i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>)
TET	Translocação Metilcitosina Dioxigenase
TFIIIA	Fator de transcrição IIIA
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TRX	Tiorredoxina
YACs	Cromossomos Artificiais de Leveduras
ZFN	Nucleases de Dedo de Zinco (do inglês <i>Zinc Finger Nucelases</i>)

CAPÍTULO 6

FERRAMENTAS DE EDIÇÃO GÊNICA

Data de aceite: 10/05/2021

Joaquim Gasparini dos Santos

Bacharel em Ciências Biológicas, Mestre e Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal do Espírito Santo/RENORBIO
<http://lattes.cnpq.br/2629284844712364>
<https://orcid.org/0000-0001-6096-116X>
joaquimgasparini@gmail.com, Universidade Federal do Espírito Santo

Aline Ribeiro Borçoi

Farmacêutica pela UFJF, Mestre em Farmacologia pela UNIFESP, Doutora e Pós-Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Federal do Espírito Santo/RENORBIO.
<http://lattes.cnpq.br/0558531160628107>
<https://orcid.org/0000-0003-4594-9888>
alineborçoi@gmail.com, Universidade Federal do Espírito Santo

RESUMO: A surpreendente capacidade do DNA em armazenar e transmitir informações necessárias para o desenvolvimento e manutenção da vida possibilitou a criação de um novo campo de pesquisa denominado de engenharia genética. Este segmento é totalmente voltado para o desenvolvimento de tecnologias capazes de manipular e modificar de maneira precisa e pontual as informações contidas no DNA de diversos tipos de organismos. A partir da descoberta da atividade das enzimas de restrição e de outras ferramentas como ZFN, TALEN e CRISPR, abriu-se um mundo de possibilidades para se realizar uma edição genômica cada vez mais precisa.

PALAVRAS-CHAVE: CRISPR-Cas9; ZFN; TALEN; Edição gênica.

GENOME EDITING TOOLS

ABSTRACT: The surprising ability of DNA to store and transmit information necessary for the development and maintenance of life, made it possible to create a new field of research called genetic engineering. This segment is totally focused on the development of technologies capable of manipulating and modifying in a precise and punctual way the information contained in the DNA of different types of organisms. From the discovery of the activity of restriction enzymes and other tools such as ZFN, TALEN and CRISPR, opening up a world of possibilities to carry out an increasingly accurate genomic edition.

KEYWORDS: CRISPR-Cas9; ZFN, TALEN, Genic edition

1 | INTRODUÇÃO

Em meados de 1970, com a descoberta das enzimas de restrição – as quais possuem a capacidade de clivar regiões específicas do DNA de invasores em bactérias - e de sua junção com outras técnicas, forneceu aos cientistas a capacidade de manipulação e de transferência de fragmentos de DNA para diversos organismos, dando se início a tecnologia do DNA recombinante (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013a).

Apartir desse primeiro passo, começaram a emergir outras técnicas de manipulação que possibilitaram aos cientistas uma maior precisão, dentre as quais podemos citar as nucleases de dedo de zinco (do inglês Zinc Finger Nucleases – ZFN), nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (do inglês transcription activator-like effector nucleases – TALENs) e repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente

interespaçadas (do inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR) conjugadas com uma enzima Cas9, permitindo aos cientistas: realizarem com maior precisão alterações em regiões responsáveis pelo desenvolvimento de diversos tipos de doenças; desenvolvimento de fármacos mais precisos e eficazes; criação de cultivares mais eficientes na produção de alimentos; desenvolvimento de novos biocombustíveis e outras diversas aplicações (GUPTA; MUSUNURU, 2014).

A base de aplicação das técnicas de edição gênica tem como princípio gerar uma quebra na dupla da fita de DNA em uma região de interesse. Em células de eucariotos essa quebra pode tomar dois caminhos para ser reparadas que são: reparo por junções terminais não homólogas (do inglês non-homologous end joining - NHEJ) ou reparo por recombinação homóloga (do inglês Homologous Recombination - HR). O tipo de reparo que será realizado pela célula após a quebra da fita dupla de DNA vai depender muito da fase do ciclo celular que a célula está. O reparo por NHEJ tem seu ponto de ocorrência durante a fase G1 do ciclo celular, já o reparo por HR tem seu ponto de ocorrência no final da fase S até o final da fase G2 do ciclo celular, pois nesse ponto temos uma maior disponibilidade de fita homóloga para que seja realizado esse reparo (GUPTA; MUSUNURU, 2014; NEMUDRYI et al., 2014).

O reparo por NHEJ (Figura 1) ocorre de forma aleatória e tem uma eficiente junção da quebra realizada. Entretanto, esse reparo muitas vezes pode gerar perda de informação naquela região devido a frequentes ocorrências de inserção ou deleções (INDEL) de nucleotídeos. Desta maneira, pode causar a inativação por completo de um gene devido a formação de um mRNA que será degradado ou de uma proteína truncada causada por uma tradução de um mRNA sem sentido. Esse tipo de reparo muito vezes é desejado para gerar um gene *knockout* ou o silenciamento da região específica do genoma que se pretende estudar (JOUNG; SANDER, 2013).

O reparo por HR (Figura 1) é um tipo mais complexo para se reparar a quebra na fita dupla de DNA, pois ele só será realizado mediante a presença de uma fita homóloga. Para induzir esse tipo de reparo é inserido na célula, em conjunto com a técnica selecionada para edição gênica, um DNA doador ao qual contém a região de interesse que o pesquisador queira inserir no genoma do receptor. Esse tipo de abordagem muitas vezes é utilizado para se corrigir uma região com erros na sequência do DNA causadoras de doenças, corrigindo desta forma a função normal do gene. Também pode ser utilizado para inserir um gene de interesse para que a célula exerça uma nova função pretendida, como no desenvolvimento de novos cultivares, onde características de interesse podem ser inseridas no genoma da planta (MA et al., 2017).

ZFN, TALEN e CRISPR

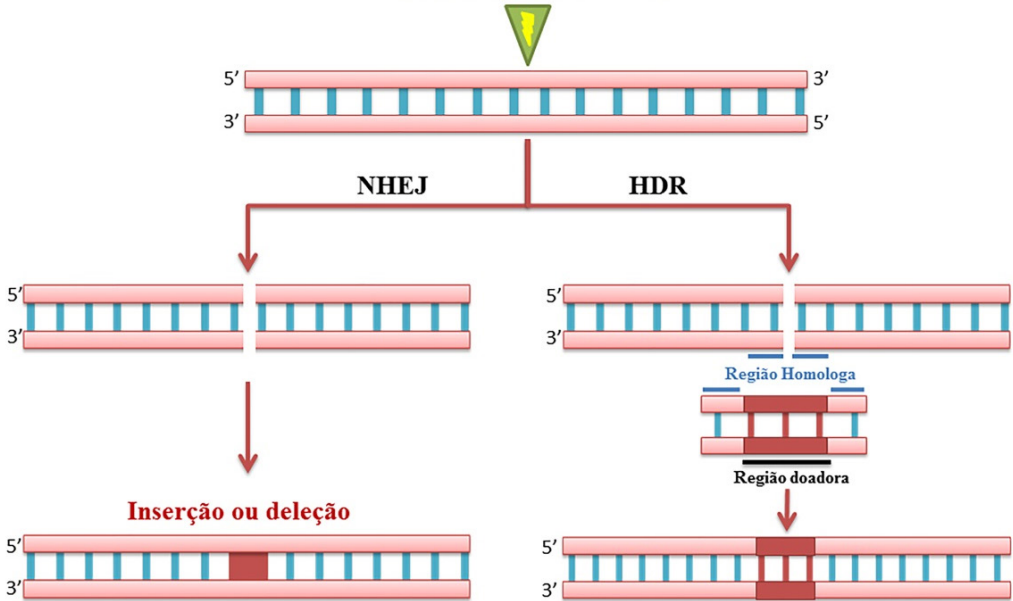


Figura 1. Duas possíveis vias de reparo de uma clivagem genômica da dupla fita de DNA, realizado por meio do uso de técnicas de edição. Alternativamente, a ruptura da fita dupla de DNA pode ser reparada por junções terminais não homólogas (NHEJ), ao qual leva a mutações no local da clivagem através de inserção ou deleção de pares de bases presente na fita dupla do DNA. Quando fornecido a célula um DNA doador homólogo, o reparo poderá prosseguir por recombinação homóloga (HDR), onde será utilizado o doador como modelo.

2 | NUCLEASE DE DEDO DE ZINCO (ZFN)

Nuclease de dedo de zinco (ZFN) está presente em 3% do genoma humano e foi descoberto em 1985 por Miller, enquanto realizava estudos com o Fator de transcrição IIIA (TFIIIA) em oocistos imaturos de *Xenopus*. Os ZFNs são proteínas de fatores de transcrição formadas por um arranjo de motivos em tandem, onde cada motivo do dedo de zinco contém aproximadamente 30 amino ácidos arranjados em uma estrutura beta-beta-alfa. Cada folha β anti-paralelas contém dois resíduos de Cisteínas e duas Histidinas na subunidade alfa-hélice, ligadas e estabilizadas por um zinco (Cys2 - Zn - His2) (Figura 2). A região alfa-hélice de cada dedo de zinco possui sequências específicas de aminoácidos capazes de reconhecer e se ligar com fidelidade a três pares de bases do DNA (URNOV et al., 2010; CARROLL, 2011).

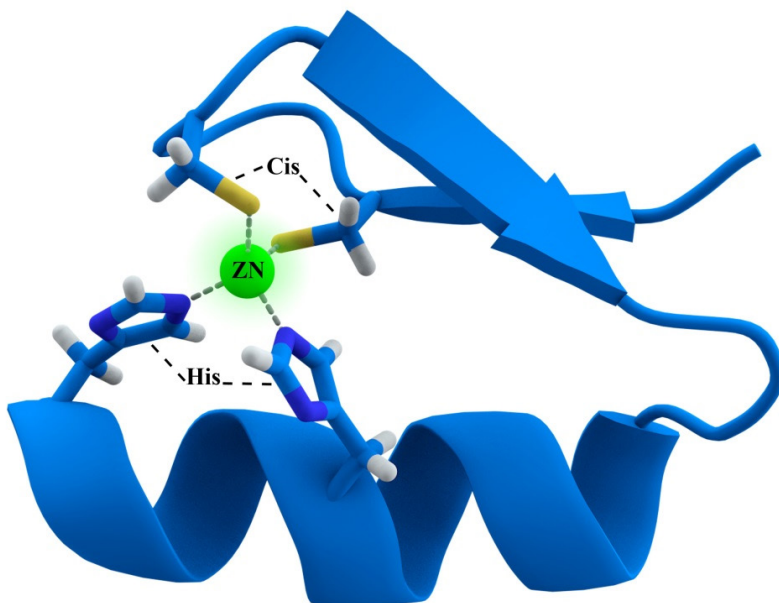


Figure 2. Representação esquemática da proteína de dedo de zinco (ZFP) (Modificado de Thomas Splettstoesse. Wikipedia).

A primeira aplicação prática utilizando dedo zinco foi realizada em 1994, a partir de um estudo realizado *in vitro* por Cho e colaboradores, capaz de reconhecer e inibir a transcrição do oncogene *bcr-abl*. Esse oncogene é denominado de cromossomo Filadélfia, formado a partir da translocação entre o cromossomo 9 e 22, capaz de levar a uma divisão desordenada das células, causando a leucemia mielóide crônica. Esse importante feito abriu caminho para a criação das primeiras empresas de biotecnologia - a Sangamo BioSciences na Califórnia e Gendaq Ltda no Reino Unido com intuito de explorar e desenvolver nova tecnologia para o uso terapêutico (JAMIESON; MILLER; PABO, 2003; CHANDRASEGARAN, 2017).

Em 1996 Chandrasegaran junto com sua equipe conseguiram desenvolver a primeira endonuclease de restrição quimérica com capacidade de gerar uma quebra dupla da fita de DNA (do inglês Double-Stranded Break – DSB) em um local específico *in vitro*, a partir da fusão da proteína de dedo de zinco com um domínio de clivagem não específico *FOK I* (domínio catalítico presente na *Flavobacterium okeanoikoites*) (Figura 3). O desenvolvimento da ZFN foi uma divisora água para os futuros trabalhos de engenharia genética, pois facilitou a criação de modelos *knockout* para estudos de doença; possibilitou a inserção de gene doadores ao genoma do receptor, como a inserção de uma proteína marcadora que emite fluorescência verde, reparo de regiões responsáveis pelo desenvolvimento e doenças ou até mesmo regular a expressão de genes específicos; além de possibilitar a produção de novas cultivares pela eliminação ou adição de novos genes para aumento da produção (CHANDRASEGARAN, 1996; KLUG, 2010).

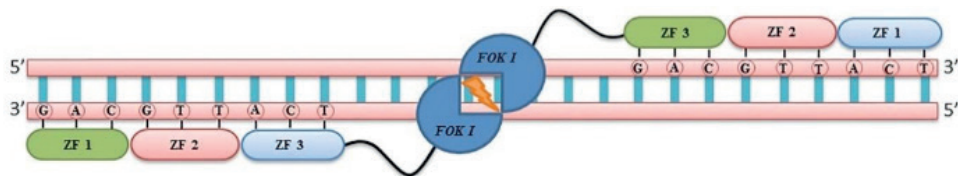


Figura 3. Cada nuclease de dedo de zinco (ZFN) consiste de domínios protéicos que reconhecem sequências específicas de três nucleotídeos do DNA. Na ponta de cada dedo de zinco encontra-se um domínio de clivagem composta por uma nuclease FOK I que quando unidas causa o corte abrupto na fita dupla de DNA.

Um dos mais importantes estudos conduzindo ZFN com intuito terapêutico aplicável em humanos foi a deleção do gene CCR5 em linfócitos T de portadores do vírus HIV. Sabe-se que o gene CCR5 é responsável por gerar um co-receptor que facilita a infecção do vírus HIV em linfócitos T. A partir desses dados, os cientistas realizaram os primeiros estudos com linfócitos CD4+ T *in vitro*, ao qual inativaram o gene CCR5 através do desenvolvimento de um ZFN específico e, após a modificação, inseriram as células em camundongos infectados com vírus do HIV. Foi observado que os camundongos que receberam as células modificadas possuíam uma baixa carga viral quando comparado com os selvagens. Esse estudo foi deu início a um teste clínicos em humanos e para o desenvolvimento de uma nova terapia para o vírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (PEREZ et al., 2008).

O processo de edição gênica realizada por ZFN são realizados através da introdução de duas nucleases, cada uma compostas de 3 a 9 dedos de zinco conjugadas com um domínio de clivagem *FOK I*, cada uma ZFN com sua capacidade de reconhecimento de 9 a 18 pares de base presentes no DNA (PEREZ et al., 2012).

Outros tipos de proteínas de dedo de zinco com diferentes domínios funcionais foram desenvolvidas para abordagens mais específicas. Essas ZFN são conjugadas com domínios que não tem atividade de gerar quebra na fita dupla de DNA, mas sim com fatores que causam a repressão de promotores gênicos, realizam a modificação da cromatina, realizam o controle da expressão gênica por meio de ligantes específicos ou ativam constantemente a expressão do gene de interesse ou podem realizar a metilação de regiões específicas do DNA (URNOV et al., 2010; PEREZ et al., 2012).

Um ponto importante em relação ao uso da técnica de edição gênica por ZFN, são as vantagens e a limitação para seu uso. Como vantagens pode se destacar que é uma técnica que não tem risco de ser incorporada no genoma, devido a utilizar uma proteína durante a fase de edição. Outro ponto é o baixo ponto de off-targets, ou seja, pontos de ação da nuclease que estão fora do alvo gênico pretendido, já que possui uma alta especificidade de ligação a região ao qual foi desenhada. Além disso essa técnica de edição genica pode se trabalhada em qualquer tipo de célula. Como pontos negativos pode se ressaltar principalmente a dificuldade de desenvolvimento, pois o processo de construção demanda tempo uma complexa engenharia na hora de desenhar. Além disso você só pode atingir um alvo de interesse de cada vez, não podendo realizar a modificação em vários alvos ao mesmo tempo, por fim ela é uma técnica que ainda possui um baixo

3.1 NUCLEASES COM EFETORES DO TIPO ATIVADOR TRANSCRICIONAL (TALEN)

A técnica de edição gênica baseada em TALEN surgiu como uma opção alternativa ao uso de ZFN, apesar das duas técnicas compartilharem similaridades, como ser conjugada com uma nuclease não específica a *FOK I*. Os efetores do tipo ativador transcricional (TALEs), são proteínas secretadas pela *Xanthomona* spp., uma bactéria fitopatogênica causadora da ferrugem bacteriana, que invade células de plantas, alterando a expressão gênica da mesma. Os TALEs são compostos por uma região C-terminal onde encontramos uma porção ao qual é um sinal de localização nuclear (NLS). Em conjunto com essa porção encontra-se um domínio de ativação (AD), ao qual tem como função ativar constitutivamente a transcrição da célula hospedeira. A parte mais complexa de TALE possui uma porção modular composta por 10 a 30 repetições, cada uma com aproximadamente 33 a 35 repetições de aminoácidos, denominado de repetições variáveis diresíduos (RVS). Na posição 12-13 das RVS encontram-se os aminoácidos variáveis responsáveis por realizar o reconhecimento e a ligação aos nucleotídeos do DNA do hospedeiro, ou seja, sequências de aminoácidos presentes nessa região como Asn e Ile (NI) se ligam a base adenina (A), Asn e Gly (NG) se ligam a base guanina (G), duas Asn (NN) irá se ligar a guanina (G) ou adenina (A) e His and Asp (HD) irão se ligar a citosina (C) (Figura 4) (JOUNG; SANDER, 2013; NEMUDRYI et al., 2014)

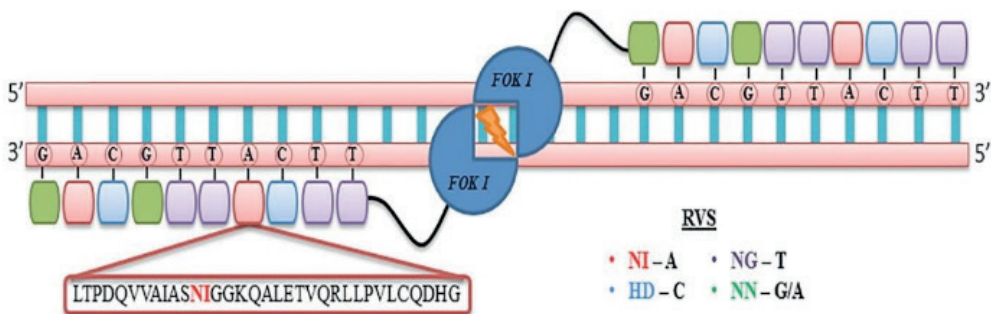


Figura 4. Estrutura esquemática de TALEN com seus domínios de repetição e o domínio de clivagem composto pela nuclease FOK I. Cada repetição TALE é constituída por 34 aminoácidos, onde os aminoácidos presentes nas posições 12 e 13, denominados de repetições variáveis diresíduos (RVDs), determinam a especificidade de ligação a bases presentes no DNA.

A técnica de TALEN vem sendo amplamente utilizada nas áreas de desenvolvimento de terapias humanas e agrícola. No desenvolvimento de terapias humanas foi desenvolvido com TALEN a inativação do gene CCR5, o mesmo objetivo citado anterior realizado com ZFN. Outro interessante projeto é o desenvolvimento de células de defesa UCARTs (Universal Chimeric Antigen Receptor T-cells products), que são células T de defesa provenientes de um doador saudável modificadas *in vitro* e inserida no paciente refratários aos medicamentos disponíveis contra o câncer. A modificação realizada nessas células

provocam capacidade de reconhecimento e eliminação das células do câncer (KUSANO et al., 2016).

Na área agrária podemos citar o desenvolvimento de uma cultivar de arroz resistente a ataque de *Xanthomona* spp., onde TALEN foi utilizado para inativar a região gênica de ligação de TALE, inibindo dessa forma as perdas de produção causada pela ferrugem bacteriana (NEMUDRYI et al., 2014).

Outro projeto interessante utilizando a tecnologia de TALEN foi desenvolvido pela empresa Recombinectis (Minnesota – EUA), em que dois machos mestiços de raça leiteiros mochos não desenvolviam chifres ao longo do seu crescimento, evitando dessa forma um processo doloroso para o gado de descorna. O processo de edição gênica se deu a partir de uma célula doadora de um macho de vaca leiteira com presença de chifres e um alelo doador celtico da raça Angus, ao qual não apresenta chifre. Dessa forma, utilizou-se a tecnologia de TALEN em que a região do genoma responsável por produzir os chifres foi cortada e inserida no lugar o alelo celtico dominante. Por fim, foram selecionadas as células que sofreram a modificação desejada e clonadas a partir da transferência de núcleo, para assim, criar o embrião que seria transplantado na vaca aceptora, gerando com sucesso bezerros sem chifres. Entretanto, o projeto não teve sucesso. A agência regulatória de alimentos e medicamentos (FDA) dos Estados Unidos da América considerou o animal transgênico e teve sua comercialização proibida em 2019, já que parte do plasmídeo utilizado para entregar o alelo celtico foi integrada ao genoma dos bezerros (ZHANG et al., 2013; CHAUDHARY; PRATAP; SHARMA, 2016; LI et al., 2020).

O processo de edição gênica realizada por TALEN é bem parecido com o de ZFN, devido introdução de duas quimeras nucleases proteicas na célula alvo. TALEN pode ser desenvolvida para reconhecer de 12 a 20 pares de bases. Além disso pode ser substituído a nuclease *FOK I* por outros domínios funcionais como as citadas em ZFN (JOUNG; SANDER, 2013).

As vantagens de utilizar a técnica de edição gênica por TALEN está na forma mais fácil de desenhar e projetar, além de apresentar um baixo efeito de off-target e citotoxicidade quando comparado com a técnica de ZFN. Além disso, TALEN possui uma taxa de 96% de afinidade com a região ao qual foi projetada para se ligar. As desvantagens estão na baixa eficiência em regiões de alta metilação do DNA, um custo elevado para se projetar e requer um processo metodológico de clonagem complexo (CHAUDHARY; PRATAP; SHARMA, 2016).

4 | CRISPR-CAS9

Observado pela primeira vez no genoma de *E. coli* por Ishino em 1987, batizada em 2002 por Mujica com o nome de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespçadas (do inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR), só em 2007 foi descoberta a sua função como um sistema de defesa de bactérias contra vírus invasores por Philippe Horvath e colaboradores. A infecção viral em bactéria muitas vezes leva a morte do hospedeiro, mas algumas bactérias que conseguem sobreviver a esse ataque integram ao seu DNA denominada de “CRISPR locus” o material

genético do invasor. Assim, quando essa bactéria é novamente infectada pelo mesmo vírus, é ativada a transcrição da região genômica responsável pela formação do complexo entre o RNA guia que irá reconhecer o DNA invasor e endonuclease Cas9 ao qual tem a capacidade de clivar o DNA invasor, evitando que ele infecte a bactéria e cause à morte ou danos à mesma (BARRANGOU; HORVATH, 2017).

No ano de 2012 as pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna, conseguem criar um RNA guia sintético capaz de guiar a Cas9 para regiões desejadas, conseguindo aperfeiçoar e simplificar o método de produção de CRISPR/Cas9. Nesse mesmo ano foi registrado o pedido de patente nos EUA para CRISPR/Cas9 como nova forma de edição gênica. Quase ao mesmo tempo o pesquisador Feng Zhang (Instituto Broad) e George Church (Universidade de Harvard), também registraram pedido de patente, onde o processo de autoria e patente se arrasta até hoje na justiça (JINEK et al., 2012; PICKAR-OLIVER; GERSBACH, 2019).

Um fato interessante de se observar em relação à produção científica sobre CRISPR/Cas9, é que de 2002 - ano em que Mujica deu nome à essa região - até o ano de 2013 - após início da briga pela patente – apenas 29 estudos foram publicados. De 2013 a 2019 o número de publicações saltou para 3.221 publicações, com a China liderando as pesquisas com relação a utilização dessa técnica na edição gênica (PICKAR-OLIVER; GERSBACH, 2019).

Estudos voltados para edição gênica de mamíferos tiveram adaptações e testes em células humanas foram realizadas por Feng Zhang em 2013. A partir desse estudo, Jiahao Sha em conjunto com outros pesquisadores na universidade da China, conseguiram em 2014 gerar macacos com modificações de genes gerados por CRISPR/Cas9. Um grande avanço na área médica foi possível e revelado em 2015, quando Church conseguiu eliminar do genoma de suínos 62 retrovírus (PERVS) com potencial patogênico a humanos. Esse estudo foi recebido com bastante impacto pelo meio científico, pois abriu as portas para aprimorar o xenotransplante de órgão em humanos, com grande possibilidade de diminuir a espera por um órgão na fila de transplante.

No ano de 2016, You Lu da universidade Schian na China tiveram sucesso a desativação do gene PD-1 de células T, estimulando as mesmas a combaterem células de câncer de pulmão de pacientes refratários aos tratamentos disponíveis. Em 2017, Ha Youn Shin, em conjunto com outros pesquisadores do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, conseguiram identificar que a técnica de CRISPR/Cas9 pode causar efeitos off-targets fora do alvo de estudo. No mesmo ano um feito inédito realizado por Shoukhrat Mitalipov em conjunto com sua equipe na Universidade de Saúde e Ciência do Oregon, conseguiram reparar com sucesso uma mutação do gene *MYBPC3* causador da cardiomiopatia hipertrófica em embriões inviáveis, abrindo as portas para novos estudos com doenças geneticamente herdáveis (MA et al., 2017; SCHAEFER et al., 2017).

Em resumo, muitos avanços na pesquisa utilizaram como técnica CRISPR/Cas9. Entretanto, pouco se discutia sobre a ética da utilização das técnicas de edição gênica em embriões viáveis e até que ponto a ciência pode interferir no processo natural da vida ou na geração de indivíduos dotados de capacidades ou habilidades por meio de modificações genéticas.

Em novembro de 2018 o pesquisador He Jiankui da Universidade de Ciência e tecnologia do Sul da China veio a público anunciar que tinha gerado gêmeas geneticamente modificadas por CRISPR/Cas9. A modificação realizada por ele foi o silenciamento do gene CCR5 nos embriões, ao qual gera um receptor responsável por facilitar a infecção pelo vírus HIV. He Jiankui foi julgado e condenado a três anos de prisão por exercício ilegal da medicina na China, a pagar multa de US\$430,000, além de ter sido banido da comunidade científica (LU et al., ; THURTLIE-SCHMIDT; LO, 2018; PICKAR-OLIVER; GERSBACH, 2019).

A técnica de CRISPR/Cas9 é vista como revolucionária no cenário da edição gênica devido ao seu baixo custo, sua versatilidade e facilidade de desenvolvimento quando comparada com ZFN e TALEN. CRISPR/Ca9 é composta por um RNA guia de aproximadamente 23 nucleotídeos, dentre eles três nucleotídeos iniciais que se denomina motivo PAM (Protospacer Adaptor Motif), responsáveis por reconhecer a região de interesse do DNA e permitir o anelamento dos outros 20 nucleotídeos presentes no RNA guia. Em conjunto com RNA guia há uma Cas9 com duas subunidades catalíticas (RuvC1 e HNH), responsável por realizar o corte na fita dupla do DNA (Figura 5).

Após a descoberta de CRISPR/Cas9, diversas outras variantes foram desenvolvidas para finalidades específicas de edição gênica, repressão ou ativação de regiões do genoma, em que cada modelo vai depender do objetivo do seu estudo (LU et al., ; GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013b; BARRANGOU; HORVATH, 2017).

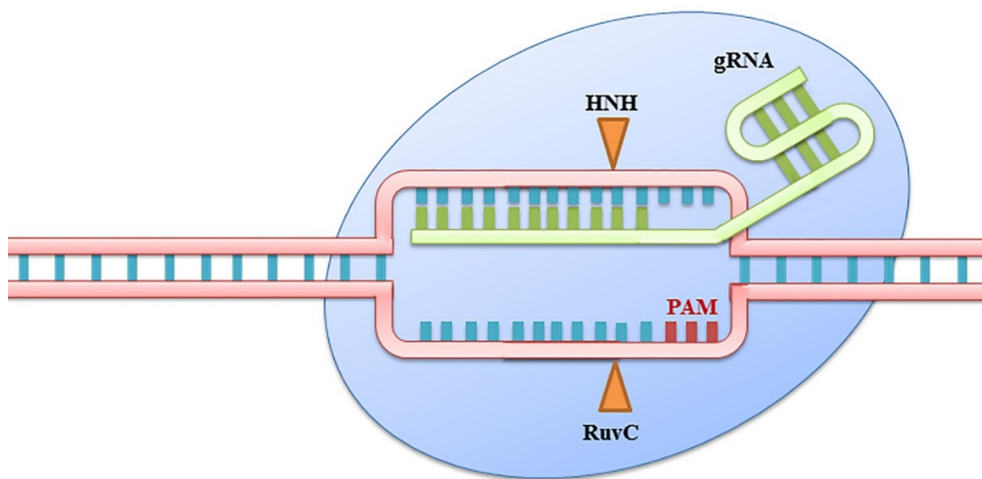


Figura 5. Estrutura esquemática de CRISPR-Cas9 ao qual é orientado por uma fita guia de RNA (gRNA) e um protospacer de motivo adjacente (PAM), responsável por direcionar sua especificidade, devido sua complementariedade e emparelhamento complementar com uma sequência alvo presente no DNA. Ao realizar o emparelhamento dois domínios catalíticos, RuvC e HNH, realizam a quebra da fita dupla de DNA.

As vantagens de usar CRISPR/Cas9 ou qualquer outra variante estão no seu baixo custo para desenvolvimento, alta eficiência para realização de edições gênicas,

possibilidade de se realizar diversas modificações gênicas ao mesmo tempo, o que não é possível utilizando ZFN e TALEN, além de ter sido testado com sucesso em diversos tipos de células. Como desvantagens estão na limitação na disponibilidade para região de reconhecimento de PAM (ADLI, 2018).

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de diferentes técnicas de edição gênica vem gerando um avanço no meio científico, seja na possibilidade de desenvolvimento de novas terapias para doenças que afetam os seres humanos, seja no desenvolvimento de bases mais eficientes na agricultura, com novas cultivares mais eficientes na produção de alimentos, resistências a pragas e na diminuição de uso de defensivos agrícolas, além de possibilitar a criação de animais com características desejadas, não precisando passar pelo demorado processo de seleção clássica das características desejadas através de diversos cruzamento.

Além disso, levanta uma discussão ética de até onde a pesquisa pode prosseguir, sem ser utilizada para caráter extremamente exclusiva de interesse de apenas uma minoria, como a realização de melhoramento genético humano, seleção de características vistas como padrões aceitáveis, ou até mesmo para criação de verdadeiras máquinas de guerra ou novas armas químicas. Toda nova tecnologia sempre será bem-vinda, quando for para alimentar o bem comum de todos e sempre respeitando a liberdade de escolha de cada indivíduo.

REFERÊNCIAS

ADLI, M. **The CRISPR tool kit for genome editing and beyond.** Nature Communications, v. 9, n. 1, 2018.

BARRANGOU, R.; HORVATH, P. **A decade of discovery : CRISPR functions and applications.** Nature Publishing Group, v. 2, n. June, p. 1–9, 2017.

CARROLL, D. **Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases.** Genetics, v. 188, n. August, p. 773–782, 2011.

CHANDRASEGARAN, S. **Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, n. February, p. 1156–1160, 1996.

CHANDRASEGARAN, S. **Recent advances in the use of ZFN-mediated gene editing for human gene therapy.** Cell and Gene Therapy Insights, v. 3, n. 1, p. 33–41, 2017.

CHAUDHARY, K.; PRATAP, D.; SHARMA, P. K. **Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): An efficient tool for plant genome editing.** Engineering in Life Sciences, p. 330–337, 2016.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. **ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering.** Trends in Biotechnology, v. 31, n. 7, p. 397–405, 2013a.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. **ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering.** Trends in Biotechnology, v. 31, n. 7, p. 397–405, jul. 2013b..

GUPTA, R. M.; MUSUNURU, K. **Expanding the genetic editing tool kit : ZFNs , TALENs , and CRISPR-Cas9.** Journal of Clinical Investigation, v. 124, n. 10, 2014.

JAMIESON, A. C.; MILLER, J. C.; PABO, C. O. **Drug discovery with engineered zinc-finger proteins.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 2, p. 14–20, 2003.

JINEK, M. *et al.* **A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.** Science, v. 337, n. 6096, p. 816–822, 2012.

JOUNG, J. K.; SANDER, J. D. **TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 14, n. 1, p. 49–55, 2013..

KLUG, A. **The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation.** Quarterly Reviews of Biophysics, v. 43, n. 1, p. 1–21, 2010.

KUSANO, H. *et al.* **A simple Gateway-assisted construction system of TALEN genes for plant genome editing.** Nature Publishing Group, n. July, p. 1–7, 2016.

LI, H. *et al.* **Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects.** Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 5, 2020.

LU, Y. *et al.* **Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer.** Nature Medicine, v. 26, p. 732–740, 2020.

MA, H. *et al.* **Article Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos.** Nature, v. 548, p. 413–419, 2017.

NEMUDRYI, A. A. *et al.* **TALEN and CRISPR / Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery.** Acta Naturae, v. 3, n. 22, p. 19–40, 2014.

PEREZ, E. E. *et al.* **Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases.** Nature Biotechnology, v. 26, n. 7, p. 808–816, 29 jul. 2008.

PEREZ, E. E. *et al.* **Editing Using Zinc-Finger Nucleases.** Nat Biotechnol, v. 26, n. 7, p. 808–816, 2012.

PICKAR-OLIVER, A.; GERSBACH, C. A. **The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 20, n. 8, p. 490–507, 2019.

SCHAEFER, K. A. *et al.* **Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing *in vivo*.** Nature Methods, v. 14, p. 547–548, 2017.

THURTLIE-SCHMIDT, D. M.; LO, T. W. **Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/ CAS9 gene editing for undergraduates.** Biochemistry and Molecular Biology Education, v. 46, n. 2, p. 195–205, 2018.

URNOV, F. D. *et al.* **Genome editing with engineered zinc finger nucleases.** Nature, v. 11, n. 9, p. 636–646, 2010.

AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br

AVANÇOS METODOLÓGICOS EM BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br