

Impactos das Tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde

3

Christiane Trevisan Slivinski
(Organizadora)

 **Atena**
Editora

Ano 2019

Christiane Trevisan Slivinski
(Organizadora)

Impactos das Tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde 3

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
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
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall'Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant'Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

I34 Impactos das tecnologias nas ciências biológicas e da saúde 3
[recurso eletrônico] / Organizadora Christiane Trevisan Slivinski. –
Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. – (Impactos das
Tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde; v. 3)

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-85-7247-037-7
DOI 10.22533/at.ed.377191601

1. Ciências biológicas. 2. Farmacologia. 3. Saúde. 4. Tecnologia.
I. Slivinsk, Christiane Trevisan.

CDD 620.8

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

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.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A tecnologia está ganhando cada dia mais espaço na vida das pessoas e em tudo que as cerca. Compreende-se por tecnologia todo o conhecimento técnico e científico e sua aplicação utilizando ferramentas, processos e materiais que foram criados e podem ser utilizados a partir deste conhecimento. Quando, para o desenvolvimento da tecnologia estão envolvidos sistemas biológicos, seres vivos ou seus metabólitos, passa-se a trabalhar em uma área fundamental da ciência, a Biotecnologia.

Toda produção de conhecimento em Biotecnologia envolve áreas como Biologia, Química, Engenharia, Bioquímica, Biologia Molecular, Engenharia Bioquímica, Química Industrial, entre outras, impactando diretamente no desenvolvimento das Ciências Biológicas e da Saúde. A aplicação dos resultados obtidos nos estudos em Biotecnologia está permitindo um aumento gradativo nos avanços relacionados a qualidade de vida da população, preservação da saúde e bem estar.

Neste ebook é possível identificar vários destes aspectos, onde a produção científica realizada por pesquisadores das grandes academias possuem a proposta de aplicações que podem contribuir para um melhor aproveitamento dos recursos que a natureza nos oferece, bem como encontrar novas soluções para problemas relacionados à manutenção da vida em equilíbrio.

No volume 2 são apresentados artigos relacionados a Bioquímica, Tecnologia em Saúde e as Engenharias. Inicialmente é discutida a produção e ação de biocompostos tais como ácido hialurônico, enzimas fúngicas, asparaginase, lipase, biossurfactantes, xilanase e eritritol. Em seguida são apresentados aspectos relacionados a análise do mobiliário hospitalar, uso de oxigenoterapia hospitalar, engenharia clínica, e novos equipamentos utilizados para diagnóstico. Também são apresentados artigos que trabalham com a tecnologia da informação no desenvolvimento de sistemas e equipamentos para o tratamento dos pacientes.

No volume 3 estão apresentados estudos relacionados a Biologia Molecular envolvendo a leptospirose e diabetes melitus. Também foram investigados alguns impactos da tecnologia no estudo da microcefalia, agregação plaquetária, bem como melhorias no atendimento nas clínicas e farmácias da atenção básica em saúde.

Em seguida discute-se a respeito da utilização de extratos vegetais e fúngicos na farmacologia e preservação do meio ambiente. Finalmente são questionados conceitos envolvendo Educação em Saúde, onde são propostos novos materiais didáticos para o ensino de Bioquímica, Biologia, polinização de plantas, prevenção em saúde e educação continuada.

Christiane Trevisan Slivinski

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
A SOS BOX PATTERN FOR LEPTOSPIRA SPP.	
Livia de Moraes Bomediano	
Renata Maria Augusto da Costa	
Ana Carolina Quirino Simões	
DOI 10.22533/at.ed.3771916011	
CAPÍTULO 2	7
ANÁLISE IN SILICO DO GENE LIPID TRANSFER PROTEIN SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE ABIÓTICO	
Renan Gonçalves da Silva	
Jóice de Oliveira Leite Silva	
Lucas de Faria Nogueira	
Cyro Bueno Neto	
Sonia Marli Zingaretti	
DOI 10.22533/at.ed.3771916012	
CAPÍTULO 3	16
ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE DELEÇÃO DOS GENES GSTM1 E GSTT1 E <i>DIABETES MELLITUS</i> EM IDOSOS: ESTUDO PILOTO	
Layse Rafaela Moroti – Perugini	
Luana Oliveira de Lima	
Audrey de Souza Marquez	
Regina Célia Poli-Frederico	
DOI 10.22533/at.ed.3771916013	
CAPÍTULO 4	25
CRISPR/CAS9 – UMA PROMISSORA FERRAMENTA DE EDIÇÃO GÊNICA	
Dalila Bernardes Leandro	
Jessyca Kalynne Farias Rodrigues	
Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.3771916014	
CAPÍTULO 5	41
POLIMORFISMOS NO GENE DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL2)	
Carmem Gabriela Gomes de Figueiredo	
Maria Soraya Pereira Franco Adriano	
Claudence Rodrigues do Nascimento	
Luciane Alves Coutinho	
Marizilda Barbosa da Silva	
Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura	
DOI 10.22533/at.ed.3771916015	
CAPÍTULO 6	52
SELEÇÃO DE CARACTERÍSTICAS POR ALGORITMO GENÉTICO NA CLASSIFICAÇÃO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA	
Lucas de Souza Rodrigues	
Cristina Sady Coelho da Rocha	
Murilo Eugênio Duarte Gomes	
DOI 10.22533/at.ed.3771916016	

CAPÍTULO 7	61
MICROCEPHALY BRAIN UNFINISHED	
Cicera Páz da Silva	
Italo Marcos Páz de Andrade	
DOI 10.22533/at.ed.3771916017	
CAPÍTULO 8	67
O SUJEITO DA CLÍNICA E A CLÍNICA RELACIONAL: CONTRIBUIÇÕES PARA A CLÍNICA DE ATENÇÃO BÁSICA DO SUS	
Rita de Cássia Gabrielli Souza Lima	
DOI 10.22533/at.ed.3771916018	
CAPÍTULO 9	79
AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIA EM SAÚDE: PERFIL DO USUÁRIO BRASILEIRO DO PROGRAMA FARMÁCIA POPULAR COM HIPERTENSÃO ARTERIAL DIAGNOSTICADA	
Simone Bezerra Franco	
Ronni Geraldo Gomes de Amorim	
Marília Miranda Forte Gomes	
DOI 10.22533/at.ed.3771916019	
CAPÍTULO 10	91
ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA COM SORO DO LÁTEX DE <i>HIMATANTHUS SUCUUBA</i>	
Janeth Silva Pinheiro Marciano	
Renan Gonçalves da Silva	
Juliana da Silva Coppede	
Sonia Marli Zingaretti	
DOI 10.22533/at.ed.37719160110	
CAPÍTULO 11	98
PERFIL DO CONSUMO DE ÁLCOOL POR ESTUDANTES DE FISIOTERAPIA DE UMA UNIVERSIDADE PRIVADA DE SALVADOR	
Aísa de Santana Lima	
Ana Paula Amaral de Brito	
Átina Carneiro Rocha	
Gleice de Jesus Oliveira	
DOI 10.22533/at.ed.37719160111	
CAPÍTULO 12	111
USO DE BIOMASSA FÚNGICA PARA REMOÇÃO DE FÁRMACOS	
Caroline Aparecida Vaz de Araujo	
Elidiane Andressa Rodrigues	
Giselle Maria Maciel	
Priscila Ayumi Sybuia	
Wagner Mansano Cavalini	
Cristina Giatti Marques de Souza	
DOI 10.22533/at.ed.37719160112	

CAPÍTULO 13 118

ANORMALIDADES ERITROCÍTICAS EM *Sciades herzbergii* E FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE RIOS DA ILHA DO MARANHÃO

Natália Jovita Pereira
Nayara Duarte da Silva
Sildiane Martins Cantanhêde
Janderson Bruzaca Gomes
Ligia Tchaicka
Débora Martins Silva Santos

DOI 10.22533/at.ed.37719160113

CAPÍTULO 14 130

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES: CORDYCIPIACEAE) E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Pogostemon cablin* (LAMIALES: LAMIACEAE) SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE *Gallus gallus* (GALLIFORMES: PHASIANIDAE)

Lucas Trentin Larentis
Tainá dos Santos
Alanda de Oliveira
Patricia Franchi de Freitas

DOI 10.22533/at.ed.37719160114

CAPÍTULO 15 135

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS ORGÂNICOS DO ISOLADO JUANT028 NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Igor Shoiti Shiraishi
Wellington Luiz de Oliveira
Robert Frans Huibert Dekker
Aneli de Melo Barbosa-Dekker
Juliana Feijó de Souza Daniel

DOI 10.22533/at.ed.37719160115

CAPÍTULO 16 144

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EXTRATO VEGETAL DE *Cymbopogon winterianus* SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE AVE

Gabrielly Cristina Galvão
Juliana Marceli Hofma Lopes
Letícia Mencatto Bueno
Patricia Franchi de Freitas

DOI 10.22533/at.ed.37719160116

CAPÍTULO 17 150

EXTRATO DE *Fusarium graminearum* É UMA ALTERNATIVA NÃO TÓXICA PARA USO COMO CORANTE NATURAL: OBTENÇÃO, ESTABILIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Brenda Kischkel
Beatriz Paes Silva
Fabiana Gomes da Silva Dantas
Kelly Mari Pires de Oliveira
Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Melyssa Negri

DOI 10.22533/at.ed.37719160117

CAPÍTULO 18 166

O USO DE HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO NO BRASIL E NO MUNDO E SEUS IMPACTOS AO MEIO AMBIENTE E SAÚDE HUMANA

Yuri Dornelles Zebral

Adalto Bianchini

DOI 10.22533/at.ed.37719160118

CAPÍTULO 19 178

AVALIAÇÃO DE LINGUIÇA TOSCANA ADICIONADA DE INULINA COMO SUBSTITUTO DA GORDURA E INGREDIENTE FUNCIONAL PREBIÓTICO

Fabiane Ferreira dos Santos

Rosires Deliza

Simone Pereira Mathias

DOI 10.22533/at.ed.37719160119

CAPÍTULO 20 191

QUALIDADE DA DIETA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Olívia Farias dos Santos

Cecília Fischer Fernandes

Cristielle Aguzzi Cougo de Leon

Fernanda Vighi Dobke

Sandra Costa Valle

Renata Torres Abib Bertacco

DOI 10.22533/at.ed.37719160120

CAPÍTULO 21 199

CONSTRUINDO RELAÇÕES DE CUIDADO POR MEIO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE: O PAPEL DO FISIOTERAPEUTA NA ESCOLA REGULAR

Maria Bethânia Tomaschewski Bueno

Tatiane Barcellos Corrêa

DOI 10.22533/at.ed.37719160121

CAPÍTULO 22 209

ESTUDO DOS PADRÕES DE POLINIZAÇÃO DE *Apis mellifera* L. EM PLANTAS DA CAATINGA, COMO ESTRATÉGIA PARA A CONSTRUÇÃO DE UM MATERIAL DIDÁTICO

Fernanda Kamila Oliveira de Aquino

Raíza Lorena Peixoto

Larissa Mércia Peixoto

George Machado Tabatinga Filho

Ileane Oliveira Barros

DOI 10.22533/at.ed.37719160122

CAPÍTULO 23 224

IMAGENS ANALÓGICAS EM LIVROS DIDÁTICOS DE BIOLOGIA

Francisco Alves Santos

Andréa Pereira Silveira

Isabel Cristina Higino Santana

DOI 10.22533/at.ed.37719160123

CAPÍTULO 24 234

SITUAÇÃO DA PREVENÇÃO DE DOENÇAS EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS, MORADORAS NA ÁREA DE ABRANGÊNCIA DE UM SERVIÇO DE ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE

Déborah Silveira König
Juvenal Soares Dias da Costa
Denise Silva da Silveira
Cintia Müller Leal
Ubirajara Amaral Vinholes Filho

DOI 10.22533/at.ed.37719160124

CAPÍTULO 25 239

UMA NOVA ABORDAGEM PARA A ORIENTAÇÃO SEXUAL NA ESCOLA ESTADUAL NESTOR LIMA, NATAL RN.

Francicleide Venâncio Bezerra Alves
Gabriel Henrique Santana da Silva
Kaline Karla Gomes dos Santos
Rosangela Lopes Dias

DOI 10.22533/at.ed.37719160125

CAPÍTULO 26 252

UTILIZAÇÃO DE ESTUDO DE CASO NO TÓPICO SISTEMA REPRODUTOR HUMANO NO ENSINO MÉDIO

Messias Rodrigues Arruda
Isabel Cristina Higino Santana
Andréa Pereira Silveira

DOI 10.22533/at.ed.37719160126

CAPÍTULO 27 263

INTERVENÇÃO PEDAGÓGICA DO PIBID CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM SALA DE RECURSO MULTIFUNCIONAL

Emellyn Gabriela Ioris
Claudinei de Freitas Vieira
Leide Daiane Nascimento Mascarello
Michele Potrich

DOI 10.22533/at.ed.37719160127

CAPÍTULO 28 268

UTILIZAÇÃO DO LÚDICO NO ENSINO DE BIOQUÍMICA: JOGOS DE ENCAIXE PARA DEMONSTRAÇÃO DIDÁTICA DE MUDANÇAS ESTRUTURAIS DOS COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS DA GLICÓLISE

Maria Julia Sousa da Fonseca
Rebeca Eller Ferreira
Luis Flávio Mendes Saraiva

DOI 10.22533/at.ed.37719160128

SOBRE A ORGANIZADORA 273

CRISPR/CAS9 – UMA PROMISSORA FERRAMENTA DE EDIÇÃO GÊNICA

Dalila Bernardes Leandro

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
– Programa de Pós-Graduação em Genética.
Recife/PE

Jessyca Kalynne Farias Rodrigues

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
– Graduação em Biomedicina. Laboratório de
Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Recife/PE

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
– Programa de Pós-Graduação em Genética.
Recife/PE

RESUMO: A técnica de CRISPR/cas9 (Agrupamentos regularmente interespaciaados de pequenas repetições palindrômicas associados à endonuclease Cas9) é relativamente recente e tem se mostrado muito promissora para edição do DNA de vários organismos. O sistema CRISPR/Cas9 foi descrito originalmente como “sistema imune adaptativo” de alguns procaríotos, defendendo estes de vírus e plasmídeos invasores. Esta técnica permite a clivagem específica de uma determinada região da dupla cadeia de DNA com grande eficiência, permitindo assim, a inserção ou deleção de sequências de DNA alvo. Recentemente sua aplicabilidade foi estendida à edição gênica. Este trabalho tem como objetivo revisar alguns aspectos da tecnologia CRISPR/Cas9,

descrevendo sua importância e utilização como ferramenta de edição do DNA. A técnica CRISPR/Cas9 promete grandes avanços na terapia gênica e no tratamento contra infecções de alguns patógenos. Sua capacidade de edição do DNA possibilita remover genes causadores de uma determinada anomalia ou até mesmo, substituí-los por genes saudáveis. Além disso, pesquisas apontam para a possibilidade do uso desta tecnologia na produção de modelos animais de estudo, plantas transgênicas, tratamento de doenças genéticas hereditárias, terapia do câncer, entre outros. Outra aplicação abordada neste trabalho, é sua utilização na remoção do provírus em pessoas infectadas pelo HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), agindo principalmente nos reservatórios virais. Contudo, apesar de uma técnica extremamente inovadora, a CRISPR/Cas9 ainda requer grandes estudos com o intuito de avaliar seus efeitos a longo prazo tanto no indivíduo quanto em sua linhagem germinativa e garantir que não ocorra uma clivagem inespecífica do DNA. **PALAVRAS-CHAVE:** CRISPR/Cas9, Terapia Gênica, ferramenta de edição do DNA.

ABSTRACT: The CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated with the Cas9 endonuclease) technique is relatively recent and has been promising for DNA editing of several organisms.

CRISPR/Cas9 system was originally described as an adaptive immune system of some prokaryotes, due to the defense against invasive viruses and plasmids. This technique allows the specific cleavage of a specific region of the double strand of DNA with great efficiency, thus allowing the insertion or deletion of DNA target sequences. Its applicability, recently, has been extended to genic edition. This study aims to review some aspects of CRISPR/Cas9 technology, describing its importance and use as a DNA editing tool. The CRISPR/Cas9 technique promises great advances in gene therapy and in treatment of some pathogens infections. The CRISPR/Cas9 ability to edit DNA makes it possible to remove genes that cause a particular anomaly or even replace them with healthy genes. In addition, researches indicates the possibility of to use this technology in production of animal models, transgenic plants, treatment of hereditary genetic diseases, cancer therapy, and others applications. Another application discussed in this paper is the use of CRISPR/Cas9 in the removal of provirus in people infected with HIV (Human Immunodeficiency Virus), acting mainly in viral reservoirs. However, despite an extremely innovative technique, CRISPR/Cas9 technology still requires large studies in order to evaluate their long-term effects in both individual and germ line and to ensure that a nonspecific DNA cleavage does not occur.

KEYWORDS: CRISPR/Cas9, Gene Therapy, DNA editing tool.

1 | INTRODUÇÃO

CRISPR/Cas9 é uma promissora ferramenta de edição do DNA que permite clivar especificamente uma determinada região da dupla cadeia de DNA com maior rapidez, eficiência, relativa facilidade de manipulação e baixo custo quando comparada a técnicas anteriormente utilizadas como ZFNs (*Zinc-finger nucleases*) ou TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*). O sistema CRISPR/Cas9 é um conjunto formado por uma endonuclease denominada Cas9, cuja função é cortar a dupla cadeia de DNA em um local específico, e uma sequência de RNA que age como um guia, direcionando a endonuclease para o local onde deve ocorrer a clivagem (SHUI et al., 2016).

Naturalmente, CRISPR/Cas9 faz parte do “sistema imune adaptativo” de alguns procariotos, defendendo estes de vírus ou plasmídeos invasores. Assim, provavelmente sua eficácia advém do fato de que este não foi um sistema criado em laboratório mas, um sistema naturalmente desenvolvido e aprimorado ao longo da evolução por bactérias e archaeas, ou seja, resultado milhões de anos de adaptação (SHUI et al., 2016).

Esta ferramenta promete avanços promissores em terapia gênica, sendo capaz de corrigir falhas genéticas no DNA, editando-o. Através desta técnica, é possível, por exemplo, remover genes causadores de uma determinada anomalia e substituí-los por genes saudáveis. Estudos recentes apontam para a possibilidade de uma utilização futura desta tecnologia em casos como, correção da distrofia muscular de Duchenne, ou silenciamento de genes específicos do *Aedes aegypti* (LI et al., 2015; LONG et al., 2016; JUPATANAKUL et al., 2017).

Outro exemplo de aplicação bastante interessante é o uso do complexo CRISPR/Cas9 para remoção do genoma viral inserido no genoma do hospedeiro em pessoas infectadas pelo HIV (provírus), agindo principalmente nos reservatórios virais onde antirretrovirais não atuam efetivamente. Estima-se que tal reservatório de células latentes infectadas pode permanecer neste estado por décadas, constituindo a maior barreira para a cura efetiva da infecção pelo HIV. Assim, avaliar novas estratégias promissoras que busquem solucionar este problema, é imprescindível (JEROME, 2016).

Porém, apesar de uma técnica extremamente inovadora, interessante e promissora, ainda são necessários maiores estudos para avaliar, principalmente os efeitos a longo prazo da utilização do sistema CRISPR/Cas9 na edição de genomas humanos (WANG et al., 2016).

2 | OBJETIVO

Apresentar a tecnologia CRISPR/Cas9 descrevendo sua importância e crescente utilização como ferramenta de edição do DNA, bem como suas principais aplicabilidades.

3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Técnicas de edição do genoma

A terapia gênica é baseada no princípio da manipulação genética de RNA ou DNA para a prevenção e tratamento de doenças humanas. Esta abordagem permite inserir, deletar, substituir ou silenciar genes, e diferentes técnicas podem ser empregadas. A primeira técnica de edição gênica amplamente utilizada foi baseada no uso das endonucleases de restrição FokI, denominadas *Zinc-finger nucleases* (ZFNs) (BHAKTA et al., 2013; CATHOMEN; JOUNG, 2008; GONZALEZ et al., 2010; KIM et al., 2011; KIM; CHA; CHANDRASEGARAN, 1996; TOWNSEND et al., 2009; WOOD et al., 2011).

Em seguida, com uma abordagem não muito diferente, foram desenvolvidas as Nucleases Efetoras Ativadoras de Transcrição (TALENs) (BOCH et al., 2009; BRIGGS et al., 2012; CERMAK et al., 2011; DENG et al., 2012; KIM et al., 2013; MOSCOU; BOGDANOVA, 2009; REYON et al., 2012; SCHMID-BURGK et al., 2013). E recentemente, foi descoberto o sistema CRISPR/Cas9, que forneceu uma alternativa para ZFNs e TALENs na edição de genomas (PENNISI, 2013). Quanto a função, os três sistemas são similares, pois todos são capazes de induzir quebras na dupla fita de DNA direcionadas que ativam vias de resposta a este dano, permitindo alterações personalizadas do genoma. Porém, quanto ao modo de ação, o sistema CRISPR/Cas9 age de forma bastante diferente dos dois anteriores (ZHANG; WEN; GUO, 2014).

Em ambos, ZFNs e TALENs, as proteínas precisam ser construídas para clivar especificamente uma dada região do DNA alvo. Ou seja, a cada região que se objetiva

editar, será necessário todo o processo de engenharia, seleção e validação de tais proteínas. Porém, o sistema CRISPR/Cas é muito mais simples, já que, sempre será utilizada a mesma endonuclease para cortar a dupla fita de DNA, a Cas. O que sofrerá modificação, de acordo com a região específica a qual se tencione clivar, será o RNA guia (gRNA), uma sequência simples de RNA que é desenhada para ser exatamente complementar a região do genoma a qual se deseja editar. Assim, esta sequência será responsável por guiar a endonuclease até a região correta, sendo sua construção relativamente barata, simples e rápida. Como apenas o RNA programável é necessário para gerar especificidade de seqüência, o CRISPR/Cas9 é facilmente aplicável e menos dispendioso de tempo e custo (ZHANG; WEN; GUO, 2014).

Assim, a principal vantagem do sistema CRISPR/Cas9 é esta simplicidade, comparando às ZFNs ou TALENs, nas quais a engenharia é muito mais complexa, demorada e dispendiosa. Além disto, outro fator fundamental a se considerar, é que o sistema CRISPR/Cas9 possibilita o uso de vários gRNAs com diferentes alvos, permitindo modificações genéticas simultâneas em múltiplos sítios alvos diferentes (CONG et al., 2013).

Outra particularidade do sistema CRISPR/Cas é que, apesar de aprimorado em laboratório, é proveniente do sistema natural de defesa bacteriano, portanto, resultado de milhares de anos de evolução. O que faz dele, um sistema muito seguro e intensamente testado pela natureza (WIEDENHEFT; STERNBERG; DOUDNA, 2012).

Existem diferentes tipos de sistema CRISPR/Cas que utilizam diferentes proteínas Cas e moléculas de gRNA, podendo ser divididos em duas classes principais, classes 1 e 2. O sistema de classe 1 refere-se à utilização de múltiplos complexos protéicos para a edição, enquanto que o sistema de classe 2 refere-se ao uso de uma única nuclease. Estas classes ainda podem ser subdivididas em diferentes tipos de acordo com as proteínas específicas que são usadas. Por exemplo, no sistema de classe 2 tipo V é utilizada a nucleasse Cpf para realizar a clivagem, enquanto que o tipo II utiliza a Cas9. Porém, dentre todos os sistemas, CRISPR/Cas9 é o mais bem caracterizado e, portanto, amplamente utilizado (MAKAROVA et al., 2011; WIEDENHEFT; STERNBERG; DOUDNA, 2012).

Além da Cas9 e do gRNA, este sistema necessita de um terceiro elemento; uma pequena sequência de nucleotídeos denominada Motivo Adjacente ao Protoespaçador (PAM) que auxilia o reconhecimento do local de clivagem. Outra peculiaridade é que o gRNA, apesar de ser uma sequência contínua, é formado por duas regiões com funções bem distintas. Existe uma parte que se liga a endonuclease, CRISPR RNA (crRNA), enquanto a outra parte da sequência, o crRNA trans – ativador (tracrRNA), irá direcionar a Cas9 para a região específica de interesse no genoma ou na sequência de DNA. Esta interação entre o complexo Cas9/gRNA com a sequência de DNA alvo, promove a alteração conformacional na Cas9 capaz de ativar a endonuclease, induzindo a quebra da dupla fita de DNA (JINEK et al., 2012).

O aparecimento destas técnicas de edição do genoma tem contribuído para o

estudo e possível tratamento de várias doenças, tanto virais quanto genéticas, como será apresentado ao longo deste trabalho. Porém, muitos são os problemas que necessitam ser resolvidos até que se consiga aprimorar estas técnicas de edição de genoma suficientemente para sua aplicação segura em seres humanos (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

3.2 Principais aplicabilidades do sistema CRISPR/Cas9

3.2.1 Desenvolvimento de modelos animais de estudo

Um campo de estudo onde se observa uma crescente utilização da tecnologia CRISPR/Cas9 é em modelos animais de estudo. Esta ferramenta tem permitido promover modificações no genoma em linhagens germinais de diversos modelos animais como mosca das frutas, zebrafish, nematódeos, sapos, salamandras e até organismos mais complexos como porcos e macacos. Em camundongos, esta técnica tem sido amplamente utilizada com o intuito de gerar modelos murinos humanizados (a partir da inserção de genes humanos) o que possibilita estudos mais aprofundados, com uma resposta mais próxima do que seria observado em humanos. Assim, esta tecnologia permitiu enormes avanços no campo da biologia experimental que poucos anos atrás, seriam impensáveis (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). A partir do contínuo aprimoramento da técnica, é possível observar o crescente aumento da eficácia da edição gênica nestes modelos animais. Como exemplo, podemos analisar o estudo de Bassett e colaboradores (2013), no qual foi utilizado um sistema CRISPR/Cas9 melhorado baseado em injeção de RNA, que foi altamente eficiente para criar a mutagênese desejada no genoma de *Drosophila melanogaster*. Neste experimento, através da injeção direta do gRNA e de mRNA de Cas9 no embrião, os pesquisadores induziram mutagênese nos locais-alvo em até 88% das moscas injetadas. Além disto, as mutações geradas foram transmitidas de forma estável para 33% da prole total através da linhagem germinativa. Este são resultados bastante promissores no que concerne a modificações gênicas em modelos animais, quando comparado as técnicas anteriores utilizadas para este fim (BASSETT et al., 2013). Assim, a tecnologia CRISPR/Cas9 representa uma maneira rápida e fácil de gerar animais geneticamente modificados, principalmente em modelos murinos, promovendo um avanço significativo de achados imunológicos, ramo de pesquisa altamente dependente de modelos animais sofisticados (HOCHHEISER et al., 2018).

3.2.2 Tratamento de algumas doenças

Além do uso da tecnologia CRISPR/Cas9 em modelos animais, outra relevante área onde a aplicação deste sistema vem sendo avaliado, é no tratamento de algumas doenças. Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de uma utilização futura

desta tecnologia em várias doenças hereditárias e infecciosas por meio de diferentes abordagens. Como, por exemplo, a correção da distrofia muscular de Duchenne (LI et al., 2015; LONG et al., 2016), manipulação de genes específicos do *Aedes aegypti* (JUPATANAKUL et al., 2017), doenças hematológicas (CANVER et al., 2015; LIU et al., 2017), tratamento da infecção pelo HIV (EBINA et al., 2013), entre outros. Citaremos algumas destas utilizações ao longo deste texto.

3.2.2.1 Doenças genéticas hereditárias

Algumas aplicações da tecnologia CRISPR/Cas9 com relevância para a saúde humana incluem a capacidade de corrigir mutações genéticas responsáveis por doenças hereditárias. Alguns exemplos que serão abordados no texto, onde o uso desta técnica vem sendo avaliado com tal propósito, são no tratamento de anemia falciforme, distrofia muscular de Duchenne, fibrose cística e algumas doenças oculares.

Dois estratégias têm sido utilizadas para o tratamento da anemia falciforme usando o sistema CRISPR/Cas9: a correção da mutação que ocasiona a doença ou a indução da expressão de hemoglobina fetal (HbF). Na correção da mutação, a abordagem utilizada é o uso do sistema CRISPR/Cas9 para alteração de células-tronco hematopoiéticas que após a modificação são transplantadas para o paciente (DEVER et al., 2016). Já a segunda estratégia, indução da expressão de HbF, envolve o BCL11A, um regulador transcricional que age como um forte silenciador deste tipo de hemoglobina. Assim, a supressão de BCL11A por meio do sistema CRISPR/Cas9, pode levar ao aumento na produção de HbF, sendo, portanto, uma possível estratégia no tratamento da anemia falciforme (CANVER et al., 2015; LIU et al., 2017). Já as abordagens utilizadas para tratar a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) incluem: correção de mutações pontuais, remoção completa do éxon alterado ou ainda a restauração do quadro de leitura (EL REFAEY et al., 2017; LI et al., 2015; ZHU et al., 2017). Recentemente, Li et al. (2015) demonstraram a correção precisa da distrofia muscular de Duchenne em células-tronco pluripotentes induzidas humanas (iPSC) com o uso das tecnologias de edição gênica TALEN e CRISPR/Cas9 (LI et al., 2015).

No que concerne a outras patologias, estudos envolveram o uso da tecnologia CRISPR/Cas9 mediada por HDR no tratamento da Fibrose Cística (FC), e apresentaram resultados promissores. Tais estudos objetivavam corrigir em iPSCs, a mutação DF508 no gene CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) presente em 90% dos pacientes com FC (FIRTH et al., 2015).

Nas doenças oculares, a catarata foi o primeiro distúrbio editado pelo sistema CRISPR/Cas9 para fins terapêuticos. Wu e colaboradores (2013) corrigiram uma mutação dominante no gene *Crygc*, em camundongos, via modificação de alelos mutantes, mediada por recombinação homóloga direta (HDR). Além desta, outras patologias como Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), Distrofia Corneana Epitelial de Meesmann (MECD), e Retinite Pigmentosa (RP) vem sendo estudadas e avaliadas quanto a possível utilização da tecnologia CRISPR/Cas9 para

seus respectivos tratamentos (PEDDLE; MACLAREN, 2017).

3.2.2.2 Combate às infecções virais

Dentre as muitas outras pesquisas que envolvem o uso da tecnologia CRISPR/Cas9, podemos destacar o trabalho de combate à transmissão da dengue desenvolvido por pesquisadores da Universidade Estadual Paulista (Unesp). Este estudo identificou, no mosquito *Aedes aegypti*, genes que podem estar ligados à resistência a dengue. E a partir da tecnologia CRISPR/Cas9, objetivaram inserir genes mutantes em outros *Aedes aegypti* que não possuem esta resistência. Este tipo de pesquisa pode impactar futuramente o campo da saúde pública, uma vez que diminuiria os casos de dengue, caso a tecnologia fosse empregada (JUPATANAKUL et al., 2017).

Outra importante virose para a qual tal sistema CRISPR/Cas9 é cogitado como uma estratégia de tratamento, é a infecção pelo HIV. Neste contexto, duas diferentes estratégias estão sendo avaliadas na tentativa de combater tal infecção. A primeira abordagem consiste no uso de células-tronco hematopoiéticas modificadas (HSC) derivadas de medula óssea ou sangue periférico com o intuito de desativar genes do hospedeiro que sejam necessários ao vírus. Em um estudo de 2014, pesquisadores utilizaram o sistema CRISPR/Cas9 com RNA guia desenvolvido para interromper eficientemente o gene *CCR5* em células-tronco hematopoiéticas e progenitoras (MANDAL et al., 2014). Assim, este sistema poderia gerar camundongos transplantados que são funcionalmente resistentes à infecção por um HIV R5 trópico. Até agora, esta abordagem tem sido usada apenas em laboratório em modelos animais. Porém, sua aplicabilidade é inviável, em particular para uma grande população de indivíduos HIV positivos. Além dos efeitos colaterais, procedimento complexo e alto custo do transplante autólogo, outra grande limitação é o potencial escape viral da restrição de entrada baseada no *CCR5* (DIDIGU et al., 2014).

Já a segunda estratégia envolve o provírus, estado no qual o genoma viral (HIV) se encontra integrado ao genoma do hospedeiro em uma condição de latência. Neste caso, o alvo é o próprio DNA viral integrado, onde se objetiva promover mutações no genoma viral integrado capazes de silenciar o vírus, ou ainda, remover o vírus pela clivagem do provírus de células infectadas. Como exemplo, podemos citar o uso recente do sistema CRISPR/Cas9 para remover todo o genoma do HIV-1, abrangendo as LTRs 5' e 3' completas do DNA proviral integrado. Foram utilizadas células TCD4+ humanas infectadas pelo HIV-1 proviral nas quais foi aplicada a tecnologia CRISPR/Cas9. A técnica foi considerada segura neste experimento, uma vez que não foram observados efeitos fora do alvo (KAMINSKI et al., 2016). Além disto, a excisão do DNA proviral não provocou nenhum efeito deletérico significativo na saúde celular nos vários índices avaliados, como, viabilidade celular, progressão do ciclo celular e apoptose. Outro ponto extremamente importante foi a expressão contínua do gRNA e Cas9 nestas células T, onde o HIV-1 foi eliminado, que mostrou proteção contra novas infecções pelo HIV-1 quando desafiadas (HU et al., 2014; LIAO et al., 2015). Além

disto, CRISPR/Cas9 também foi usado com sucesso para ativar células infectadas em estado latente com o objetivo de promover uma melhor detecção dessas células pelo sistema imune efetor (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Atualmente, não existem ensaios clínicos em andamento CRISPR/Cas9 como intervenção terapêutica anti-HIV. Isto não é surpreendente, dado o difícil processo e rede reguladora em torno da aprovação para a execução de um ensaio clínico. No entanto, todos estes estudos pré-clínicos demonstram a importância desta abordagem como ferramenta para uma possível intervenção terapêutica anti-HIV (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; WANG et al., 2014). Além disto, outro ponto de resistência ao uso desta tecnologia em tratamentos que envolvam o HIV é a grande capacidade mutacional do vírus. No intuito de reduzir este escape viral, uma nova abordagem utilizada é a aplicação do sistema CRISPR/Cas9 multiplex, no qual múltiplos gRNAs são direcionados para diferentes regiões conservadas do genoma viral (TER BRAKE et al., 2006).

É importante ressaltar que, especificamente para o tratamento do HIV, esta é uma alternativa bastante promissora, pois representa a remoção do provírus integrado ao genoma do hospedeiro presentes no reservatório em estado de latência. Problema que, sem dúvida, representa a maior barreira para a cura definitiva do HIV/AIDS, para o qual ainda não foi encontrada nenhuma solução viável (EBINA et al., 2013).

Além destes dois exemplos, estratégias CRISPR/Cas9 também foram aplicadas a vários outros patógenos virais, incluindo Papilomavírus Humano (HPV), Vírus da Hepatite B (HBV), alguns tipos de Herpesvírus, John Cunningham Vírus (JC) e Vírus da Hepatite C (HCV) (MOLLANOORI; TEIMOURIAN, 2018; SOPPE; LEBBINK, 2017), apresentando resultados promissores.

3.2.2.3 Terapia do câncer

Outra abordagem que tem sido avaliada é a utilização do sistema CRISPR/Cas para o tratamento de determinados tipos de câncer. O câncer inclui alterações complexas com múltiplas mutações, translocações, perdas e ganhos cromossômicos. Assim, a habilidade de identificar e corrigir tais mutações é um objetivo importante em seu tratamento. Neste contexto, o sistema CRISPR/Cas tem mostrado um potencial promissor para atuar nesta correção. Vários cientistas, em todo o mundo, estão usando tal sistema para abordar o tratamento de variados tipos de câncer a partir de diferentes perspectivas de pesquisa (RATAN et al., 2018).

Um dos exemplos mais recentes, é a sua utilização para alterar geneticamente receptores de células T (TCRs) com o intuito de que apresentem um maior reconhecimento e maior afinidade a células tumorais. Um dos maiores progressos na imunoterapia personalizada do câncer, foi a produção do receptor de antígeno quimérico (CAR). CARs são proteínas de fusão manipuladas que incorporam um domínio de reconhecimento de antígeno para um alvo específico (isto é, um antígeno de tumor) e um domínio de sinalização de células T. Eles são únicos, pois agem independentemente do complexo principal de histocompatibilidade (ABATE-

DAGA; DAVILA, 2016; RESTIFO; DUDLEY; ROSENBERG, 2012). Na terapia celular autóloga (TART), as células são removidas, projetadas geneticamente para atacar antígenos específicos do câncer alvo, a partir do sistema CRISPR/Cas e, em seguida, transferidas de volta para o paciente (MOLLANOORI; TEIMOURIAN, 2018; ZYCH; BAJOR; ZAGOZDZON, 2018).

Até a presente data, as células T modificadas por CAR foram aplicadas a vários tumores malignos, embora a investigação e aplicação tenham sido mais robustas em malignidades hematológicas de células B. Em 2014, Maude e colaboradores publicaram um estudo crucial em que trinta pacientes foram tratados com células T autotransportadas anti-CD19 com Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) recidivante/refratária. Notavelmente, 90% dos pacientes tratados tiveram uma remissão completa (MAUDE et al., 2014). Com este sucesso impressionante, células T CAR foram aplicadas a neoplasias adicionais, incluindo Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) e linfomas não-Hodgkin. Recentemente, Turtle e colaboradores (2017) trataram vinte e quatro pacientes de LLC de alto risco, dos quais setenta e um por cento tiveram uma resposta completa ou parcial à terapia e em muitos desses pacientes, nenhuma doença residual foi detectada após tal tratamento (TURTLE et al., 2017). Assim, recentemente, após demonstrar esta significativa eficácia clínica, este novo agente terapêutico foi aprovado pela FDA para o tratamento de DLBCL recidivante/refratária e leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA). No entanto, a possibilidade de efeitos fora do alvo e toxicidade, continuam sendo investigados. Embora a mutagênese insercional não tenha sido observada nas terapias de células T modificadas por CAR até o momento, esta possibilidade existe e deve ser considerada (BEAR et al., 2012; DOTTI et al., 2014; HACKETT et al., 2013).

Valletta e colaboradores (2015), restauraram a função do gene *ASXL1* em uma linhagem de células de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) que não expressavam o modificador epigenético ASXL1. O ASXL1 é conhecido como um importante supressor de tumor, no qual mutações, estão envolvidas na patogênese de várias leucemias mielóides. Neste estudo, a partir da correção do gene, foi reestabelecida a expressão normal da proteína e a sobrevivência foi melhorada, em um modelo de xenoinxerto murino utilizando células corrigidas (VALLETTA et al., 2015).

Em 2017, Garcia-Tunon e colaboradores aplicaram a tecnologia CRISPR/Cas9 à LMC positiva para BCR/ABL e demonstraram que poderiam bloquear eficazmente a expressão da variante p210 do gene de fusão BCR/ABL. Isto foi feito utilizando uma linhagem celular de leucemia Boff-p210 e *in vivo*, em modelo murino. Estes são apenas alguns dos muitos exemplos da aplicação da tecnologia CRISPR/Cas em estudos que objetivem o tratamento do câncer, com o crescimento contínuo previsto nos próximos anos (GARCÍA-TUÑÓN et al., 2017).

3.2.3 Regulação transcricional

Outro exemplo de aplicação do sistema CRISPR/Cas é na regulação de genes específicos a partir da interrupção de sítios funcionais relacionados à transcrição. Tal sistema é então denominado *CRISPR inference* (CRISPRi), e foi desenvolvido para a regulação da transcrição guiada por RNA (CHENG et al., 2013; GILBERT et al., 2013; QI et al., 2013) a two-component transcriptional activator consisting of a nuclease-dead Cas9 (dCas9. Qi e colaboradores (2013) gerou um mutante Cas9 (dCas9) cataliticamente defeituoso sem atividade de nucleases. Neste caso, o sistema somente reconhece e liga à sequência alvo, gerando um impedimento alostérico que não permite a transcrição, porém, sem clivar tal sequência. Assim, este complexo de reconhecimento, pode interferir no alongamento transcricional, na atividade da RNA polimerase, ou ainda, na ligação de fatores de transcrição (QI et al., 2013). Em um experimento em *Escherichia coli*, utilizando dois gRNAs direcionados, respectivamente, um gene da proteína fluorescente vermelha (RFP) e um gene da proteína verde fluorescente (GFP), foi observado que CRISPRi poderia reprimir simultaneamente a expressão de RFP e GFP. No entanto, em células de mamíferos, o grau de repressão da expressão gênica obtido pelo CRISPRi foi pouco expressivo (QI et al., 2013). Gilbert e colaboradores (2013) também demonstraram que domínios efetores repressivos ou ativadores fundidos com dCas9, juntamente com o gRNA, poderiam desempenhar um controle transcricional preciso e estável dos genes-alvo, incluindo a repressão e ativação da transcrição (GILBERT et al., 2013). Além disto, Cheng e colaboradores (2013) evidenciaram o desempenho do CRISPRi para regular a transcrição tanto em genes individuais como simultaneamente em múltiplos genes. Portanto, o CRISPRi fornece uma nova ferramenta altamente específica para alternar a expressão gênica sem alterar geneticamente a sequência de DNA alvo (CHENG et al., 2013).

3.3 Outras aplicações

A partir de uma abordagem diferente, o sistema CRISPR/Cas9, pode também ser utilizado como um marcador de loci específicos em células vivas. A partir do uso de uma proteína dCas9 marcada com proteína fluorescente verde melhorada e um gRNA estruturalmente otimizado, foi possível obter imagens robustas de elementos repetitivos e não repetitivos em telômeros e genes codificadores em células vivas. Esta ferramenta de imagem CRISPR tem o potencial de melhorar as tecnologias atuais para o estudo da dinâmica conformacional de cromossomos nativos em células vivas, principalmente se imagens multicoloridas podem ser desenvolvidas usando múltiplas proteínas Cas9 distintas (CHENG et al., 2013).

Outro uso crescente desta tecnologia é a sua aplicação na área vegetal e de fungos. Neste contexto, ela tem sido utilizada para induzir alterações genômicas desejadas em plantas, objetivando gerar características específicas, como fenótipos valiosos ou resistência a doenças (JIANG et al., 2013; XIE; YANG, 2013). Desde sua

demonstração como uma ferramenta de edição do genoma em *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana benthamiana* esta tecnologia promete mudar o ritmo e o curso da pesquisa agrícola (LI et al., 2013; NEKRASOV et al., 2013). Jiang e colaboradores (2013) realizaram experimentos onde, o gene da proteína de fluorescência verde, foi transferido para o genoma da *Arabidopsis sp.* e do tabaco, e genes da susceptibilidade à ferrugem bacteriana, para o genoma do arroz (JIANG et al., 2013). Miao e colaboradores (2013) demonstraram a robustez e eficiência do CRISPR/Cas9 na edição do genoma do arroz, onde a modificação eficaz nos genes-alvo ocorreu em aproximadamente 50% das células embriogênicas que receberam as estruturas de gRNA e Cas9 (MIAO et al., 2013; ZHANG; WEN; GUO, 2014). Além disso, essas mudanças genéticas foram passadas para a próxima geração de plantas sem nova mutação ou reversão, e o sequenciamento do genoma completo não revelou nenhuma edição fora do alvo. Tais estudos sugerem que a modificação dos genomas de plantas pode fornecer proteção contra doenças e resistências de forma segura e simples. As implicações regulatórias do uso da tecnologia CRISPR-Cas9 em plantas ainda não estão claras e dependem do tipo de mutação a ser introduzida (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014), fazendo-se necessários maiores estudos com o intuito de elucidar tais questões.

3.4 Discussões éticas

Como foi possível perceber, o número de aplicações potenciais da tecnologia CRISPR/Cas9 é muito amplo. No entanto, sua aplicabilidade, na maioria dos casos, principalmente no que tange à utilização terapêutica desta tecnologia, ainda permanece altamente controversa. Primeiro, porque ainda não está definido o quão segura esta técnica é, principalmente no que diz respeito aos potenciais efeitos fora do alvo. Em segundo lugar, existem várias questões éticas associadas à terapia gênica mediada por CRISPR/Cas9, como: Qual será o limite entre defeitos genéticos que devem ser corrigidos e anomalias genéticas, que permanecem sem tratamento? Quais serão as consequências e efeitos a longo prazo da correção de mutações patogênicas, no contexto dos antecedentes genéticos individuais dos pacientes? Devem ser permitidas modificações do genoma em zigotos ou embriões humanos, que afetarão somente suas células somáticas, ou também aquelas que poderão ser transmitidas à linhagem germinativa? (HOCHHEISER et al., 2018).

Outro ponto, extremamente preocupante, é a possibilidade de gerar mutações fora do alvo, a partir da edição do genoma mediada por CRISPR/Cas9. Genomas grandes geralmente contêm múltiplas seqüências de DNA que são idênticas ou altamente homólogas às seqüências de DNA alvo, que podem ser erroneamente clivadas, levando a mutações em locais indesejados. Tais mutações podem resultar em morte ou drástica transformação celular. Assim, com o intuito de solucionar este problema, garantindo uma maior especificidade do sistema CRISPR/Cas9, o ideal é selecionar locais de destino com o menor número de locais fora do alvo possíveis.

Xiao e colaboradores (2014) recentemente, desenvolveram uma ferramenta de busca flexível, a CasOT (*Cas Off-Target sites*), que possibilita a identificação de potenciais locais fora do alvo em genomas inteiros. No entanto, vários pesquisadores estão estudando diferentes métodos para superar este obstáculo e, assim, tornar a utilização do sistema realmente segura (XIAO et al., 2014; ZHANG; WEN; GUO, 2014).

Ainda associado a este problema, existe a dificuldade do desenvolvimento de um método de entrega do sistema CRISPR/Cas que seja totalmente eficaz em organismos multicelulares com sistemas mais complexos. Algumas técnicas baseadas em injeção de DNA e RNA vêm sendo utilizadas para distribuição do sistema, tais como injeção de plasmídeos expressando Cas9 e gRNA (GRATZ et al., 2013) ou injeção direta de tais componentes CRISPR/Cas9 (BASSETT et al., 2013; YU et al., 2013). A eficiência destes métodos de entrega dependem dos tipos de células e do tecido alvo. Assim, várias equipes de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de métodos de entrega mais robustos, com o intuito de minimizar tal dificuldade (ZHANG; WEN; GUO, 2014).

4 | CONCLUSÃO

A tecnologia CRISPR/Cas9 revolucionou a engenharia genômica e certamente, foi uma das maiores descobertas para a pesquisa científica do século atual. Embora existissem outras tecnologias de edição do genoma anteriores á descoberta deste sistema, sua simplicidade, precisão e versatilidade são qualidades sem precedentes.

Porém, apesar de uma técnica extremamente inovadora e interessante, a CRISPR/Cas9 ainda requer grandes estudos, pois muitos dos experimentos foram realizados apenas *in vitro*. Portanto, avaliar seus efeitos a longo prazo tanto no indivíduo quanto em sua linhagem germinativa, bem como aprimorar sua capacidade de clivagem específica do DNA alvo, evitando a clivagem “fora do alvo”, e o desenvolvimento de mecanismos de entrega mais eficazes, é imprescindível. Sobrepujados estes obstáculos, a tecnologia CRISPR/Cas9 tem grande potencial de se tornar a ferramenta de edição de genoma mais confiável, de fácil utilização e baixo custo.

Assim, esforços futuros deverão se concentrar em desenvolver ainda mais a precisão da tecnologia, possibilitando sua utilização com total segurança e eficácia.

REFERÊNCIAS

ABATE-DAGA, Daniel; DAVILA, Marco L. CAR models: Next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 3, p. 16014, 2016.

BASSETT, Andrew R. et al. Highly Efficient Targeted Mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System. **Cell Reports**, v. 4, n. 1, p. 220–228, 2013.

BEAR, Adham S. et al. Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical

trials: Is it time to revise the testing requirements? **Molecular Therapy**, v. 20, n. 2, p. 246–249, 2012.

BHAKTA, Mital S. et al. Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly. **Genome Research**, v. 23, n. 3, p. 530–538, 2013.

BOCH, Jens et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. **Science**, v. 326, n. 5959, p. 1509–1512, 11 dez. 2009.

BRIGGS, Adrian W. et al. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e117–e117, 1 ago. 2012.

CANVER, Matthew C. et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 192–197, 16 nov. 2015.

CATHOMEN, Toni; JOUNG, J. Keith. Zinc-finger Nucleases: The Next Generation Emerges. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 7, p. 1200–1207, jul. 2008.

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

CHENG, Albert W. et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. **Cell Research**, v. 23, n. 10, p. 1163–1171, 27 out. 2013.

CONG, Le et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 15 fev. 2013.

DENG, Dong et al. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. **Science**, v. 335, n. 6069, p. 720–723, 10 fev. 2012.

DEVER, Daniel P. et al. CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 539, n. 7629, p. 384–389, 7 nov. 2016.

DIDIGU, Chuka A. et al. Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors *ccr5* and *cxcr4* protects CD4⁺ T cells from HIV-1 infection. **Blood**, v. 123, n. 1, p. 61–69, 2 jan. 2014.

DOTTI, Gianpietro et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. **Immunological Reviews**, v. 257, n. 1, p. 107–126, jan. 2014.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096–1258096, 28 nov. 2014.

EBINA, Hirotaka et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 2510, 26 dez. 2013.

EL REFAEY, Mona et al. In Vivo Genome Editing Restores Dystrophin Expression and Cardiac Function in Dystrophic Mice Novelty and Significance. **Circulation Research**, v. 121, n. 8, p. 923–929, 29 set. 2017.

FIRTH, Amy L. et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. **Cell Reports**, v. 12, n. 9, p. 1385–1390, set. 2015.

GARCÍA-TUÑÓN, Ignacio et al. The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. **Oncotarget**, v. 8, n. 16, p. 26027–26040, 2017.

- GILBERT, Luke A. et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. **Cell**, v. 154, n. 2, p. 442–451, jul. 2013.
- GONZALEZ, Beatriz et al. Modular system for the construction of zinc-finger libraries and proteins. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 791–810, 1 abr. 2010.
- GRATZ, Scott J. et al. Genome Engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease. **Genetics**, v. 194, n. 4, p. 1029–1035, ago. 2013.
- HACKETT, Perry B. et al. Evaluating risks of insertional mutagenesis by DNA transposons in gene therapy. **Translational Research**, v. 161, n. 4, p. 265–283, abr. 2013.
- HOCHHEISER, Katharina et al. CRISPR/Cas9: A tool for immunological research. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 4, p. 576–583, abr. 2018.
- HSU, Patrick D.; LANDER, Eric S.; ZHANG, Feng. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262–1278, jun. 2014.
- HU, W. et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 31, p. 11461–11466, 5 ago. 2014.
- JEROME, Keith R. Disruption or Excision of Provirus as an Approach to HIV Cure. **AIDS Patient Care and STDs**, v. 30, n. 12, p. 551–555, dez. 2016.
- JIANG, Wenzhi et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 20, p. e188–e188, 1 nov. 2013.
- JINEK, Martin et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.
- JUPATANAKUL, Natapong et al. Engineered Aedes aegypti JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005187, 12 jan. 2017.
- KAMINSKI, Rafal et al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22555, 4 abr. 2016.
- KIM, Seokjoong et al. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. **Nature Methods**, v. 8, n. 1, p. 7–7, 1 jan. 2011.
- KIM, Y. G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 3, p. 1156–1160, 6 fev. 1996.
- KIM, Yongsub et al. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 251–258, 17 mar. 2013.
- LI, Hongmei Lisa et al. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 1, p. 143–154, jan. 2015.
- LI, Jian-Feng et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 688–691, 1 ago. 2013.

- LIAO, Hsin-Kai et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6413, 10 dez. 2015.
- LIU, Yali et al. One-Step Biallelic and Scarless Correction of a β -Thalassemia Mutation in Patient-Specific iPSCs without Drug Selection. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 6, p. 57–67, mar. 2017.
- LONG, Chengzu et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. **Science**, v. 351, n. 6271, p. 400–403, 22 jan. 2016.
- MAKAROVA, Kira S. et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467–477, 9 jun. 2011.
- MANDAL, Pankaj K. et al. Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 5, p. 643–652, 6 nov. 2014.
- MAUDE, Shannon L. et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 16, p. 1507–1517, 16 out. 2014.
- MIAO, Jin et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. **Cell Research**, v. 23, n. 10, p. 1233–1236, 3 out. 2013.
- MOLLANOORI, Hasan; TEIMOURIAN, Shahram. Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy. **Biotechnology Letters**, v. 40, n. 6, p. 907–914, 28 jun. 2018.
- MOSCOU, Matthew J.; BOGDANOVA, Adam J. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. **Science**, v. 326, n. 5959, p. 1501–1501, 11 dez. 2009.
- NEKRASOV, Vladimir et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 691–693, 1 ago. 2013.
- PEDDLE, Caroline F; MACLAREN, Robert E. The Application of CRISPR/Cas9 for the Treatment of Retinal Diseases. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 4, p. 533–541, 2017.
- PENNISI, Elizabeth. The CRISPR Craze. **Science**, v. 341, n. 6148, p. 833–836, 23 ago. 2013.
- QI, Lei S. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1173–1183, fev. 2013.
- RATAN, Zubair Ahmed et al. CRISPR-Cas9: a promising genetic engineering approach in cancer research. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 10, p. 175883401875508, 5 jan. 2018.
- RESTIFO, Nicholas P.; DUDLEY, Mark E.; ROSENBERG, Steven A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 4, p. 269–281, 1 abr. 2012.
- REYON, Deepak et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 460–465, 8 maio 2012.
- SCHMID-BURGGK, Jonathan L. et al. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator–like effector genes. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 76–81, 16 jan. 2013.
- SHUI, Bing et al. The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–17, 2016.
- SOPPE, Jasper Adriaan; LEBBINK, Robert Jan. Antiviral Goes Viral: Harnessing CRISPR/Cas9 to

Combat Viruses in Humans. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 833–850, out. 2017.

TER BRAKE, Olivier et al. Silencing of HIV-1 with RNA Interference: a Multiple shRNA Approach. **Molecular Therapy**, v. 14, n. 6, p. 883–892, dez. 2006.

TOWNSEND, Jeffrey A. et al. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 442–445, 29 maio 2009.

TURTLE, Cameron J. et al. Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 26, p. 3010–3020, 10 set. 2017.

VALLETTA, Simona et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. **Oncotarget**, v. 6, n. 42, p. 44061–71, 29 dez. 2015.

WANG, Gang et al. A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures. **Cell Reports**, v. 17, n. 11, p. 2819–2826, 13 dez. 2016.

WANG, Weiming et al. CCR5 Gene Disruption via Lentiviral Vectors Expressing Cas9 and Single Guided RNA Renders Cells Resistant to HIV-1 Infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e115987, 26 dez. 2014.

WIEDENHEFT, Blake; STERNBERG, Samuel H.; DOUDNA, Jennifer A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 331–338, 16 fev. 2012.

WOOD, Andrew J. et al. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. **Science**, v. 333, n. 6040, p. 307–307, 15 jul. 2011.

WU, Yuxuan et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. **Cell Stem Cell**, v. 13, p. 659–662, 5 dez. 2013.

XIAO, An et al. CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. **Bioinformatics**, v. 30, n. 8, p. 1180–1182, 15 abr. 2014.

XIE, Kabin; YANG, Yinong. RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR–Cas System. **Molecular Plant**, v. 6, n. 6, p. 1975–1983, nov. 2013.

YU, Z. et al. Highly Efficient Genome Modifications Mediated by CRISPR/Cas9 in Drosophila. **Genetics**, v. 195, n. 1, p. 289–291, 1 set. 2013.

ZHANG, Feng; WEN, Yan; GUO, Xiong. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 1, p. 40–46, 2014.

ZHU, Pei et al. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Corrects Dystrophin Mutation in Skeletal Muscle Stem Cells in a Mouse Model of Muscle Dystrophy. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 7, p. 31–41, 16 jun. 2017.

ZYCH, Agata O.; BAJOR, Malgorzata; ZAGOZDZON, Radoslaw. Application of Genome Editing Techniques in Immunology. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 66, n. 4, p. 289–298, 17 ago. 2018.

SOBRE A ORGANIZADORA

CHRISTIANE TREVISAN SLIVINSKI Possui Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (2000), Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (2007) e Doutorado em Ciências - Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (2012). Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Biotecnologia, atuando principalmente nos seguintes temas: inibição enzimática; fermentação em estado sólido; produção, caracterização bioquímica e purificação de proteínas (enzimas); e uso de resíduo agroindustrial para produção de biomoléculas (biossurfactantes). É professora na Universidade Estadual de Ponta Grossa nas disciplinas de Bioquímica e Química Geral desde 2006, lecionando para os cursos de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, Farmácia, Educação Física, Enfermagem, Odontologia, Química, Zootecnia, Agronomia, Engenharia de Alimentos. Também leciona no Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais – CESCAGE desde 2012 para os cursos de Fisioterapia, Odontologia, Farmácia, Nutrição, Enfermagem e Agronomia, nas disciplinas de Bioquímica, Fisiologia, Biomorfologia, Genética, Metodologia Científica, Microbiologia de Alimentos, Nutrição Normal, Trabalho de Conclusão de Curso e Tecnologia de Produtos Agropecuários. Leciona nas Faculdades UNOPAR desde 2015 para o curso de Enfermagem nas disciplinas de Ciências Celulares e Moleculares, Microbiologia e Imunologia.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-037-7

