

O impacto na sociedade da tecnologia de edição gênica com base no sistema CRISPR-Cas9

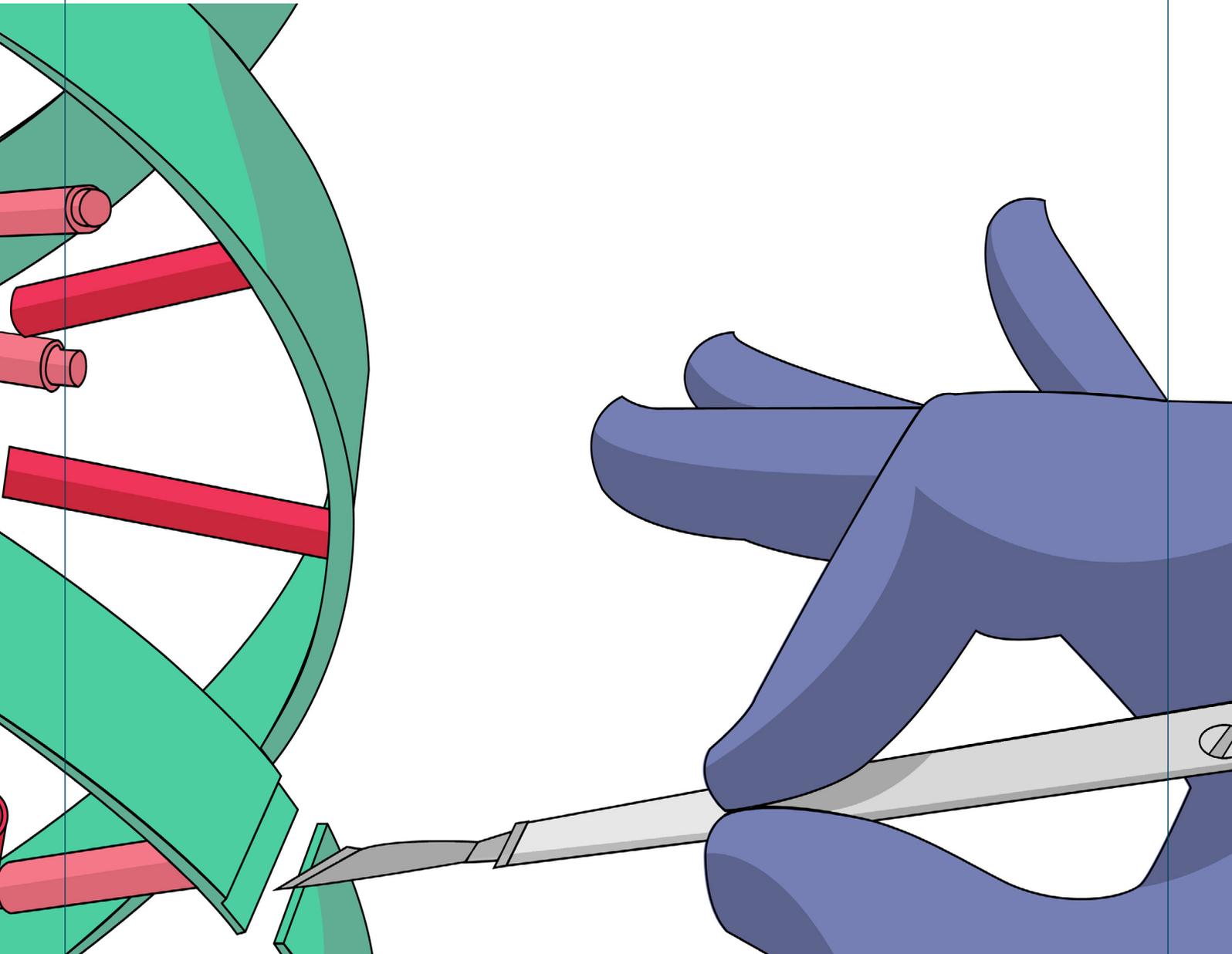
Tiago Alves Jorge de Souza¹ e Tiago Campos Pereira^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

² Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

Autor para correspondência: tiagocampospereira@ffclrp.usp.br

Palavras-chave: knockout, knock in, engenharia genética, bioética, indústria, medicina



A aparente simplicidade de alguns organismos esconde fantásticos ensinamentos que têm o potencial de modificar a nossa sociedade. A observação e elucidação do sistema imune de bactérias e archaea nas últimas décadas, por exemplo, levou à elaboração de uma versátil ferramenta denominada edição gênica com base no sistema CRISPR-Cas9 (CRISPR). Essa tecnologia tem revolucionado a genética molecular, proporcionando uma forma rápida, simples e eficiente de se editar o genoma de qualquer organismo. A utilização bem sucedida dessa técnica para a produção de animais transgênicos, combate a vetores de doenças e elaboração de estratégias terapêuticas são apenas algumas de suas potencialidades. Assim, o estudo, a difusão e a implementação dessa técnica no ambiente acadêmico e parques industriais poderão trazer enormes benefícios para a população e economia do Brasil e do mundo.

A FERRAMENTA CRISPR

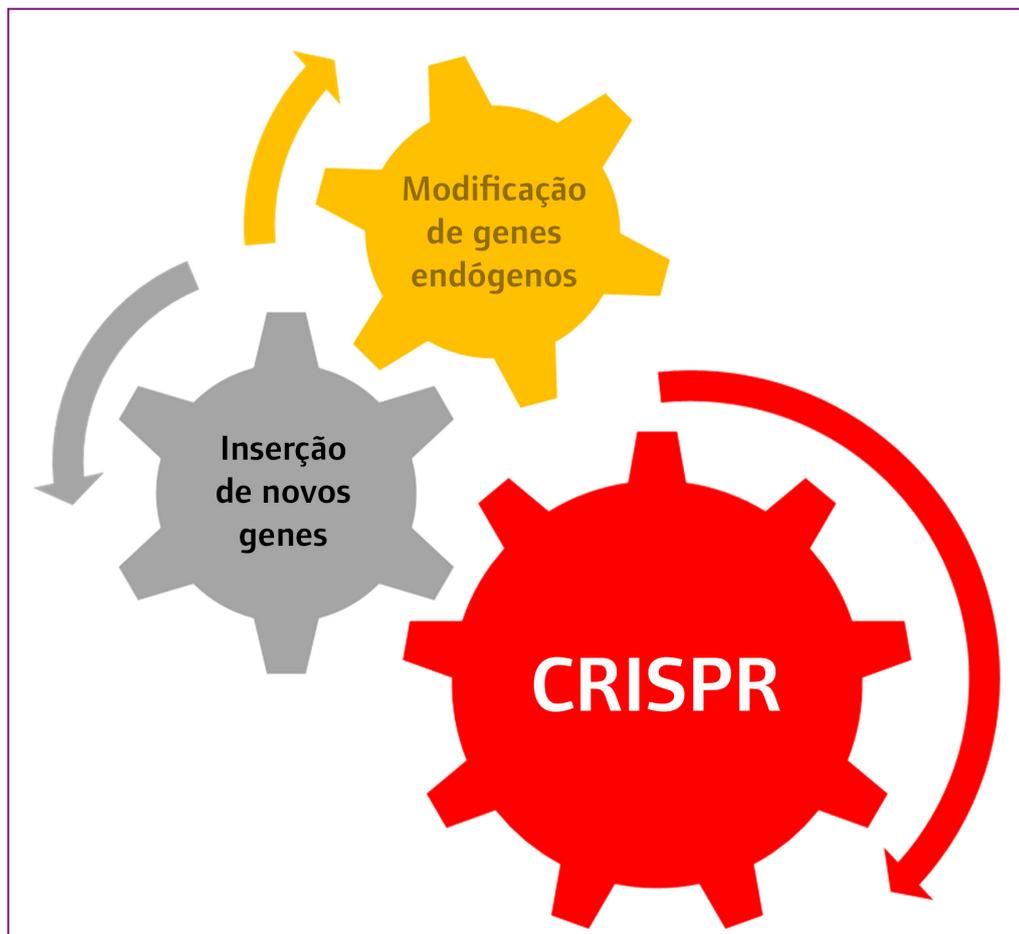
Recentemente, uma técnica tem sido amplamente discutida no ambiente acadêmico. Trata-se da edição gênica com base no sistema CRISPR-Cas9, aqui referida simplesmente como CRISPR, uma ferramenta simples e eficiente baseada no sistema imune da bactéria *Streptococcus pyogenes* capaz de promover nocaute (*knockout*), inserção (*knock in*), silenciamento gênico e **marcação gênica**, dentre outras aplicações de forma eficiente e mais barata

e prática do que as técnicas anteriormente utilizadas (e.g. “nucleases dedos de zinco” (**ZNFs**) e “nucleases fusionadas ao efator semelhante ao ativador de transcrição” (**TALENs**) (Figura 1). Informações sobre o sistema imune de bactérias (CRISPR), seus fundamentos moleculares, nocaute e inserção, ZNFs e TALENS podem ser encontradas no artigo ‘A revolucionária técnica de edição genética “CRISPR” da seção Conceitos em Genética desta mesma edição (páginas 114 a 123).

ZNFs (Zinc Finger Nucleases) - são enzimas construídas em laboratório capazes de promover cortes em sequências específicas do genoma. Dessa forma, elas podem ser utilizadas para os mesmos fins da CRISPR, isso é, edição genética. Elas apresentam em sua estrutura tridimensional certas projeções que parecem “dedos” (*finger*), por isto o nome.

TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) - são enzimas construídas em laboratório capazes de promover cortes em sequências específicas do genoma. Ao contrário das ZNFs, elas são baseadas em uma classe de proteínas semelhantes a fatores de transcrição (proteínas que se ligam ao DNA), por isso o nome.

Marcação gênica - técnica baseada em microscopia de fluorescência que permite visualizar a localização de determinado gene no genoma.



As peculiaridades desta técnica aliadas à sua praticidade têm permitido que cientistas sejam capazes de editar de forma rápida o genoma de qualquer organismo. Devido à sua versatilidade e baixo custo, esta técnica revolucionária tem o potencial de impactar de forma positiva a agropecuária, indústria e a saúde humana (Figura 2). Entretanto, por outro lado, ela também tem gerado

questionamentos de natureza ética acerca dos limites que devem ser impostos para a sua utilização. Dessa forma, a divulgação das potencialidades da ferramenta CRISPR na sociedade permitirá que todos se conscientizem acerca das benesses advindas da sua utilização consciente, alavancando assim a sua aplicação para fins econômicos e terapêuticos.

Figura 1. CRISPR como técnica de edição genética. A tecnologia de CRISPR permite que o pesquisador altere os genomas de maneira precisa, por exemplo, *introduzindo* um novo gene de resistência a vírus em uma planta ou *corrigindo* uma mutação em um gene endógeno em pacientes (terapia gênica).

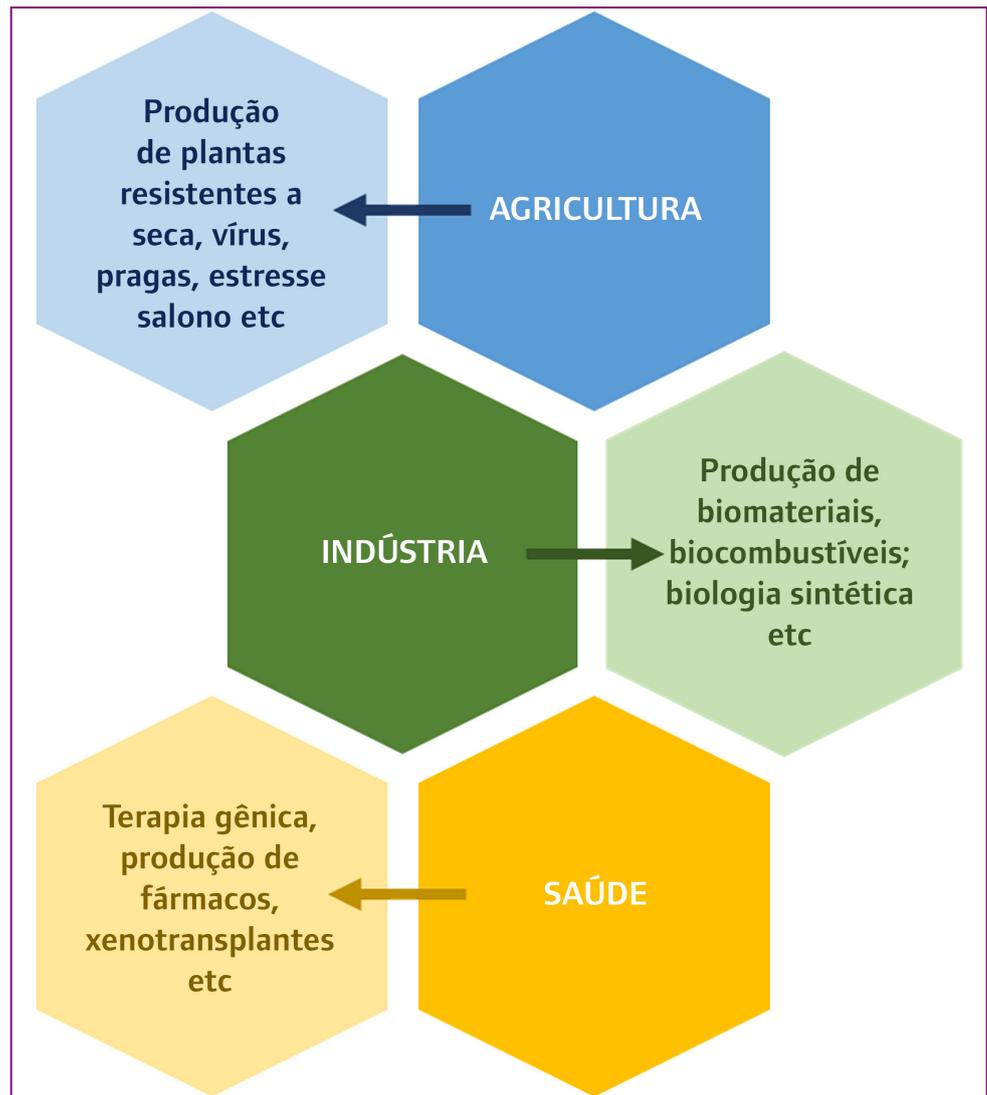


Figura 2. Impacto de CRISPR na sociedade. As diversas aplicações desta técnica de edição genética alcançam a agricultura, medicina, indústria, pecuária e diversos outros campos, assim como também levanta questões éticas e ambientais relevantes.

APLICAÇÕES NA AGRICULTURA

Nós últimos anos o regime irregular de chuvas e as alterações climáticas têm sido os principais problemas enfrentados pela agricultura brasileira. No ano de 2016, por exemplo, a falta de chuvas comprometeu a produtividade de soja no oeste da Bahia gerando um prejuízo de aproximadamente 1 bilhão de reais. O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, dessa forma, perdas dessa magnitude comprometem seriamente o agronegócio brasileiro.

Assim, considerando que vários genes relacionados ao estresse hídrico já foram identificados em animais e plantas, a introdução desses genes por CRISPR em cultivares de

grande interesse econômico, como a soja, poderia aumentar a resistência desses vegetais à seca, impedindo o comprometimento da colheita. Adicionalmente, CRISPR também poderia ser utilizada para produzir plantas não transgênicas resistentes a pragas por meio da introdução de mutações em genes não essenciais cujos produtos são os alvos de parasitas, salvaguardando assim a produção agrícola. Tais plantas, por não serem transgênicas, seriam mais facilmente liberadas para o plantio e aceitas para consumo.

Por fim, tem sido sugerido que vegetais modificados por CRISPR tenderiam a não provocar alergias no ser humano uma vez que Cas9 não apresenta similaridade a alérgenos, além de ser facilmente digerida (NAKAJIMA *et al.*, 2016).

APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA

As mudanças climáticas que afetam a agricultura brasileira e outros setores de nossa economia são em parte consequência da ação antrópica no meio ambiente e a crescente utilização de combustíveis de origem fóssil constitui uma das principais causas dessas mudanças. Dessa forma, têm se buscado a utilização crescente de energias renováveis como o etanol. O Brasil destaca-se no cenário mundial pela produção de etanol, mas vem sendo criticado pela comunidade internacional pelo fato de implementar grandes monoculturas de cana de açúcar para a produção desse biocombustível, impactando assim de forma negativa o meio ambiente. Apesar da eficiência da produção de etanol brasileiro a partir da cana de açúcar (*Saccharum spp*) ser muito maior do que a partir do milho, como ocorre nos EUA. A utilização de ferramentas de edição genômica como a CRISPR poderia aperfeiçoar a produção de etanol a partir do milho, o que diminuiria a ocupação de terras férteis por extensas monoculturas de cana de açúcar.

Nesse cenário, um dos fatores que impedem a otimização da produção de etanol é a presença de lignina na parede das células, o que

dificulta a conversão da biomassa de lignocelulose em etanol. Recentemente, pesquisadores da Flórida utilizaram TALENS para introduzir mutações no gene *COMT* (*caffeic acid O-methyltransferase*) o qual está relacionado com a produção de lignina. A edição gênica dos indivíduos resultou na redução na produção de lignina. Além disso, os indivíduos modificados passaram essas mutações para sua progênie, estabelecendo-se assim uma linhagem com maior potencial de produção de etanol. Esse foi o primeiro estudo que editou o genoma de cana de açúcar, abrindo as portas para novas abordagens, que poderão utilizar CRISPR. A técnica seria ideal para a produção de espécimes com menos lignina, pois é capaz de editar diferentes genes de forma simultânea por meio da introdução de quebras de fita dupla em vários sítios do genoma (Informações sobre “quebras no DNA” podem ser encontradas no artigo ‘A revolucionária técnica de edição genética “CRISPR” da seção Conceitos em Genética desta mesma edição). Assim não só o gene *COMT*, mas outros relacionados (e.g. *cafeoil CoA O-metiltransferase (CCoAOMT)* e *ferulato 5-hidroxilase (F5H)*) à síntese de lignina poderiam ser editados com um baixo custo envolvido.



APLICAÇÕES NA SAÚDE

Apesar da relevância do emprego da ferramenta CRISPR na agricultura e indústria, provavelmente o benefício mais imediato da utilização desta tecnologia ocorreria no campo da saúde. Nos últimos anos, a população brasileira vem sofrendo com doenças como a dengue, chikungunya, zika e a febre amarela urbana. Mais especificamente neste ano, um surto de febre amarela tem causado mortes em diversos estados do Brasil, preocupando as autoridades. O maior desafio relacionado

à prevenção de epidemias de tais doenças é a eliminação do vetor que as transmite, o *Aedes aegypti*. *A priori*, este díptero reproduz-se apenas em água limpa, assim, a população tem sido orientada a evitar o acúmulo de água parada nos recipientes dentro de suas propriedades. No entanto, recentemente, foi descoberto que ele também é capaz de se reproduzir em água poluída. Desta forma, levando em conta as condições de saneamento básico presentes em grande parte das cidades brasileiras, a luta contra este vetor estaria praticamente perdida.



Neste cenário, pesquisadores norte-americanos têm se valido de estratégias moleculares para combater este mosquito, as quais poderiam ser implementadas em nosso país. Eles descobriram que o gene *Nix* está diretamente relacionado com a diferenciação sexual de *Aedes aegypti*. Mais especificadamente, este gene é necessário e suficiente para o surgimento

dos órgãos sexuais masculinos nestes dípteros. A partir desta constatação, eles utilizaram CRISPR para introduzir o gene *Nix* no genoma de fêmeas, que são hematófagas, transformando-as em machos inofensivos (HALL *et al.*, 2015). A liberação destes ‘machos’ no ambiente comprometeria a reprodução, controlando assim o crescimento populacional.

QUESTÕES ÉTICAS E DESAFIOS

Além de entusiasmo, a técnica CRISPR também tem causado polêmicas e discussões de natureza ética na comunidade científica. Nos últimos anos, por exemplo, cientistas chineses utilizaram a CRISPR em embriões humanos não viáveis na tentativa de corrigir uma mutação associada a **beta-talassemia** (no gene da beta-globina: *beta-globin*, *HBB*) assim como alterar o **gene CCR5** a fim de tornar as células resistentes à infecção pelo vírus HIV. Esses estudos têm causado alvoroço e suscitado uma discussão na comunidade científica acerca da eficiência/especificidade da edição genômica via CRISPR visando o estabelecimento de terapias para doenças humanas, que até o presente momento não têm cura, *versus* a necessidade de se estabelecer limites éticos para a utilização da técnica. Após os pioneiros estudos chineses, o Reino Unido e a Suécia também permitiram pesquisas sobre a edição do genoma de embriões humanos e, considerando o rápido avanço da ciência, em breve teremos de lidar com essa questão no Brasil. A edição de um embrião viável implicaria no desenvolvimento de um indivíduo capaz de transmitir para sua prole (e para a população) a edição genética – algo sem precedentes na espécie humana.

Outra questão que vem gerando polêmica em relação à utilização da técnica CRISPR é a MCR (*Mutagenic Chain Reaction*). Em essência, MCR é uma estratégia de edição genética baseada em CRISPR que permite que

os alelos editados apresentem uma herança 'não-mendeliana', isto é, se propaguem muito mais rapidamente dentro de uma população de reprodução sexuada (sejam animais ou plantas). Ela foi estabelecida inicialmente por cientistas da Universidade da Califórnia em San Diego, que visavam à produção de moscas (*Drosophila*) homozigotas mutantes por meio da introdução da maquinaria CRISPR nesses organismos. Para isso, eles prepararam um cassete de MCR contendo um **sgRNA** e a Cas9, que estava sob o controle de um promotor para expressão ubíqua, isto é, em todos os tecidos da mosca. Flanqueando esse cassete foram adicionadas sequências homólogas ao gene alvo, que nesse caso foi o gene **yellow** do cromossomo X de *Drosophila*. Esse cassete foi injetado em embriões de *Drosophila* e acabou por se integrar em uma cópia do cromossomo X e remover o gene *yellow*. Posteriormente, essa construção também mediou a edição da região correspondente no seu cromossomo homólogo, proporcionando homozigose da alteração desejada. Por estarem em homozigose, as alterações foram diretamente transmitidas para as progênes dos indivíduos modificados.

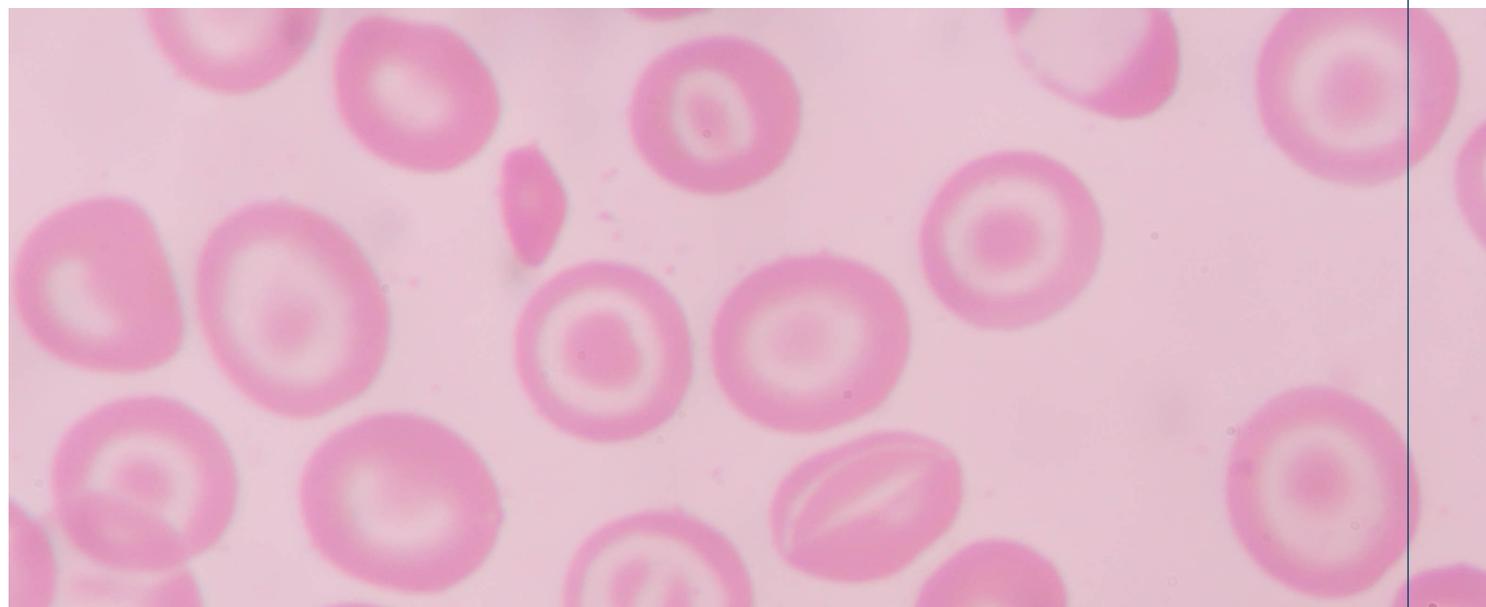
Recentemente, o mesmo grupo de pesquisa tem utilizado a tecnologia MCR para diminuir a fertilidade de espécies do gênero *Anopheles* a fim de controlar a população desses vetores de doenças. Essa estratégia juntamente com inserção do gene *Nix*, previamente descrita, podem ser de grande valia no controle de surtos de dengue e febre ama-

Beta-talassemia - doença genética devida a mutações no gene da beta-globina (*HBB*) e caracterizada pela produção anormal de hemoglobina.

sgRNA - RNA guia, isto é, uma pequena molécula de RNA que se liga à proteína Cas9 e a direciona ao DNA alvo.

yellow - gene cujo produto proteico é responsável pela pigmentação da cutícula da mosca das frutas (drosófila).

Gene CCR5 - trata-se de um gene codificador de uma proteína que age como um receptor de superfície, na membrana da célula. O HIV se liga a esta proteína para conseguir invadir a célula.



Dinâmica transcricional - a forma como a célula expressa seus genes, produzindo RNAs e proteínas ao longo do tempo. Essa dinâmica pode ser analisada em tubos de ensaio (*in vitro*) ou diretamente na própria célula/organismo (*in vivo*).

rela, por exemplo. No entanto, assim como a manipulação de embriões humanos, a MCR tem gerado discussões e preocupações no meio acadêmico devido à possibilidade de indivíduos contendo a construção MCR espalharem mutações para populações selvagens na natureza, o que poderia comprometer ou mesmo extinguir comunidades de organismos necessárias para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas.

CONCLUSÕES

Grande parte dos trabalhos atuais utilizando CRISPR são pesquisas de natureza 'básica', isto é, visam a demonstrar a utilidade da técnica nas diversas células, tecidos e espécies; mais recentemente, estudos mais aplicados começaram a emergir. As aplicações de CRISPR relatadas neste artigo são apenas uma pequena parcela das enormes potencialidades advindas da utilização desta metodologia. Só em 2016, mais de 2300 artigos foram publicados abordando esta tecnologia, quase o mesmo volume de trabalhos publicados em 30 anos de pesquisa sobre o tema. Adicionalmente, a cada novo mês, diversos estudos propondo novas aplicações para CRISPR são divulgados, demonstrando que ainda estamos longe de esgotar a versatilidade desta técnica. Recentemente, por exemplo, a descoberta de que RNAs exógenos também podem ser incorporados no locus CRISPR e que a dinâmica de inserção de espaçadores pode ser documentada têm sugerido a possibilidade de que futuramente CRISPR poderá ser utilizada também para

esclarecer a origem e evolução de doenças por meio do monitoramento da **dinâmica transcricional** *in vitro* e *in vivo*. Dessa forma, considerando as potencialidades previamente relatadas e as novas aplicações que têm surgido para a técnica, pode-se afirmar que a sua implementação nos laboratórios e empresas brasileiras permitirá o avanço científico e econômico nos mais diversos segmentos, permitindo que o Brasil possua alternativas para alguns de seus problemas socioeconômicos e se torne cada vez mais competitivo no cenário internacional.

REFERÊNCIAS

- HALL, A. B.; BASU, S.; JIANG, X.; QI, Y.; TIMOSHEVSKIY, V. A.; BIEDLER, J. K.; SHARAKHOVA, M. V.; ELAHI, R.; ANDERSON, M. A.; CHEN, X. G.; SHARAKHOV, I. V.; ADELMAN, Z. N.; TU, Z. SEX DETERMINATION. A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, v. 12, n. 348(6240), p. 1268-1270, 2015.
- KANG, X.; HE, W.; HUANG, Y.; YU, Q.; CHEN, Y.; GAO, X.; SUN, X.; FAN Y. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 33, n. 5, p. 581-588, 2016.
- NAKAJIMA O, NISHIMAKI-MOGAMI T, KONDO K. Cas9 in Genetically Modified Food Is Unlikely to Cause Food Allergy. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 39, n. 11, p. 1876-1880, 2016.
- PARA SABER MAIS**
- GANTZ, V. M.; BIER, E. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science*, v. 348, n. 6233, p. 442-444, 2015.
- JUNG, J. H.; ALTPETER, F. TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. *Plant Molecular Biology*, v. 92, n. 1-2, p.131-142, 2016.
- LIANG, P.; XU, Y.; ZHANG, X.; DING, C.; HUANG, R.; ZHANG, Z.; LV, J.; XIE, X.; CHEN, Y.; LI, Y.; SUN, Y.; BAI, Y.; SONGYANG, Z.; MA, W.; ZHOU, C.; HUANG, J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, v. 6, n. 5, p. 363-72, 2015.