

Engenharia Genética

DONA CIÊNCIA



gibi
52



*Associação
Fundo
de Incentivo
à Pesquisa*

apresenta:

DONA CIÊNCIA

Engenharia Genética

Idealizadora: Monica L. Andersen

Autores do texto: Mayara Paschalidis, Pedro Guerreiro, Mariana Moyses

Ilustração: Mônica Oka

Revisão textual: Maria Isabel Melaragno e Allan Saj Porcaccia



Olá! Eu sou a Dona
Ciência e tenho várias
histórias interessantes
para contar a vocês!

Em cada gibi vou
mostrar como a socie-
dade é beneficiada com
as descobertas feitas
pelos cientistas!

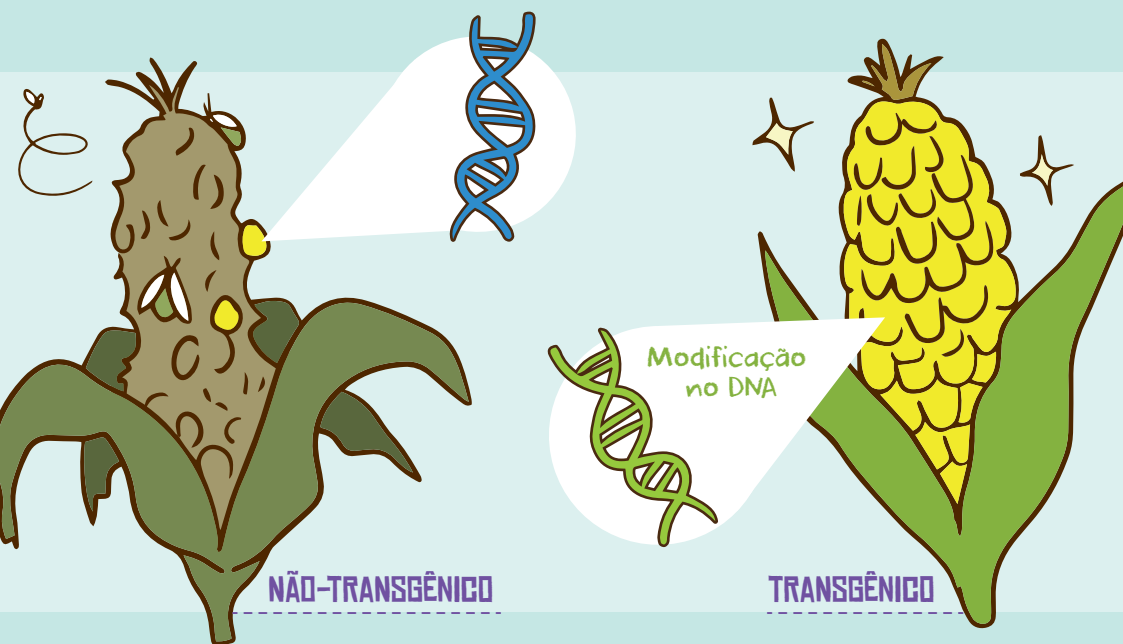
Neste gibi, vamos conhecer sobre a

ENGENHARIA GENÉTICA,

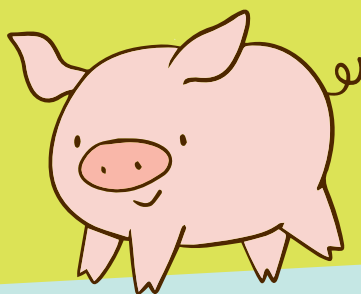
área que envolve a edição de DNA com o
propósito de estudar doenças genéticas
e melhorar a vida das pessoas!

O QUE É E PARA QUE SERVE ENGENHARIA GENÉTICA?

A engenharia genética é a manipulação e **modificação do DNA** de um organismo, por meio de técnicas de biotecnologia. Ela permite corrigir ou introduzir variantes genéticas (ou seja, "mutações") e até mesmo inserir características de um organismo em outros!

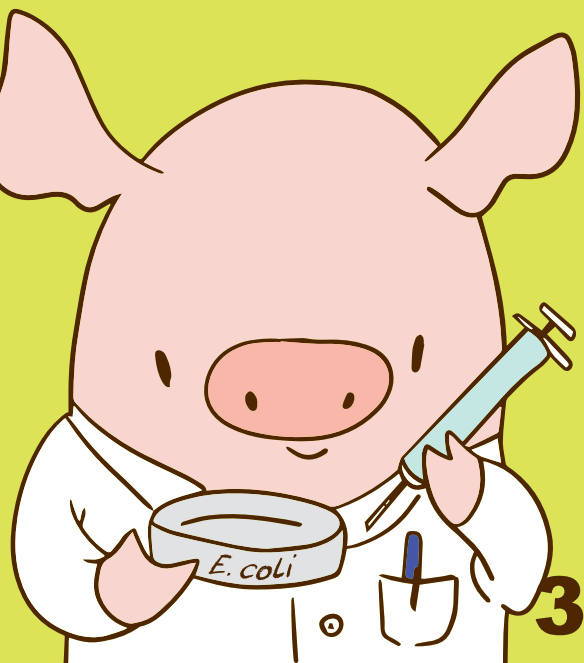


Hoje em dia, a engenharia genética já está presente em nosso cotidiano: está nos alimentos transgênicos, que são mais produtivos e resistentes a pragas e doenças, nas vacinas e nos remédios produzidos por microrganismos geneticamente modificados, bem como nas pesquisas científicas!



VOCÊ SABIA?

Antigamente, a insulina, usada no tratamento da diabetes, era extraída de porcos. Com o surgimento da engenharia genética, ela passou a ser produzida por bactérias, como a *Escherichia coli*, nas quais foram introduzidos genes humanos para a produção de insulina! Além de isso facilitar a produção desse hormônio sintético em larga escala, tornou o seu uso mais seguro pelos humanos, evitando reações alérgicas, como ocorria mais frequentemente com a insulina de origem suína.



Com o avanço dessas técnicas, talvez seja possível, no futuro, tratar doenças genéticas, como a anemia falciforme e a doença de Huntington, ou até mesmo doenças como câncer, diabetes e AIDS.

Apesar de as metodologias científicas de manipulação direta do DNA serem relativamente recentes, nós, humanos, realizamos uma estratégia de manipulação genética há milênios em nossas atividades de agricultura e criação de animais:

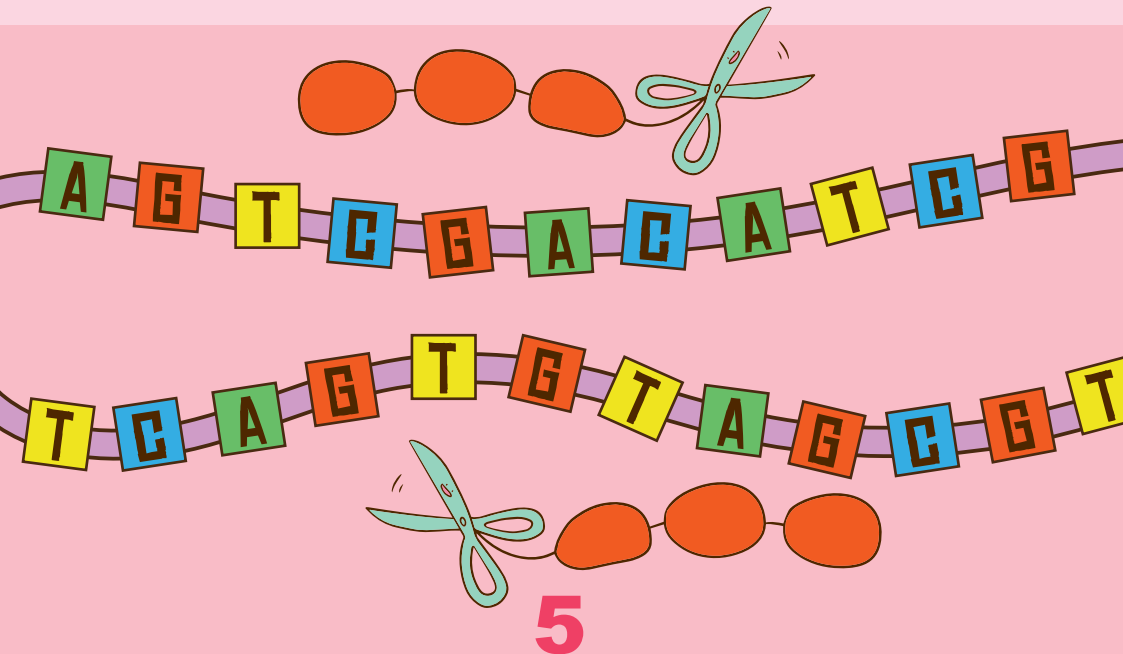
A **SELEÇÃO ARTIFICIAL**, ou cruzamento seletivo. Por meio dessa técnica, nossos ancestrais e nós selecionamos e permitimos que apenas plantas e animais com características de interesse se reproduzam.

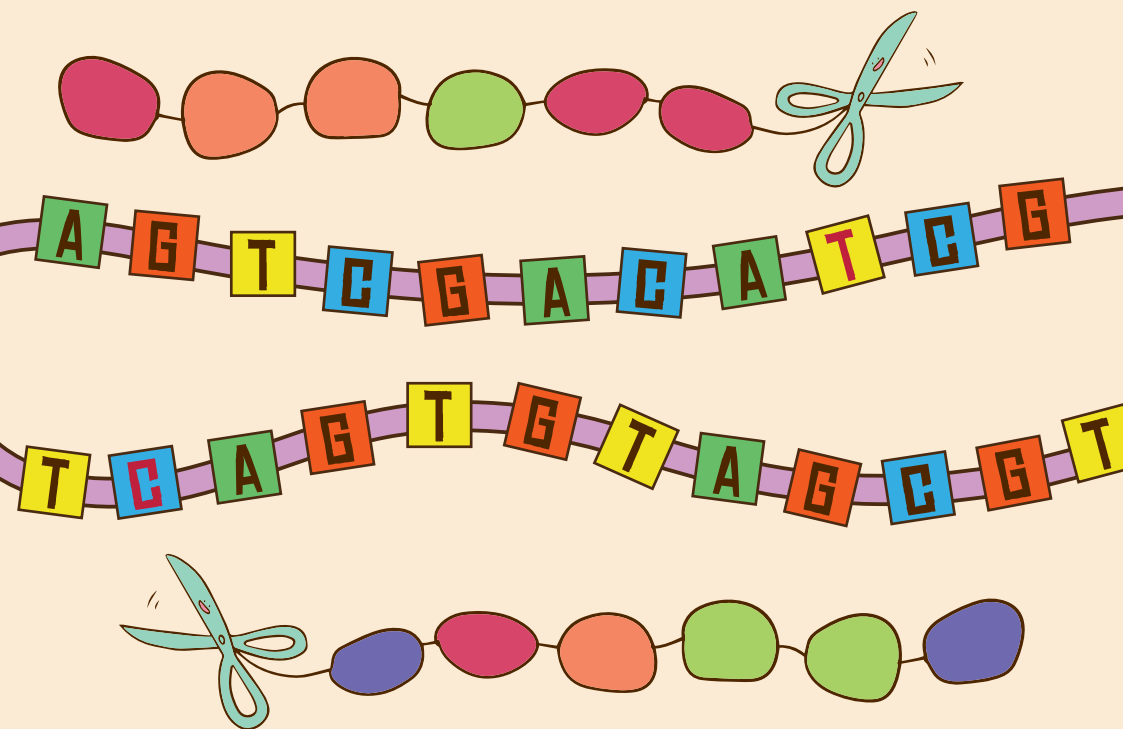


Selecionamos grãos – por exemplo, o milho, o arroz e o trigo –, verduras e frutas para que se tornassem maiores e mais saborosas, como as melancias, que eram muito diferentes há **apenas** 400 anos! Pensando nos animais de estimação, nós selecionamos lobos mais dóceis, que, após milhares de anos, originaram os cães domésticos. Conseguimos selecionar até mesmo fungos e bactérias, microrganismos muito utilizados na produção de alimentos, como laticínios e bebidas fermentadas!

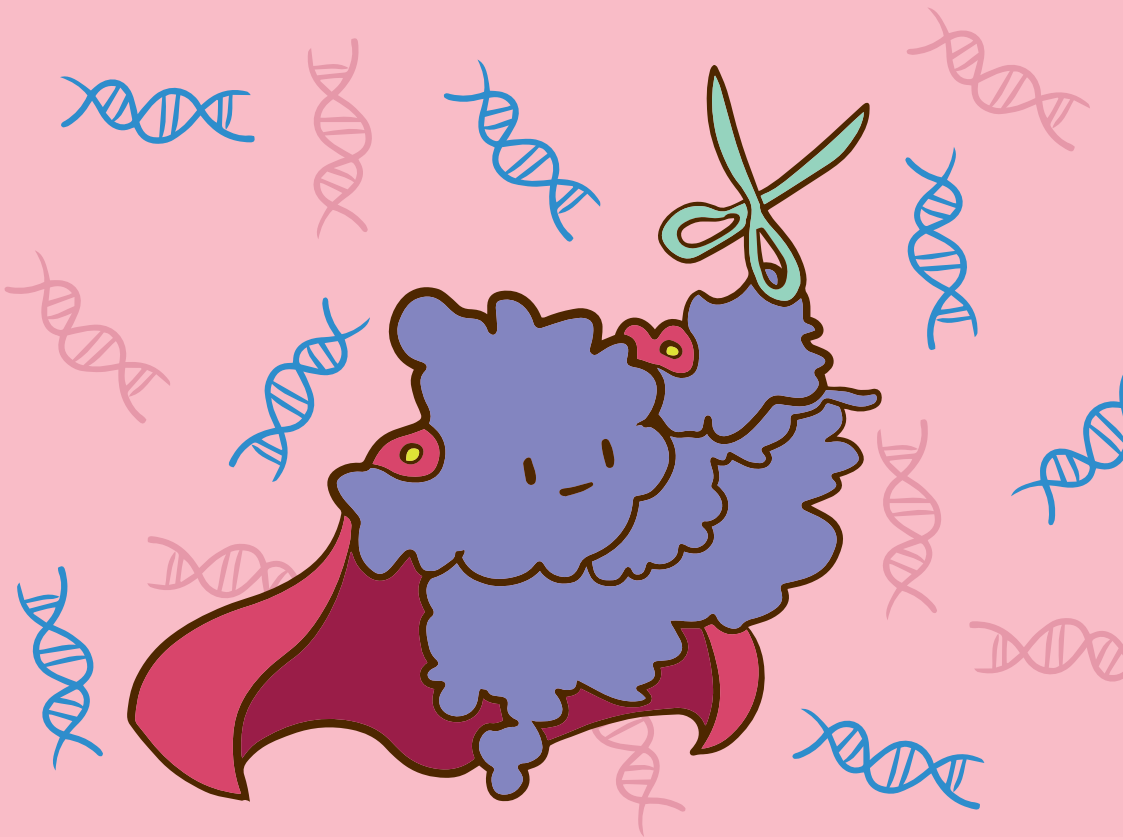


Já no ano de 1994, as **ZFNs** (do inglês, "*zinc finger nucleases*") foram a base de um dos primeiros sistemas de edição genética desenvolvido por cientistas em laboratório. As proteínas zinc finger são abundantes nas células eucariontes, e interagem com o DNA por meio de um motif específico (ou seja, uma sequência de DNA específica a que essas proteínas se ligam). Quando as proteínas zinc finger foram fusionadas a um domínio proteico com função de nuclease (que tem a função de cortar a molécula de DNA), esses motifs das ZFNs passaram a ser utilizados para direcionar a região alvo da edição no genoma.



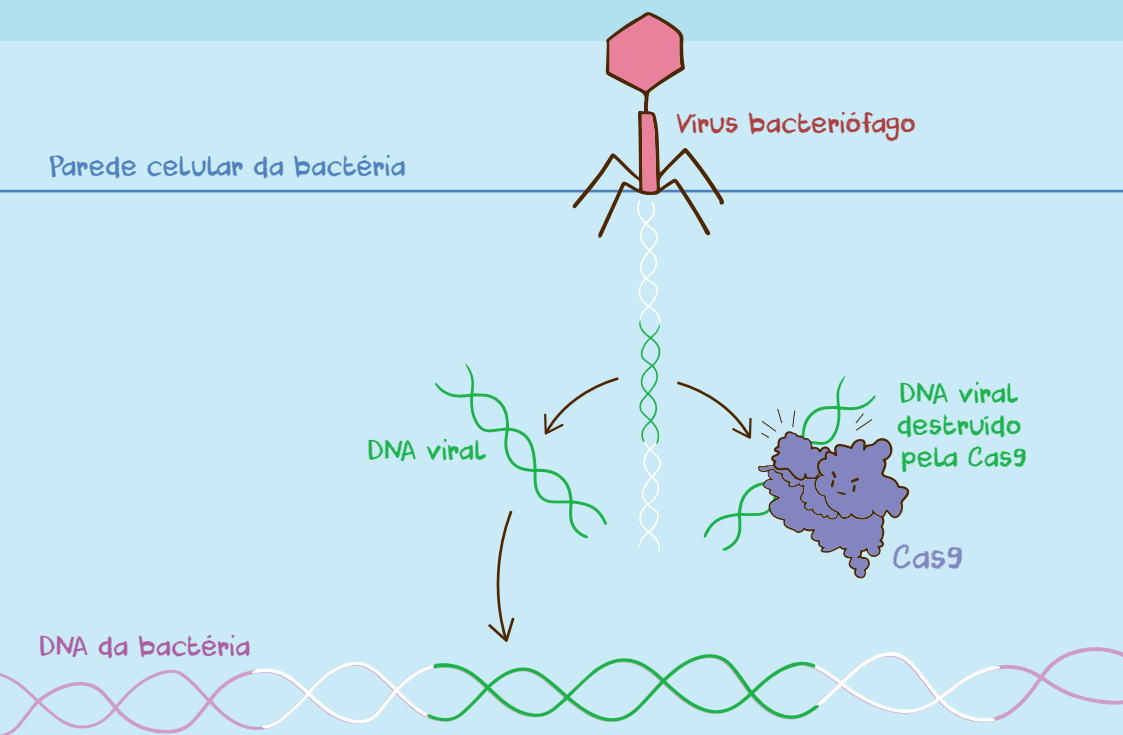


Uma outra forma de edição genética é pelo uso de **TALENs** (do inglês, "*transcription activator-Like effector nuclease*"). Nessa metodologia, outro tipo de proteínas que se ligam ao DNA (também em motivos específicos), as TALE, foram fusionadas com nucleases, atuando de forma semelhante às ZFNs. Esses dois sistemas fazem uso da enzima FokI como nuclease, ou seja, como efetora do corte de DNA, e utilizam proteínas que se ligam ao DNA para direcionar o corte e determinar o alvo da edição genética. Ambos exigem o desenho e a produção de combinações de proteínas específicas para cada alvo de edição, o que é uma atividade cara, demorada e muito trabalhosa. Além disso, permitem apenas uma edição por vez no genoma.

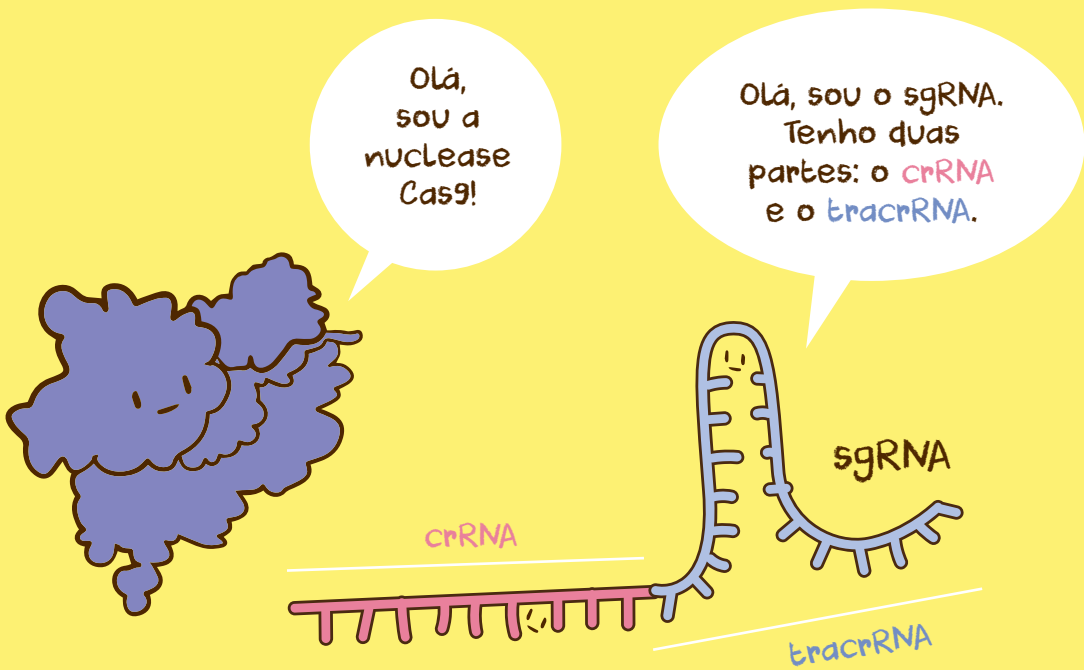


A metodologia de **CRISPR** (Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Interespaçadas, do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) é o mais recente sistema de edição genética e causou uma revolução na ciência! Ela apresenta diversas vantagens sobre os sistemas anteriores, desde custo mais baixo e maior facilidade de uso até a sua grande especificidade e diversa gama de aplicações. Ela permite a edição de vários pontos do genoma simultaneamente e pode ser modificada para cumprir diferentes funções, como transporte de RNA e regulação da atividade de genes sem alterar a sequência de DNA (também chamada de "regulação epigenética").

Esse sistema surgiu a partir de estudos com bactérias, como a *Streptococcus pyogenes*, que têm uma espécie de "sistema imune" contra vírus. Quando uma bactéria sobrevive a uma infecção viral, ela incorpora um pequeno trecho do DNA do vírus a uma região específica do seu genoma. Caso o mesmo vírus ataque a bactéria novamente, ela é capaz de reconhecer esse trecho de DNA viral e rompê-lo, utilizando enzimas nucleases, como a **Cas9**, sobre a qual falaremos a seguir!



Parte do DNA do vírus é inserida no DNA da bactéria.



Para que a edição genética por CRISPR ocorra, é necessária uma ribonucleoproteína, isto é, uma proteína que forma um complexo com uma molécula de RNA. Nessa ribonucleoproteína, a proteína é a nuclease Cas9 e a molécula de RNA é o gRNA, ou RNA guia. O RNA guia é composto por dois componentes: o RNA CRISPR (crRNA), que tem 20 nucleotídeos complementares à região que queremos editar de forma que determina o alvo da edição no genoma, e o RNA transativante (tracrRNA), que tem 80 nucleotídeos e é responsável pela formação do complexo do RNA guia com a Cas9 e pela ativação da atividade de nuclease da Cas9.

O crRNA se liga à sequência de interesse no DNA por complementaridade de bases, permitindo edições extremamente precisas. Além disso, o uso de RNA para determinar a sequência do DNA alvo é mais fácil e barato do que o uso de proteínas (como é feito nas metodologias de ZFN e TALEN), tornando a técnica de CRISPR mais vantajosa na maioria dos casos.

Juntos formamos uma
ribonucleoproteína que
corta um alvo no DNA



Na técnica de **CRISPR**, antes da interação do RNA guia com o DNA da célula, a Cas9 vasculha o genoma por um



A descoberta do sistema CRISPR e o seu desenvolvimento como técnica de edição genética levou cerca de 2 décadas e teve a colaboração de muitos cientistas!

1993 – 2005

Francisco Mojica: Descoberta do CRISPR e sua função.

MAIO DE 2005

Alexander Bolotin: Descoberta da Cas9 e da PAM.

MARÇO DE 2006

Eugene Koonin: Esquema hipotético de imunidade adaptativa.

MARÇO DE 2007

Philippe Horvath: Demonstração experimental da imunidade adaptativa.

AGOSTO DE 2008

John van der Oost: Sequências de spacer são transcritas em RNAs guia.

DEZEMBRO DE 2008

Luciano Marraffini e Erik Sontheimer: CRISPR age em alvos de DNA.

MARÇO DE 2011

Emmanuelle Charpentier: Descoberta do tracrRNA para o sistema Cas9.

JULHO DE 2011

Virginijus Šikšnys: CRISPR pode funcionar de forma heteróloga em outras espécies.

SETEMBRO DE 2012

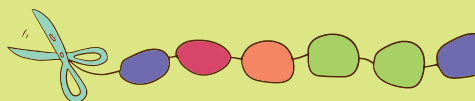
Virginijus Šikšnys: caracterização bioquímica da clivagem mediada por Cas9*.

*Achados similares e independentes reportados quase ao mesmo tempo por Charpentier e Jennifer Doudna, que também reportaram que crRNA e tracrRNA podiam ser fusionados para criar um único guia sintético, simplificando ainda mais o sistema.

JANEIRO DE 2013

Feng Zhang: CRISPR-Cas9 aplicado à edição genética**

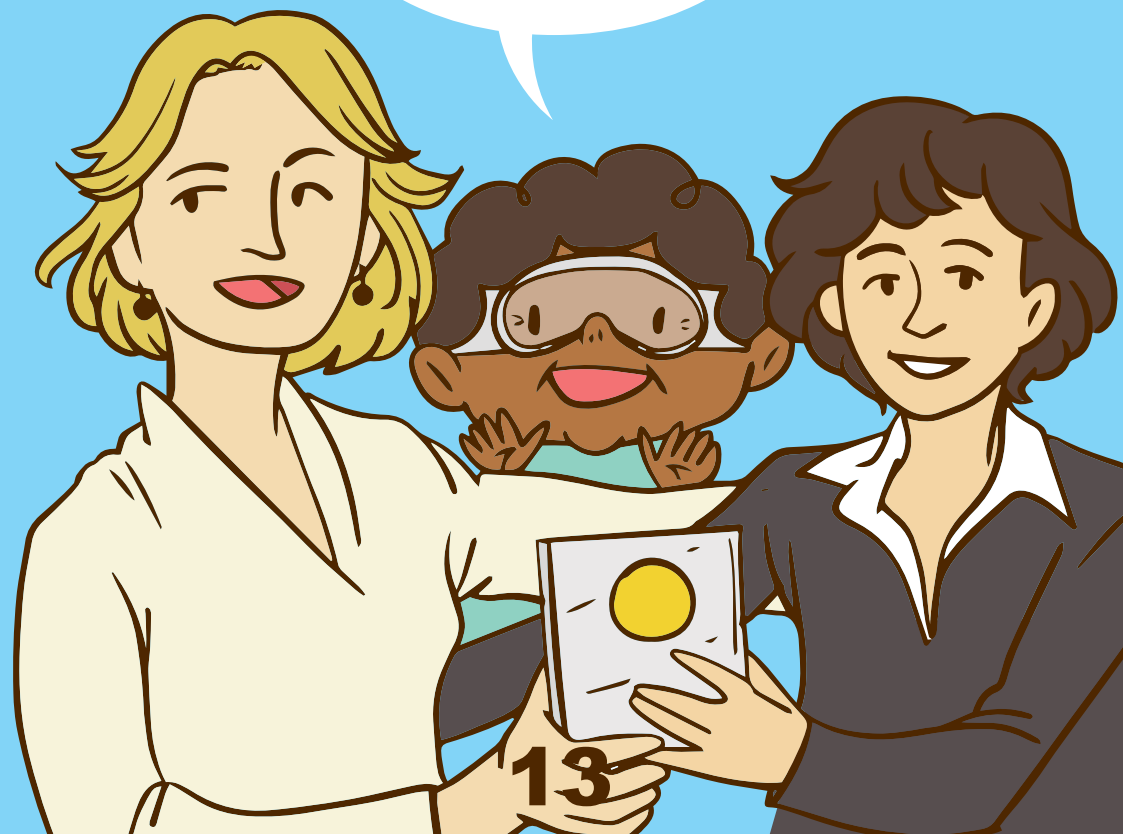
**Achados similares foram reportados por pesquisadores do Laboratório de George Church, em Harvard, na mesma edição da revista Science.



Esse sistema rapidamente se tornou popular entre os cientistas devido à sua precisão, praticidade e acessibilidade em relação aos sistemas de edição genética anteriores.

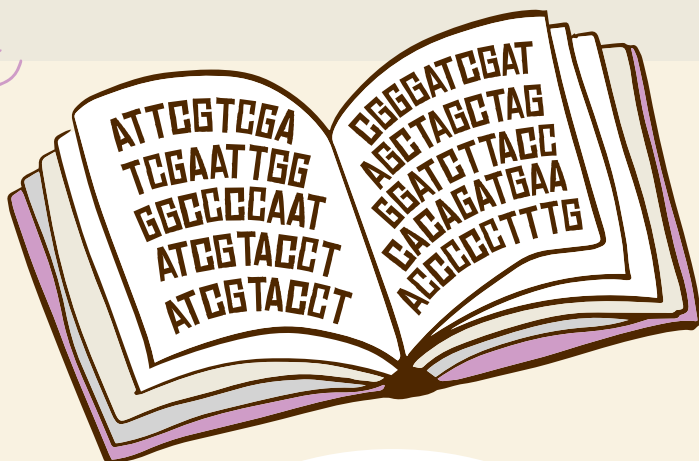
Sua importância é tanta que rendeu um Prêmio Nobel a **JENNIFER DOUDNA** e **EMMANUELLE CHARPENTIER** em 2020, por suas contribuições para o desenvolvimento da técnica de CRISPR-Cas9!

Agora que você já conhece o sistema CRISPR, vamos saber para o que ele pode ser utilizado?



ANTES DISSO, VAMOS LEMBRAR RAPIDAMENTE O QUE É O DNA.

O DNA é como se fosse um livro que tem muitas páginas com as Letras A, T, C e G (ou seja, os nucleotídeos) escritas em uma certa sequência. Os éxons são regiões específicas dentro dos genes, como se fossem frases muito importantes deste livro. Nos éxons, cada sequência de três Letras codifica um aminoácido. Por sua vez, uma determinada sequência de aminoácidos origina uma certa proteína.



Caso queira saber mais sobre a estrutura e funcionalidade do DNA (ácido desoxirribonucleico), acesse a Edição 12 do Gibi Dona Ciência, que é sobre a **DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE!**



O SISTEMA CRISPR TEM DIVERSAS APLICAÇÕES. NÓS VAMOS RESSALTAR AS 3 MAIS IMPORTANTES:

- 1 Como primeira aplicação, é usado principalmente para estudar a perda de função de genes.

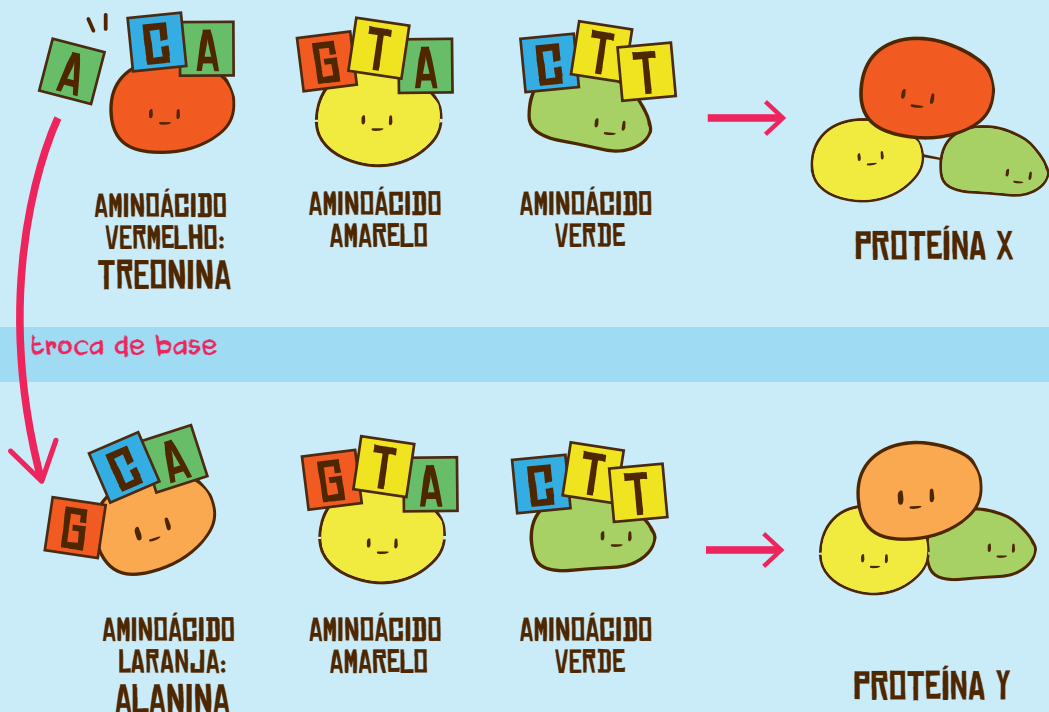
A proteína Cas9 é usada junto com o RNA guia para fazer um corte nas duas fitas de DNA. Após o corte do genoma, a célula utiliza mecanismos de reparo do DNA, que podem causar inserções ou deleções de nucleotídeos naquela região. No caso de deleção de nucleotídeos, por exemplo, uma parte da sequência do DNA é deletada. Ou seja, uma página do livro ficará com algumas palavras faltando. Se a edição foi feita em uma região do genoma que codifica proteína (ou seja, nos éxons), essa proteína pode ficar incompleta, pois certos aminoácidos não serão mais produzidos. Neste cenário, não se tem controle da sequência final que será resultante da edição genética, pois ela será determinada pelo sistema de reparo de DNA de cada célula, de maneira aleatória. É possível controlar apenas o local em que o corte do DNA será feito.



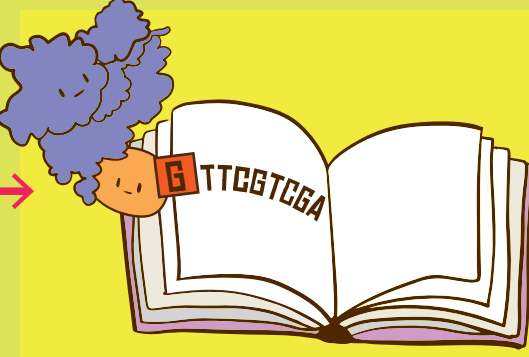
2

Como segunda aplicação, o objetivo passa a ser inserir mudanças específicas na sequência do DNA, que podem ou não gerar a perda de função dos genes.

Nesse tipo de edição, uma das Letras do DNA pode ser trocada por outra. Assim, pode haver uma substituição de aminoácidos, havendo a possibilidade de prejudicar a formação e a função da proteína. Por exemplo, a sequência ACA produz um aminoácido específico (chamado "treonina"). A primeira Letra da sequência pode ser substituída por G, sendo que as Letras GCA produzem um aminoácido diferente (chamado "alanina"). Esse tipo de alteração no genoma é denominado "variante de sentido trocado".



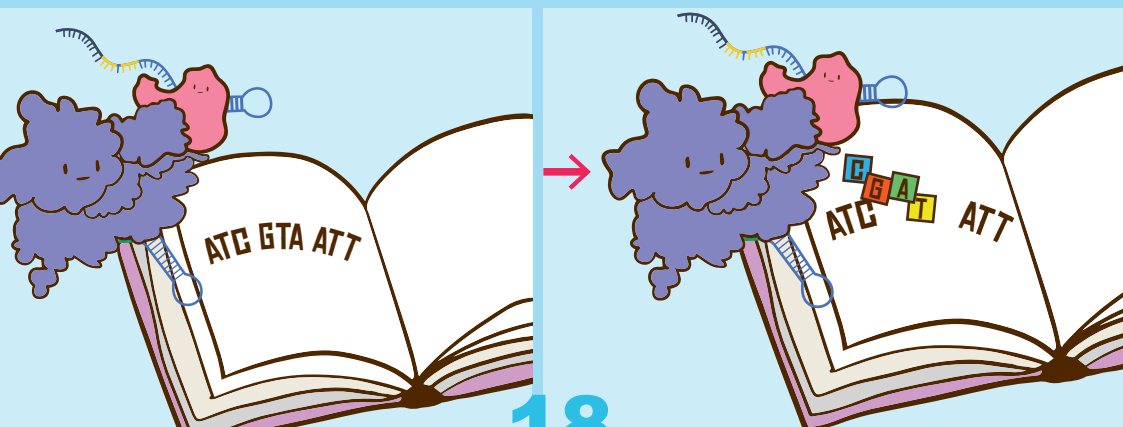
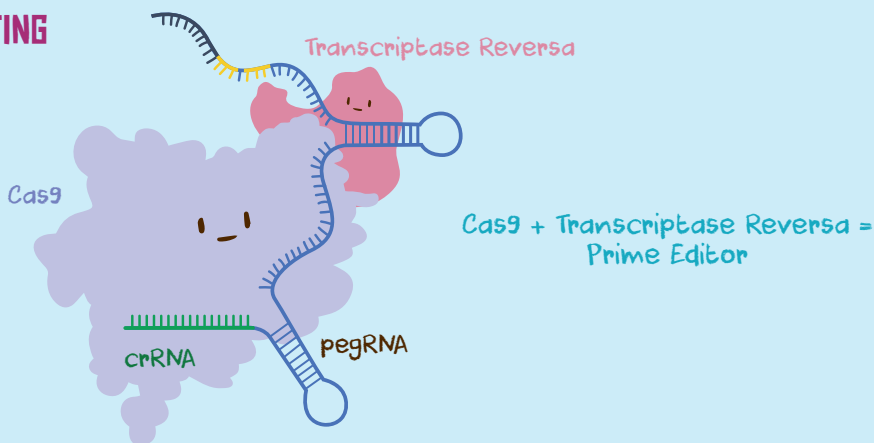
Para se ter total controle sobre como será feita a troca de bases (ou seja, qual Letra do DNA substituirá a Letra que será trocada), é possível usar metodologias de CRISPR mais avançadas, como a técnica de **Base Editing**. Nesse sistema, a proteína Cas9 corta apenas uma das fitas de DNA (não mais as duas) e, por isso, é chamada de **Cas9 nickase**. Para se realizar a técnica de Base Editing, a Cas9 nickase é fusionada a outras proteínas: a **CBE** (do inglês, "**cytosine base editors**") ou a **ABE** (do inglês, "**adenine base editors**"). Essas duas proteínas são responsáveis por fazer a troca da Letra que precisa ser substituída de forma precisa.



A Cas9 nickase também pode ser utilizada junto com uma enzima chamada **Transcriptase Reversa** em uma estratégia de edição que é chamada de **PRIME EDITING**.

Nessa estratégia, a Cas9 nickase faz um corte próximo à letra que será trocada e a **Transcriptase Reversa** insere uma sequência de cerca de 20 nucleotídeos na região. Esta sequência inserida terá a modificação genética de interesse, que pode ser uma troca de bases, uma deleção ou uma inserção de nucleotídeos específicos. A metodologia de *Prime Editing* é mais flexível que a de *Base Editing*, uma vez que existem mais possibilidades de modificações que podem ser realizadas na sequência de DNA.

PRIME EDITING



3

Já como terceira aplicação, o sistema CRISPR pode ser usado em outras metodologias que envolvem **BIOLOGIA MOLECULAR**, mas não envolvem alteração da sequência de DNA.

Nesse caso, a Cas9 será modificada para não cortar o DNA, sendo chamada de **dCas9** (do inglês, "*Dead Cas9*", ou Cas9 "morta"). A dCas9 é fusionada a outra proteína, levando-a a uma parte específica do DNA.

Proteína
dCAS9



Proteína Levada
ao dna pela dCAS9



Essa proteína levada pela dCas9 pode fazer com que haja aumento ou diminuição da expressão do gene alvo (ou seja, da atividade do gene). Consequentemente, deverá haver aumento ou diminuição da quantidade de proteínas produzidas.





Considerando todas essas aplicações, as estratégias de edição com CRISPR permitem um maior entendimento sobre doenças relacionadas a variações da sequência de DNA (ou seja, "mutações" genéticas), como câncer*, diabetes, alguns tipos de alterações do neurodesenvolvimento e epilepsia*, entre muitas outras. Ao introduzir modificações do DNA em modelos de estudo (como modelos animais* ou células em cultura), o CRISPR ajuda a entender as consequências destas variações nos organismos, contribuindo com pesquisas sobre a base genética das doenças humanas.



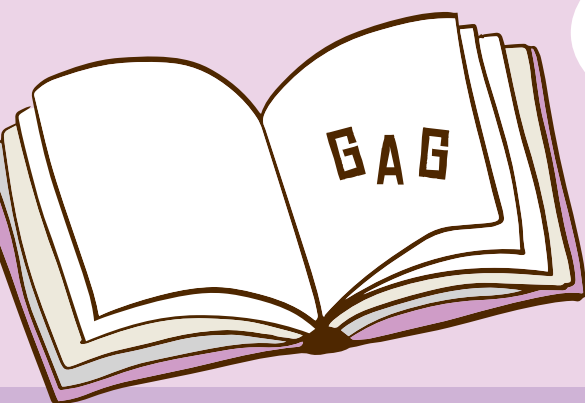
*Quer saber mais sobre **EPILEPSIA E CÂNCER?**

Você pode encontrar mais detalhes nas Edições **43 e 51** do Gibi **Dona Ciência**! Para aprender mais sobre a utilização de animais em pesquisa, acesse as Edições **1, 2 e 3** da **Dona Ciência**, que descrevem a importância dos animais em pesquisas no Brasil.

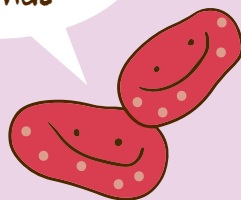


Além disso, há a possibilidade de se usar a CRISPR para corrigir as variações do DNA que causam doenças muito graves, servindo como tratamento. Por exemplo, esse sistema de edição pode ser muito útil para o tratamento da Anemia Falciforme, uma doença congênita (que se desenvolve antes mesmo do nascimento) causada pela mudança da Letra A pela Letra T em uma sequência específica do DNA. Ela faz com que um dos tipos de células que compõem nosso sangue, as hemácias, possuam um formato anormal.

PESSOA SEM ANEMIA FALCIFORME

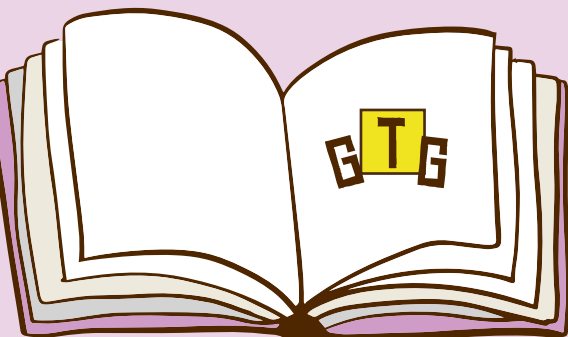


Hemácias com hemoglobina normal

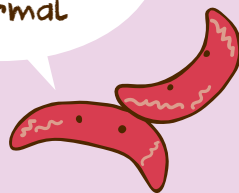


GLÓBULO VERMELHO NORMAL

PESSOA COM ANEMIA FALCIFORME



Hemácias com moléculas de hemoglobina anormal



GLÓBULO VERMELHO FALCIFORME

Assim, em indivíduos com a doença, o tratamento seria possível pela troca de T por A nessa sequência específica do DNA por meio da edição com CRISPR. Atualmente, testes clínicos estão em andamento para o desenvolvimento de tratamentos de anemia falciforme baseados em CRISPR.



Como toda tecnologia, a técnica de CRISPR é apenas uma ferramenta, que pode ser usada para finalidades boas ou ruins. A edição com CRISPR permite que se altere partes do DNA, estejam elas relacionadas a doenças ou não. Com isso, há uma preocupação ética sobre edições genéticas que não estejam voltadas para a prevenção ou tratamento de doenças.

Por exemplo, nosso DNA é o responsável pela cor dos nossos olhos e dos cabelos, pela nossa altura e por muitos outros aspectos individuais!

Suponha que todas as pessoas quisessem mudar a cor de seus olhos ou a cor dos olhos dos seus descendentes por meio da edição genética via CRISPR. Isso poderia se tornar um problema pelos seguintes motivos:

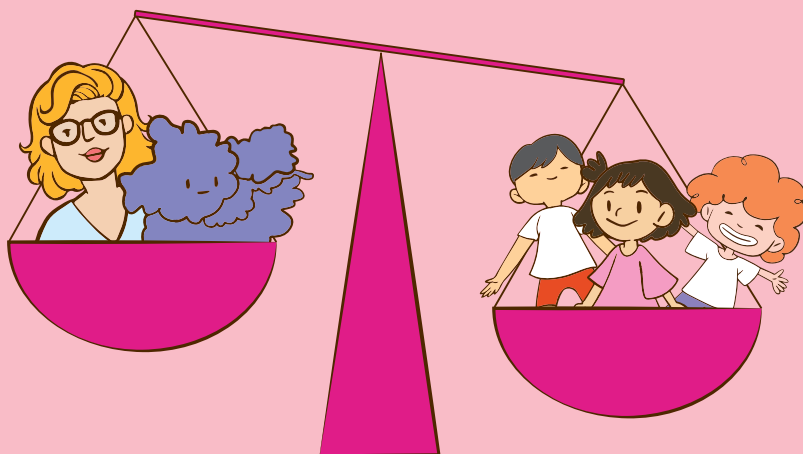
- 1 A cor dos olhos deixaria de ser uma característica que difere uma pessoa da outra. E não seria chato viver em um mundo onde todos são iguais?!



Além disso, a diversidade humana é muito importante, pois possibilita que haja troca de experiências e culturas entre pessoas diferentes, garantindo que a sociedade se desenvolva e evolua.

Ao mesmo tempo, a diversidade genética é necessária para que exista a adaptação dos organismos ao ambiente e a evolução das espécies.

2 A edição genética ainda é um processo muito caro, que demanda altos custos e, portanto, não é acessível para toda a população. Assim, as pessoas que não pudessem pagar por ela não teriam acesso aos mesmos procedimentos que aquelas que conseguiriam pagar, gerando desigualdade na sociedade. E a desigualdade social nunca é algo bom, ainda mais quando atrelada a diferenças físicas, não é verdade?!

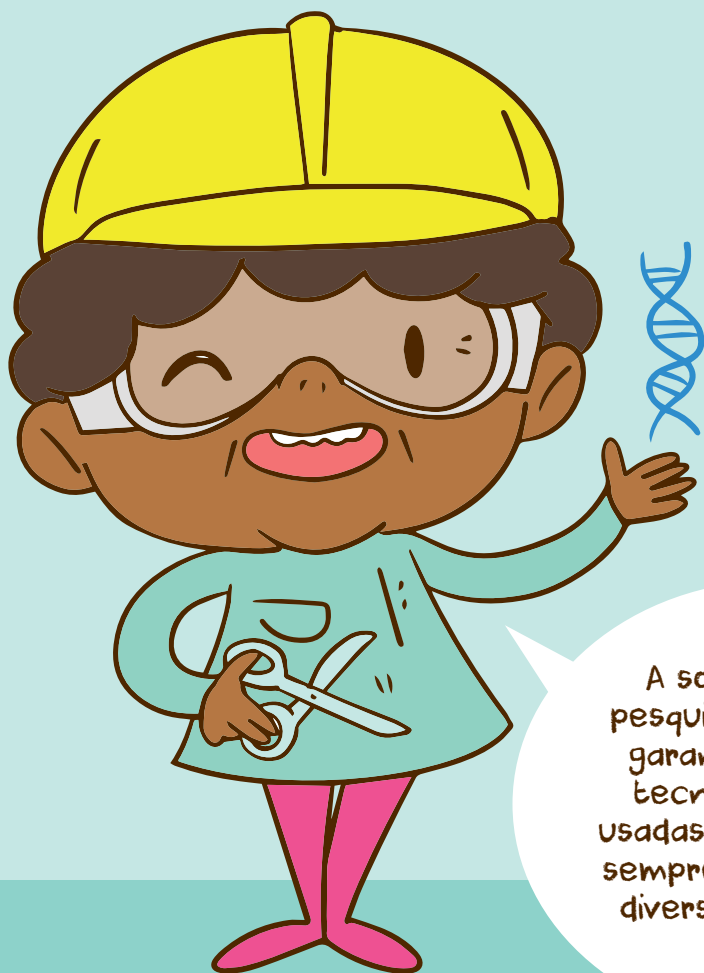


3 A edição de uma parte específica do DNA pode impactar outros processos genéticos e moleculares que até então não são conhecidos, causando prejuízos ao organismo e à sua saúde.



Este aqui é um exemplo de mudança de cor de olhos, mas não se esqueça que a edição genética por CRISPR é muito ampla e pode resultar em muitas outras alterações de características humanas (ou até mesmo não humanas, como de animais e plantas)!

Neste gibi, vimos a importância da engenharia genética em nosso cotidiano e nas pesquisas científicas. Também vimos como a edição genética pode impactar a vida das pessoas no futuro, principalmente pelas suas aplicações na área da saúde.



A sociedade e os pesquisadores devem garantir que novas tecnologias sejam usadas de forma ética, sempre respeitando a diversidade humana!

OBRIGADA!

MATERIAL DE ESCLARECIMENTO
SOBRE ENGENHARIA GENÉTICA.

PARA O PAÍS SE DESENVOLVER,
É NECESSÁRIA A FORMAÇÃO SÓLIDA
DAS CRIANÇAS E JOVENS, FUTUROS
PROFISSIONAIS DESTA NAÇÃO.



AFIP

Associação
Fundo
de Incentivo
à Pesquisa