



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Matheus Machado Rodrigues de Holanda

Clonagem terapêutica e CRISPR-Cas9: técnicas e aplicabilidade.

Rio de Janeiro

2022

Matheus Machado Rodrigues de Holanda

Clonagem terapêutica e CRISPR-Cas9: técnicas e aplicabilidade.

**Monografia apresentado à Escola Politécnica de
Saúde Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo
Cruz (EPSJV-Fiocruz) como requisito parcial
para aprovação no Curso Técnico em
Biotecnologia**

Orientador(a): Tainah Silva Galdino De Paula

Coorientador(a): Dário Eluan Kalume

Rio de Janeiro

2022

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, e me dar forças para seguir alegre e confiante.

A Virgem Maria, pela sua intercessão e amor.

A minha família, por sua paciência, apoio, fidelidade e incentivo. Sobretudo a minha mãe Magali Machado Rodrigues de Holanda, ao meu pai Valterfrêdo Alves de Holanda, a minha irmã Maria Clara Machado de Holanda, e ao meu irmão Lucas Machado Rodrigues de Holanda, que me serviram de motivação.

Aos meus orientadores Tainah Silva Galdino de Paula e Dário Eluan Kalume pela grande paciência, pela orientação, disponibilidade e valiosas instruções.

A todos os professores que me ensinaram importantes ensinamentos.

A Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, pela oferta de estudo e possibilidade de escrita científica.

Ao corpo docente da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, pelos ensinamentos na minha formação.

A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), pela oportunidade de participar do meio científico.

*“Trabalhe com o que você ama e
nunca mais precisará trabalhar na vida.”*

Confúcio

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Experimento de Briggs e Kings -----	12
FIGURA 2 - Experimento da ovelha Dolly -----	13
FIGURA 3 - Clonagem para obtenção de tecido -----	14
FIGURA 4 - Esquema representativo da Clonagem reprodutiva -----	15
FIGURA 5 - Esquema representativo da Clonagem terapêutica -----	16
FIGURA 6 - Esquema representativo sobre o experimento de Doudna e Charpentier -----	20
FIGURA 7 - Esquema representativo sobre o funcionamento do sistema CRISPR -----	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
2. JUSTIFICATIVA	09
3. OBJETIVOS	10
3.1. OBJETIVO GERAL	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. METODOLOGIA	13
4. A CLONAGEM	11
4.1. HISTÓRICO E DESENVOLVIMENTO DA CLONAGEM.	11
4.2. USO DA CLONAGEM TERAPÊUTICA.	14
4.3. CLONAGEM UTILIZANDO CÉLULAS TRONCOS DE INDIVÍDUOS ADULTOS.	17
4.4. CLONAGEM COM CÉLULAS-TRONCOS EMBRIONÁRIAS.	18
5. O SISTEMA CRISPR-CAS9	19
5.1. A DESCOBERTA DO SISTEMA CRISPR	19
5.2. O FUNCIONAMENTO DO SISTEMA CRISPR-CAS9	21
5.3. APLICAÇÕES DO SISTEMA CRISPR.	22
6. QUESTÕES ÉTICAS	23
7. CONCLUSÃO	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RESUMO

O desenvolvimento científico e o avanço nos estudos de edição genética propiciaram novas abordagens para a Clonagem terapêutica (CT) e CRISPR-Cas9. A Clonagem é um processo natural cuja característica principal é a reprodução preservando mutuamente as características entre os clones. O sistema CRISPR é um sistema de defesa adaptativo das bactérias contra bacteriófagos invasores, através da enzima nuclease Cas9. A aplicabilidade potencial destas técnicas intersecta diversas áreas médicas tais como oncológicas, cardiológica. Apesar de promissora, deve-se ter um cuidado quanto a parte ética devido aos riscos e, portanto, da necessidade de aprimoramento das técnicas e manejo de embriões. Este estudo visou a compreensão e o esclarecimento acerca do funcionamento dessas metodologias e suas possíveis aplicações, através de revisão de literatura e busca em *sites* de pesquisas acadêmicos.

Palavras chaves: Clonagem Terapêutica, CRISPR-Cas9, Terapia gênica.

1. INTRODUÇÃO

A molécula de DNA, ácido desoxirribonucleico, é responsável por carregar e armazenar informações das espécies traduzidas em proteínas, responsável pelo fenótipo de uma célula ou de uma espécie (DE ANDRADE, 2009)

James Watson e Francis Crick postularam sobre a estrutura molecular do DNA após observarem os resultados dos ensaios sobre difração de raios-x da molécula realizados por Rosalind Franklin. Desde então, o avanço nos estudos sobre o funcionamento dos genes e sua importância na expressão gênica, tem promovido aumento das expectativas no que tange a pesquisa genética. A possibilidade de se editar o genoma humano é almejado na medicina desde o conhecimento do DNA como unidade básica da hereditariedade (Gonçalves GA, Paiva RM, 2017).

Grande parte das pesquisas no âmbito genético buscam alcançar terapias que curam algumas manifestações clínicas, principalmente as que não apresentam tratamentos adequados como doenças de origem genética. Tais terapias, denotadas de terapia gênica, estão relacionadas com modificações pontuais no genoma a fim de promover uma correção em genes alterados ou “defeituosos”. Cada vez mais, esse tipo de terapia é difundido em laboratórios de pesquisa (Gonçalves GA, Paiva RM, 2017).

O avanço da terapia gênica possibilitou a ampliação do tratamento de patologias ligadas desde as desordens genéticas (alguns tipos de câncer) até as virais (HIV). Dentro desse cenário, uma das técnicas que se mostrou bastante promissora foi a utilização de DNA recombinante através da inserção do gene de interesse em um vetor. (MISRA, 2013).

De acordo com os estudos de Bernal et al (2013), a implementação de métodos relacionados com a engenharia genética que possibilitam a transferência artificial de genes de modo controlado e programado, originando novos componentes tais como novas células de procariontes, eucariontes e biomoléculas poderão ser utilizadas no processo de cura de várias classes de doenças (BERNAL et al., 2013).

A inserção da tecnologia do DNA recombinante, cuja metodologia consiste na transferência de um gene de interesse de um organismo para outro gerando fragmentos de DNA de duas ou mais fontes, geralmente de espécies diferentes, modificou as bases da experimentação em regiões do genoma, pois permitiu clonar, sintetizar e elaborar novos genes com potencial de alterar a expressão gênica. A introdução desses genes “exógenos” nas células através de uso de vetores pode ser

classificada em virais e não-virais, cuja função é levar o gene terapêutico até a célula-alvo (Buldu et al., 2007).

Os vetores são transferidos para o alvo de modo *in vivo*, onde vetor é introduzido diretamente nas células-alvo, sem que sejam retiradas do corpo; ou, no tipo *ex vivo* onde as células são retiradas do paciente e são inseridas nos vetores carreadores do gene terapêutico e, em seguida, reintroduzindo as células modificadas no corpo do (a) paciente (AZEVEDO, 2009).

Baseada nessa ideia, desenvolveu-se a técnica da clonagem, que permitiu realizar a edição de genes. O conceito de clonagem envolve o elemento clone. Mais especificamente, os clones contêm conjuntos idênticos de material genético em cada célula, ou seja, células de dois clones têm o mesmo DNA e os mesmos genes em seus núcleos. Detalhes do mecanismo de clonagem, seu uso (terapêutica e reprodutiva) são discutidos no Capítulo 1.

Outra estratégia de potencial terapêutico envolve a técnica de CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) e CRISPR-associados (Cas). Na verdade, este sistema se baseia na maquinaria de imunidade de bactérias contra bacteriófagos, e foi adaptado para aplicações em células das mais diversas espécies, como será detalhado no Capítulo 2.

Enfim, a aplicação dessas técnicas de edição gênica em terapias ou na pesquisa básica, sempre são carregadas de polêmicas e discussões. E isso implica em questões éticas e bioéticas, as quais são discutidas no Capítulo 3

2. JUSTIFICATIVA

A curiosidade científica pessoal de entender melhor as técnicas mencionadas anteriormente, atreladas à possibilidade de ampliar os conhecimentos na área de biotecnologia contribuíram para a abordagem da revisão da literatura sobre clonagem terapêutica destacando seu potencial de uso na medicina, como no tratamento de síndromes genéticas e na produção de fármacos.

De acordo com o estudo de Tonelli (2016), o uso da edição gênica já é utilizado em diversos laboratórios ao redor do mundo, sendo responsáveis por avanços significativos que trazem esperança no avanço na medicação, ou qualidade de vida ou mesmo em relação a sobrevivência de pacientes.

A capacidade de modificação do genoma humano em *locus* gênicos específicos tem sido a meta da medicina moderna pois a terapia genética faz parte de um grupo de estudos capaz de desenvolver um tratamento específico para patologias extremamente complexas e sem cura (Tebas

et al. (2014). Dessa forma, a ampliação dos conhecimentos sobre novas terapias com grande potencial terapêutico se faz necessário para maior compreensão e divulgação.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Compreender o processo de desenvolvimento das técnicas de clonagem terapêutica e CRISPR-Cas9, seu funcionamento, suas aplicações terapêuticas e sua implicação ética.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Descrever o desenvolvimento das técnicas de clonagem e CRISPR
- 2) Compreender o funcionamento do sistema CRISPR-Cas9 e sua possível aplicabilidade.
- 3) Descrever a clonagem terapêutica, suas aplicações e seu potencial uso na saúde humana.
- 4) Apresentar o debate ético em torno destas técnicas.

4. METODOLOGIA

Abordaremos uma revisão da literatura especializada e científica sobre a clonagem terapêutica e o sistema CRISPR-Cas9, cuja pesquisa usará ferramentas de busca de periódicos e livros em banco de dados Scielo, Google acadêmico e PubMed. Na monografia será destacada a análise dos vários potenciais de uso desta técnica na medicina e na pesquisa básica. A princípio, o estudo escrito constará de três capítulos e das conclusões.

CAPÍTULO 1: A CLONAGEM.

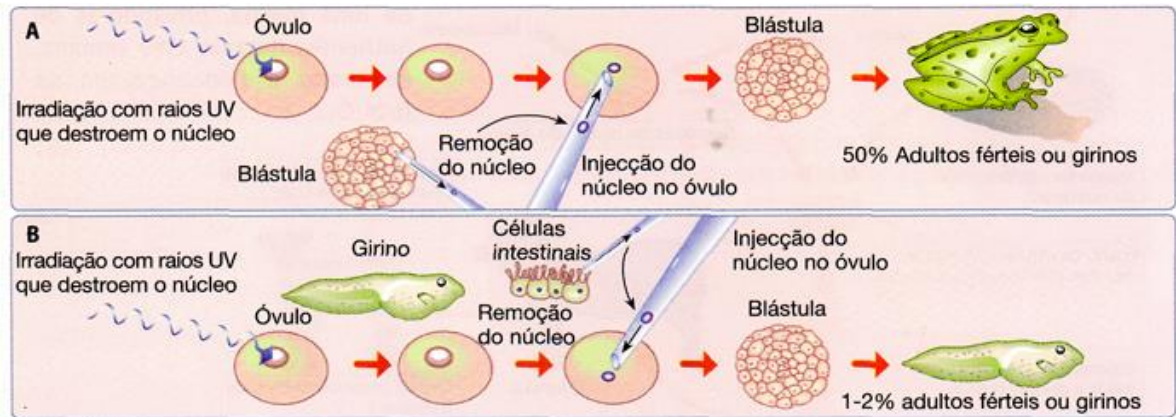
A clonagem é um mecanismo de proliferação natural que ocorre em alguns organismos tais como plantas ou bactéria (Zatz, 2004). Segundo Webber (1903), um clone é definido como um conjunto de moléculas, células ou organismos oriundos de uma única célula com identidade à célula original e entre elas. Na espécie humana, os clones naturais são os gêmeos idênticos (univitelinos) originados da divisão de um mesmo óvulo fertilizado (Zatz, 2004).

1.1 HISTÓRICO E DESENVOLVIMENTO DA CLONAGEM

O americano Hans Spemann teve grande importância no entendimento sobre o desenvolvimento embrionário (Spemann, 1902). Spemann comprovou que embriões de vertebrados também podem ser “geminados” para conseguir múltiplos organismos idênticos, mas haveria diferença em certo momento do desenvolvimento. Tal experimento usou um fio de cabelo de um bebê fazendo um pequeno laço, o qual foi pressionado entre os zigotos de salamandras, até que se separassem, obtendo, assim, dois zigotos que se desenvolveram e chegaram a fase adulta. Em 1928, Spemann conseguiu mostrar a capacidade do núcleo celular de controlar o desenvolvimento embrionário. Estes trabalhos com embriões conferiram a Spemann o Prêmio Nobel em 1935.

No ano de 1952, realizou-se a primeira transferência nuclear bem-sucedida do núcleo de um embrião de girino para um ovo anucleado de um sapo, desenvolvendo-se até gerar um girino. Entretanto, todos morreram antes de amadurecer e se tornarem rãs. Esse experimento, liderado por Robert Briggs e Thomas Kings mostrou que a transferência nuclear era possível, e que o núcleo guia o crescimento celular sendo as células embrionárias melhores para clonagem do que células posteriores (Briggs e Kings, 1952). (Figura 1).

Figura 1 (<http://cienciasdavidaeterra25.blogspot.com/2011/10/experiencias-de-robertbriggs-e-thomas.html>)



6 Dispositivo experimental para demonstrar a influência do grau de especialização na reversão da diferenciação.

Figura 1: Legenda: Ilustração mostrando o processo de retirada de núcleo do óvulo e inserção de núcleo de outra célula e seu processo de desenvolvimento, esclarecendo o experimento de Briggs e Kings. A: Há a remoção do núcleo do óvulo através de irradiação com raios ultravioleta (UV) e a separação do núcleo de uma célula na fase de blastócito logo após a inserção no óvulo enucleado, gerando 50% de girinos ou adultos férteis. B: Seguindo os mesmos passos do esquema A, entretanto o núcleo utilizado era de células intestinais – células já diferenciadas – resultando em 1 a 2% de adultos férteis ou girinos.

Em 1958, o biólogo inglês John Gurdon, baseando-se nos experimentos de Briggs e Kings (LEE, 2017), conseguiu evidenciar a transferência nuclear de uma célula diferenciada através da implantação do núcleo de uma célula do intestino de girino em um ovo de sapo sem núcleo, criando clones do girino. Assim, provou que era possível usar o núcleo de células somáticas de animais totalmente desenvolvidos. Entretanto, surgiu uma dúvida se tais células intestinais seriam realmente “adultas”, pois, apesar de ser de um tecido totalmente formado ela poderia ser imatura com estrutura semelhante ao de um embrião.

Na década de 60, houve um domínio das técnicas de fertilização *in vitro*. No ano de 1962 nasceu nos Estados Unidos o primeiro bezerro de proveta, e no ano de 1969 começaram os experimentos de fecundação de óvulos humanos, culminando, em 1978, no nascimento do primeiro bebê de proveta humano. No ano de 1975, Derek Bromhall conseguiu o primeiro embrião de mamífero criado por transferência nuclear, a partir de células de ovo de coelho. E em 1984, surgiu o primeiro mamífero criado pela transferência nuclear. Willadsen, através de eletroporação, fundiu o núcleo nas células de óvulos enucleadas de um cordeiro. Dias depois da implantação dos embriões no útero de ovelhas-mãe, nasceram 3 cordeiros vivos, comprovando, então, que era

possível clonar um mamífero por transferência nuclear. Vale ressaltar que estes núcleos doadores vieram de células embrionárias precoces (Centro de Aprendizagem de Ciência Genética, 2014).

E em 1996, foi realizado o conhecido experimento da ovelha Dolly, onde foi clonado com sucesso o primeiro mamífero (a ovelha Dolly) através da transferência nuclear de células somáticas (Figura 2).

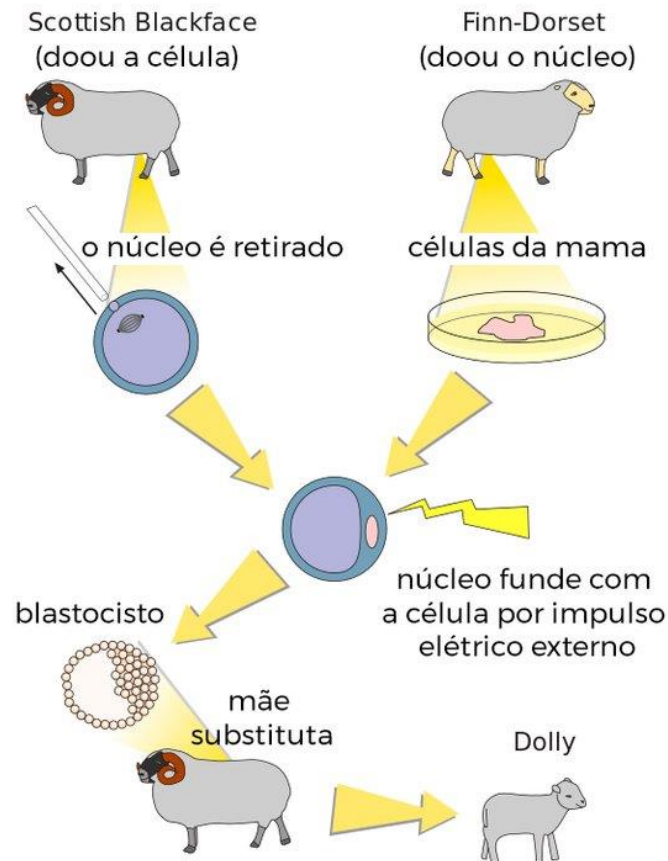


Figura 2: Experimento da ovelha Dolly. Removeu-se o núcleo de um óvulo “doador” e ocorreu a inserção do núcleo da célula mamária através de impulso elétrico neste óvulo. Este foi inserido no útero de uma outra ovelha que gerou a ovelha Dolly- que carrega as características da ovelha que doou o núcleo-.

(<https://observador.pt/especiais/ian-wilmot-o-pai-da-ovelha-dolly-a-clonagem-nao-funciona-bem-em-humanos/>)

Mitalipoy (2013) e colaboradores geraram células troncos embrionárias através da transferência nuclear, assim, superando diversos desafios técnicos. Obteve-se células-tronco específicas para o paciente de onde vieram, e abrindo porta para uma utilização terapêutica destas células clonadas e altamente específica (Centro de Aprendizagem de Ciência Genética, 2014).

No desenvolvimento da clonagem, duas técnicas destacaram-se: a clonagem reprodutiva e terapêutica, a clonagem reprodutiva é uma técnica focada na obtenção de um outro ser que carrega as informações genéticas da célula somática (todas as células eucarióticas exceto células germinativas) que tem seu núcleo extraído e inserido num óvulo, o qual se desenvolve e cresce até a formação total do indivíduo, enquanto a clonagem terapêutica consiste na inclusão de um núcleo de uma célula somática em um óvulo, chegando na fase de blastocisto (fase com cerca de 100 células, chega-se com aproximadamente 72 horas após a fecundação) para a obtenção de células totipotentes (Figura 3), conferindo as células pluripotentes, obtendo-se tecidos ou organismo com as mesmas características da célula original, sendo essa a mais promissora. (Zatz, 2004).

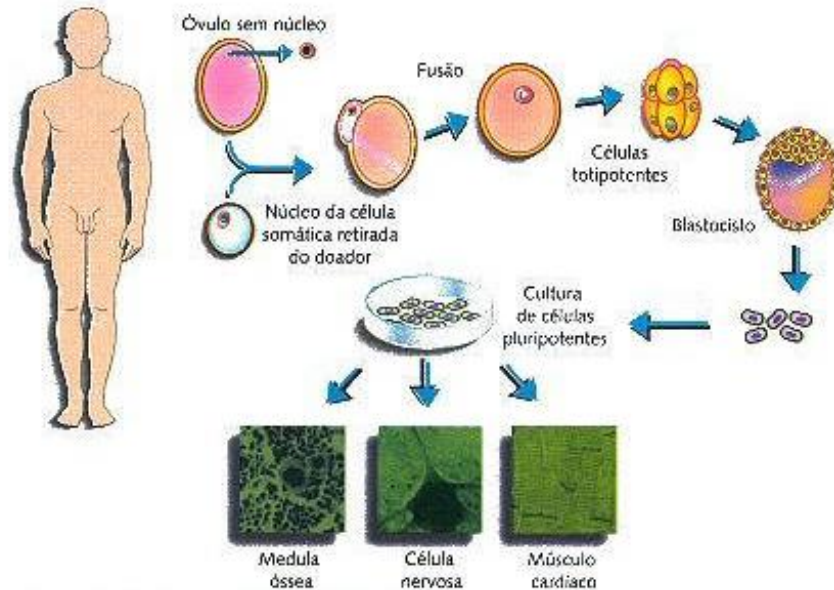


Figura 3: Ilustração de Sirio J. B. Cançado modificada para o suplemento especial clonagem da pesquisa fapesp nº 73, de março de 2002. Implantação do núcleo do doador num óvulo anucleado e induzida em laboratório cultura de células pluripotentes, resultando diversos tecidos diferenciados, através de estímulos específicos.

USO DA CLONAGEM TERAPÊUTICA.

Desde o sucesso do experimento da ovelha Dolly (Campbell et al, 1996), a clonagem ganhou espaço na discussão e na produção de fármacos modernos (Jann et al, 2001) e, impactou rapidamente os avanços dos estudos de células troncos (WEINTRAUB, 2016). Os estudos com a ovelha Dolly propiciaram o imaginário da clonagem humana, pois pela primeira vez era possível

clonar um mamífero, ou seja, uma cópia geneticamente idêntica a partir de uma célula somática diferenciada (Zatz, 2004).

A pluralidade de técnicas fez com que houvesse uma segmentação da clonagem sendo principalmente classificada em reprodutiva e terapêutica, tendo como diferença a metodologia utilizada. A clonagem reprodutiva, a que mais aflora o imaginário popular, tem por objetivo a cópia de um indivíduo existente. Baseia-se na inclusão de um núcleo de uma célula somática em um óvulo, através da técnica denominada Transferência Nuclear de Célula Somática (ou da sigla em inglês SCNT, *Somatic Cell Nuclear Transfer*), que extrai o núcleo de um óvulo e o substitui por outro núcleo originado de uma célula somática. Em seguida, o embrião é inserido em um útero de outro indivíduo da mesma espécie, havendo diferenciação das células (Freitas e colaboradores, 2007) (Figura 4). Após o período de gestação surge um indivíduo com patrimônio genético idêntico ao do doador da célula somática (NALINI, 2001)

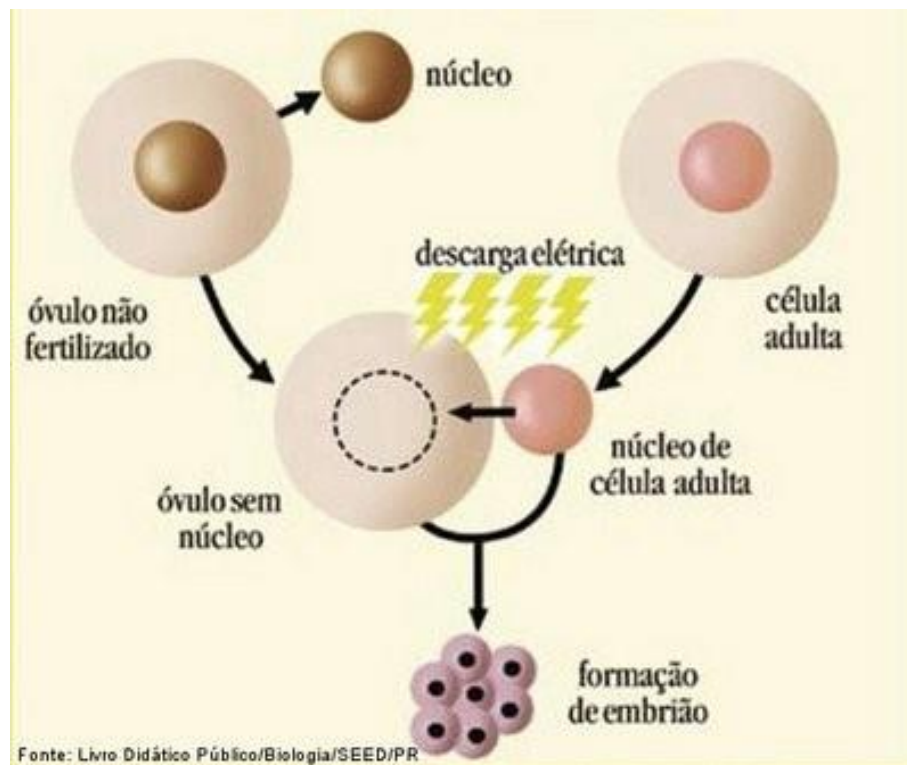


Figura 4 – Esquema representativo da Clonagem reprodutiva. O núcleo de um óvulo é removido, e é implementado o núcleo de uma célula adulta no óvulo anucleado através de descarga elétrica, assim formando-se o embrião. (Fonte:

Livro Didático Público / Biologia / SEED / PR)

Contraposto do pensamento popular, a clonagem reprodutiva de um humano é improvável, beirando a impossibilidade atualmente, tanto por ser proibido no Brasil, devido a um documento de 2003 assinado juntamente com outros 63 países que pediam o banimento de tal técnica em humanos, quanto por questões éticas (Williams, 2011). Além disso, os resultados apresentados estão muito aquém do esperado; o próprio experimento de Ian Wilmut teve seus problemas apresentando um alto custo, logrando êxito após 276 tentativas. Dentre os principais entraves da clonagem reprodutiva destaca-se a alta taxa de morte dos clones antes da gestação e quando sobrevivem apresentam anomalias e falhas genéticas (Zatz, 2004). De acordo com Zatz (2004, p. 24) “...Seria a mesma coisa que discutir os prós e os contras em relação à liberação de uma medicação nova, cujos efeitos são devastadores e ainda totalmente incontroláveis...”

Na clonagem terapêutica, almeja-se a obtenção de células totipotentes. As etapas iniciais são as mesmas da clonagem reprodutiva diferindo apenas na não implantação do zigoto no útero, que deverão ser manipulados em laboratório para a produção de células-tronco totipotentes (capazes de diferenciar em qualquer célula) com o intuito de produzirem tecidos ou órgãos, com as mesmas características da célula original, para transplante como ilustrado na figura 5 (FAGOT-LARGEAULT, 2003).

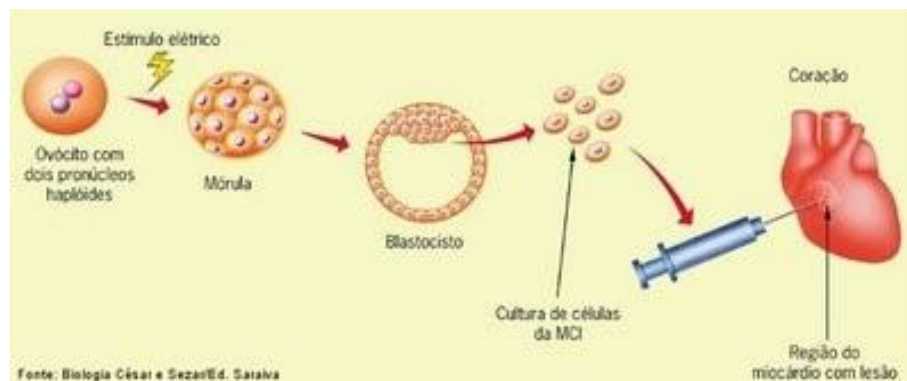


Figura 5 – O núcleo é isolado de uma célula adulta do doador e introduzida em um óvulo enucleado (sem núcleo). Em seguida, após algumas divisões, as células tronco são estimuladas laboratorialmente para a produção de tecidos e órgãos para os doadores, minimizando a chance de rejeição (Fonte: Cesa e Cezar – editora Saraiva).

Faz-se necessário esclarecer que no processo de clonagem terapêutica não há o desenvolvimento completo de um ser para a obtenção de tecidos e células, mas, a proliferação natural do óvulo até a fase de blastócitos (fase com cerca de 100 células) que está pluripotente, assim, com grande diferenciação celular. Uma das grandes vantagens desta técnica é a baixa

rejeição por parte do paciente, caso o doador seja o próprio, porém, é mister evidenciar que em caso deste ser portador de doença genética, a célula preservaria tais características.

A utilização da clonagem varia de acordo com a necessidade terapêutica. De certo, uma das principais aplicações é a clonagem com células-tronco adulto

CLONAGEM UTILIZANDO CÉLULAS-TRONCOS DE INDIVÍDUOS ADULTOS.

As células-tronco (CT) apresentam grande capacidade de proliferação e auto renovação além de ter capacidade de responder a estímulos externos dando origem a diferentes linhagens de células especializadas, e, portanto, apresentando-se como potencial fonte ilimitada de tecidos para transplante. Em tese, pode ser reproduzida e especializada em laboratório e quando transplantada regeneraria órgãos e tecidos doentes. Apesar de ser encontrada em diversos tecidos, a fonte mais conhecida de CT são as presentes na medula óssea - as CTs hematopoiéticas - que podem originar diversos tipos de células do sangue como linfócitos, hemácias e plaquetas. As CTs são utilizadas em diversos tratamentos desde a década de 1950, principalmente em doenças que afetam o sistema hematopoiético (PEREIRA, 2008).

Uma das doenças que apresentam alta taxa de mortalidade são doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio, e quando o paciente sobrevive carrega graves sequelas. Outra doença que afeta o coração é a doença de Chagas que, atualmente, não apresenta muitas alternativas de tratamento. Entretanto, a utilização de células-troncos em pacientes chagásicos é pesquisada. O procedimento é feito com a retirada de CT adultas da medula óssea do próprio paciente e sua reintrodução. Foi observado a diminuição dos danos causados ao miocárdio, nesse sentido exorta uma possibilidade de aplicação em outras patologias cardiológicas (SOARES, 2008).

CLONAGEM COM CÉLULAS-TRONCOS EMBRIONÁRIAS.

As células-tronco embrionárias estão presentes nos primeiros momentos de um embrião – cerca de cinco a quatro dias de fecundação, e são extraídas dos blastocistos. O fator que ressalta o interesse nelas é sua capacidade de dar origem a uma grande variedade de células e tecidos tal como células neurológicas, sanguíneas, musculares (RIBEIRO et al. 2019).

A aplicação de CT adultas para tratamento da doença de Parkinson é vista como promissora, a partir da reprogramação de CT adultas, consegue-se células-tronco pluripotentes induzidas (iPS),

que apresentam características de CT embrionária e, assim, apresentam grande capacidade de diferenciação em praticamente todos os tecidos do corpo (ALVES et al. 2019).

Cientistas japoneses notaram que as células iPS geradas a partir de células da pele e do sangue eram capazes de se transformar em células neurais e tinham a possibilidade de produzir dopamina. Estas células foram transplantadas em macacos “induzidos” com Doença de Parkinson. O resultado foi a melhora nos movimentos espontâneos dos macacos logo após o transplante das células. Tanto células de pacientes saudáveis quanto de pacientes acometidos pela doença foram capazes de melhorar os movimentos, e não geraram tumores até 2 anos após a inserção (RIBEIRO, 2017).

Há um certo receio constante com as terapias envolvendo CT pois teme-se que surja tumores, câncer, nos locais onde foram inoculadas as células. É importante ressaltar que estes experimentos são para se consolidar uma terapia, e não há uma terapia já preparada e amplamente utilizada na clínica médica. Por ser tratamento experimental que ainda não foi estabelecido na clínica médica corre-se o risco de haver efeitos colaterais incluindo a morte, até que se chegue a um procedimento que leve a cura do paciente (ALVES et al. 2019). Desta forma, o experimento com os macacos gerou uma grande expectativa devido ao seu potencial de aplicação como uma terapia celular para a Doença de Parkinson. Espera-se, portanto, que os resultados dos testes clínicos em pacientes, ao se usar a técnica de reprogramação em células iPS, se mantenham tão promissores quanto aos que foram observados nos modelos animais (ALVES et al. 2019) (RIBEIRO, 2017).

Enfim, a clonagem terapêutica, quando combinada com técnicas de edição gênicas, busca avanços para o desenvolvimento genético. Nesse sentido, é fundamental entender as origens das técnicas, seu funcionamento e seu potencial uso, para o desenvolvimento de novas tecnologias mais eficazes. Ambas as técnicas se destacam devido à grande possibilidade de aplicações em áreas tais quais a oncologia, cardiologia e na genética médica, que por exemplo, recentemente, obteve-se sucesso na correção da mutação no gene da subunidade β da hemoglobina (HBB) o qual origina a anemia falciforme, e, portanto, se “corrigindo” a sua expressão (HAYDAR et al, 2021) (Gonçalves GA, Paiva RM, 2017).

CAPÍTULO 2: A DESCOBERTA DO SISTEMA CRISPR

Em 1987, Ishino, enquanto estudava as cepas da bactéria *E. coli* descreveu estruturas curiosas que tinham sequências quase perfeitas palindrômicas, identificando, então algumas matrizes CRISPR em aproximadamente 40% das bactérias e 90% de *Archea*.

No ano de 1989, Francisco Mojica iniciou seus estudos de doutorado no mesmo ano na Universidade de Alicante na Espanha. Nos seus estudos, Mojica isolou cepas de *Archea* tolerantes a salinidade do local e observou que a concentração salina estava afetando a ação das enzimas de restrição destas bactérias. Ele isolou fragmentos de DNA das bactérias, e encontrou uma estrutura que continha múltiplas cópias de uma sequência palindrômica, agrupando 30 bases que não tinha sequência genômica relacionada a qualquer família de microrganismos conhecidos à época. Em artigo publicado em 1993, Mojica foi o primeiro pesquisador a caracterizar o que hoje é chamado de CRISPR. Assim, Mojica dedicou-se a este sistema durante toda a década de 1990, e em 2000, observou que as sequências dispare de repetição era de um conjunto comum reconhecidas por serem marcas da sequência CRISPR. No ano de 2005, Mojica denotou que as sequências CRISPR continham parte dos genomas de bacteriófagos invasores, e levantou-se a hipótese de que isso seria parte do sistema imunitário adaptativo das bactérias (MATAVEIA, 2020).

Até o fim da primeira década do século 21, as funções do sistema CRISPR foram tornando-se mais evidentes. Diversas pesquisas começaram a desvendar o sistema CRISPR natural buscando várias aplicações biotecnológicas, entre elas a geração de culturas lácteas resistentes aos bacteriófagos. Uma das descobertas fundamentais do sistema CRISPR foi a família de enzima Cas, que poderiam estar envolvidas na reparação do DNA. Apesar de serem descobertas diversas enzimas Cas, para a edição gênica, a proteína Cas9 é a mais evidenciada (MATAVEIA, 2020)

Em 2013, as pesquisadoras Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier mostraram em seus experimentos que o sistema CRISPR-Cas9 poderia cortar o DNA isolado em pontos específicos (Figura 6), abrindo portas para a utilização em células eucarióticas.

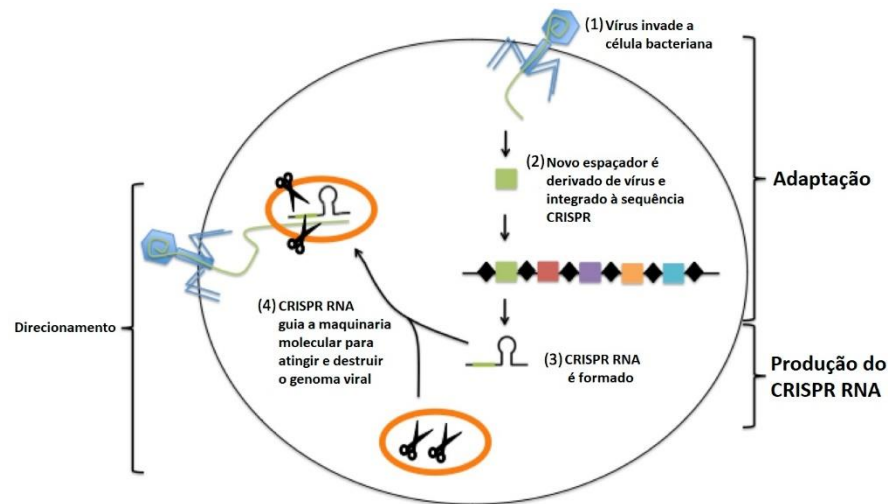


Figura 6: A partir da inserção do DNA invasor há a adaptação deste e a geração de um novo espaçador e a implementação na sequência CRISPR. É, então, gerado o CRISPR RNA sinalizando o sítio de clivagem pela ação da nuclease Cas9. (Adaptado de <https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2014/crispr-a-game-changing-genetic-engineering-technique/>).

O sistema CRISPR é uma potente ferramenta para edição genômica, pois reconhece o material genético invasor, o fragmenta em pequenos pedaços e, posteriormente o integra em seu próprio DNA (MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010). Quando ocorre uma segunda infecção, esse material incorporado ao DNA, promoverá a transcrição do *locus* CRISPR, que deverá processar um RNA mensageiro (RNAm), criando fragmentos de CRISPR RNA (RNACr) que se unirão às proteínas Cas formando um complexo capaz de reconhecer RNA estranho e o destruí-lo. Dessa forma, essa ferramenta de edição gênica permite a correção e modificações específicas em genes alterados e promotores de doenças ainda sem cura (TEBAS et al., 2014).

Assim, o sistema CRIPR-Cas9 apresenta-se como uma grande ferramenta que potencializa a terapia gênica apresentando uma vasta aplicabilidade. Apesar de promissora, sua aplicação terapêutica ainda está restrita a testes laboratoriais. A alta expectativa pelos tratamentos através da CRISPR se reflete no número de publicações e pesquisas que, de acordo com relatório publicado pela revista *Nature*, superou todas as outras técnicas de edição gênica com mais de 700 estudos no início de 2014. Nesse sentido, uma possível mudança em alocação de finanças e pedidos de patente aparenta uma mudança significativa, com o surgimento de empresas com foco para esta técnica.

O FUNCIONAMENTO DO SISTEMA CRISPR-CAS9

O sistema de defesa das bactérias e arqueobactérias apresenta um mecanismo chamado CRISPR, que as protege de invasores como bacteriófagos e plasmídeos de DNA. Assim, surge a memória imunológica após a segmentação em curtos fragmentos do DNA invasor que é integrado ao CRISPR locus, chamado de protoespaçador; após este processo há a construção de uma cadeia pre-crRNA (cadeia precursora de RNA não-codificante). Essas cadeias em repetição se hibridam em conjunto com o “*transactivating CRISPR RNA*” (tracrRNA), que é um RNA não codificante, assim, formando uma cadeia dupla de RNA que será fragmentada e processada pela RNase (*host factor ribonuclease*). O tracrRNA junto com o crRNA forma um conjugado que se liga à nuclease Cas9, gerando um agrupado em um complexo que é responsável por detectar e eliminar o DNA invasor (Figura 7) (BARBOZA et al, 2020).

Este complexo é próprio para uma sequência alvo e tem o crRNA como espaçador, juntando-se a ela por complementaridade e traz consigo a Cas9. A nuclease Cas9 apresenta um sítio de reconhecimento (REC) que reconhece o complexo crRNA-tracrRNA. Ademais, há também o sítio de reconhecimento da sequência *Proto-spacer adjacent motive* (PAM), e o sítio NUC, que tem ação de nuclease, e apresenta 2 regiões diferentes com atividade de nuclease: a HNH, que fragmenta a cadeia complementar, e a RuvC, que fragmenta a cadeia não complementar, assim, gera incisuras na cadeia dupla de DNA. É importante destacar que esse evento só acontece se a sequência alvo estiver próximo a uma região PAM. (BARBOZA et al, 2020).

No ano de 2012, Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna desenvolveram uma adaptação do CRISPR, o sistema CRISPR-Cas9 tipo II. Nesta adaptação, após formação do complexo formado pelo tracrRNA com a crRNA, gerou-se o *single guide RNA* (sgRNA), que direcionaria a Cas9 a sítios específicos do genoma por meio de pareamento de bases. Portanto, viabilizou a edição de sequência de DNA alvo-específico do genoma do organismo, e graças a ação de somente 3 moléculas: o DNA alvo do organismo, o RNA guia - que guia o complexo até o alvo, e a Cas9 (a nuclease). Dessa forma, o uso do sistema CRISPR-Cas9 apresenta maior simplicidade técnica comparada as outras, que atua por meio da deleção, substituição ou inclusão de genes (Gonçalves GA, Paiva RM, 2017) (BARBOZA et al, 2020).

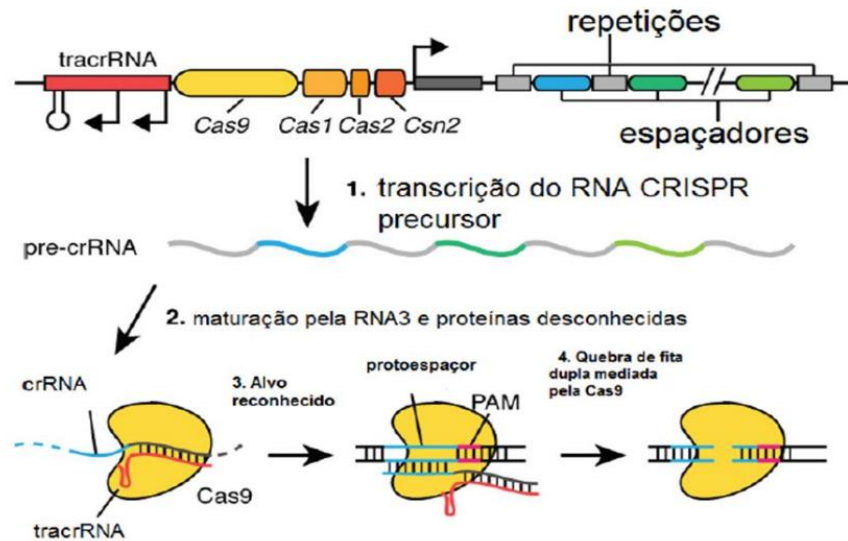


Figura 7: Esquema representativo sobre o funcionamento do sistema CRISPR, juntamente com a ação da Cas9. (BARBOZA et al, 2020).

APLICAÇÕES DO SISTEMA CRISPR.

O sistema CRISPR apresenta diversa aplicabilidade desde a agricultura à saúde humana. A esperança na saúde humana está em algumas doenças específicas e que são de maior interesse como na área oncológica (BARBOZA et al, 2020).

O câncer apresenta terapias limitadas, necessitando de alternativas de tratamento que sejam mais efetivas e menos danosas. Esta doença apresenta diversas alterações genéticas e epigenéticas resultando na ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores tumorais. Assim, o uso do potencial de manipulação de quase todas as sequências é promissor, podendo fazer a correção dos genes cancerígenos. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram o grande potencial, utilizando a edição de proto-oncogenes ou a supressão dos genes do tumor, podendo ser aplicada até na avaliação aos medicamentos quimioterápicos, ajudando a eliminar ou reduzir a resistência aos medicamentos (BARBOZA et al, 2020).

CAPÍTULO 3: QUESTÕES ÉTICAS

O simples fato de se imaginar a clonagem ou a edição de gene já implica em questões éticas e, de certo, a aplicação prática não se isenta de importante discussão. A divergência de opiniões faz-se presente na variação da técnica. Apesar de na bioética a clonagem terapêutica ser mais aceita em comparação com a clonagem reprodutiva humana, ainda encontra opiniões contrárias, tendo como principais receios que a utilização de células embrionárias acarretaria o surgimento de comércio de óvulos e a possível destruição de um embrião humano. Logo, seria destruir uma vida para tentar salvar outra (CAMPODONIO, 2021) (DE FREITAS, 2007).

A reprodutiva, especificamente a humana, encontra grande objeção, sendo vista como antiética, uma vez que o debate se faz entorno da destruição do embrião após a retirada das células troncos impedindo o desenvolvimento embrionário, impossibilitando o surgimento de uma nova vida e destruindo os óvulos (CAMPODONIO, 2021). Havendo também com uma preocupação sociológica quanto a dependência familiar deste ser clonado, quais os vínculos que este teria e quem seria responsável por ele, seria legítimo clonar um ser sem família e sem relação com cultura externa.

Quanto a edição gênica, especificamente o CRISPR, tem o apoio da maior parte da comunidade científica no uso da terapia genética em células somáticas, em especial em casos de doenças de desordens graves. No entanto, a pesquisa realizada por grupos chineses para garantir resistência ao HIV através de mutação no gene CCR5, que expressa a proteína presente na membrana dos linfócitos T auxiliares CD4+, envolvendo a modificação de células embrionárias utilizando a técnica por CRISPR-Cas9, foi severamente criticada eticamente. Isso porque levantou um questionamento sobre até quando a ação humana pode interferir no desenvolvimento de um novo ser, e se essa interferência resultaria numa caracterização de eugenia (ATENOR, 2019). Além disso, foi evidenciado a necessidade de aprimoramento da técnica após análise genética cujo resultado mostrou que apenas 4 dos 26 embriões foram editados com sucesso (Gonçalves GA, Paiva RM, 2017).

No entanto, apesar da técnica de CRISPR ser uma ferramenta biotecnológica potencialmente robusta, em 2015 houve uma reunião internacional denominada como “Cúpula Internacional sobre Edição do Gene Humano” na qual foram discutidas questões como os cuidados a serem tomados em relação a essa metodologia para uso em seres humanos. Isso se deve ao fato

desta técnica envolver questões intimamente ligadas à ética, porque embora apresente várias vantagens, não sabemos a respeito dos prejuízos que poderão estar vinculadas no futuro (Hirsch, Levy e Chneiweiss, 2017).

Devido ao potencial de periculosidade éticos e sociais que as técnicas podem apresentar, impuseram-se limites visando a determinação de regras para estes tipos de estudos. Uma das ações foi a elaboração de documentos internacionais tal qual a Declaração Universal sobre o Genoma Humano e os Direitos Humanos (1997), a Declaração Internacional sobre os Dados Genéticos Humanos (2004), e recentemente, a Cúpula Internacional sobre Edição Genética Humana/Washington DC (2015). No Brasil, há a Constituição da República Federativa do Brasil de 1988 (CRFB) e a Lei sobre a Biossegurança nº 11.105/20055, que assegura a integridade e variabilidade da herança genética e proíbe alterações em células reprodutivas. Em países como o China e Reino Unido há a legalidade na alteração em células germinativas humanas (BARBOZA et al apud VIVANCO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2017).

7. CONCLUSÃO.

Os avanços relacionados a terapia gênica ao longo de décadas vêm se tornando cada vez mais evidentes seja pelo desenvolvimento de vetores, uso de células-tronco pluripotentes induzidas usadas em conjunto com modelos de edição genética, como o CRISPR-Cas9, e até mesmo com o uso de modelos contraditórios quanto ao caráter ético, caso das células germinativas por exemplo. Alguns êxitos viabilizaram tratamento por aplicação da terapia gênica na clínica médica como forma alternativa para pacientes com doenças congênitas ou mesmo câncer quando o tratamento clássico falhou.

A evolução das técnicas e o seu aprimoramento favoreceram o aumento da eficácia tornando os sistemas cada vez mais específicos e, por consequência, seu uso cada vez mais seguro para o uso na clínica.

No entanto, como todo avanço científico, a terapia gênica requer mais estudos para garantir um uso mais amplo e confiável, como aconteceu com a descoberta de fármacos, como os antibióticos e quimioterápicos, ao longo da história.

Portanto, evidencia-se as técnicas de clonagem terapêutica e CRISPR-Cas9 como grandes descobertas na área da Biotecnologia, mas com necessidade de melhorias na técnica, e certos cuidados com a parte ética devido a delicadeza das questões técnicas-sociais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Suelen et al. O Uso Terapêutico de Células Tronco. **Revista Saúde em Foco–Edição.**

ANTENOR, Samuel. **Experimento chinês confronta limites entre ética e ciência.** [S. l.], 11 nov. 2019. Disponível em: <https://www.ipea.gov.br/cts/pt/central-de-conteudo/artigos/artigos/55-experimento-chines-confronta-limites-entre-etica-e-ciencia>. Acesso em: 19 jan. 2022.

AZEVÊDO E, S. Terapia Gênica. *Revista Bioética*. Salvador, v.5 n.2 p.5.2009

BARBOZA, Caroline Mota Souza et al. A TÉCNICA DE CRISPR-Cas9 NA TERAPIA GÊNICA: uma revisão da literatura. **Revista Transformar**, v. 14, n. 1, p. 562-698, 2020.

BERNAL, C.P.J. et al. **Biología sintética: aplicaciones y dilemas éticos. III Congreso Internacional de la REDBIOÉTICA UNESCO para América Latina y el Caribe Bioética en un continente de exclusión: de la reflexión a la acción.** Colômbia, Nov. 2010.

BULDU, JM et al. Redes genéticas sintéticas: de lo simple a lo complejo. *Revista española de física*, v.21, n.3, p.10-16, out. 2007.

CAMPBELL, Keith HS et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 64-66, 1996.

CAMPODONIO, Isabel Moura. A clonagem humana, suas características éticas e jurídicas. 2021.

Centro de Aprendizagem de Ciência Genética. "A História da Clonagem". *Learn.Genetics*. 10 de julho de 2014. Acessado em 19 de janeiro de 2022. <https://learn.genetics.utah.edu/content/cloning/clonezone/>.

DE ANDRADE, Mariana Ap Bologna Soares; DE ANDRADE CALDEIRA, Ana Maria. O modelo de DNA e a Biologia Molecular: inserção histórica para o Ensino de Biologia. **Filosofia e História da Biologia**, v. 4, n. 1, p. 139-165, 2009.

DE FREITAS, Rodrigo Therezan et al. Aspectos científicos e sociais da clonagem reprodutiva e terapêutica. 2007.

DE OLIVEIRA JÚNIOR, Eudes Quintino. Aspectos éticos e legais da clonagem. 2011.

FRANGOUL, Haydar et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 3, p. 252-260, 2021.

GAJ, Thomas et al. Genome-editing technologies: principles and applications. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 12, p. a023754, 2016.

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel de Melo Alves. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. *Einstein (São Paulo)*, v. 15, p. 369-375, 2017.

HIRSCH F.; LÉVY Y.; CHNEIWEISS H. CRISPR-Cas9: A European position on genome editing. *Nature*. London, v. 541, n. 7635, p 30, Jan.2017.

JANN, Michael W.; SHIRLEY, Kara L.; FALEK, Arthur. The Impact of Cloning in Pharmaceutical Products and for Human Therapeutics. **Global Bioethics**, v. 14, n. 2-3, p. 47-51, 2001.

LEE, Giselle. "**A Capacidade de Desenvolvimento dos Núcleos Retirados das Células Epitéliais Intestinais de Girinos Alimentares**" (1962), por John B. Gurdon. [S. l.], 16 mar. 2017. Disponível em: <https://embryo.asu.edu/pages/developmental-capacity-nuclei-taken-intestinal-epithelium-cells-feeding-tadpoles-1962-john-b>. Acesso em: 18 jan. 2022.

LUSTOSA, André Luiz Paiva. **Potencial do uso da terapia genética no tratamento de doenças**. 2019.

MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. **CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea**. *Nature Reviews Genetics*, London, v. 11, n. 3, p. 181-190, mar. 2010.

MATAVEIA, Elly Raquelina Flor. Aplicabilidade clínica da técnica CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) no tratamento da anemia falciforme: uma revisão integrativa. 2020.

MISRA, S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *The Journal of the Association of Physicians of India, Bombay*, v. 61, n.2, p.127-133, Fev.2013.

PEREIRA, Lygia da Veiga. **A importância do uso das células tronco para a saúde pública**. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, p. 07-14, 2008.

Ribeiro, Patrícia de Carvalho. Células-tronco para o tratamento da doença de Parkinson. *Nanocell News*. Belo Horizonte, 27 de set. de 2017.

SOARES, Milena Botelho Pereira; SANTOS, Ricardo Ribeiro dos. Terapias com células de medula óssea para cardiopatia chagásica e hepatopatias crônicas: do modelo animal para o paciente. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 17-19, 2008.

TEBAS, P. et al. **Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV**. *The New England journal of medicine*, Boston, v.370, n. 10, p. 901-910, Mar.2014

Tonelli FCP, Resende RR. CRISPR: a técnica de engenharia genética que pode mudar o mundo! 2016. 3(7). DOI: [Acesso em 15 de dezembro 2021]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2016.02.26.002>

WEINTRAUB, Karen. **20 Years after Dolly the Sheep Led the Way—Where Is Cloning Now?** [S. l.], 5 jul. 2016. Disponível em: <https://www.scientificamerican.com/article/20-years-after-dolly-the-sheep-led-the-way-where-is-cloning-now/>. Acesso em: 16 set. 2021

WILLIAMS, Nigel. Top scientists back human cloning ban. **Current Biology**, v. 13, n. 20, p. R785-R786, 2003.

ZATZ, Mayana. Clonagem e células-tronco. **Ciência e Cultura**, v. 56, n. 3, p. 23-27, 2004.