



XXXIV FEIRA CIENTÍFICO-CULTURAL

PROJETO DE PESQUISA

Manaus-AM

2020

Júlio Manoel Bentes
Maria Clara Braga
Mariana Scaini
Mateus Bezerra

O uso da edição genética contra a COVID-19

Projeto da Turma 3001 apresentado à
Comissão da Banca Avaliadora da XXXIV
Feira Científico-Cultural do Colégio Martha
Falcão.

Orientador: Professor Rodrigo Marinho

Manaus-AM

2020

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

2. DESENVOLVIMENTO

3. CONCLUSÃO

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUÇÃO

O tema central dessa feira científico-cultural refere-se à Nova Terra, tendo como título do projeto de pesquisa: O uso da edição genética contra a COVID-19. Propagar o conhecimento científico por meio de tecnologias futurísticas em meio a pandemia da Covid-19.

Os coronavírus são uma grande família de vírus comuns em muitas espécies diferentes de animais, incluindo camelos, gado, gatos e morcegos. Raramente, os coronavírus que infectam animais podem infectar pessoas, como exemplo do MERS-CoV e SARS-CoV. Recentemente, em dezembro de 2019, houve a transmissão de um novo coronavírus (SARS-CoV-2), o qual foi identificado em Wuhan na China e causou a COVID-19, sendo em seguida disseminada e transmitida pessoa a pessoa.

A COVID-19 é uma doença causada pelo coronavírus, denominado SARS-CoV-2, que apresenta um espectro clínico variando de infecções assintomáticas a quadros graves. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a maioria (cerca de 80%) dos pacientes com COVID-19 podem ser assintomáticos ou oligossintomáticos (poucos sintomas), e aproximadamente 20% dos casos detectados requer atendimento hospitalar por apresentarem dificuldade respiratória, dos quais aproximadamente 5% podem necessitar de suporte ventilatório.

DESENVOLVIMENTO

BIOTECNOLOGIA

As biotecnologias, em seu sentido mais amplo, compreendem a manipulação de microrganismos, plantas e animais, com vistas à obtenção de processos e produtos de interesse para a sociedade. A rigor, as biotecnologias não são novas, mas sim, usam novas ferramentas tecnológicas, baseadas no conhecimento científico e que, hoje, são empregadas nas diferentes disciplinas científicas da área biológica, como a genética, a bioquímica, a entomologia e a fisiologia, entre outras.

Há mais de cinco mil anos a espécie humana vem utilizando biotecnologias, notadamente as fermentações para a produção de alimentos e bebidas, como pão e vinho. A cultura de tecidos e células foi estabelecida em meados do século passado e por meio dela, são produzidas no mundo milhões de mudas por ano de plantas clonais para uso agrícola, com impactos benéficos em termos de conservação de germoplasma, fixação de ganhos genéticos e diminuição do uso de agrotóxicos.

Desde então, outras biotecnologias foram desenvolvidas, sendo as mais importantes:

- (i) marcadores moleculares, que permitem a análise da diversidade genética e os testes de paternidade;
- (ii) engenharia genética, também chamada de tecnologia do DNA recombinante, que possibilita a obtenção de transgênicos, denominação ampla dada aos Organismos Geneticamente Modificados - OGMs;
- (iii) sequenciamento de DNA, que permite o conhecimento do genoma dos organismos e sua aplicação no melhoramento genético;
- (iv) clonagem de animais e,
- (v) células tronco.

O termo biotecnologia, em sentido estrito, tem sido utilizado para referir-se às técnicas modernas de biologia molecular e celular, incluindo a engenharia genética. Atualmente, de todas as biotecnologias, a engenharia genética e a clonagem são as que causam maior perplexidade à população, particularmente pelos seus potenciais efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente e suas implicações éticas.

O desenvolvimento da biotecnologia depende da compreensão da biologia e de como esse conhecimento pode ser usado para desenvolver novas aplicações. Por exemplo, o entendimento de que a informação biológica é armazenada no DNA, e que o DNA coordena quase todas as funções de um ser biológico, são duas das pedras fundamentais da biotecnologia moderna. Portanto, novas técnicas que nos ajudam a “ler”, “multiplicar” ou “editar” o DNA ajudam a trazer novos avanços na biotecnologia.

O sequenciamento de DNA é a principal ferramenta para “ler” o DNA, em outras palavras, determinar a sequência exata e única que torna cada ser vivo único. O sequenciamento de DNA nos dá a capacidade de entender quais são as diferenças entre pessoas saudáveis e pessoas que sofrem de doenças hereditárias, ou quais são nossas origens ancestrais.

Essa capacidade de “ler” o DNA aumentou continuamente nos últimos anos, enquanto seu custo diminuiu na mesma proporção, e espera-se que essa explosão de informações sobre o DNA mude a vida das nossas futuras gerações de várias maneiras.

Para “ler” ou “editar” o DNA, é necessário ter grandes quantidades dele. A maneira mais fácil de obter DNA é extraído de células vivas, no entanto o DNA é apenas uma parte muito pequena das células, o que torna necessário ter uma grande quantidade de células vivas para obter uma grande quantidade de DNA. Esse desafio foi resolvido quando foi encontrada uma maneira de “multiplicar” o DNA, obtida pela compreensão de como as células copiam seu próprio DNA. Isto permitiu estabelecer um método que multiplica exponencialmente, de uma maneira muito específica, grandes quantidades de DNA obtidos de uma pequena quantidade. Este processo é chamado Polymerase Chain Reaction (ou PCR) e revolucionou a biotecnologia moderna desde a sua invenção em 1983.

EDIÇÃO DE GENES HUMANOS

O ato de editar um gene humano é um tipo de engenharia genética em que o ADN é inserido, substituído, ou removido de um genoma utilizando nucleases modificadas artificialmente, ou "tesoura molecular".

A edição do genoma com nucleases de engenharia, uma poderosa ferramenta para entender a função biológica e revelar a causalidade, foi construída em um esforço conjunto pela academia e indústria de 1994 a 2010. O uso do CRISPR/Cas9 é a implementação de 2013 na "caixa de ferramentas" de edição genética. A estratégia de substituição baseada em recombinação homóloga nasceu nos anos 70 nos laboratórios de Gerry Fink e Ron Davis que mostraram que um gene de levedura pode ser substituído por um marcador selecionável e, portanto, eliminado. Este método tornou-se uma fonte chave da "genética do fermento", e ao longo das três décadas subsequentes, a comunidade de pesquisa de leveduras o usa, entre outras coisas, para fazer uma coleção de alelos nulos e hipomórficos em todo o genoma do fermento, amplamente utilizado para reversão malhas genéticas, a edição do genoma baseia-se no conceito de reparação de mecânica do DNA fita dupla pausa (DSB).

Engenharia de nucleases:

A chave para a edição do genoma é criar um DSB em um ponto específico dentro do genoma. As enzimas de restrição comumente usadas são eficazes no corte de DNA, mas geralmente reconhecem e cortam em vários locais. Para superar esse desafio e criar DSB específico do local, três classes distintas de nucleases foram descobertas e bioengenharia até o momento. Estas são as nucleases de dedo de zinco (ZFNs), nucleases efetoras como ativador de transcrição (TALEN), meganucleases e o sistema de repetições palindrômicas curtas e inter-espaçadas regularmente (CRISPR/Cas9).

O cientista chinês He Jiankui em novembro de 2018 foi responsável pela primeira edição de DNA em fetos humanos, nascendo duas meninas gêmeas no processo. De acordo com o cientista, a edição torna as crianças imunes a HIV, varíola e cólera. Apesar do avanço, He ainda não explicou todos os detalhes sobre sua pesquisa, nem o que ocorreu com os outros casais e embriões que participaram dos testes. Dado a complexidade do assunto, são levantadas questões morais e éticas sobre a pesquisa realizada. Há um receio de que os genes modificados sejam passados para as gerações seguintes, assim, caso algum erro foi feito, impactará várias vidas futuras.



CRISPR

A edição genética através de cortes em locais específicos do DNA veio demonstrar todo o potencial das nucleases, enzimas capazes de quebrar as ligações existentes entre bases nucleotídicas. Existem 4 grandes grupos de proteínas que ligam ao DNA utilizadas em edição génica: as meganucleases provenientes de elementos genéticos móveis microbianos, as nucleases baseadas nos fatores de transcrição eucariotas como zinc fingers (ZFN), as transcription activator-like effectores (TALENs), provenientes da bactéria *Xanthomonas* e mais recentemente a endonuclease Cas9 do sistema imunitário adaptativo de algumas bactérias como *S. pyogenes*. As proteínas meganucleases, ZFN e TALENs reconhecem locais específicos na sequência de DNA através de interações proteína-DNA.

As meganucleases reconhecem sequências relativamente grandes de DNA e não foram extensamente adotadas na engenharia genética devido à falta de especificidade entre a proteína e o DNA alvo (SANDER e JOUNG, 2014). As ZFNs e as TALENs possuem módulos que reconhecem 3 e 1 nucleótidos, respetivamente, pelo que podem ser direcionadas para locais específicos no DNA através de alterações nos módulos e nas suas combinações. Contudo, as ZFNs e TALENs exibem uma ligação ao DNA dependente da conformação criada entre os vários domínios ZF adjacentes e o mesmo sucede com os monómeros TALE, o que exige laboriosos processos de mapeamento e enormes investimentos laboratoriais, constituindo uma limitação ao seu uso. A grande diferença entre a Cas9 e as restantes é o fato do reconhecimento feito entre RNA e DNA, ter por base a complementaridade de bases (ligações Watson e Crick). A nuclease Cas9 é direcionada por uma pequena sequência de RNA que reconhece o DNA alvo por complementaridade tornando-o acessível à ação da Cas9, o que possui inúmeras vantagens comparativamente às nucleases anteriores.

Todo o redirecionamento das nucleases ZFNs e TALENs requer processos laboratoriais de desenho e ressíntese de proteínas que possam guiar as nucleases para o local pretendido, enquanto o redirecionamento da nuclease Cas9 depende de duas sequências de RNA, o que é bastante mais fácil e simples CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias

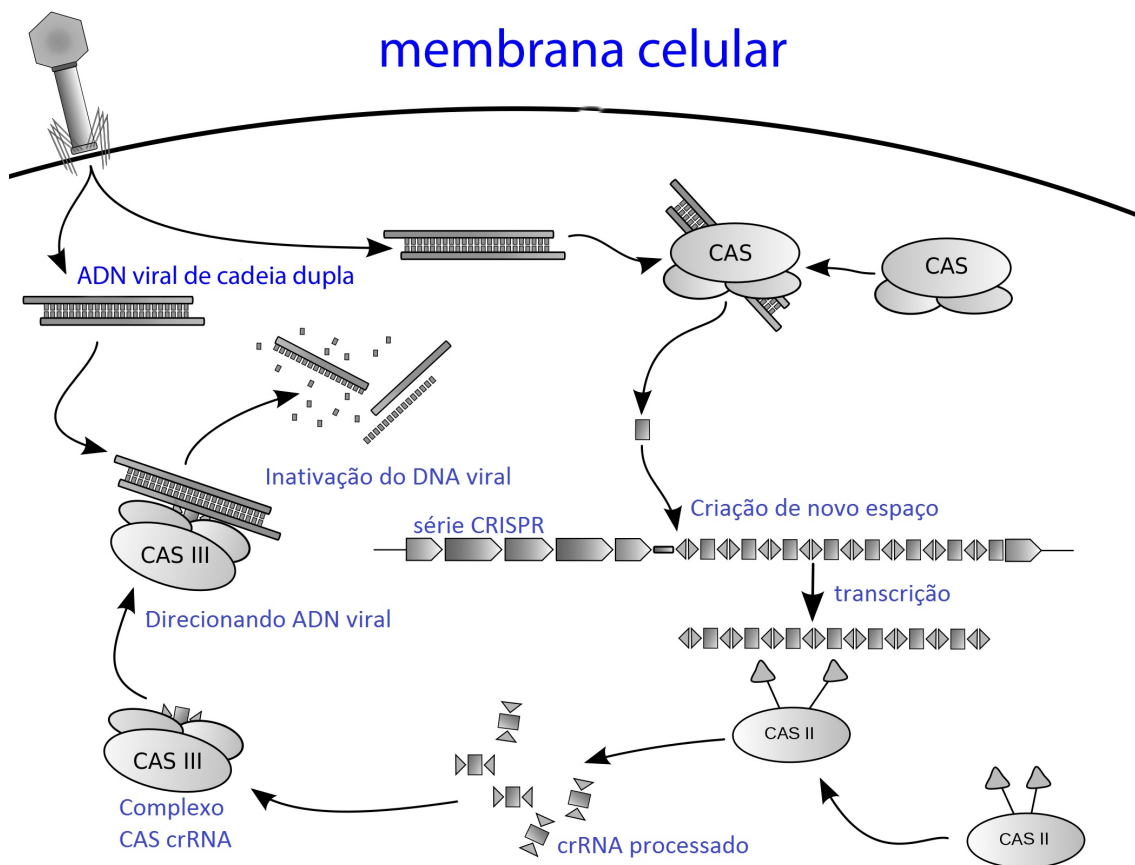
2- Funcionamento do sistema CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR/Cas9 do tipo II é um mecanismo de defesa das bactérias e Archaea contra elementos genéticos invasores como fagos e plasmídeos de DNA. A memória imunitária surge após o DNA ser cortado em pequenos fragmentos e incorporado no CRISPR locus, passando a designar-se por protoespaçador. O locus é transcrito numa cadeia precursora de RNA não codificante (pre-crRNA).

As cadeias repetidas do pre-crRNA sofrem hibridação com um segundo RNA não codificante, o trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA), formando uma cadeia dupla de RNA que é clivada e processada pela host factor ribonuclease (RNase) III. A forma duplex de crRNA-tracrRNA associa-se com a nuclease Cas9 e forma um complexo responsável pelo reconhecimento e destruição do DNA invasor in vitro e nas células procariota.

Esta estrutura formada, que possui o crRNA com o espaçador, tem especificidade para uma sequência alvo, ligando-se por complementaridade e arrastando consigo a nuclease Cas9. O seu domínio HNH cliva a cadeia complementar e o domínio RuvC a cadeia não complementar, provocando um duplo corte na dupla cadeia de DNA. Tal só acontece caso a sequência alvo se encontre na região adjacente a uma pequena sequência conhecida como protospacer adjacent motif (PAM)

O crRNA derivado do protoespaçador hibridiza com o tracrRNA. O híbrido formado complexa com a Cas9, dirigindo-se até ao DNA alvo onde a região referente ao protoespaçador se liga por complementaridade, permitindo a clivagem pela Cas9. Adaptado de uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias



De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) ela concedeu a sua primeira autorização de emergência para um teste baseado na técnica CRISPR para a Covid-19, desenvolvido pela Sherlock Biosciences, a produzir emergencialmente um teste rápido para infecção pelo vírus SARS-CoV-2 que detecta o material genético do invasor em secreções de nariz e garganta, gerando resultados comparáveis aos dos testes laboratoriais de PCR – o padrão ouro para diagnóstico da COVID-19 – em menos tempo e *in loco*.

O teste desenvolvido pela SHERLOCK adapta o sistema CRISPR-Cas que bactérias usam, na natureza, para se proteger de vírus, e que também está na base das recentes tecnologias CRISPR de edição e manipulação genética.

Nas bactérias, o CRISPR-Cas reconhece e destrói vírus que já invadiram a bactéria antes. Quando esses vírus voltam a atacar, o sistema CRISPR produz sondas de RNA, chamadas crRNA, que reconhecem o material genético do vírus e se ligam a ele, direcionando uma enzima do tipo Cas, que age como uma tesoura molecular e "picota" o material genético do vírus nos pontos indicados pelas sondas.

A enzima Cas9, inicialmente descrita com o sistema CRISPR, reconhece e corta moléculas de DNA e foi adaptada para fazer edições de genoma. Vários grupos estudam esse sistema como uma estratégia de terapia gênica. Mas o uso original, das bactérias, era como defesa contra vírus. Alguns grupos estudam a possibilidade de usar essa habilidade de bactérias para desenvolver testes diagnósticos para doenças virais, e no futuro, terapias antivirais.

Existe uma outra enzima da família Cas, a Cas13, que corta não DNA, mas moléculas de RNA viral. Aparentemente, as bactérias também são atacadas por vírus que têm RNA como material genético, como é o caso dos coronavírus humanos. Adaptando esse aparato, a pequena empresa de biotecnologia SHERLOCK (acrônimo para o inglês *Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing*), desenvolveu seu teste diagnóstico para COVID-19.

EDIÇÃO GÊNICA DO DNA HUMANO E A EXCLUSÃO DO RNA VIRAL

Quando nos deparamos com uma doença infecciosa, a princípio pensamos que não há nenhuma relação com a genética. Mas não é bem assim. A recente pandemia pelo vírus SARS-CoV-2 (“novo” coronavírus) nos ensina que é muito importante conhecer a genética do coronavírus e de seus hospedeiros, em especial o humano. Compreender a sequência do genoma de um único indivíduo com o vírus SARS-CoV-2 já é importante, mas a comparação de múltiplos genomas de diferentes pacientes, animais, lugares e em diferentes períodos de tempo, é muito mais informativo.

Conhecendo a genética do coronavírus podemos entender como esta pandemia começou, com que velocidade ele muda seu código genético e como está se propagando mundialmente. SARS-CoV-2 pertence ao gênero betacoronavirus, que infecta principalmente os morcegos, mas também infectam outras espécies, como seres humanos, camelos e coelhos.

O material genético do novo coronavírus (SARS-CoV-2) é um pequeno RNA, composto por apenas trinta mil bases nitrogenadas. O genoma contém 15 genes. Para termos de comparação, o genoma humano é composto de DNA, tem cerca de 3 bilhões de bases nitrogenadas e cerca de 20 mil genes. Ao desvendar a sequência do Genoma dos primeiros casos do novo Coronavírus, os pesquisadores chineses imediatamente confirmaram que a sequência genética do SARS-CoV-2 é extremamente parecida com a do genoma de um “velho” Coronavírus, sequenciado em 2015, que infecta morcegos, e que através dos morcegos infecta outros animais, até chegar ao ser humano.

A sequência genética identificada pelos pesquisadores chineses no SARS-CoV-2 é também muito parecida com a do Pangolim malaio (*Manis javanica*), um mamífero parecido com o Tamanduá, que é caçado e utilizado como especialidade gastronômica pelas populações das zonas onde habita. As suas escamas são traficadas para serem utilizadas como afrodisíaco. Estes pangolins foram ilegalmente importados (até porque é uma espécie considerada como criticamente ameaçada de extinção) para o porto de Guangdong, uma província no sul da China. Daí a hipótese mais aceita atualmente é que o morcego infectou o pangolim, que ao ser oferecido como alimento no mercado de Wuhan, na província de Hubei, no centro da China, infectou animais, humanos, e causando milhares de mortes.

O Brasil, de forma inédita, teve (e continua tendo) papel pioneiro neste tipo de investigação genética. Antes mesmo dos pesquisadores italianos conhecerem a genética do Coronavírus que infectou a Itália, pesquisadores brasileiros do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP), 48 horas após a confirmação dos primeiros brasileiros infectados pelo novo coronavírus, já haviam tido o genoma sequenciado e obtiveram dados inéditos não só para o Brasil, mas também para a Itália.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a revelação futura de cartuchos microfluidic-baseados transportáveis e os reagentes liofilizados para executar o ensaio podiam permitir o teste do ponto--cuidado fora do laboratório diagnóstico clínico - tal como clínicas, departamentos de emergência locais, aeroportos, e outros lugar. as ferramentas diagnósticas CRISPR-baseadas podem dramática transformar o campo de diagnósticos moleculares, fazendo os disponíveis e acessíveis basicamente em qualquer lugar no mundo.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

<https://brasil.elpais.com/ciencia/2020-04-22/tecnica-experimental-promete-detectar-o-coronavirus-em-40-minutos.html>

<http://www.microbiologia.ufrj.br/portal/index.php/en/graduacao-2/informe-da-graduacao/995-crispr-cas9>

<https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/patentes/tecnologias-para-covid-19/Diagnostico>

<https://www.infoescola.com/genetica/crispr/>

<https://revistagalileu.globo.com/Ciencia/Saude/noticia/2019/05/edicao-de-genes-humanos-nem-sempre-e-assustadora-entenda.html>

<https://www.scielo.br/pdf/bioet/v27n2/1983-8042-bioet-27-02-0223.pdf>