**Impactos da nova técnica de edição de genomas CRISPR-Cas9**

**na ciência e na sociedade**

***Introdução:***

Desde o século passado, sabemos que a molécula de DNA é o material genético dos seres vivos. Numa sequência espetacular de descobertas, a estrutura da dupla-hélice do DNA foi revelada e o código genético desvendado. Conseguir manipular o material genético teve um primeiro grande desenvolvimento no início da década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição, e a possibilidade de recombinar essa molécula *in vitro,* estabelecendo o que ficou conhecido como Engenharia Genética. Apesar da facilidade de se realizar experimentos utilizando a tecnologia do DNA recombinante em bactérias e mesmo alguns fungos, a modificação do material genético de células de plantas, mamíferos e humanas, por meio das técnicas de engenharia genética inicialmente desenvolvidas se mostrou complexa, pouco eficiente e sujeita a várias limitações.

O genoma humano (haplóide) é organizado em 23 cromossomos, armazenando pouco mais de 3 bilhões de pares de bases. No início desse século, o Projeto Genoma Humano descreveu cerca de 99% da sequência desses cromossomos, fato que tornou possível o sonho de editar o genoma, de forma direcionada e específica. Mas isso continuou um sonho, por bastante tempo.

Recentemente, vários genomas de microorganismos e plantas também foram sequenciados, oferecendo os mapas genéticos detalhados que começaram a ser manipulados com as técnicas desenvolvidas durante o século XX. Milhares de experimentos demonstraram claramente que alterações no genoma podem, de fato, alterar o funcionamento dos seres vivos e sua adaptação ao ambiente. Esses experimentos proporcionaram não somente um avanço extraordinário do conhecimento sobre diferentes organismos, incluindo o homem, como também resultaram em avanços biotecnológicos com enorme impacto para a sociedade como a criação de novas formas de controle e tratamento de doenças e o aumento na produção de alimentos que contribuiu com a redução da fome no mundo.

A busca por estratégias para consertar ou modificar os genomas foi revolucionada nos últimos 4 anos pela descoberta de um sistema bacteriano, que resultou na criação da tecnologia de edição genômica chamada CRISPR/Cas9 (um acrônimo derivado da expressão complicada em inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated 9*). A tecnologia se baseia em mecanismo natural de defesa de bactérias contra vírus que infectam bactérias, semelhante a ação de uma vacina.

Esse mecanismo envolve moléculas de RNA (RNA guia), que direcionam uma endonuclease Cas (no caso a Cas9) para a clivagem de sequências específicas do DNA do vírus. O RNA guia é responsável pela especificidade de reconhecimento de Cas9, tornando o vírus inativo. Dessa forma, as bactérias defendem-se de infecções virais.

***Utilização de CRISPR/Cas9 em biotecnologia:***

Os cientistas descobriram que esse mecanismo pode ser utilizado para editar o genoma de células de qualquer organismo. Basta desenhar moléculas de RNA guia capazes de localizar genes que se queira editar (genes-alvo) e a inserir esses guias, em conjunto com a endonuclease Cas9 bacteriana, na célula do organismo em questão. O gene-alvo é localizado pelo RNA guia e a endonuclease gera quebras em locais específicos da dupla fita de DNA. Em seguida, entra em ação o sistema de reparo de DNA, já presente em todas as células, que é capaz de consertar a quebra. Vários trabalhos têm buscado o aumento da eficiência e precisão do processo. O sistema CRISPR/Cas9 pode também ser utilizado para corrigir um defeito genético. A alteração de um gene, ou qualquer sequencia de DNA, através do processo CRISPR/Cas9 é extremamente simples. A sequencia do “RNA guia”, como o nome informa, dirige o local da modificação no genoma. Esta modificação pode ser pontual e específica ou pode ser espalhada pelo genoma em regiões que compartilhem a mesma sequência do RNA guia. Como a sequência do RNA guia é desenhada no laboratório, a edição de um gene via CRISPR/Cas9 é extremamente simples.

***O uso de CRISPR/Cas9 na saúde humana***

Associando a funcionalidade da ferramenta CRISPR/Cas9 ao grande número de seres vivos que tem seus genomas sequenciados, é agora possível alterar a informação genética de basicamente qualquer espécie. Uma outra vantagem é que tal alteração pode, se houver interesse, se tornar hereditária. A edição de genes usando CRISPR/Cas9 abre caminho para grande número de aplicações terapêuticas, já que muitas das doenças que acometem seres humanos são de origem genética, e algumas atribuídas à ocorrência de mutação única no genoma (ou seja, elas são monogênicas). Por estes motivos, CRISPR/Cas9 passou a ser encarada como uma tecnologia capaz de promover o reparo pontual de um gene mutado, causador de uma doença genética, eliminando tal mutação do genoma e impedindo a herança da doença a indivíduos das sucessivas gerações.

Outra grande aplicação para o CRISPR/Cas9 é o uso na pesquisa biomédica básica e pré-clínica. A ferramenta fornece um método fácil de se estudar vias moleculares e a função de genes e proteínas nos mais diferentes organismos assim como criar modelos mais adequados para o estudo de doenças em animais de experimentação. Através da inativação ou inserção de DNA no genoma de células eucarióticas com a utilização da ferramenta CRISPR/Cas9, e a análise do consequente fenótipo e comportamento biológico dos organismos modificados geneticamente, consegue-se estudar as diferentes vias celulares e moleculares que estão envolvidas nos mecanismos fisiológicos e patológicos das mais variadas doenças que afetam os seres humanos. Certamente esses estudos envolvendo pesquisas em ciências biomédicas poderão ter impactos fantásticos na obtenção de novas formas terapêuticas, importantes para a saúde humana, ou mesmo animal. Por exemplo, vários projetos de pesquisa vêm explorando a aplicabilidade de CRISPR/Cas9 no uso como terapia para AIDS, tratamento eficaz contra o câncer ou correção de mutações em doenças monogênicas, como a distrofia muscular de Duchenne, entre outras.

***Utilização de CRISPR/Cas9 na agropecuária:***

Além de auxílio nas pesquisas básica e biomédica, a possibilidade de edição de genomas de animais e plantas pela técnica CRISPR/Cas9 abre novos horizontes na pesquisa agropecuária. Animais domesticados para consumo poderão ter seus genomas editados de forma a ter maior produção, ou simplesmente resistência a doenças infecciosas, por exemplo. Como em humanos, há uma série de doenças em animais (citrulinemia e a Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina por exemplo) que poderiam ser melhor estudadas utilizando a técnica de CRISPR/Cas9.

Da mesma forma, essa metodologia abre incrível possibilidade para que se efetue edição genética em plantas, com grande impacto na agricultura, desenhando plantas com maiores níveis de produção, melhor aproveitamento como alimento, e resistência a pragas.

Uma das grandes ameaças à civilização são os impactos das Mudanças Climáticas Globais. Dentre os impactos est seca, alagamento e alta temperatura. a poderiam ser atacadas utilizando tessoas entenderá a adaptação que nossas plantações precisarão à seca, alagamento e alta temperatura. A metodologia CRISPR/Cas9 poderá acelerar muito o processo de reengenharia de plantas cultivadas, como soja, milho, cana, feijão, entre outras, preservando um dos mais importantes setores da economia brasileira, o agronegócio.

A tecnologia CRISPR/Cas9 é totalmente diferente de tecnologias anteriores, sendo possível produzir organismos com as alterações desejadas de modo preciso e localizado, sem necessariamente envolver transgenes. Assim, essa tecnologia gera plantas e animais contendo mutações direcionadas de acordo com o interesse do homem, devendo ser considerados como produtos que podem ser obtidos de forma segura nos laboratórios.

***Utilização de CRISPR/Cas9 para a geração de organismos geneticamente modificados:***

Vale ainda a pena lembrar o potencial de uso dessa tecnologia de modo contínuo, que permite a geração de organismos geneticamente modificados (plantas ou animais) que herdem os genes que codificam a CRISPR-Cas9 e RNA guia, e com isso a capacidade de promoverem a modificação genética na geração seguinte: conhecido como *gene drive.* Esse mecanismo é uma estratégia muito eficiente para modificar geneticamente, em poucas gerações, toda uma população de uma determinada espécie. É um mecanismo de herança que não temos similar na natureza e que pode trazer muitos benefícios, mas que precisa ser realizado sob estrito controle. Como por exemplo, podemos imaginar como plenamente factível a capacidade de modificação genética de uma população de mosquitos (como o *Aedes aegypti*) de forma que as novas gerações simplesmente não sejam vetores de vírus patogênicos humanos, como o vírus da dengue ou zika. Entretanto, o uso dessa estratégia poderosa deve ser feito apenas mediante testes efetivos, que permitam avaliar eventuais riscos do processo biológico a ser gerado.

***Aspectos éticos da aplicação de* *CRISPR/Cas9 em seres humanos***

Se por um lado essa nova tecnologia de edição de genomas traz enormes perspectivas de avanços para a sociedade, essa capacidade de editar genomas traz à tona a discussão sobre os aspectos éticos e de biossegurança envolvidos em projetos básicos e aplicados utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9. Apesar das metodologias clássicas de manipulação de genomas já terem possibilitado a realização de pesquisas científicas com edição gênica em embriões humanos, os quais, se implantados em útero, poderiam gerar um ser humano com genoma modificado, o uso de CRISPR/Cas9 torna esse processo muito mais acessível e mais facilmente realizável mesmo por pesquisadores com menor experiência na área. Desta forma, são necessários estudos que promovam um melhor entendimento das consequências da edição genética gerada por essa tecnologia. A segurança e as consequências decorrentes desta manipulação do DNA precisam ser melhor entendidas antes de se pensar em edição de genótipos em células portadoras de alterações patológicas ou não patológicas em seres humanos.

Com relação a esse aspecto, é proposta a criação de regulamentação específica que iniba a realização de edição genética por CRISPR/Cas9 em embriões humanos para posterior implantação, até que estudos mais aprofundados sejam realizados e a segurança dessa técnica seja comprovada de maneira que metodologias adequadas para aplicação clínica possam ser estabelecidas. O uso indiscriminado de CRISPR/Cas9 em embriões humanos para reprodução assistida deve ser desestimulado até que os aspectos técnico-científicos, éticos, sociais, e legais sejam amplamente discutidos pela comunidade.

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, CTNBio, responsável pelos aspectos regulatórios de organismos geneticamente modificados, já está discutindo formas de avaliar os projetos e produtos gerados por técnicas de edição de genomas como o uso de CRISPR/Cas9. A avaliação deverá ser feita caso a caso, à semelhança do que já vem sendo feito com relação aos OGM gerados por tecnologias de DNA recombinante.

***Perspectivas:***

 Em virtude dos potenciais benefícios que a tecnologia de edição de genomas CRISPR/Cas9 pode proporcionar pesquisas que testem amplamente a segurança, a eficácia e as possibilidades de aplicação dessa nova e promissora ferramenta devem ser estimuladas.

É importante estabelecer um diálogo entre a comunidade científica e a população em geral. O público precisa compreender melhor tanto o funcionamento como as consequências do uso desta metodologia, pois trata-se de uma ferramenta revolucionária em termos de custo e praticidade que possibilita a manipulação do DNA de várias formas, em especial, reparar mutações genéticas associadas a doenças como Alzheimer e câncer, além de impactos na agropecuária.

Assim como ocorreu nos anos 70, quando foram realizados os primeiros experimentos de manipulação genética, é importante que as novas perspectivas sobre o uso da ferramenta CRISPR/Cas9 em pesquisa básica e ou aplicada sejam amplamente discutidas de modo a definir diretrizes para que a sociedade brasileira possa usufruir com segurança da sua utilização. Nesse sentido, pesquisas que contribuam para aprofundar o conhecimento sobre eventuais riscos associados a essa tecnologia nos diferentes níveis de organização (celular, tecidual, fisiológico, individual, social/ecológico, etc), bem como dos seus impactos (clínicos, ambientais, biotecnológicos, econômicos, etc) são essenciais para melhor fundamentar tais discussões. Propõe-se a adesão à iniciativa de limitar a edição genética para projetos que não envolvam de embriões humanos e sua posterior implantação no útero para fins reprodutivos. Por outro lado, é extremamente importante ressaltar o incentivo à realização de pesquisas envolvendo o uso de CRISPR/Cas9 e o intercâmbio técnico-científico, com o propósito de estimular discussões permanentes e aprofundadas sobre o tema. Iniciativas como essas são essenciais para a elaboração de políticas públicas sobre esse tema em nosso país.

**Comissão elaboradora do texto**

Carlos Frederico M. Menck (ICB- USP)

Chao Yun Irene Chan (ICB- USP)

Katiuchia Sales (FMRP- USP)

Márcio de Castro Silva Filho (ESALQ/PRPG- USP)
Marcos Buckeridge (IB-USP/ACIESP)

Margareth Capurro Guimarães (ICB-USP)

Maria Lucia Zaidan Dagli (FMVZ-USP-CTNBio)

Maria Rita Passos Bueno (IB-USP)
Marie Anne Van Sluys (IB- USP)

Mayana Zatz (IB- USP)
Oswaldo Keith Okamoto (IB- USP)

Santuza Maria Ribeiro Teixeira (IB-UFMG)

Tiago Campos Pereira  (FFCLRP- USP)

Wilson Silva (FMRP- USP)