

Contribuições da engenharia genética no tratamento de doenças

Contributions of genetic engineering in the treatment of diseases

DOI:10.34117/bjdv7n3-711

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 01/03/2021

Vinicius Sartor dos Santos

Graduação em Biomedicina

Instituição de atuação atual: Laboratório Caron

Endereço completo: Rua Madre Justina Ines, 570, CEP 99840-000, Sananduva, RS

E-mail: vsds96@hotmail.com

Paula Wiethölter

Doutorado em Melhoramento Genético

Instituição de atuação atual: Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul/FASURGS

Endereço completo: Rua Angélica Otto, 160, CEP 99025-270, Passo Fundo, RS.

E-mail: paulawiet@gmail.com

RESUMO

No decorrer do desenvolvimento científico, a engenharia genética encontrou aplicação em quase todas as áreas das ciências naturais. As aplicações dessa biotecnologia podem envolver terapia gênica, epigenética, biologia sintética, defesas antivirais, medicamentos, controle de vetores de doenças, reprodução humana, etc. Esta revisão tem como objetivo descrever como a engenharia genética contribuiu com o tratamento de doenças, além de analisar e discutir os principais métodos e mudanças ocorridos no decorrer do desenvolvimento dessa biotecnologia. Entre os meses de outubro de 2019 e fevereiro de 2020, foram buscados artigos nas bases de dados Bireme, PubMed e EBSCO, foram incluídos os artigos científicos completos publicados no período de 2010 a 2020. Os resultados dessa revisão mostram a engenharia genética é amplamente usada no tratamento de diversas doenças, existem pesquisas com HIV, câncer, hepatite b, células tronco, entre outras. Além disso, a engenharia genética é usada também em outras áreas como agricultura e pecuária, desenvolvendo meios mais eficazes na produção de alimentos. A engenharia genética está no caminho de se tornar uma realidade cheia de oportunidades e desafios, esta pesquisa mostra resultados promissores que corroboram para a otimização do tratamento de diversas doenças.

Palavras-chave: Engenharia genética. Tratamento. Doenças.

ABSTRACT

In the course of scientific development, genetic engineering has found application in almost all areas of the natural sciences. The applications of this biotechnology may involve gene therapy, epigenetics, synthetic biology, antivirals, drugs, disease vector control, human reproduction, etc. This review aims to introduce and clarify how genetic engineering contributes to the treatment of diseases, in addition to analyzing and discussing the main methods and changes that occurred during the development of this biotechnology. Between

the months of October 2019 and February 2020, articles were found in the Bireme, PubMed and EBSCO databases, full scientific articles published from 2010 to 2020 were included. The results of this review show that genetic engineering is used in the treatment of several diseases, there is research on HIV, cancer, hepatitis b, stem cells, among others. In addition, genetic engineering is also used in other areas such as agriculture and livestock, developing methods most used in food production. Genetic engineering is on the way to becoming a reality full of opportunities and challenges, this research shows promising results that corroborate for the optimization of the treatment of several diseases.

Keywords: Genetic Engineering. Treatment. Diseases.

1 INTRODUÇÃO

A engenharia genética é parte da biotecnologia caracterizada por realizar modificações no genoma de um organismo. Essas modificações servem para introduzir ou retirar determinadas características, podendo também atuar na produção de novas proteínas ou enzimas. A capacidade de manipular o DNA permite que os cientistas descubram novos tratamentos para inúmeras doenças. Além disso, permite criar novos organismos com traços genéticos específicos, gerando tratamentos e até produtos terapêuticos mais baratos e efetivos (KLUG et al. 2010).

Nas últimas décadas o impacto das doenças baixaram drasticamente, a taxa de mortalidade infantil global, por exemplo, é a mais baixa de todos os tempos (5%) (ONU, 2017). O aumento da longevidade na população humana, de 29 anos em 1770 para 71 nos em 2015 (ROSER et al., 2019) ocorreu graças a diversos fatores, como saneamento básico, higiene, e principalmente a criação e desenvolvimento de vacinas e antibióticos. “Em 1967, a varíola havia infectado 15 milhões de pessoas e matado 2 milhões, mas em 2014 não houve uma única pessoa infectada ou morta por essa doença.” (HARARI, 2016, p. 20).

No decorrer da história e do desenvolvimento científico, diversas descobertas contribuíram para o avanço da humanidade. No século XIX, Gregor Mendel propôs que as características dos organismos eram transmitidas de forma hereditária (MENDEL, 1865), influenciando a biologia de modo geral e dando origem a pesquisas posteriores sobre genética e hereditariedade. Juntamente com os estudos de Thomas Hunt Morgan sobre os cromossomos já no século XX (MORGAN, 1910), a base da genética clássica foi formada.

Posteriormente, as descobertas de Francis Crick e James Watson sobre a estrutura dupla-hélice do DNA ajudaram a entender como a hereditariedade está ligada aos genes (CRICK; WATSON, 1953). Essa descoberta auxiliou na previsão de doenças transmitidas geneticamente, proporcionando um possível tratamento precoce. Quando a humanidade

descobriu que praticamente todos os processos do nosso corpo tem origem no genoma, foram criadas novas tecnologias e técnicas que visavam analisar, compreender, diagnosticar e tratar enfermidades (LINDEN, 2010).

Uma das técnicas mais conhecidas foi desenvolvida pelo químico norte-americano Paul Berg, que conseguiu combinar duas moléculas de DNA em laboratório, criando a técnica do DNA recombinante (BERG, 1972). “A tecnologia do DNA recombinante produz combinações artificiais de moléculas de DNA, habitualmente a partir de duas fontes diferentes, com maior frequência de espécies diferentes.” (KLUG et al., 2010, p. 323).

As novas moléculas de DNA são inseridas em células bacterianas que serão replicadas, resultando em clones bacterianos idênticos que contém o DNA recombinante. Por exemplo, pode-se produzir insulina em bactérias a partir da clonagem do material genético humano, para tratar pacientes com diabetes. A partir do isolamento do RNA mensageiro do gene responsável pela produção de insulina, obtém-se o DNA complementar que é inserido num plasmídeo que por sua vez, será injetado numa *Escherichia coli* (BAESHEN et al., 2014).

Outro tipo de aplicação desta biotecnologia é a produção de vacinas por meio da técnica do DNA recombinante, onde se tem aplicados esforços para a produção de vacinas contra a influenza tipos A e B, a pólio, a herpes, e a hepatite A e B. O processo para produção da vacina é bem parecido com a produção de insulina. A informação genética do patógeno responsável pela produção de proteínas (antígenos com aplicação viral) é clonada e aplicada na *Escherichia coli*. Esses procedimentos são mais seguros e efetivos que os anteriores, gerando um melhor custo-benefício para a saúde pública (BAESHEN et al., 2014) Ainda, vacinas de origem bacteriana, para diversos tipos de meningite, têm sido produzidas por meio de fermentação, bem como o componente *pertussis* da vacina tríplice (LIMA; MOTA, 2003).

A amplificação das moléculas de DNA pode ser realizada *in vitro*, utilizando o método de reação em cadeia polimerase (PCR). Por ser uma técnica confiável, barata e rápida a PCR é usada rotineiramente para fazer o diagnóstico molecular de diversas doenças e para identificação de patógenos como vírus e bactérias. Além disso, é amplamente utilizada em pesquisas envolvendo biologia molecular, em testes de paternidade, maternidade ou irmandade e na medicina forense (AMBERS, 2018).

Em 1974 o cientista Rudolph Jaenisch produziu o primeiro mamífero modificado geneticamente, introduzindo o DNA do vírus SV40 num rato (JAENISCH, 1974). Com o avanço dos estudos e pesquisas na área da genética, em 1996 nasceu o primeiro mamífero

clonado a partir de uma célula somática, a ovelha Dolly. Esses experimentos foram importantes para a compreensão da estrutura dos cromossomos e a relação entre os telômeros e o envelhecimento (OLIVEIRA et al., 2013), além do desenvolvimento da clonagem terapêutica, que pode trazer diversas vantagens no tratamento de doenças, por exemplo, substituir o tecido cardíaco em uma pessoa que sofreu um infarto ou reconstituir a medula em alguém que se tornou paraplégico após um acidente (ZATZ, 2004).

A engenharia genética em alimentos também contribuiu para o tratamento de doenças, um exemplo é o arroz dourado, o qual cientistas alteraram o seu genoma para que o mesmo produzisse betacaroteno, um precursor da vitamina A (XUDONG et al., 2000). No mundo cerca de meio milhão de crianças ficam cegas devido à deficiência de vitamina A, além de comprometer o sistema imunológico (SOMMER, 1992). O cultivo desses tipos de alimentos ajuda a melhorar a qualidade da saúde de pessoas de um modo geral, além de beneficiar agricultores e o ambiente. É necessário um rigoroso critério de avaliação antes da distribuição desses alimentos, porém nenhum caso até hoje demonstrou que esses tipos de alimentos causem malefícios a saúde.

Atualmente a mais nova tecnologia de edição genética é a técnica de CRISPR, onde se utiliza um modelo de sistema de defesa antiviral bacteriano (CRISPR-Cas9). Usando como referência um trecho do DNA, o RNA-guia se liga a proteína Cas9 que faz o corte próximo à sequência estabelecida, podendo realizar a inativação ou correção dos genes (SAMPSON, 2014). Descoberta por Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier em 2012 (DOUDNA, 2014), essa técnica se tornou famosa pela sua simplicidade e eficácia, gerando novas pesquisas e publicações que impulsionaram o avanço e a evolução dessa tecnologia (PEREIRA et al., 2016).

Em julho de 2019 cientistas associaram a técnica CRISPR com medicamentos antirretrovirais e uma nova técnica de terapia chamada LASER ART + para eliminar o vírus HIV das células de camundongos. Ao fim do período de tratamento, cerca de um terço dos ratos infectados haviam sido totalmente curados da doença, não apresentando nenhum indício da existência do vírus HIV em seus organismos, gerando expectativas de que a eliminação viral é permanente possível (DASH et al., 2019).

Ainda, a técnica de CRISPR pode ser usada para outros fins que não de edição genética, por exemplo, marcação de DNA, regulação da expressão genica, clivagem de DNA, mapeamento de genes ou rastreamento de RNA. Esse conjunto de técnicas derivadas é denominado “caixa de ferramentas da CRISPR”, com todas essas possíveis aplicações, essa técnica é responsável pela “revolução CRISPR” (PEREIRA et al., 2016).

Recentemente, um cientista chinês através do CRISPR-Cas9 ajudou a criar os primeiros bebês imunes ao vírus do HIV. No experimento o cientista retirou o gene CCR5, impedindo a ligação do vírus do HIV na célula do hospedeiro (LIMAYE, 2013). Embora seja um grande salto para a ciência e ética, esse experimento gerou diversas opiniões distintas, pois modificar um embrião é algo permanente, as características modificadas passarão pelas futuras gerações desses seres humanos (KRIMSKY, 2019).

Por não se ter conhecimento total do genoma, a engenharia genética pode causar danos graves aos organismos. Por exemplo, a perda da função do gene CCR5 pode aumentar em até quatro vezes o risco de contaminação de outras doenças como vírus do Nilo Ocidental e influenza (MURPHY, 2011), além de aumentar a probabilidade de apresentar encefalite grave causada por doenças transmitidas por carrapatos e ter uma reação severa à vacina contra a febre amarela (PULENDRAN et al., 2008). Por essa razão deve-se procurar um equilíbrio racional antes da utilização dessas técnicas, tomando cuidado para que não seja usada de maneira equivocada, visando e preconizando a saúde e a estabilidade dos organismos (LANDER et al., 2019).

Desta forma, o objetivo da presente revisão de literatura é descrever como a engenharia genética contribuiu com o tratamento de doenças. A revisão, além de analisar e discutir os principais métodos e mudanças ocorridos no decorrer do desenvolvimento dessa biotecnologia, também apresenta uma visão futura que essa nova tecnologia poderá promover na medicina e na sociedade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada por meio de uma revisão de literatura, onde foram reunidos e sintetizados os resultados encontrados em pesquisas prévias que analisaram exclusivamente a contribuição da engenharia genética no tratamento de doenças, além de abordar perspectivas futuras relacionadas com o uso dessa biotecnologia.

Para responder a questão norteadora do estudo, entre os meses de outubro de 2019 e Janeiro de 2020, foram buscados artigos nas bases de dados Bireme, PubMed e EBSCO, utilizando os seguintes descritores (Decs) na Bireme: engenharia genética x tratamento x doenças e no PubMed e EBSCO: genetic engineering x treatment x diseases.

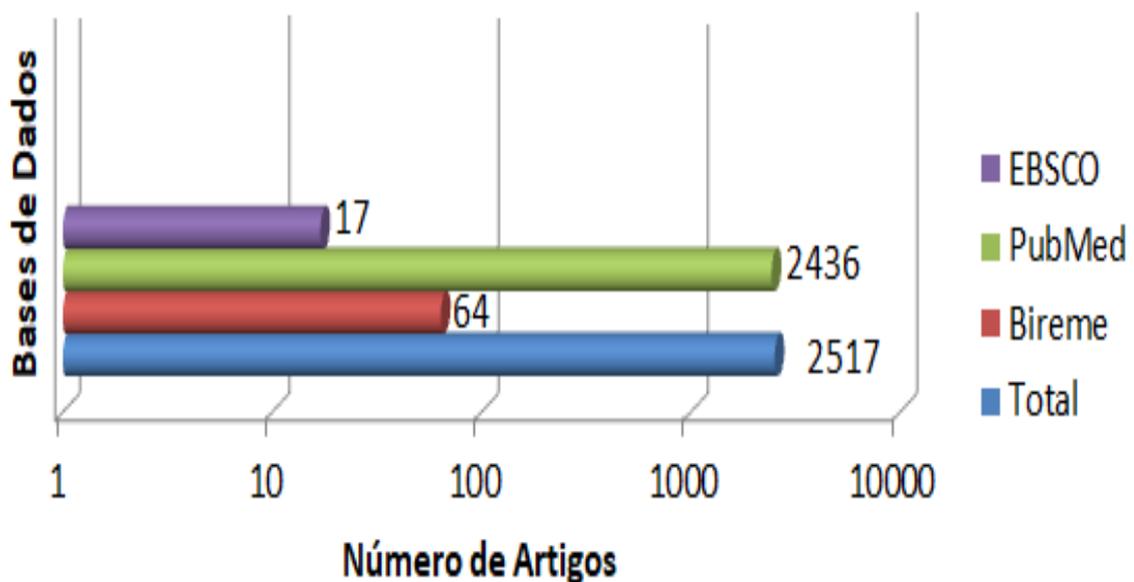
Foram incluídos os artigos científicos completos disponíveis nas bases de dados supracitadas no período de 2010 a 2020, nos idiomas português, inglês e espanhol. Foram excluídos os artigos que não enfocaram a relação da engenharia genética com o tratamento de doenças e artigos repetidos entre as três bases de dados.

Foram coletadas as seguintes informações em cada artigo: título do trabalho, autores, ano de publicação, tipo de estudo, objetivo, resultados e conclusões. As informações foram reunidas e apresentadas em três quadros. No primeiro foram expostos dados sobre as principais contribuições dessa área no decorrer da história. No segundo a alguns estudos e técnicas de engenharia genéticas utilizadas para o tratamento de doenças e no terceiro algumas perspectivas futuras.

3 RESULTADOS

Após uma busca nas bases de dados utilizando os descritores (Decs) genetic engineering x treatment x diseases no PubMed e EBSCO e engenharia genética x tratamento x doenças na Bireme, além dos filtros como período (2010-2020) e idiomas (português, inglês e espanhol), foram encontrados 2517 artigos no total. (Figura 1)

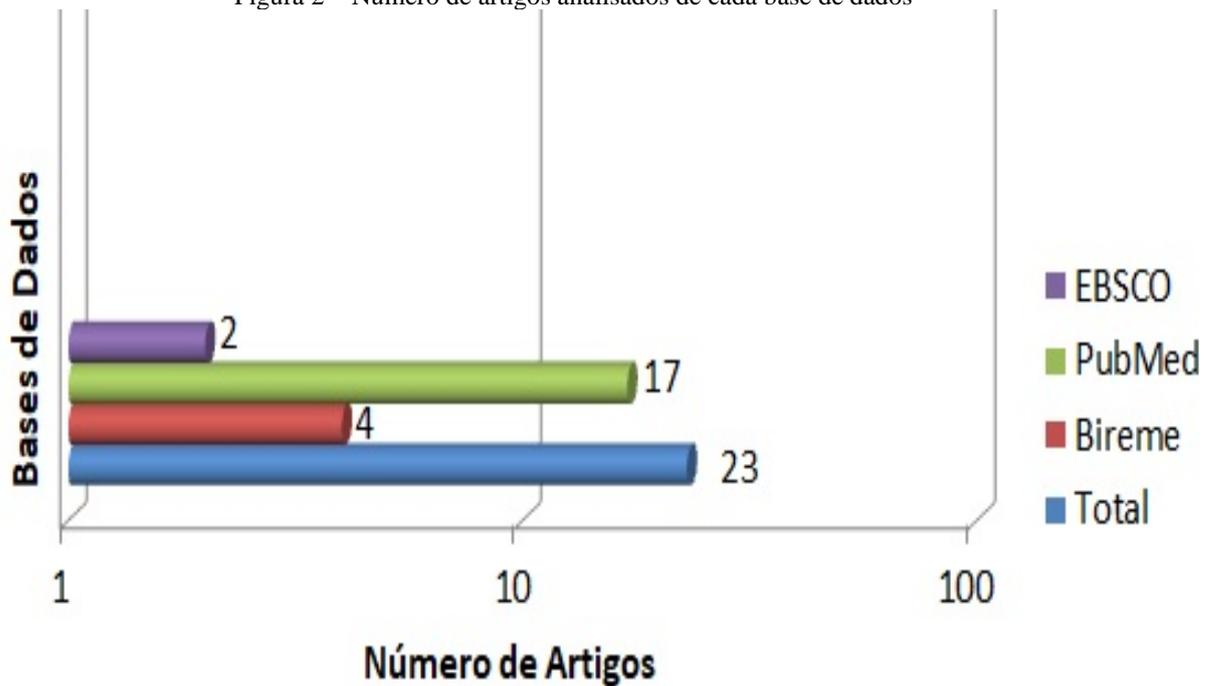
Figura 1 – Número de artigos encontrados nas bases de dados



Fonte: os autores

Após o uso desses critérios, foram selecionados e analisados 2 artigos encontrados na EBSCO, 17 no PubMed e 4 na Bireme, totalizando 23 artigos para a pesquisa. (Figura 2)

Figura 2 – Número de artigos analisados de cada base de dados



Fonte: os autores

Todos os artigos selecionados para realização da pesquisa foram reunidos em um quadro. Neste quadro, é informado o título dos artigos, o país de origem do estudo, a sua referência bibliográfica e o ano de publicação (Quadro 1).

Após a seleção, leitura e análise dos artigos foram feitas três tabelas, a primeira ilustra o histórico do uso e desenvolvimento da engenharia genética. Na segunda, estudos utilizando engenharia genética no tratamento de doença e por fim, a terceira tabela mostra diversas perspectivas e aplicações futuras para o uso dessa biotecnologia.

Quadro 1 – Artigos selecionados para a pesquisa

Título do estudo	País	Referência/Ano
Targeted gene addition to human mesenchymal stromal cells as a cell-based plasma-soluble protein delivery platform	Canadá	BENABDALLAH, et al., 2010
Genome editing of mouse fibroblasts by homologous recombination for sustained secretion of PDGF-B and augmentation of wound healing	Estados Unidos	BARKER, et al., 2014
Genome Engineering with Zinc-Finger Nucleases	Estados Unidos	CARROLL, 2011
To CRISPR and beyond: the evolution of genome editing in stem cells	Inglaterra	CARROCHEN, KNOEPFLER, 2016
Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently 4 inhibits viral replication	Holanda	DONG, et al., 2015
The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9	Estados Unidos	DOUDNA, CHARPENTIER, 2014
The promise and challenge of therapeutic genome editing	Estados Unidos	DOUDNA, 2020
Neo-evolution: is Homo sapiens ready?	Inglaterra	FINEBERG, 2011
NTALEN-mediated targeting of HPV oncogenes ameliorates HPV-related cervical malignancy	Estados Unidos	HU, et al., 2015
Applications of CRISPR-Cas Enzymes in Cancer Therapeutics and Detection	Inglaterra	HUANG, et al., 2018
TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing	Inglaterra	JOUNG, SANDER, 2012
Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study	Inglaterra	KAMINSKI, et al., 2016
CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering	Estados Unidos	KNOTT, DOUDNA, 2018
Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells	Inglaterra	LIAO, et al., 2015
RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9	Estados Unidos	MALI, et al., 2013
Recent progress 2 in CRISPR/Cas9 technology	China	MEI, et al., 2016
Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies	Estados Unidos	POIROT, et al., 2015
A New Class of Medicines through DNA Editing	Estados Unidos	PORTEUS, 2019
Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells	Estados Unidos	QASIM, et al., 2017
Advances In Research On Genome Editing Crispr-Cas9 Technology	Paquistão	SHAH, et al., 2019
In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy	Estados Unidos	SHARMA, et al., 2015
CRISPR/Cas9: a historical and chemical biology perspective of targeted genome engineering	Inglaterra	SINGH, CHAKRABORTY, MAITI, 2016
The iCRISPR platform for rapid genome editing in human Pluripotent Stem Cells	Estados Unidos	ZHU, GONZÁLEZ, HUANGFU, 2014

Fonte: os autores

3.1 HISTÓRICO DO USO DA ENGENHARIA GENÉTICA

No decorrer da história e do desenvolvimento científico, descobertas no campo da engenharia genética contribuíram para o avanço da humanidade, nos anos 70, cientistas inseriram fragmentos de DNA em bactérias, plantas e animais para estudá-los e modificá-los para pesquisas. O primeiro animal geneticamente modificado nasceu em 1974, fazendo do camundongo a ferramenta padrão para pesquisas, salvando milhões de vidas (JAENISCH, 1974).

Nas últimas décadas, os pesquisadores desenvolveram com sucesso sistemas supereficientes, usando diversas ferramentas que facilitaram a edição genética, como o DNA recombinante. A partir dos anos 80, entramos no comércio produzindo vários produtos químicos por meio de modificação genética, como agentes coagulantes, hormônios de crescimento e insulina (BAESHEN et al., 2014).

Em 1996 nasceu o primeiro mamífero clonado a partir de uma célula somática, a ovelha Dolly. Três ovelhas diferentes contribuíram para o seu nascimento. Uma forneceu o ovócito, a outra, os cromossomos que foram inseridos no núcleo desse ovócito. A terceira foi a responsável pela gestação. Além de gerar diversas polêmicas no campo da biologia e da bioética, esse evento acrescentou muito para o desenvolvimento e avanço da área de clonagem terapêutica (HWANG et al., 2004).

No começo do século XXI foi publicado o Projeto Genoma Humano, o sequenciamento do genoma humano surtiu efeitos em quase todos os campos da biologia. O Projeto Genoma Humano revelou que os animais abrigam grandes trechos de DNA viral. Auxiliou os cientistas a reconstruir as origens e a evolução de centenas de ramificações da vida, inclusive as de nossos antepassados primatas. Confirmou o número reduzido de genes que os seres humanos têm e fez com que os pesquisadores percebessem que as características complexas dos homens derivam da regulação e da divisão específicas do DNA (KEAN, 2012).

Tudo isso é muito impressionante, mas até recentemente a edição genética era algo extremamente caro, complicado e levava muito tempo para ser feito. Isso agora mudou com uma revolucionária nova tecnologia: CRISPR. Do dia para a noite os custos de engenharia diminuíram significativamente. É difícil entender o quão grande é uma revolução como o CRISPR. Ela tem, literalmente, o poder de mudar a humanidade para sempre (DOUDNA, 2014) (Figura 3).

Figura 3 - Linha do tempo dos principais desenvolvimentos na engenharia genética



Fonte: Os autores

3.2 FERRAMENTAS DE ENGENHARIA GENÉTICA DESENVOLVIDAS AO LONGO DO TEMPO

Uma das primeiras técnicas de edição genômica foi as nucleases de dedo de zinco (ZFNs). Essa técnica possui esse nome devido à necessidade de um átomo de zinco para a sua estrutura se formar. Elas são uma classe de proteínas que se ligam o DNA, e foi uma das primeiras ferramentas capazes alterar de forma controlada um local predeterminado no

genoma. “As quebras de fita dupla de DNA induzidas por ZFNs estão sujeitas a processos de reparo de DNA que levam à mutagênese direcionada e à substituição genética direcionada em frequências notavelmente altas.” (CARROLL, 2011).

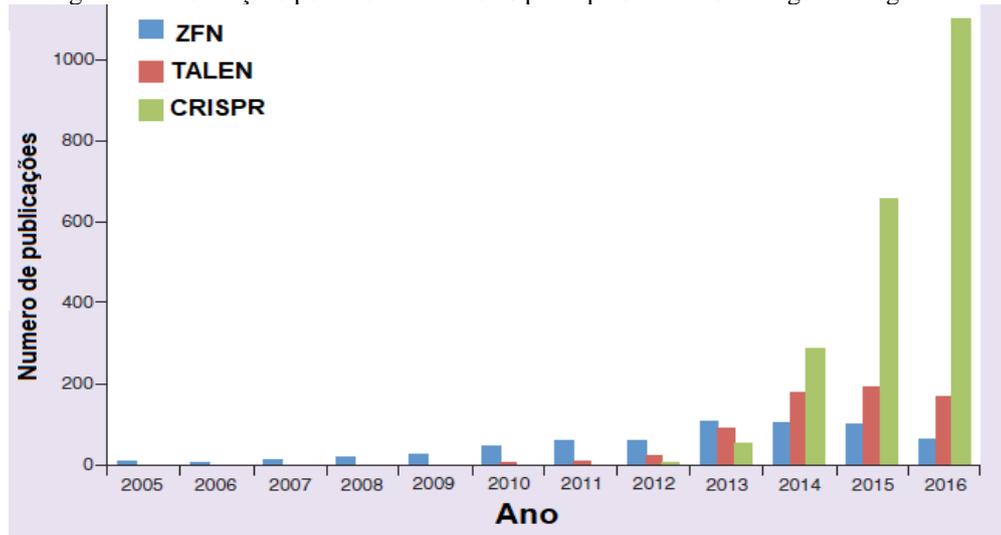
Outra técnica amplamente usada é as nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs), a qual permite a alteração de praticamente qualquer gene em vários tipos de células e organismos, desde vírus e leveduras a células de mamíferos. Enquanto as ZFNs reconhecem uma sequência de DNA de três letras, cada segmento de TALEN reconhece letra por letra individualmente. “As TALENs compreendem uma nuclease inespecífica de clivagem de DNA fundida a um domínio de ligação a DNA que pode ser facilmente manipulada para que os TALENs possam atingir qualquer sequência.” (JOUNG, 2012).

Em 2012 foi descoberta a mais eficaz tecnologia de edição genética até o momento, a técnica de CRISPR/Cas9, acrônimo para Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas ligada à proteína Cas9 que utiliza um modelo de sistema antiviral bacteriano (DOUDNA, 2014). Além disso, a técnica de CRISPR pode ser usada para outros fins além da edição genética, por exemplo, marcação de DNA, regulação da expressão genica, clivagem de DNA, mapeamento de genes ou rastreamento de RNA (PEREIRA et al., 2016).

Comparações diretas entre as principais ferramentas de edição genética são difíceis de avaliar, em algumas análises as eficiências de edição feitas por CRISPR/Cas9 podem atingir 80% ou mais, o que é muito superior aos níveis observados usando ZFNs ou TALENs (DOUDNA, 2014). O grande sucesso do sistema CRISPR/Cas9, se deve pela sua simplicidade, baixo custo e eficiência superior comparado às ZFNs e TALENs.

A CRISPR/Cas9 apresentou um rápido avanço em seu desenvolvimento e aplicabilidade nos últimos dois anos. (MEI, 2016) O gráfico a seguir mostra as publicações de estudos envolvendo as técnicas ZFNs, TALENs e CRISPR/Cas9 até o ano de 2016. Nota-se um aumento significativo do número de publicações envolvendo a técnica de CRISPR/Cas9 (CHEN, 2016) (Figura 4). Independente da técnica utilizada, a capacidade de alterar genes de forma rápida e eficiente usando essas técnicas, promete ter impactos profundos na pesquisa biológica, além de produzir estratégias terapêuticas potenciais para cura de diversas doenças.

Figura 4 - Publicações por ano utilizando as principais técnicas de engenharia genética



Fonte: To CRISPR and beyond: the evolution of genome editing in stem cells

3.3 RELAÇÕES DAS TÉCNICAS DE ENGENHARIA GENÉTICAS UTILIZADAS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS

Foram selecionados e analisados 12 artigos para a elaboração desta tabela. (Quadro 2) Entre os estudos apresentados na tabela, quatro deles usaram a técnica de CRISPR/Cas9, um estudo utilizou CRISPR/Cas9 associado à TALENs. Dois estudos utilizaram a técnica com TALENs e dois estudos utilizaram a ferramenta de ZFNs. Apenas um estudo aplicou um transgene previamente modificado.

Quadro 2 - Estudos utilizando engenharia genética relacionado ao tratamento de doenças

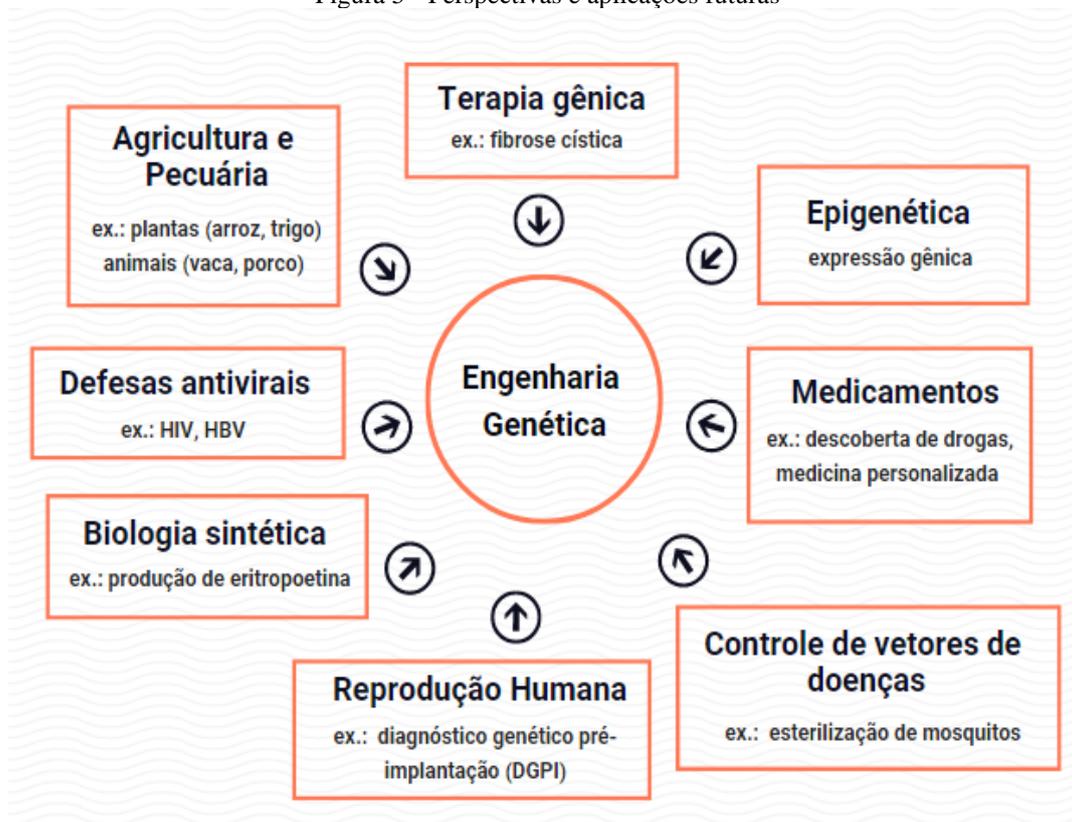
Aplicações	Organismos modelo	Técnica	Referências
HIV	Células humanas, Ratos e Camundongos	CRISPR/Cas9	LIAO et al, 2015, KAMINSKI et al, 2016
Câncer	Tecido hematopoiético, Linfócitos T	CRISPR/Cas9	HUANG et al, 2018
Hepatite B	Células Huh7	CRISPR/Cas9	DONG et al, 2015
Células Tronco	Células humanas	CRISPR/Cas9 e TALENs	MALI et al, 2013 ZHU et al, 2014
Leucemia Linfoblástica Aguda	Célula CAR-T CD19	TALENs	PORIOT et al, 2015, QASIM et al, 2017
HPV	Camundongos	TALENs	HU et al, 2015
Hemofilia	Camundongos	ZFNs	SHARMA et al, 2015
Síndrome de Hurler	Células-tronco (MSC), Camundongos	ZFNs	BENABDALLAH et al, 2010
Síndrome de Hunter	Fibroblastos, Camundongos	Aplicação do transgene PDGF-B	BARKER et al, 2014
Eritropoetina			
Cicatrização de feridas			

Fonte: os autores

3.4 POSSÍVEIS ÁREAS DE ESTUDO ENVOLVENDO ENGENHARIA GENÉTICA

A engenharia genética encontrou aplicação em quase todas as áreas das ciências naturais. As aplicações dessa biotecnologia podem envolver terapia gênica, epigenética, biologia sintética, defesas antivirais, medicamentos, controle de vetores de doenças, reprodução humana, etc. (DOUDNA, 2014). Além da área biomédica, essa biotecnologia pode envolver agropecuária e agricultura. Alimentos como arroz, trigo e sorgo já foram editados para melhorar o rendimento da colheita e a tolerância a doenças (SINGH, 2016) (Figura 5).

Figura 5 - Perspectivas e aplicações futuras



Fonte: os autores

4 DISCUSSÃO

Nesta revisão foi observado um enorme número de estudos e pesquisas relacionados ao tratamento de doenças com a engenharia genética. Durante a revisão, foram encontradas pesquisas que demonstram uma variedade de áreas estudadas, desde pesquisas com vírus e síndromes genéticas a cicatrização de tecidos e células-tronco.

No tratamento por infecção ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), dois artigos mostraram significantes avanços. Ambos usaram a tecnologia CRISPR/Cas9, no estudo de 2015 os cientistas conseguiram interromper o genoma viral contra infecção,

expressão e replicação em células humanas (LIAO et al, 2015). Já em 2016, eliminaram um segmento do DNA viral em ratos e camundongos e diminuíram significativamente o nível de expressão gênica viral no sangue. Os resultados do estudo demonstraram pela primeira vez a erradicação in vivo do DNA do HIV-1 por CRISPR/Cas9 (KAMINSKI et al, 2016).

O uso dos sistemas CRISPR/Cas melhorou bastante a edição do genoma para o tratamento do câncer e detecção de mutações. Os recentes avanços no campo da imunoterapia contra o câncer destacam o potencial terapêutico, com altas taxas de remissão em pacientes. Em 2016, a China iniciou o primeiro estudo clínico para tratar pacientes com câncer de pulmão metastático. Atualmente, existem vários estudos semelhantes para o tratamento de câncer de esôfago, câncer de próstata, câncer de bexiga, carcinoma de células renais, melanoma, sarcoma, mieloma múltiplo metastático e malignidades associadas ao vírus Epstein-Barr (EBV) (HUANG, C; LEE, K; DOUDNA; 2018).

Um estudo de 2015 demonstrou que o sistema CRISPR/Cas9 atingiu com precisão e eficiência o genoma do vírus da Hepatite B (HBV) e inibiu eficientemente a replicação HBV (DONG et al, 2015). A técnica de CRISPR/Cas9 também permite alterações na sequência de DNA em células-tronco embrionárias pluripotentes (MALI et al, 2013) que podem ser cultivadas para produzir tecidos específicos, como cardiomiócitos ou neurônios (ZHU; GONZÁLEZ; HUANGFU; 2014).

Utilizando outra técnica de edição (TALENs), cientistas conseguiram inibir o crescimento e reduzir a tumorigenicidade do vírus do papiloma humano (HPV) em camundongos. O tratamento interrompeu eficientemente os oncogenes reduzindo a carga viral de DNA, sugerindo que os TALENs têm potencial para o tratamento do HPV (HU et al, 2015).

Em outra pesquisa, o uso da técnica TALENs possibilitou a remissão da leucemia linfoblástica aguda (LLA) em dois bebês, após 28 dias do início do tratamento (QASIM et al, 2017). Além disso, outra pesquisa demonstrou que a edição de genes feita por TALENs pode ser usada para imunoterapias com células T-CAR, células que tem capacidade de identificar e matar células tumorais (POIROT et al, 2015).

Através do método de nucleases de dedo de zinco (ZFN), utilizando o gene da albumina foram substituídas proteínas direcionadas ao fígado, os resultados demonstram a correção da hemofilia A e B em camundongos e nas síndromes de Hurler e Hunter (SHARMA et al, 2015). A associação de engenharia genética e biologia sintética possibilitam editar células para secretar eritropoietina (BENABDALLAH et al, 2010), ou

fatores de crescimento para cicatrização de feridas (BARKER et al, 2014). Pode ser possível editar células de maneira que se tornem úteis para tratar tecidos doentes.

Outros exemplos de pesquisas na área de engenharia genética para o tratamento de doenças incluem distrofia muscular, doenças neurológicas, incluindo esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington. Além disso, existem estudos abordando a doença falciforme, diabetes tipo 1, lesão renal aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia mielóide aguda, câncer de fígado, e Sarcoma de Ewing, entre outros (KNOTT; DOUDNA; 2018).

Até o momento não existe total conhecimento das interações que ocorrem entre os genes no nosso genoma, por isso existem várias preocupações em relação à ética e biossegurança do uso da engenharia genética. A modificação de células germinativas humanas deve ser considerada com muita seriedade. Assim, a edição de embriões humanos está se tornando cada vez mais controversa entre os cientistas. Alguns países já restringiram a ferramenta CRISPR/Cas9, outros proibiram completamente seu uso em seres humanos. Os aspectos positivos e negativos da edição, as preocupações éticas científicas e sociais devem ser levadas em consideração simultaneamente (MEI et al, 2016).

Dado o amplo uso e o baixo custo dessa biotecnologia, o uso incorreto pode prejudicar a sociedade não apenas por acidentes de laboratório, mas também através de armas biológicas ou bioterrorismo. É importante entender os impactos na sociedade e na vida das pessoas de modo geral. Novas pesquisas serão necessárias para entender toda a amplitude dos impactos para outros organismos e para o meio ambiente (SHAH et al, 2019).

Hoje, as famílias com histórico de doenças genéticas podem usar o diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) para identificar embriões que possuem genes conhecidos ou alterações no genoma, como fibrose cística ou hemofilia A, e predisposição ao câncer de mama (presença do gene BRCA1). Pense também se fosse possível escolher não apenas o sexo do seu filho ou reduzir a probabilidade de ter doença genética, mas também fazer os ajustes genéticos em seu corpo que curariam ou impediriam doenças. E se você pudesse fazer as alterações genéticas para eliminar o diabetes ou Alzheimer ou reduzir o risco de câncer ou eliminar o derrame? Se olharmos para o futuro, esses tipos de mudanças serão cada vez mais possíveis (FINEBERG, 2011).

O CRISPR-Cas9 invadiu o domínio da regulação epigenética, onde diferentes modificações nas bases de DNA podem ativar ou desativar genes. No campo da terapia genica, houve correção de desordens humanas através da técnica de CRISPR/Cas9. Talvez

a aplicação mais comum do CRISPR/Cas9 para a epigenética seja na descoberta de genes, usando abordagens de perda ou ganho de função (SINGH; CHAKRABORTY; MAITI; 2016).

A engenharia genética está possibilitando um meio transformador de gerar medicamentos e fornece uma precisão que não era possível anteriormente. Diversos estudos já estão em testes clínicos com o objetivo de gerar uma nova classe de medicamentos. A chamada medicina personalizada busca apresentar um benefício terapêutico para a população (PORTEUS, 2019).

Mais de 5 mil doenças genéticas são causadas por apenas uma única letra incorreta no DNA e afetam pelo menos 250 milhões de indivíduos em todo o mundo (DOUDNA, 2020). Com o avanço dessas biotecnologias em uma década ou duas, nós podemos possivelmente tratar e curar milhares de doenças, aumentar nossa qualidade de vida e conseqüentemente, nossa longevidade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As novas biotecnologias são certamente um pouco assustadoras, mas como esse trabalho mostra, nós temos muito a ganhar com a engenharia genética. Além disso, ela pode ser apenas um passo natural na evolução da nossa espécie. Podemos ter a chance de curar milhares de doenças e salvar inúmeras vidas. Essa biotecnologia traz a questão fundamental de como a humanidade será no futuro e se iremos assumir o controle do nosso destino genético. A engenharia genética está no caminho de se tornar a nossa nova realidade, uma realidade cheia de oportunidades e desafios. Porém, novos estudos são necessários para aumentar nosso conhecimento nessa área. Os cientistas e pesquisadores devem ter muita responsabilidade e procurar um equilíbrio racional antes de usar essas técnicas, pois a engenharia genética tem o poder de mudar o destino da humanidade para sempre.

REFERÊNCIAS

- AMBERS, A. et al. Direct PCR amplification of DNA from human bloodstains, saliva, and touch samples collected with microFLOQ® swabs. **Forensic Science International: Genetics**, Amsterdã, v. 32, n. 32, p. 80-87, 2018.
- BAESHEN, A. N. et al. Cell factories for insulin production. **Microbial Cell Factories**, Londres, v. 13, n.13, p.141-150, 2014.
- BARKER, J. C.; BILLS, J. et al. Genome editing of mouse fibroblasts by homologous recombination for sustained secretion of PDGF-B and augmentation of wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**. Baltimore, v. 134, n. 3, p. 389-401, 2014.
- BENABDALLAH, B. F. et al. Targeted gene addition to human mesenchymal stromal cells as a cell-based plasma-soluble protein delivery platform. **Cytotherapy**, Vancouver, v. 12, n. 3, p. 394-399, 2010.
- BERG, P. JACKSON, A. D.; SYMONS, H. R. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 69, n. 10, p. 2904-2909, 1972.
- CARROLL, D. Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. **Genetics**, Austin, v. 188, n. 4, p. 773-782, 2011.
- CHEN, K Y; KNOEPFLER, P S; . To CRISPR and beyond: the evolution of genome editing in stem cells. **Regenerative medicine**, London, v. 11, n. 8, p. 801-816, 2016.
- DASH, P K.; GENDELMEN, H., E.; EDAGWA, B.; et al. Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice. **Nature**, Londres, v. 10, n. 2753, p. 1-20, 2019.
- DONG, C. et al. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently 4 inhibits viral replication. **Antiviral research**: Elsevier, Amsterdam, v. 118, n. 7, p. 110-117, 2015.
- DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, Washington, v. 346, n. 6213, p. 1077-1087, 2014.
- DOUDNA, J. A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. **Nature**, London, v. 578, n. 1, p. 229-236, 2020.
- FINEBERG, H. V. Neo-evolution: is Homo sapiens ready? **BMJ: British medical journal**, London, v. 343, n. 1, p. 1-3, 2011.
- HARARI, N. Y. **Homo Deus**. São Paulo: Companhia das Letras, 2016.

HU, Z. et al. TALEN-mediated targeting of HPV oncogenes ameliorates HPV-related cervical malignancy. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 125, n. 1, p. 425-436, 2015.

HUANG, C.; LEE, K.; DOUDNA.; et al. Applications of CRISPR-Cas Enzymes in Cancer Therapeutics and Detection. **Trends in cancer**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 499-512, 2018.

JAENISCH, R.; MINTZ, B. Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1250-1254, 1974.

JOUNG, J. K; SANDER, J. D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. **Nature reviews. Molecular cell biology.**, London, v. 14, n. 1, p. 46-55, 2012.

KAMINSKI, R. et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. **Gene therapy**, Basingstoke, v. 23, n. 8, p. 690-695, 2016.

KEAN, S. **The Violinist's Thumb: and Other Lost Tales of Love, War, and Genius, as Written by Our Genetic Code** Rio de Janeiro: Zahar, 2012

KLUG, S. W. et al. **Conceitos de Genética**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

KNOTT, G J; DOUDNA, J A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. **Science**, New York, v. 361, n. 6405, p. 866-869, 2018.

KRIMSKY, S. Ten ways in which He Jiankui violated ethics. **Nature Biotechnology**, Londres, v. 37, n. 1, p. 19-20, 2019.

LANDER, E.; BAYLIS, F.; ZHANG, F. et al. Adopt a moratorium on heritable genome editing. **Nature**, Londres, v. 567, n. 7747, p. 165-168, 2019.

LIAO, K. H. et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. **Nature**, Londres, v. 1, n. 6, p. 1-10, 2015.

LIMA, N.; MOTA, M. **Biotecnologia: fundamentos e aplicações**. Portugal: Lidel, 2003.

LIMAYE, N. Pharmacogenomics, Theranostics and Personalized Medicine – the complexities of clinical trials: challenges in the developing world. **Applied Translational Genomics**, Amsterdã, v. 2, n. 2, p. 17-21, 2013.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é o que não é e o que será. **Estudos Avançados**. São Paulo: v. 24, p. 31-69, 2010.

MALI, P. et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. **Science**, New York, v. 339, n. 6121, p. 823-826, 2013.

MEI, Y. et al. Recent progress 2 in CRISPR/Cas9 technology. **Journal of genetics and genomics**, Beijing, v. 43, n. 2, p. 63-75, 2016.

MENDEL, G. Experiments in Plant Hybridization. **Proceedings of the Natural History Society**, Boemia, v. 4, n. 204, p. 3-47, 1865.

MORGAN, T.; H. Sex-limited inheritance in Drosophila. **Science**, Washington, v. 32, n. 812, p. 120-122, 1910.

MURPHY, M. P.; LIM, K. J. Chemokine control of West Nile virus infection. **Experimental Cell Research**, Amsterdã, v. 317, n. 5, p. 569-574, 2011.

OLIVEIRA, S. S. et al. A Influência genética dos Telômeros sobre o Envelhecimento Celular e sua Relação Cancerígena. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ENVELHECIMENTO HUMANO, 2013, Paraíba.

PEREIRA, T. C. et al. **Introdução à técnica CRISPR**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016.

POIROT, L. et al. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies. **American Association for Cancer Research**, Chicago, v. 75, n. 18, p. 3853-3864, 2015.

PORTEUS, M. H. A New Class of Medicines through DNA Editing. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 380, n. 10, p. 947-959, 2019.

PULENDRAN, B. et al. Case of Yellow Fever Vaccine–Associated Viscerotropic Disease with Prolonged Viremia, Robust Adaptive Immune Responses, and Polymorphisms in CCR5 and RANTES Genes. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 198, n. 4, p. 500-507, 2008.

QASIM, W. et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. **Science translational medicine**, Washington, v. 9, n. 374, p. 1-8, 2017.

ROSER, M.; RITCHIE, H. **Causes of Death**. Our World in Data, 2018. Disponível em: <<https://ourworldindata.org>>. Acesso em: 12 abr. 2019.

SAMPSON, T.; R.; WEISS S.; D.; Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. **Bioessays**, Nova Jersey, v. 36 n. 36, p. 34–38, 2014.

SHAH, S. Z. et al. Advances In Research On Genome Editing Crispr-Cas9 Technology. **Journal of Ayub Medical College**, Abbottabad, v. 31, n. 1, p. 108-122, 2019.

SHARMA, R. et al. In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. **Blood**, New York, v. 126, n. 15, p. 1777-1784, 2015.

SINGH, A.; CHAKRABORTY, D.; MAITI, S. CRISPR/Cas9: a historical and chemical biology perspective of targeted genome engineering. **Chemical Society reviews**, London, v. 45, n. 24, p. 6659-6890, 2016.

SILVER, M. L. Genetics goes to Hollywood. **Nature Genetics**, Londres, v. 17, n. 14, p. 260-261, 1997.

SOMMER, A.; WEST J.R. K. P.; HUMPHREY, H. J. Vitamin A deficiency and attributable mortality among under-5-year-olds. **Bulletin of the World Organization**, Geneva, v. 70, n. 2, p. 225-232, 1992.

UNITED NATIONS. Economics and Social Affairs. **World Mortality 2017**. United States of America: ONU, 2017.

WATSON, D. J.; CRICK F. H. C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, Londres, v. 171, n. 346, p. 737-738, 1953.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 31-69, 2010.

XUDONG, Y. et al. Engineering the Provitamin A (B-Carotene) Biosynthetic Pathway Into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. **Science**, Washington, v. 287, n. 5451, p. 303-305, 2000.

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos Avançados**. São Paulo, v. 18, n. 51, p. 247-256, 2004.

ZHU, Z.; GONZÁLEZ, F.; HUANGFU, D. The iCRISPR platform for rapid genome editing in human Pluripotent Stem Cells. **Methods in enzymology**, New York, v. 546, n. 36, p. 215-250, 2014.