

Edição dirigida do genoma por CRISPR/Cas9: uma nova tecnologia para o melhoramento de plantas

Oeber de Freitas Quadros¹, José Aires Ventura², Antonio Alberto Ribeiro Fernandes³, Patricia Machado Ribeiro Fernandes⁴

Resumo - A edição genética de plantas pelos sistemas CRISPR e principalmente pelo CRISPR/Cas9 tem proporcionado uma nova revolução nos trabalhos de melhoramento genético garantindo a alteração do progresso da pesquisa biotecnológica. As grandes vantagens desta tecnologia são a capacidade para a alteração de regiões específicas do DNA, a customização do sistema e o baixo custo dos insumos necessários para edição, quando comparados com outras metodologias através da modulação de genes-alvo envolvidos no metabolismo da planta, imunidade e tolerância ao estresse para gerar culturas com as melhorias desejadas. O LBAA/UFES e o Incaper têm desenvolvido pesquisas de proteômica e transcriptômica do mamoeiro com foco nessas tecnologias. Os resultados já alcançados têm possibilitado estratégias de edição do mamoeiro por CRISPR/Cas9. Sobre os aspectos legais, o Departamento de Agricultura dos EUA se posicionou favorável à tecnologia, e alimentos editados por CRISPR/Cas9 já foram liberados para comercialização. No Brasil, a CTNBio vem discutindo a questão sobre as técnicas inovadoras de melhoramento de precisão, em que se enquadram estas novas tecnologias de edição genética.

Palavras-chaves: Agronegócio; Biotecnologia; DNA; CRISPR; Resistência; Melhoramento.

Genome editing by CRISPR/Cas9: a new technology for plant improving

Abstract - Genome editing known as CRISPR/Cas9 has provided a new emerging genetic revolution that assures the change in the progress of biotechnological research. The great advantages of this technology are the ability to change specific DNA regions, system customization and the low cost of the inputs required for editing, compared to other methodologies through modulation of target genes involved in plant metabolism, immunity and stress tolerance to generate crops with the desired improvements. LBAA/UFES and INCAPER have developed research on proteomics and transcriptomics of papaya. The results already achieved have enabled papaya editing strategies by CRISPR/Cas9. As to the legal aspects, the US Department of Agriculture has positioned itself in favor of this technology, and food edited by CRISPR/Cas9 has already been released for sale. In Brazil, CTNBio has been discussing the issue of the innovative precision improvement techniques, in which these new genetic editing technologies fit.

Keywords: Agribusiness. Biotechnology. DNA. CRISPR. Resistance. Plant breeding.

INTRODUÇÃO

O agronegócio tem sido um dos principais pilares da economia brasileira, contribuindo com o produto interno bruto (PIB) do País e onde a produção e o

consumo de frutas representam parte importante, estando associado à melhoria da saúde da população.

O ser humano sempre buscou melhorias na produção de alimentos. Por exemplo, a espiga de milho,

¹ Biólogo, Doutor em Biotecnologia, Pesquisador da LBAA/UFES, e-mail: oeberquadros@gmail.com

² Engenheiro. Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Pesquisador do Incaper

³ Físico, Doutor em Ciências dos Materiais, Professor Titular da UFES, Pesquisador do LBAA/UFES

⁴ Bióloga, Doutor em Bioquímica, Professora Titular da UFES, Pesquisadora do LBAA/UFES

vigorosa e cheia de grãos amarelos homogêneos que conhecemos hoje surgiu a partir de outra gramínea: o teosinto. Há muito tempo se percebeu que as melhores espigas deveriam ser usadas como matrizes para o replantio. Durante milênios, a domesticação do milho foi realizada pela seleção artificial. Uma recente análise do transcriptoma do milho e do teosinto revelou o resultado desta seleção: mais de 1.000 genes com expressão significativamente alterados, que podem ter contribuído para a evolução do milho (SWANSON-WAGNER et al., 2012).

Com o avanço científico, a identificação e manipulação dos genes de interesse deram um grande salto: transformação genética de plantas. Na década de 1980, surgiram os primeiros vegetais transgênicos, e em 1994, o primeiro alimento geneticamente modificado – o tomate *Flavr Savr*. O termo transgênico refere-se a um organismo que recebeu um gene de outro organismo doador, que pode ser de outra espécie do mesmo gênero ou até mesmo de um reino diferente.

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), (CTNBio, 2018), de 1998 até 04/05/2018, já aprovou 78 plantas geneticamente modificadas para comercialização, sendo: 16 de soja, 44 de milho, 15 de algodão, 1 de feijão, 1 de eucalipto e 1 de cana-de-açúcar. Atualmente, 96% da soja, 88% do milho e 78% do algodão aqui plantados são geneticamente modificados, principalmente resistentes a herbicidas e/ou a insetos (CIB, 2018).

Um relatório apresentado pela Academia Nacional de Ciências, Engenharia e Medicina dos Estados Unidos (NASEM, 2016) considera seguro o consumo dos alimentos transgênicos, pois já se passaram mais de 20 anos de sua utilização e não foram encontradas evidências que correlacionem um maior risco no consumo de transgênicos em comparação com plantações convencionais. Entretanto, ainda existem em diferentes segmentos da sociedade questionamentos críticos em relação aos alimentos transgênicos.

São várias as possibilidades de melhoramento genéticos de plantas. Os principais desafios

econômicos e agrônômicos enfrentados pelos agricultores são o controle de doenças e pragas, bem como o comportamento de tolerância das plantas em condições climáticas adversas. Quanto à tolerância ao estresse abiótico, os dois principais objetivos são obter tolerância aos herbicidas e ao estresse ambiental natural, tais como, calor, frio, salinidade e seca. Com o melhoramento vegetal, tanto pelas estratégias convencionais, quanto os mais recentes métodos moleculares e de engenharia genética, as pesquisas têm buscado aumentar a produtividade e produção agrícola.

Este trabalho objetiva realizar uma abordagem sobre a nova ferramenta para o melhoramento de plantas: a edição dirigida do genoma por CRISPR/Cas9.

NOVAS ALTERNATIVAS PARA MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

Com o surgimento de novas metodologias de sequenciamento, mais rápidas e baratas, muitos vegetais tiveram seus genomas sequenciados e anotados em bancos de dados *on-line*, gerando metadados de informação. Paralelamente, novas abordagens biotecnológicas têm permitido uma revolução, capaz de transformar ciência básica em aplicada e personalizada.

Neste sentido, a “edição gênica dirigida” é uma abordagem moderna para a modificação do genoma, que tem emergido como uma alternativa aos métodos de melhoramento clássico e transformação genética para gerar novas cultivares e assegurar a produção de alimentos.

Estas novas Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs) permitiram que pesquisadores fizessem modificações precisas no DNA, em praticamente qualquer organismo que desejassem, sem a necessidade de fazer a introdução de genes de outras espécies. A edição genômica de plantas de interesse econômico tem avançando rapidamente.

Das estratégias de edição gênicas, a que tem sido mais utilizada é aquela que provoca uma deleção do DNA em um local específico. Características

indesejadas do genoma são inativadas com esta quebra e que, após um mecanismo de reparo natural das células, as características indesejadas desaparecem completamente.

Dentre as metodologias para edição gênica, destacam-se a “Nucleases Dedo de Zinco” (ZFN - *Zinc Finger Nuclease*), “Nucleases Baseadas como Ativadores de Transcrição” (TALEN - *Transcription Activator - Like Effector-Based Nucleases*) e o “Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associada a enzima nuclease Cas9” (CRISPR/Cas9 - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9*). Essas novas tecnologias podem ser usadas para introduzir, remover ou substituir um ou mais nucleotídeos específicos em um local desejado no genoma do organismo.

As nucleases TALEN e ZFN são enzimas quiméricas (fusão de mais de um tipo de enzima) que são capazes de se ligar e de cortar o DNA. Elas são fabricadas de acordo com as sequências específicas do genoma que se deseja inativar. Entretanto, a fabricação das enzimas TALEN e ZFN são relativamente caras, e a personalização de novas enzimas para cada mudança que se deseja criar no DNA é um processo complicado.

A tecnologia de edição gênica por CRISPR/Cas9 tem-se destacado devido à sua versatilidade e simplicidade de manuseamento em laboratório e pela sua simplicidade tem sido matéria de capa de várias revistas científicas e também em jornais populares. A descoberta foi por acaso, surgida a partir de uma curiosidade: algumas bactérias usadas na fabricação de iogurte não eram atacadas por vírus. Foi verificado que um mecanismo de defesa destas bactérias sintetizava uma enzima chamada “Cas9” e duas fitas de RNA “guias”, que juntos reconhecem e cortam o DNA do vírus (Figura 1). Em seguida, os vários fragmentos do DNA do vírus são guardados no genoma da bactéria, como uma “memória da infecção”.

Além da Cas9, também foram descobertas outras nucleases no sistema CRISPR, como Cpf1 e Cas13a (anteriormente C2c2), que, apesar de apresentarem semelhanças no mecanismo, existe uma grande variação nos sistemas CRISPR/Cas encontrada em diferentes bactérias (Figura 2). Em comparação com CRISPR/Cas9, no sistema CRISPR/Cpf1 existe uma única fita de crRNA; a região PAM é formada por uma sequência TTTN e o corte do DNA alvo é realizado em aproximadamente 18 a 23 pares de bases a jusante do local PAM, induzindo um corte coesivo no local do DNA alvo. Em CRISPR/Cas13a o alvo de

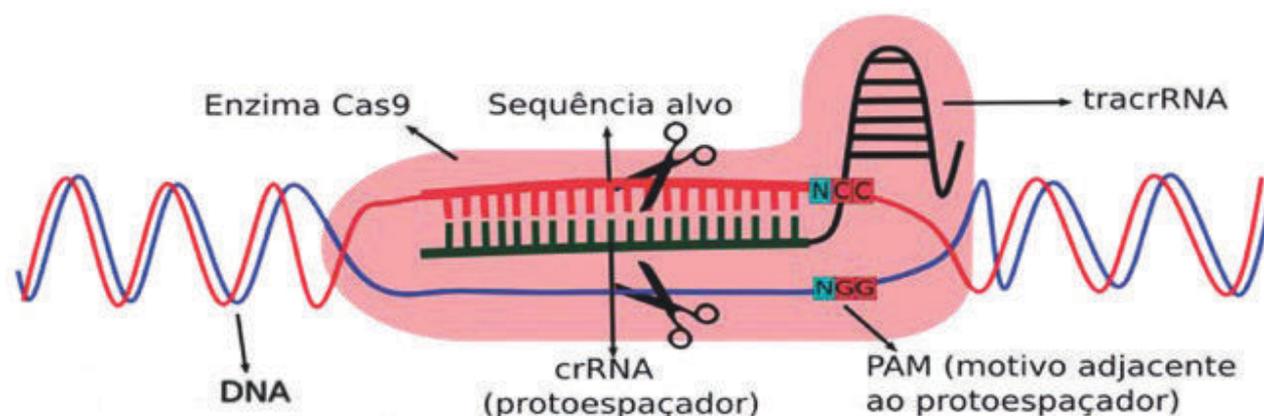


Figura 1. Esquema do reconhecimento e clivagem da sequência alvo pela enzima Cas9. Para o sistema CRISPR agir são necessárias duas fitas de RNAs: *tracrRNA* e *crRNA*; que juntas funcionam com guias para a enzima Cas9. Um detalhe principal em CRISPR/Cas9 é a necessidade do sistema reconhecer a sequência alvo do corte. Sendo assim *crRNA* pode ser customizada de acordo com a região do DNA que se deseja cortar. Outra particularidade é que o alvo deve ser 3 nucleotídeos a montante da sequência NGG, chamada de região PAM.

Fonte: Adaptado de FERNANDES, 2018.

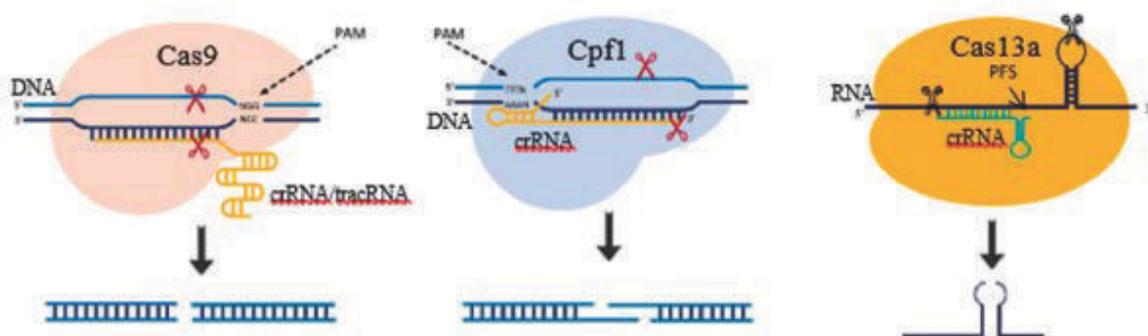


Figura 2. Diferenças nos sistemas CRISPR/Cas9, Cpf1 e Cas13a. Cada sistema possibilita diferentes estratégias de edição gênica.
Fonte: Adaptado de Zaidi; Mahfouz; Mansoor, 2017 e Abudayyeh, et al, 2016.

clivagem não é o DNA e sim o RNA. Outra diferença em Cas13a é a região PFS (sequência flanqueadora do protoespaçador), que é análoga à sequência PAM para Cas9 e consiste em um único par de bases A, U ou C. A existência de variantes raras implica que tipos e subtipos adicionais ainda precisam ser caracterizados (MAKAROVA et al., 2015).

O grande interesse suscitado pela tecnologia CRISPR/Cas9 é ser facilmente programável para reconhecer e clivar sítios específicos de um gene alvo e, portanto, passível de ser usada para edição de genomas.

No sistema CRISPR/Cas9 não há necessidade de cortar genes de animais ou bactérias e colocar dentro de plantas. Nesta tecnologia, para realizar mudanças de interesse, os códigos genéticos das plantas são reeditados em regiões específicas.

Em teoria, com esta técnica é possível modificar qualquer gene de interesse. Sendo assim, os cientistas podem utilizar o sistema CRISPR/Cas9 para modificar com precisão a sequência do genoma de qualquer organismo de forma mais rápida, mais barata, precisa e altamente eficiente na edição de genomas quando comparado com as nucleases TALEN e ZFN, e é menos controverso que as técnicas de produção de transgênicos convencionais (Tabela 1). Ainda é de longe muito mais preciso do que os cruzamentos mendelianos, reduzindo em anos ou mesmo décadas o tempo necessário para desenvolver novas variedades de culturas para os agricultores (ZHANG et al., 2017).

A tecnologia CRISPR já revolucionou as pesquisas em ciências da vida e tem provocado uma verdadeira corrida biotecnológica aplicada ao agronegócio. O Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT) publicou que a tecnologia CRISPR/Cas9 foi a maior descoberta de biotecnologia do século (REGALADO, 2016).

Tabela 1. Comparação das propriedades das quatro principais ferramentas de edição do genoma.

Propriedades	ZFNs ¹ (2003)	TALENs ² (2010)	CRISPR/Cas ³ (2012)
Proteínas (n°)	2	2	1+1 RNA
Realização	Não muito fácil	Fácil	Muito fácil
Custo Produção (€)	5.000	1.000	10
Tempo necessário	Meses	Semanas	Dias

¹ZFNs: Zinc-finger nucleases; ²TALENs: Transcription Activator-Like Effector Nucleases; ³CRISPR/Cas: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.

Fonte: Bertrand Dagallier-OECD (Comunicação Pessoal, 2018).

DA FICÇÃO À REALIDADE: ALIMENTOS JÁ EDITADOS POR CRISPR/CAS9

Muitos são os desafios relativos à aplicação de CRISPR/Cas9. Embora os genomas de muitas plantas tenham sido sequenciados, a função da grande

maioria dos genes permanece desconhecida. Em outras palavras, não alcançamos o completo nível de entendimento das funções dos principais genes de plantas. Entretanto, as análises de dados de sequenciamento de próxima geração (NGS) e os estudos de associação genômica ampla (GWAS) têm possibilitado prever a função de muitos genes. Pelo processo evolutivo e algumas centenas de anos, mudanças nos genes poderiam ocorrer por mutações naturais. Com a edição gênica orientada por CRISPR/Cas9, estas modificações genéticas não foram consideradas transgênicas.

A aplicação de CRISPR/Cas9 para a melhoria de alimentos foi relatada muito recentemente. A maioria das edições gênicas já realizadas usando CRISPR/Cas9 baseou-se na deleção direcionada do DNA, em que ocorreu apenas o desligamento de genes nativos, sem a necessidade de incluir novos genes de outras espécies:

- O tomateiro é infectado pelo fungo *Oidium neolycopersici*, agente causal da doença do oídio. O gene *SIM1o1* do tomateiro foi escolhido como alvo de deleção, porque este gene é o principal causador da vulnerabilidade ao patógeno. Como resultado, a planta editada com a deleção demonstrou resistência ao patógeno *Oidium neolycopersici* (NEKRASOV et al., 2017).

- A deleção dos genes *SIAGL6* do tomateiro produziu frutos partenocárpicos com grande interesse para indústria de processamento. Esta nova cultivar de tomateiro apresentou tolerância a altas temperaturas, e as plantas foram capazes de produzir frutos sob condições de estresse por calor (KLAP et al., 2017)

- Desenvolvimento de uma variedade de arroz que produz de 25% a 31% de grãos a mais, através da modificação de 13 genes associados na produção do fitormônio ácido abscísico. Simultaneamente, a mutação dos genes que codificam os receptores ABA de resistência à pirabactina 1-like 1 (*PYL1*), *PYL4* e *PYL6* ocasionaram o crescimento aprimorado e o aumento no rendimento de grãos no arroz (MIAO, 2018).

- Em outra pesquisa, uma alteração simultânea em

três genes de arroz (*GW2*, *GW5*, *TGW6*) que regulam negativamente o tamanho da semente resultou no aumento significativos do tamanho e peso da semente em até 30% (XU et al., 2016).

- O fator de iniciação da tradução eucariótica, *eIF4E*, e sua isoforma, *eIF4E(iso)*, desempenham papéis fundamentais pela célula para a tradução na síntese proteica. Entretanto, muitos vírus de RNA em plantas se utilizam dos fatores *eIF4E* e *eIF4E(iso)* para manter sua multiplicação durante a infecção. A inativação de um dos fatores não causa danos aparentes nas plantas. Em pepino, o fator de iniciação *eIF4E* foi inativado. Sem este fator disponível, os vírus testados não conseguiram mais causar doenças no pepino (CHANDRASEKARAN et al., 2016)

- A alteração do fator de iniciação *eIF4E(iso)* em mandioca permitiu um aumento da resistência à doença da mancha marrom da mandioca, provocado pelo *Ipomovirus* (GOMEZ et al., 2018).

- A bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* é o agente causador da doença cancro cítrico, extremamente devastadora nos pomares cítricos, tanto no Brasil como em outras regiões produtoras do mundo. A deleção de diferentes alelos do gene *CsLOB1* presentes em toranja possibilitou o desenvolvimento de frutos resistentes ao cancro cítrico (PENG et al., 2017).

- Cultivares de milho, soja e arroz resistentes aos herbicidas também foram obtidos através da edição dirigida do gene *ALS1*, responsável por uma enzima chave para a biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada e alvo principal para herbicidas importantes, incluindo clorosulfurão e bispiribaque sódico (SUN, et al., 2016)

- Em um ensaio de expressão transiente, a interrupção do gene *TcNPR3*, um supressor da resposta de defesa do cacauero, possibilitou um aumento da resistência do tecido foliar à infecção do agente etiológico do cacau *Phytophthora tropicalis* (FISTER et al., 2018).

- Em arroz, a inativação dos genes *OsSWEET11* e *OsSWEET14* aumentou a resistência à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryza* causadora da queima do arroz. Já a interrupção do gene *OsERF922*, maior resistência ao

fungo *Magnaporthe oryzae*, patógeno da brusone, a doença considerada como uma das mais importantes do arroz (KARKUTE et al., 2017)

- A família do gene da gliadina do trigo contém quatro peptídeos altamente estimulantes. A α -gliadina, juntamente com glutenina, formam o glúten. A α -gliadina é o principal grupo proteico associado ao desenvolvimento da doença celíaca. Recentemente foi apresentando um trigo com baixo teor α -gliadinas. Esta nova cultivar de trigo sem glúten poderia ser usada para produzir alimentos com baixo teor de glúten (SÁNCHEZ-LEÓN et al., 2018).

- No cogumelo comestível *Agaricus bisporus*, genes que codificam a polifenol oxidase são responsáveis por uma enzima envolvida no processo de escurecimento. As deleções dirigidas inativando estes genes reduziram a atividade da enzima, resultando em cogumelos com maior o tempo de validade nas prateleiras. Este foi o primeiro organismo editado por CRISPR sem a necessidade de regulamentação do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), órgão responsável pela autorização de produção de alimentos geneticamente modificados (WALTZ, 2016). Com um passe livre do governo americano, alimentos editados por CRISPR chegam ao mercado em tempo recorde.

- A DuPont Pioneer obteve aprovação comercial nos EUA para produzir milho que produz 100% de amilopectina, de maior valor agregado para indústrias de produção de papel. Este milho foi editado desligando a via da produção de amilose (WALTZ, 2018). Ressalta-se que, naturalmente, o milho produz dois tipos de amidos: amilopectina (75%) e amilose (25%), sendo que este milho foi editado, desligando-se a via da produção de amilose.

- No Brasil, estão em desenvolvimento estudos de edição gênica em soja, algodão, milho e cana-de-açúcar, visando à obtenção de cultivares resistentes a pragas e doenças e ainda tolerantes a estresses ambientais.

PESQUISAS COM MAMÃO NO ESPÍRITO SANTO

Entre as frutas da pauta de exportação brasileira, o mamão (*Carica papaya* L.) ocupa a sexta posição com cerca de 5,4% do total de frutas exportadas e 2,4% do que o país produz de mamão. O Brasil é o segundo maior produtor de mamão depois da Índia, com mais de 1,6 milhões de toneladas, produzidas em mais de 32 mil ha, concentrando-se essa produção nos estados do Espírito Santo, Bahia e Rio Grande do Norte (VENTURA et al., 2017).

No entanto, um dos principais fatores limitantes da produção é a suscetibilidade do mamoeiro às viroses, principalmente o mosaico (PRSV-P) e a meleira (PMeV e PMeV-2).

O Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo (LBAA/UFES), em parceria com o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – (Incaper), tem desenvolvido metodologias para a detecção e o diagnóstico da meleira do mamoeiro, doença associada à infecção dupla pelos vírus PMeV e PMeV2 (ANTUNES et al., 2016). Nos trabalhos em andamento, os pesquisadores têm estudado como esse vírus interagem com a planta para desencadear os sintomas da doença durante o seu desenvolvimento, principalmente a exsudação do látex, principal sintoma da meleira e usado no manejo dos pomares através do *roguing*. Os mecanismos naturais do mamoeiro em resposta ao estresse gerado pela infecção têm resultado em uma ampla obtenção de dados de proteômica e transcriptômica (SOARES et al., 2016; MADROÑERO et al., 2018). Tais informações têm contribuído para o planejamento da interação planta x patógeno e da edição gênica pelo sistema CRISPR/Cas9, visando obter mamoeiros resistentes à doença.

Tais estratégias poderão ser aplicadas em quaisquer outras demandas em que a edição gênica pode ser aplicada. Neste sentido, o LBAA/UFES produz e mantém cultura de tecidos e células de mamoeiro, além de mudas em casa em vegetação (Figura 3).

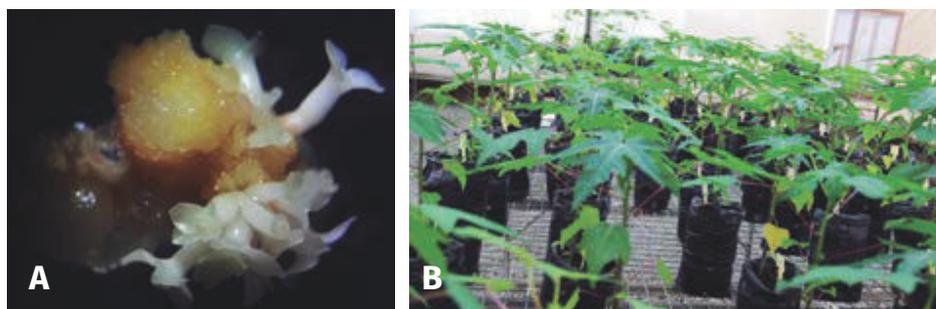


Figura 3. Culturas de tecidos de mamoeiro evidenciando a formação de *calus* (A); Mudas de mamoeiro em casa de vegetação (B).

ASPECTOS LEGAIS

Em âmbito internacional, a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) e o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança (PCB) estabelecem parâmetros para nortear as atividades que envolvem OGM e derivados.

Em 28 de março de 2018, a Secretaria de Agricultura dos EUA, Sonny Perdue, anunciou que o USDA não regulamentaria novas variedades de plantas desenvolvidas com novas tecnologias, como a edição do genoma, que produz plantas indistinguíveis daquelas desenvolvidas por métodos tradicionais de reprodução. Por outro lado, uma planta que inclui um gene ou genes de outro organismo, como bactérias, é considerada um OGM. Essa é outra razão pela qual muitos pesquisadores e empresas preferem usar o CRISPR na agricultura sempre que possível.

Para usar CRISPR/Cas9 em plantas, a abordagem padrão é inserir o gene “Cas9” e a sequência referente ao RNA guia, que juntos codificam as “máquinas de edição” CRISPR no DNA da célula da planta. Quando o gene Cas9 estiver ativo, ele localizará e reescreverá a seção relevante do genoma da planta, criando a nova característica. Posteriormente, através de cruzamentos clássicos é possível a obtenção de plantas editadas sem o gene da Cas9.

Uma questão a ser discutida entre todos os *players* do agronegócio, incluindo neste time os legisladores, a academia, o setor empresarial, os formadores de opinião e principalmente os consumidores, é se a edição genética deve ser comparada para todos os

fins com a modificação genética. Esta, no entanto, não é uma questão semântica como muitos querem colocar, mas tem sido levantada em debates nacionais e internacionais para tratar legalmente este tema.

A segunda economia do mundo, a República Popular da China, com um produto interno bruto de aproximadamente de 14 trilhões de dólares, também aderiu ao conceito do “GMO-friendly policies” que em português poderia ser traduzido como: Uma política amigável para os organismos geneticamente modificados.

A terceira economia do mundo, a comunidade europeia, com um produto interno bruto de aproximadamente de 17 trilhões de dólares (pós-BREXIT), vem discutindo se adere ao movimento de afrouxar os regulamentos. De acordo com a corte Europeia, esta adesão poderia colocar as empresas europeias de biotecnologia de volta ao jogo.

Nesse sentido, no Brasil, a Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105, de 24.3.2005) e o Decreto 5.591, de 22.11.2005, regulamentam o estabelecimento de normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de OGM e derivados (BORGES, 2018).

A avaliação de risco é atribuída à CTNBio, ficando a decisão política relativa à liberação comercial a cargo do Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS),

e a gestão de risco e a comunicação de risco são compartilhadas por todos os órgãos e instituições envolvidas no processo (BORGES, 2018).

As novas ferramentas biotecnológicas envolvendo microRNAs (miRNAs) e o CRISPR não promovem a construção de transgênicos no sentido tradicionalmente conhecido, já que são utilizados para expressar ou silenciar a expressão de um gene de interesse já existente na planta, visando introduzir as características desejadas de forma mais precisa (SABLOK et al., 2011). Considerando o potencial que as novas ferramentas biotecnológicas podem trazer, há necessidade de novas estratégias e um adequado planejamento integrado para permitir a sua regulamentação com base científica (BORGES, 2018; FLAVELL, 2017).

Foi apresentado que a utilização do CRISPR/Cas9 pode ocasionar grandes deleções de 1kb, e o mecanismo de reparo celular cria arranjos complexos, levando ao embaralhamento de genes (KOSICKI; TOMBERG; BRADLEY, 2018). Esta pesquisa foi realizada com células-tronco embrionárias de camundongos, células hematopoiéticas de camundongos e uma linhagem de células cancerígenas humanas. Estes resultados levam a um debate sobre a importância da investigação e o aprimoramento da tecnologia CRISPR, da modulação e adequação da enzima Cas9 e RNAs guias e ainda na diversidade de outras nucleases Cas. Uma técnica chamada edição por base, por exemplo, usa um sistema CRISPR modificado para trocar um nucleotídeo do DNA por outro sem cortar o DNA. Outra alternativa é usar Cas9 inativado fusionado a outras enzimas, tornando o direcionamento do RNA guia e o corte no DNA ainda mais específico (KOSICKI; TOMBERG; BRADLEY, 2018).

Neste contexto, os trabalhos realizados com a edição gênica por CRISPR/Cas9 em plantas causam menor impacto em questões éticas, pois se em uma planta for verificada alterações genéticas graves, esta será simplesmente descartada. Torna-se importante também a realização de testes de alergenicidade e toxicidade, no sentido de garantir o alimento seguro.

No Brasil, a CTNBio vem discutindo a questão e em sua Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro

de 2018, estabelece os requisitos técnicos sobre as técnicas inovadoras de melhoramento de precisão, em que se enquadram estas novas tecnologias de edição genética, tais como: nuclease do tipo dedo de zinco (ZFNs), Nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (TALENs) e, claro, CRISPR, entre outras. Esta normativa torna claro o conceito de que estas técnicas diferem fundamentalmente da transgenia clássica. A fundamentação para a norma baseou-se nas leis Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005 e a Lei nº 11.105, de 2005, que define moléculas de DNA/RNA recombinante, engenharia genética e organismo geneticamente modificado (OGM) nos incisos III, IV e V de seu art. 3º, respectivamente do marco legal brasileiro. Em junho de 2018, a CTNBio, entendeu que a levedura “Excellomol 4.0”, editada por CRISPR/Cas9, pela empresa GlobalYeast, não se enquadra na categoria de OGM, nos termos da Legislação Brasileira de Biossegurança e Resolução Normativa Nº 16. Este foi o primeiro caso no Brasil favorável à liberação comercial de um micro-organismo utilizando as TIMPs.

Desta forma, o Brasil deve, com urgência, discutir e implementar mudanças nas diretrizes e legislação do marco legal de Ciência, Tecnologia e Inovação, assim como a Lei de Propriedade Industrial (nº 9.279/96) e a Lei da Proteção de Cultivares (nº 9.456/97) para se tornar competitivo neste mercado.

Isto posto, as economias relevantes estão atentas à disrupção tecnológica que as técnicas inovadoras de melhoramento de precisão irão promover, criando um novo mercado e desestabilizando aqueles que antes o dominavam, podendo até causar, em curto prazo, a mudança de classificação das nações em relação aos seus produtos internos brutos. É o que chamamos da 2º revolução verde.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os EUA saíram na frente se posicionando sobre o melhoramento genético de alimentos usando a tecnologia CRISPR. Muitos pesquisadores no Brasil têm corrido contra o tempo para também serem

protagonistas nesta revolução. É urgente a alteração na legislação brasileira para que sejamos inseridos de forma competitiva neste novo mercado. A CTNBio vem discutindo a questão sobre as técnicas inovadoras de melhoramento de precisão, em que se enquadram estas novas tecnologias de edição genética.

No entanto, os resultados dos trabalhos realizados com a edição gênica por CRISPR/Cas9 e seus impactos em questões éticas relacionados ao embaralhamento de genes devem ser cuidadosamente avaliados no sentido de garantir segurança para as pessoas, animais e meio ambiente e disponibilizar no mercado um alimento seguro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte financeiro recebido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- ABUDAYYEH, O. O. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. **Science**. v. 353, n. 6299, p. aaf5573, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573> Acesso em: 13 jul. 2018.
- ANTUNES, T. F. S. et al. The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. **PLoS One**, v. 11, mai. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155240> Acesso em: 13 jul. 2018.
- BORGES, B.J.P. **Regulamentação de Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados**: uma abordagem a partir da dinâmica da ciência. 2018. 75f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES. 2018.
- CHANDRASEKARAN, J. et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. **Mol Plant Pathol**. v.17, n.7, p.1140-53. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mpp.12375> Acesso em: 13 jul. 2018.
- CHEN KLAP, E. Y. et al. Tomato facultative parthenocarp results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 5, p. 634, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pbi.12662> Acesso em: 13 jul. 2018.
- CIB. Conselho de Informações sobre Biotecnologia. **20 anos de transgênicos no Brasil**. fev. 2018. Disponível em: <https://cib.org.br/20-anos-de-transgenicos-no-brasil/> Acesso em: 13 jul. 2018.
- CTNBio. Comissão Técnica Nacional De Biossegurança Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Tabela de Plantas - Uso Comercial**: Plantas Geneticamente modificadas aprovadas para Comercialização. mai., 2018. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/-/document_library_display/SqhWdohU4BvU/view/1684467#/liberacao-comercial/consultar-processo> Acesso em: 13 jul. 2018.
- FERNANDES, P.M.B. **Biotecnologia branca para um mundo verde**. Curitiba: Editora CRV, 2018. 118p.
- FLAVELL, R. B. Innovations continuously enhance crop breeding and demand new strategic planning. **Global Food Security**, v. 12, p.15-21, 2017.
- FISTER, A., S. et al. Transient Expression of CRISPR/Cas9 Machinery Targeting TcNPR3 Enhances Defense Response in Theobroma cacao. **Front. Plant Sci.**, Mar., 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00268> Acesso em: 13 jul. 2018.
- GOMEZ, M. A. et al. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. **bioRxiv**. p. 209874, jun., 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/209874> Acesso em: 13 jul. 2018.
- KARKUTE, S. G. et al. CRISPR/Cas9 Mediated Genome Engineering for Improvement of Horticultural Crops. **Frontiers in Plant Science**. 8, 1635. sep., 2017. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.01635> Acesso em: 13 jul. 2018.
- KLAP, C., et al. Tomato facultative parthenocarp results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function. **Plant Biotechnology Journal**, v.15, n.5, p.634-647, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pbi.12662> Acesso em: 13 jul. 2018.
- KOSICKI, M.; TOMBERG, K.; BRADLEY, A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. **Nature Biotechnology**, v. p.1-7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.4192> Acesso em: 13 jul. 2018.
- MADROÑERO, J. et al. Transcriptome analysis provides insights into the delayed sticky disease symptoms in Carica papaya. **Plant Cell Rep.**, v. 1, jul., 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2281-x> Acesso em: 13 jul. 2018.
- MAKAROVA, K. S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology** v. 13, n. 11, p. 722, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569> Acesso em: 13 jul. 2018.
- MIAO, C. et al. Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. **PNAS**. 201804774, May 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1804774115> Acesso em: 13 jul. 2018.

- NASEM. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects. Washington, DC: **The National Academies Press**. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.17226/23395>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- NEKRASOV, V. et al. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, p. 482, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00578-x>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- PENG, A. et al. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 12, p. 1509-1519, 2017. Disponível em: <<http://doi.org/10.1111/pbi.12733>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- REGALADO A. Who Owns the Biggest Biotech Discovery of the Century? **MIT Technology Review**. Dec., 2014. Disponível em: <<https://www.technologyreview.com/s/532796/who-owns-the-biggest-biotech-discovery-of-the-century/>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- SABLOK, G. et al. Artificial microRNAs (amiRNAs) engineering-On how microRNA-based silencing methods have affected current plant silencing research. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 406, n. 3, 315–319, 2011.
- SÁNCHEZ-LEÓN, S. et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. **Plant biotechnology journal**, v. 16, n. 4, p. 902-910, 2018. Disponível em: <<http://doi.org/10.1111/pbi.12837>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- SANTAMARÍA. et al **Situación actual de la industria papayera**. Mérida: CONACYT/CICY, 2017, p.23-33.
- SOARES, E. A et al. Label-free quantitative proteomic analysis of pre-flowering PMeV-infected Carica papaya L. **Journal of Proteomics**, v. 1, jan., 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.025>> Acesso em: jun 2018
- SUN, Y. et al. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. **Molecular Plant**, v. 9, n. 4, p. 628-631, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.001>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- SWANSON-WAGNER, R. et al. Reshaping of the maize transcriptome by domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 29, p. 11878-11883, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1201961109>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- VENTURA, J.A. et al. **Situación actual de la industria papayera**. Mérida: CONACYT/CICY, 2017, p.23-33.
- WALTZ, E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. **Nature**. 532, 293. Apr., 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature.2016.19754>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- WALTZ, E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. **Nature Biotechnology**. Jan., 2018 Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nbt0118-6b>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- XU, R, et al. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. **Journal of genetics and genomics**, v. 43, n. 8, p. 529-532, 2016., Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.07.003>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- ZAIDI, S. S; MAHFOUZ, M. M.; MANSOOR, S. CRISPR-Cpf1: a new tool for plant genome editing. **Trends in plant science**, v. 22, n. 7, p. 550-553, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.05.001>> Acesso em: 13 jul. 2018.
- ZHANG, H. et al. Genome Editing—Principles and Applications for Functional Genomics Research and Crop Improvement. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.36, n.4, p.291-309. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1402989>> Acesso em: 13 jul. 2018.