

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA

Autorização Decreto nº 9237/86. DOU 18/07/96.  
Reconhecimento: Portaria 909/95, DOU 01/08-95

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIAS  
SOCIAIS

CAMPUS III – JUAZEIRO

Colegiado de Engenharia Agrônômica



**LUCAS SILVA RIOS**

**CRISPR-CAS9: UMA NOVA ERA NO MELHORAMENTO DE  
PLANTAS?**

JUAZEIRO-BA

2022

**LUCAS SILVA RIOS**

**CRISPR-CAS9: UMA NOVA ERA NO MELHORAMENTO DE  
PLANTAS?**

Projeto de pesquisa apresentado à  
Universidade do Estado da Bahia,  
Departamento de Tecnologia e Ciências  
Sociais, UNEB/DTCS Campus III, Colegiado  
de Engenharia Agrônômica como pré-requisito  
para a disciplina Trabalho de Conclusão de  
Curso – TCC.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Joselita Cardoso de  
Souza

JUAZEIRO-BA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Regivaldo José da Silva/CRB-5-1169

R586c

Rios, Lucas Silva

CRISPR-CAS9: uma nova era no melhoramento de plantas? / Lucas Silva  
Rios. Juazeiro, BA, 2022.  
47 fls.: il.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Joselita Cardoso de Souza.

Inclui Referências

TCC (Graduação - Engenharia Agrônoma) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais. Campus III. 2022.

1. Melhoramento genético. 2. Engenharia genética. 3. Biotecnologia vegetal. 4. Edição genômica. I. Souza, Joselita Cardoso de. II. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais. III. Título.

CDD: 631.5233

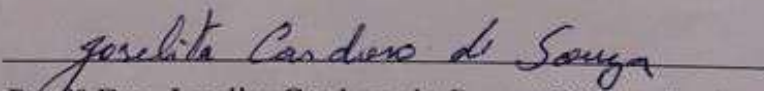
LUCAS SILVA RIOS

**CRISPR-CAS9: UMA NOVA ERA NO MELHORAMENTO DE  
PLANTAS?**

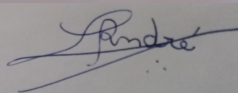
Monografia apresentada à Universidade do  
Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia  
e Ciências Sociais, UNEB/DTCS campus III,  
Curso de Engenharia Agrônômica, como um  
dos pré-requisitos para a disciplina de  
Trabalho de conclusão de curso – TCC.

Aprovado em 12/07/2022

BANCA EXAMINADORA


  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Joselita Cardoso de Souza (Orientadora)

Universidade do Estado da Bahia – Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais - III



Prof. Dr. André Luís Lopes da Silva

Universidade do Estado da Bahia – Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais - III

  
Prof. Dra. Cristiane Domingos da Paz

Universidade do Estado da Bahia – Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais - III

*Não há exemplo maior de dedicação do que o da nossa família. À minha querida família, que tanto amo, em especial aos meus pais., em prol do esforço por eles realizado ao longo deste tempestuoso período.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por ter me guiado em meio a essa trajetória difícil, por sempre me dar forças para continuar a lutar, por sempre ter sido meu refúgio e por nunca ter me deixado faltar fé.

Agradeço de forma muito especial e honrosa aos meus amados pais (Rogério Rios Oliveira) e (Luzenir Silva Monteiro Oliveira) por todos os ensinamentos de coragem, honra, honestidade, humildade e respeito.

Agradeço a minha irmã (San Mara Silva Rios) por toda sua ternura, bondade e companheirismo.

Agradeço de forma calorosa a Thais Cristina, minha companheira de graduação na Universidade do Estado da Bahia por toda sua ajuda e incentivo.

Agradeço com muito afago a Manuela Silva e Rebeca Cavalcante.

Agradeço aos colegas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em especial a Victoria Lacerda, Wellington Silva, Heloise Surlo, Camila Silva, Weyla Carvalho e Marcos Roberto por nunca me fazerem duvidar do grande potencial que existe dentro de mim.

Agradeço ao grupo de estudos em cultura de tecidos por me despertar a curiosidade e o amor pelo aprendizado em melhoramento genético de plantas, fica aqui meu muito obrigado pela oportunidade e confiança.

Agradeço, a todos os colegas que tive a oportunidade de conhecer e quando possível ajudar durante a graduação em Engenharia Agrônômica, todos vocês sem duvidas, foram incentivo para conclusão deste curso.

Agradeço em especial aos colegas Jardel Viana, Jaine Araújo, Tainá Ferreira, Shirlan Feitosa, Cinthia Carolinne, Naiane dos Santos minha dupla inesquecível, Jaqueline Gomes, Anny Carlyne, Iana Júlia Meneses e Alessandro Rosa.

Agradeço a todos os professores da Universidade do Estado da Bahia que contribuíram com minha formação, em especial: Maria Herbênia, Cristiane da Paz, Joselita Cardoso, Lindete Martins e Jairton Fraga.

Agradeço a todos os funcionários colaboradores da UNEB, sem eles, nada disso seria possível.

**RESUMO:**

A edição genômica está se tornando uma importante ferramenta para o melhoramento de plantas. O surgimento e disseminação da técnica CRISPR, e principalmente, a CRISPR-Cas9, tem proporcionado uma nova revolução nos trabalhos de melhoramento genético, garantindo o progresso da pesquisa biotecnológica. As grandes vantagens desta tecnologia são a capacidade para a alteração de regiões específicas do DNA e o baixo custo dos insumos necessários, quando comparada com outros métodos de edição genética. Por outro lado, discussões sobre esse tipo de manipulação devem ser realizadas para garantir o progresso consciente de toda a sociedade. Assim, o presente trabalho de revisão busca reunir informações sobre o uso de CRISPR na agricultura utilizando buscas em plataformas acadêmicas como: Google Acadêmico, Elsevier, Scielo e Portal de periódicos da Capes (CAFe) com palavras-chave direcionadas ao tema: CRISPR, CRISPR-Cas9, conjunto de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas e edição de genomas, que posteriormente foram selecionados conforme a qualidade e relevância com o tema proposto, estabelecendo-se critérios de inclusão e exclusão para delimitar apenas os artigos que possam nortear a resposta da seguinte pergunta “CRISPR-Cas9: uma nova era no melhoramento de plantas?”. Como demonstrado nessa revisão bibliográfica, o melhoramento genético de plantas vai evoluindo. Porém, a humanidade necessita de uma manipulação genética responsável, respeitadora e protetora da vida, e não de uma ciência manipuladora, interessada unicamente nos interesses econômicos.

**Palavras-chave:** Melhoramento Genético; Engenharia Genética; Biotecnologia Vegetal; Edição genômica.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Desenvolvimento da técnica CRISPR em bactérias compreendendo o período de 1987 a 2022.....	15
<b>Figura 2</b> – Esquematização dos locos sistema CRISPR-Cas9.....	16
<b>Figura 3</b> – Transcrição das sequencias repetidas e espaçadores como um pré- crRNA que será processado em pequenos crisprRNA.....	18
<b>Figura 4</b> – Para o sistema CRISPR agir são necessárias duas fitas de RNAs: tracRNA e crRNA; que juntas funcionam com guias para a enzima Cas9.....	18
<b>Figura 5</b> – Reprodução da ferramenta de imunidade CRISPR-Cas em procariotos.....	19
<b>Figura 6</b> – Mecanismos de reparo de DNA por união de extremidades não homólogas (NHEJ) ou por recombinação homóloga (HDR).....	21
<b>Figura 7</b> – A indução de duas quebras de fita dupla pode promover a deleção de sequências genômicas por NHEJ, de modo a reparar proteínas mutadas.....	26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Diversidade de proteínas Cas e suas múltiplas funções.....	17
<b>Tabela 2</b> – Comparação das características dos quatro principais instrumentos de edição genômica.....	23
<b>Tabela 3</b> – Aplicações de ferramentas de edição de genoma de primeira geração em plantas cultivadas.....	24
<b>Tabela 4</b> – Resumo das aplicações da técnica CRISPR nas principais culturas para melhoria de produtividade e qualidade.....	30
<b>Tabela 5</b> – Resumo de culturas resistentes a doenças causadas por fungos fitopatogênicos desenvolvidos via CRISPR-Cas9 .....	32

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**CRISPR** – Conjunto de repetições palindrômicas curtas e regularmente interespaçadas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats).

**Cas9** – Proteína Cas9 (associated protein 9).

**sgRNA** – RNA guia (single guide RNA).

**tracrRNA** – Trans ativante (trans-activating CRISPR RNA).

**PAM** – Proto-espaçador adjacente (protospacer adjacent motif).

**SSN** – Nucleases específicas de sequência programada.

**ZFNs** – Nucleases de dedo de zinco (Zinc Finger Nucleases).

**TALENs** – Nucleases Efetoras Semelhantes a Ativadores de Transcrição (transcription Activator-Like Effector Nucleases).

**DSB** – Quebra da fita dupla de DNA (double-stranded breaks).

**MNs** – Meganucleases.

**RNase** – Ribonuclease.

**HDR** – Recombinação do DNA dirigido por homologia.

**NHEJ** – Junção de extremidades não homólogas do DNA.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2. METODOLOGIA .....</b>	<b>10</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Desafios da agricultura .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Funcionamento do sistema CRISPR-Cas em organismos procariotos.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Funcionamento da técnica baseada no sistema CRISPR-Cas.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Comparação entre as técnicas de edição gênica utilizando Meganucleases, ZNFs, TALENs e CRISPR-Cas .....</b>	<b>18</b>
<b>3.5 Utilizações da ferramenta CRISPR-Cas na agricultura.....</b>	<b>22</b>
<b>3.6 Sistema CRISPR-Cas9 para resistência a doenças de plantas .....</b>	<b>28</b>
<b>3.7 Vantagens da utilização do sistema CRISPR-Cas.....</b>	<b>29</b>
<b>3.8 Considerações éticas de biossegurança da utilização da técnica de CRISPR-Cas .....</b>	<b>30</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>32</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O entendimento da estrutura tridimensional da molécula do DNA (ácido desoxirribonucleico) descoberta por Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins, originou uma nova era para a genética molecular, proporcionando o surgimento da engenharia genética (WATSON & CRICK, 1953).

O avanço da engenharia genética pode ser averiguado pelo surgimento de novas técnicas de manipulação gênica. Em 2012, as pesquisadoras Emmanuelle Charpentier, diretora do Instituto Max Planck de Biologia das Infecções, em Berlim, e Jennifer Doudna, da Universidade de Berkeley na Califórnia, elucidaram o uso do mecanismo CRISPR (conjunto de repetições palindrômicas curtas e regularmente interespaçadas) e sugeriram uma tecnologia para edição de genomas que, em poucos anos, se tornou a ferramenta mais utilizada em quase todos os laboratórios de biologia molecular do mundo. (DOUDNA & CHARPENTIER, 2020).

CRISPR é uma tecnologia adaptada do mecanismo natural de defesa de bactérias e envolve uma nucleasse, geralmente a Cas9, um RNA-guia e a sequência alvo. Em suma, permite a edição genômica, utilizando uma enzima capaz de promover o corte da fita dupla de DNA e a molécula de RNA, que direciona a atividade desta nuclease, para sítios específicos da molécula de DNA. Dessa forma, fazendo a substituição de sequências específicas do DNA é possível corrigir erros genéticos, inserir características benéficas, inibindo ou ativando determinado códon, segundo o desejo do aplicador (SGANZERLA & PESSINI, 2020; ANZALONE et al., 2020).

Diante desse cenário, a aplicação da biotecnologia de CRISPR-Cas9 tem demonstrado, com sucesso, que é possível realizar edições genômicas em organismos de forma a trazer benefícios a eles mesmos e aos seres humanos. Com isso, em teoria, com esta técnica é possível modificar qualquer gene, despertando grande interesse em diversas áreas de pesquisa científica, como nas áreas de medicina, farmácia e agricultura, no melhoramento genético de plantas e melhoramento animal.

Na agricultura, os programas de melhoramento genéticos de plantas utilizam técnicas para a criação de um produto, fazendo que o mesmo seja eficiente agronomicamente contra pragas e doenças, e, que tenha comportamento de tolerância às condições climáticas adversas, dentre outros objetivos. Das estratégias de edição

gênicas CRISPR, a que tem sido mais utilizada no melhoramento, é aquela que provoca uma alteração no DNA em um local específico (QUADROS et al., 2018). Com o CRISPR-Cas9, já disponível comercialmente, é possível aplicar esta técnica em diferentes organismos e diversos alvos genéticos, bem como, para desenvolvimento de novas pesquisas pelas suas criativas possibilidades de aplicação (AREND et al., 2017).

Segundo Nascimento (2020), a manipulação gênica sempre esteve envolta em polêmicas bioéticas. E, após ser realizada a manipulação do genoma de embriões humanos, ficou ainda mais claro que esses avanços devem ser utilizados com responsabilidade. A bioética surgiu das preocupações inerentes ao futuro das biotecnologias, que avançam cada vez mais, e de forma muito acelerada, juntamente com o crescimento da ciência e a ampliação do conhecimento, colocando em risco a própria vida na terra. Não há como negar que, em nome da ciência, várias pessoas fizeram experimentos em seres humanos, e coube à bioética limitar essas ações e apresentar os dilemas filosóficos a respeito do valor do ser humano.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi descrever o processo de uso da técnica de manipulação genética, utilizando a ferramenta CRISPR, discutir as suas principais aplicações e favorecimentos no melhoramento genético vegetal, e provocar uma reflexão sobre os limites éticos envolvidos na utilização dessa tecnologia.

## 2. METODOLOGIA

Esta monografia foi realizada por meio de uma revisão bibliográfica, estudo exploratório que provê elementos importantes sobre uma investigação atual de um tópico e pode recomendar direções futuras em outras pesquisas. Segundo Marconi & Lakatos (2013), essa modalidade de pesquisa se caracteriza a partir do registro disponível em livros, artigos, teses e documentos impressos. Dessa forma, os textos tornam-se fontes dos temas que serão trabalhados e pesquisados.

Na elaboração dessa revisão foram utilizados sites e plataformas acadêmicas como: Google Acadêmico, Elsevier, SciELO e Portal de periódicos da Capes (CAFe) com palavras-chave direcionadas ao tema: CRISPR, CRISPR-Cas9, conjunto de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas e edição de genômica. Serão utilizados trabalhos com no máximo oito anos de publicação (2014-2022)

Os artigos selecionados quando encontrados em língua inglesa foram traduzidos para língua portuguesa, que posteriormente foram escolhidos conforme a qualidade e relevância com o tema proposto.

A seleção dos estudos foi feita de acordo com as informações encontradas nas bases de dados, estabelecendo-se critérios de inclusão e exclusão em busca de delimitar apenas os artigos que possam nortear a resposta da seguinte pergunta “CRISPR-Cas9: uma nova era no melhoramento de plantas?”.

A coleta e avaliação desses dados iniciaram-se em meados de março, sendo prolongado até o mês de julho, onde foram ajustados e finalizados. A análise das informações foi realizada por meio de leitura exploratória do material encontrado, em uma abordagem descritiva.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Desafios da agricultura**

O setor agrícola está em constante transformação em busca de atender a demanda por alimentos de toda a população mundial. Nesse sentido, o agronegócio brasileiro tem sido um importante contribuinte, acarretando na geração de emprego e renda no país. Segundo dados de 2020, o agronegócio corresponde por mais de um quarto do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil (CNA, 2021).

A segurança alimentar é um direito humano, além disso, os alimentos devem ser de fácil acesso econômico e geográfico para a população mundial, tanto em relação à qualidade como a quantidade (FAO, 2014).

Segundo Paul & Qi (2016), a população mundial depende cada vez mais da agricultura, gerando demanda por vegetais com desenvolvimento mais eficiente, maior resistência às pragas, doenças e intempéries. O aperfeiçoamento de ferramentas que possam aumentar a produtividade de áreas, reduzindo o impacto ambiental e o uso de insumos químicos, representará de fato o desenvolvimento de uma agricultura mais limpa e menos impactante no meio ambiente, trazendo assim, cultivos mais sustentáveis.

Historicamente, o desenvolvimento de cultivares com características desejáveis, tais como maior produtividade, resistência a pragas ou maior valor nutricional, baseou-se principalmente em métodos de seleção de alelos favoráveis de ocorrência natural ou induzidos por mutagenese. Apesar de sua enorme contribuição, esses métodos apresentam limitações, tais como a seleção fenotípica sem conhecimento das bases moleculares e fisiológicas envolvidas (PURUGGANAN & FULLER, 2009).

Entretanto, com a utilização constante desses métodos, a variabilidade genética foi bastante reduzida por causa de anos de seleção direcionada, buscando a evolução dessas espécies de interesse, o que limita o potencial de melhoramento para muitas características (CHEN et al., 2019). É, portanto, notório que novas estratégias e procedimentos sejam utilizados para reduzir o tempo e os custos do melhoramento genético. Nesse sentido, a edição genômica em plantas é uma importante ferramenta

para o aumento da produtividade e não somente em quantidade, mais sim em qualidade e segurança alimentar dos produtos produzidos.

### 3.2 Funcionamento do sistema CRISPR-Cas em organismos procariotos

A busca por entendimento do sistema CRISPR-Cas9 teve início em 1987 e, a partir disso, seu avanço e a divulgação da técnica mostrou-se bastante acelerado até os dias atuais, como pode ser visualizado na figura 1.

Primeira descrição de uma sequência de repetições no genoma de bactérias (ISHINO et al., 1987 )	1987	(MOJICA et al., 2000 )
Surgimento do termo CRISPR e identificação do gene CAS (JANSEN et al., 2002 )	2000	Identificado CRISPR-Cas9 presente em procariontes
	2002	(MOJICA et al., 2005; POURCEL et al., 2005 & BOLOTIN et al., 2005 )
	2005	Identificação do proto-espaçador PAM
Relato do CRISPR como um mecanismo de imunidade adaptativa (BARRANGOU et al., 2007 )	2007	(BROUNS et al., 2008)
	2008	Entendimento da transcrição do DNA em crRNAs e sgRNAs específico do alvo CRISPR
Descoberta que a Cas9 cliva o local de destino por meio da quebra da fita dupla em local específico (GARNEAU et al., 2010)	2010	(JINEK et al., 2012 )
	2012	Reconhecimento da Cas9 como a endonuclease responsável por conduzir o processo de CRISPR
Primeira utilização de CRISPR-Cas9 em eucariotos (CONG et al., 2013 )	2013	(SHAN et al., 2014 )
	2014	Mais de 700 publicações sobre o sistema CRISPR associado à edição do DNA
Multiplicação da técnica CRISPR-Cas9 em laboratórios de todo o mundo (OUSTEROUT et al., 2000 )	2015	(OUSTEROUT et al., 2015 )
	2016	Edição de embriões humanos por meio do CRISPR-Cas9
Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna ganham o premio nobel de química (RIOS, 2022 )	2020	(RIOS, 2022 )
	2022	Mais de 273.000 resultados na busca de "CRISPR-Cas9" no Google acadêmico

Figura 1 – Desenvolvimento da técnica CRISPR em bactérias compreendendo o período de 1987 a 2022

Fonte: O autor (2022); Adaptado de RAZZAQ, et al., (2019); DIAS & DIAS, (2018)

Dessa forma, tudo teve início quando identificaram uma região no genoma da bactéria *Escherichia coli* com função desconhecida, contendo uma série de regiões repetidas intercaladas por regiões não repetidas ou espaçadoras (CARNEIRO & CARNEIRO, 2020).

Em busca do entendimento da função desta região, pesquisas determinaram que os fragmentos de DNA (espaçadores), presentes entre as regiões repetitivas, eram derivados de fagos invasores. Além disso, as bactérias que guardavam em sua

memória a sequência gênica do invasor nas regiões espaçadoras não eram infectadas uma segunda vez pelo mesmo fago (BOLOTIN et al., 2005).

Segundo Rath et al (2015), o CRISPR é um arranjo de pequenas sequências repetidas, intercaladas com espaçadores de sequências diferentes, presente no DNA de bactérias. Os espaçadores são provenientes de genomas virais ou plasmidiais. Novos vírus podem ser reconhecidos pelo sistema CRISPR quando um novo espaçador, desse vírus, é inserido no genoma bacteriano, sendo essa alteração transmitida à sua prole. Os espaçadores são inseridos de um único lado do loco CRISPR, dessa forma, o sistema serve como um arquivo cronológico dos vírus e plasmídeos que a célula bacteriana e sua prole encontraram.

O sistema CRISPR atua em conjunto com genes denominados Cas, geralmente localizados adjacentes a cada loco CRISPR. Existe ainda uma sequência líder, que age como um promotor (Figura 2).



Figura 2 – Esquemática dos locos presentes em sistema CRISPR-Cas9 onde se observa a posição dos genes *Cas*, a sequência líder que atua como um promotor e o loco CRISPR contendo os espaçadores provenientes dos vírus e as sequências repetidas (DR).

Fonte: MACHADO, (2019)

Dependendo das proteínas Cas específicas no genoma, famílias de genes CRISPR-Cas têm sido identificadas. Estes genes codificam uma variedade de polimerases, nucleases, helicases e outras proteínas envolvidas no funcionamento do sistema CRISPR (Tabela 1). Atualmente, 93 genes Cas diferentes foram identificados e classificados em 35 famílias com base nas semelhanças de suas sequências (MAKAROVA et al., 2015).

As proteínas Cas desempenham um papel importante na deleção de sequências invasoras interceptadas no DNA. Enquanto o CRISPR armazena as sequências de DNA do agente invasor em sua “memória imunológica”, a Cas é direcionada para clivar essa determinada região do DNA invasor, com alta especificidade (WIEDENHEFT et al., 2012).

Tabela 1 – Diversidade de proteínas Cas e suas múltiplas funções

<b>Tipo da proteína</b>	<b>Função</b>
Cas1	DNA nuclease
Cas2	RNA nuclease
Cas3	DNA nuclease e helicase
Cas4	DNA nuclease
Cas5	Processamento de pré-crRNA
Cas6	Processamento de pré-crRNA
Cas7	Reconhecimento de RNA, ligação de crRNA
Cas8	Grande subunidade do complexo de defesa antiviral
Cas9	DNA nuclease
Cas10	Grande subunidade do complexo de proteínas
Cas11	Pequena subunidade de complexos efetores
Cas12	Processamento de crRNA, DNA nuclease
Cas13	Processamento de crRNA, DNA nuclease

Fonte: Adaptado de NIDHI et al., (2021)

O funcionamento do sistema CRISPR requer a transcrição do arranjo das sequências repetidas e espaçadores, transcrita em uma longa cadeia precursora de RNA, o pré cr-RNA, que será processado em pequenos CRISPR-RNAs, com cerca de 57 nucleotídeos, que contém um espaçador flanqueado por duas repetições parcialmente conservadas (Figura 3).

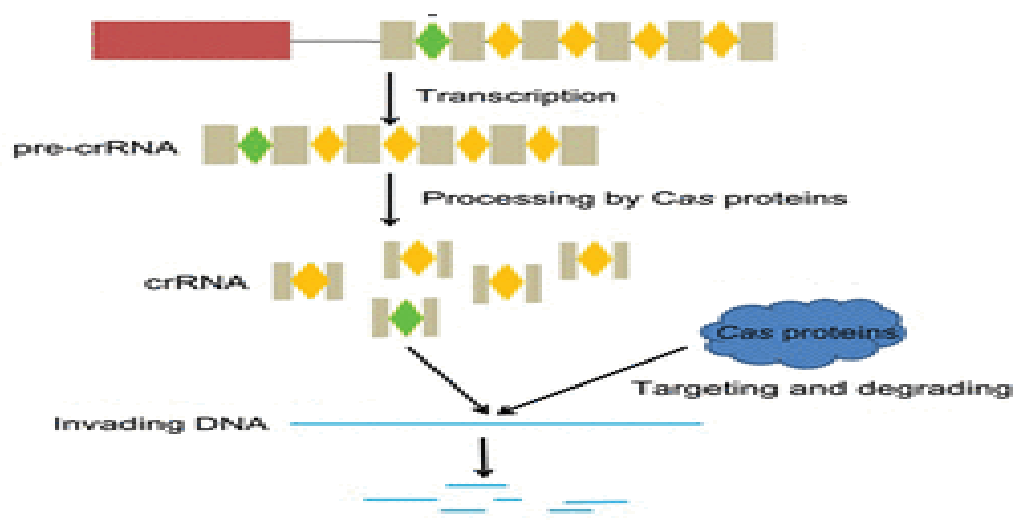


Figura 3 – Transcrição das sequências repetidas e espaçadores como um pré- crRNA que será processado em pequenos crispr-RNA, contendo um espaçador flanqueado por duas repetições.

Adaptado de ZHANG, et al., (2016)<sup>1</sup>

Complementando o sistema há um segundo RNA não codificante, o trans-ativante crispr-RNA (tracrRNA), que forma uma cadeia dupla de RNA que é clivada e processada pela ribonuclease (RNase) III (figura 4). A forma duplex de crRNA-tracrRNA associa-se com a nuclease Cas9 e forma um complexo responsável pelo reconhecimento e clivagem do DNA invasor (CONG et al., 2013; MALI et al, 2013).

No corte do DNA invasor (alvo), a enzima Cas reconhece sequências de 2 a 6 pares de bases, situada três a quatro nucleotídeos depois do sítio de corte, no DNA alvo. Esta curta sequência é identificadas pela sigla PAM (do inglês protoespacer adjacent motif). Portanto, o sítio PAM é uma região de reconhecimento, necessário para que a endonuclease Cas efetue o corte no DNA.

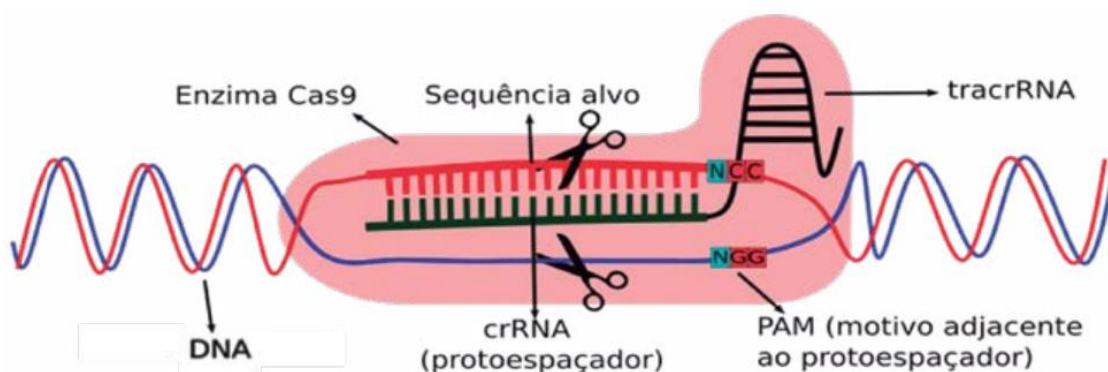


Figura 4 – Para o sistema CRISPR agir são necessárias duas fitas de RNAs: tracrRNA e crRNA; que juntas funcionam com guias para a enzima Cas9.

Fonte: Adaptado de FERNANDES (2018)

As sequências de reconhecimento PAM são específicas para cada endonuclease presentes nas diferentes bactérias. Na *Streptococcus pyogenes*, a endonuclease Cas9 reconhece a sequência PAM 5'-NGG-3' (N pode ser qualquer base no nucleotídeo). Entretanto, a enzima Cas do *Staphylococcus áureos*, reconhece uma sequência diferente.

A figura 5 resume o funcionamento do sistema de defesa CRISPR em bactérias e a captura e inserção de pequenos pedaços de DNA, advindos da invasão por vírus ou plasmídeos, ao genoma da bactéria e, contra os quais ela adquire resistência. Estes fragmentos do DNA invasor são guardados no genoma da bactéria, como uma “memória da infecção”.

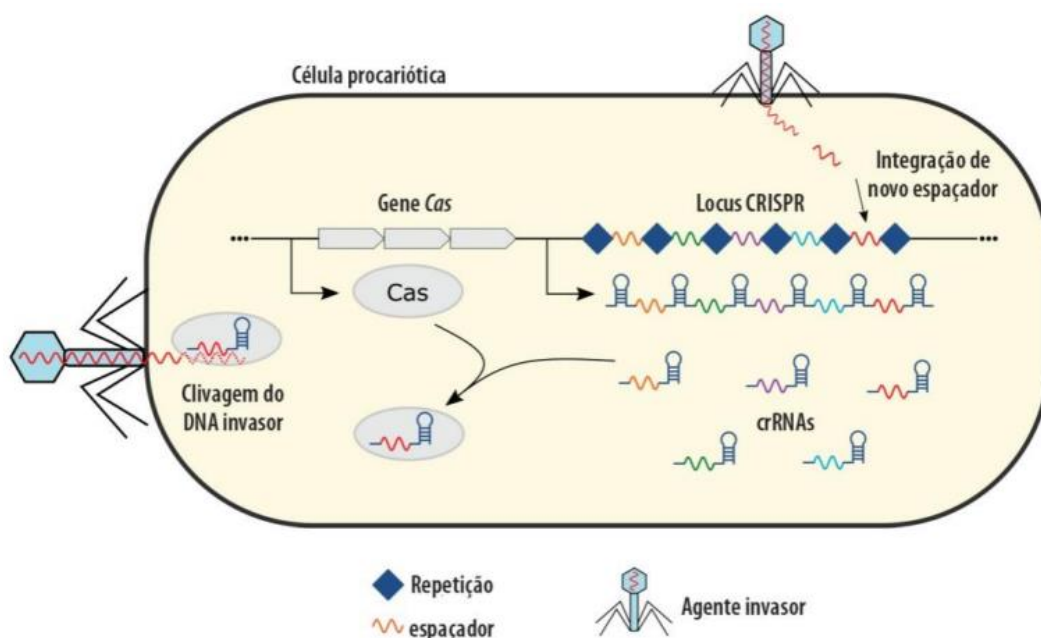


Figura 5 – Reprodução da ferramenta de imunidade CRISPR-Cas em procariotos.

Fonte: LOPES FILHO et al., (2020)

### 3.3 Funcionamento da técnica baseada no sistema CRISPR-Cas

As ferramentas de edição de genoma baseadas em CRISPR-Cas consistem em dois elementos fundamentais, um RNA guia único (sgRNA) que foi adaptação para a edição genômica contendo anteriormente dois RNAs e a nuclease Cas9. O complexo sgRNA-Cas9 desliza o genoma em busca do local alvo com padrões adjacente proto-espaçador (PAM) que é responsável pelo recrutamento e ativação da Cas9. Em seguida

ocorre a quebra da fita dupla (DSB) de DNA de forma eficiente (JINEK et al., 2012; SHELAKE et al., 2019; PRAMANIK et al., 2021).

A edição genômica ocorre por meio da ação de enzimas sítio-dirigidas, capazes de cortar a molécula de DNA-alvo, ativando a subsequente ação de mecanismos de reparo de DNA da própria célula, que podem ser direcionados por união de extremidades não homólogas (NHEJ) ou por recombinação homóloga (HDR) (SATHEESH et al., 2019).

A dupla hélice do DNA está sujeita a quebras e danos que, na maioria das vezes, são corrigidos pela maquinaria de reparo do DNA, presente na célula. Este sistema de reparo é uma importante etapa na edição genômica, na qual, após o corte no DNA realizado pelas nucleases, a integridade da dupla fita é restabelecida pelo sistema de reparo da célula, finalizando o processo (POLETTI, 2021).

O mecanismo reparo da fita dupla de DNA, usado na edição de genomas é a recombinação não homóloga que liga extremidades diferentes do DNA (NHEJ); e o sistema de reparo direcionado por uma das fitas do DNA (HDR) (GAJ et al., 2013; WATSON et al., 2004; WYMAN & KANAAR, 2006). (Figura 6)

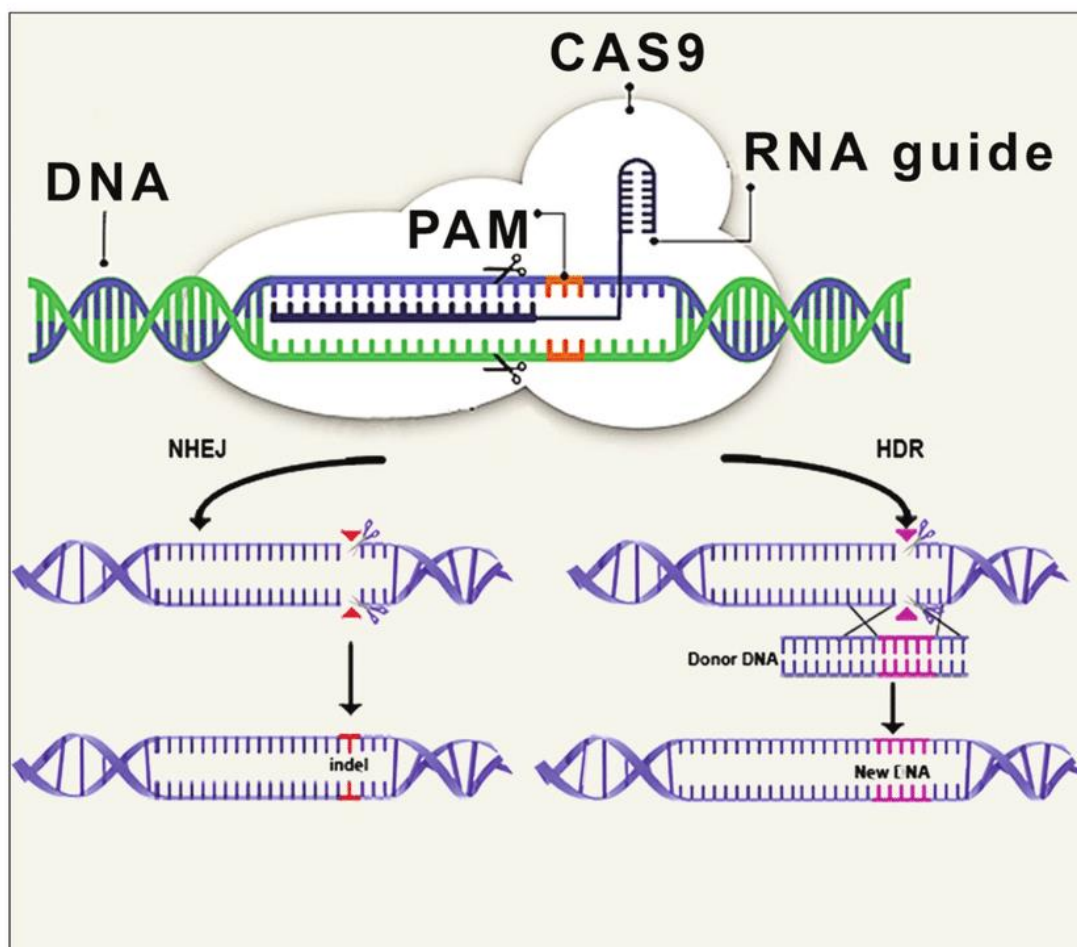


Figura 6 – Representação esquemática dos mecanismos de reparo de DNA por união de extremidades não homólogas (NHEJ) ou por recombinação homóloga (HDR).

Fonte: TORREGROSA et al., (2019)

A descoberta de nucleases específicas de sequência programada (SSNs) facilitou a edição precisa do gene de plantas, sendo reconhecido como um avanço na engenharia do genoma. Os SSNs possuem diversas aplicações para produzir mutações desejadas, como inserções, deleções, substituições, integração de sequência específica de DNA em um loco desejado e substituições dirigidas ao local em diversos tipos de organismos (RAZZAQ et al., 2019; SALEEM et al., 2019).

### 3.4 Comparação entre as técnicas de edição gênica utilizando Meganucleases, ZNFs, TALENs e CRISPR-Cas

As ferramentas de edição genômica, edição gênica ou engenharia genômica são nomes utilizados às mudanças dirigidas feitas no DNA de organismos vivos (BALTES et al., 2017).

Existem quatro grupos de proteínas que se ligam ao DNA e são utilizadas em edição genica: as meganucleases provenientes de elementos genéticos móveis microbianos (MN), as nucleases baseadas nos fatores de transcrição eucariotas como Zinc Fingers (ZFN); efetores do tipo ativador de transcrição (Transcription Activator-Like Effectores (TALENs), tecnologia advinda de bactéria e, atualmente, a ferramenta que utiliza a endonuclease Cas9 do sistema imunológico adaptativo de algumas bactérias como *S. pyogenes* (HSU et al, 2014).

Em 2003, os cientistas foram capazes de inativar genes usando ZFNs pela primeira vez (BIBIKOVA et al., 2003). Em 2005, a primeira mutagênese baseada em SSN via ZFNs foi realizada com sucesso em plantas (LLOYD et al., 2005). Portanto, ZFNs têm a capacidade de produzir a quebra da fita dupla do DNA em sítios-específicos que são utilizados para aplicações na engenharia genica (GUPTA et al., 2012).

Em 1989, os TALENs foram descobertos pela primeira vez quando uma bactéria patogênica chamada *Xanthomonas* foi estudada em muitas plantas (BONAS et al., 1989). Essa bactéria é responsável pelo crescimento desordenado das células vegetais, devido à síntese de uma nova proteína que resulta no estímulo da ativação de transcrição (TALENs), que têm como alvo sequências de DNA específicas e influenciam grandemente a expressão gênica (PESSINI et al., 2012).

As nucleases ZNFs e TALENs trouxeram uma grande contribuição no avanço da manipulação direcionada de genomas. No entanto, são técnicas complexas e exigem uma elaborada estrutura para estabelecer o sítio de reconhecimento da sequência-alvo no genoma (SMITH et al., 2006; MAEDER et al., 2008).

Essas ferramentas são demoradas e demandam de protocolos longos, como a engenharia de proteínas, para atingir a especificidade do alvo. Em comparação com as abordagens de edição de genomas ZNFs e TALENs, a ferramenta CRISPR-Cas, é mais simples de projetar, econômica e confiável (SHAN et al., 2013; MOSCOU & BOGDANOVA 2009; BOCH et al., 2009).

O sistema CRISPR-Cas9 tem vantagens sobre outras nucleases projetadas como ZFN e TALENs pelo fato de ser relativamente fácil de usar, de baixo custo,

capacidade de multiplexação e melhor atividade de clivagem no gene (MALI et al., 2013; CARROL, 2014).

QUADROS et al., (2018) em sua comparação, afirma que com a técnica CRISPR-Cas9 é possível transformar genes de interesse, de forma mais barata e altamente eficiente na edição de genomas, quando comparado com as nucleases TALEN e ZFN, e conclui que essa ferramenta é menos controversa que as técnicas de produção de transgênicos convencionais (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação das características dos três principais instrumentos de edição genômica

<b>Propriedades</b>	<b><sup>1</sup>ZFNs (2003)</b>	<b><sup>2</sup>TALENs (2010)</b>	<b><sup>3</sup>CRISPR-Cas (2012)</b>
Custo Produção	25.000 (R\$)	5.000 (R\$)	50 (R\$)
Dificuldade	Difícil	Não muito fácil	Fácil
Tempo necessário	Meses	Semanas	Dias

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

Fonte: Adaptado de QUADROS et al., (2018)

Devido à presença dessas restrições, as aplicações de TALENs e ZFNs em plantas foram ficando limitadas e abrindo espaço para novas ferramentas tecnológicas (JINEK et al., 2012).

A ferramenta TALENs é mais utilizada para edição genômica direcionada em comparação com ZFNs, mas, ainda precisam de uma maneira eficiente para que ocorra a ligação à região do DNA. Além disso, a natureza repetitiva e o grande tamanho representam em obstáculos para a entrega bem-sucedida de TALENs (PESSINI et al., 2012). Mesmo com esses empecilhos de complexidade e custo elevado, a agricultura teve um grande avanço com o emprego dessas técnicas. Na Tabela 3 é exposto à aplicação mediada por MN, TALEN e ZFN em plantas.

Tabela 3 - Aplicações de ferramentas de edição de genoma de primeira geração em plantas cultivadas

Nucleases do Editor de Genes	Espécies	Tipo de modificação	Técnica de entrega	Gene Alvo	Característica Desejada
<b>Meganuclease</b>	<i>Zea mays</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>MS26</i>	Plantas masculinas estéreis
	<i>Gossypium hirsutum</i>	Empilhamento de características	Bombardeio de partículas	<i>EPSPS</i>	Tolerância a herbicidas
	<i>Zea mays</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>LG1</i>	Mutagênese direcionada hereditária
<b>ZFN</b>	<i>Oryza sativa</i>	Empilhamento de características	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>OsQQR</i>	Detecção de locais de “porto seguro” no DNA para introdução de características
	<i>Zea mays</i>	Empilhamento de características	Bombardeamento de micropartículas	<i>ZmTLP</i>	Tolerância a herbicidas
	<i>Brassica napus</i>	Expressão genética	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>KasII</i>	Composição melhorada do óleo de semente
	<i>Glicina max</i>	Nocaut genético	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	<i>DCL</i>	Transmissão hereditária
	<i>Zea mays</i>	Reposição de genes	Bigodes	<i>IPK1</i>	Tolerância a herbicidas
<b>TALENS</b>	<i>Saccharum officinarum</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>COMT</i>	Eficiência de sacarificação melhorada
	<i>Zea mays</i>	Mutação de mudança de quadro	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>ZmMTL</i>	Indução de plantas haplóides
	<i>Glicina max</i>	Nocaut genético	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	<i>GmPDS11, GmPDS18</i>	Fenótipo albino e anão
	<i>Glicina max</i>	Empilhamento de genes	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	<i>FAD2-1A, FAD2-1B, FAD3A</i>	Alto teor de oleico, baixo teor de linoleico
	<i>Solanum tuberosum</i>	Nocaut genético	Bombardeio de partículas	<i>VInv</i>	Minimizando os açúcares redutores
	<i>Saccharum officinarum</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>COMT</i>	Composição da parede celular melhorada
	<i>Solanum tuberosum</i>	Nocaut genético	Bombardeio de partículas	<i>ELA</i>	Expressão transiente em protoplastos
<i>Zea mays</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>ZmGL2</i>	Cera epicuticular reduzida nas folhas	

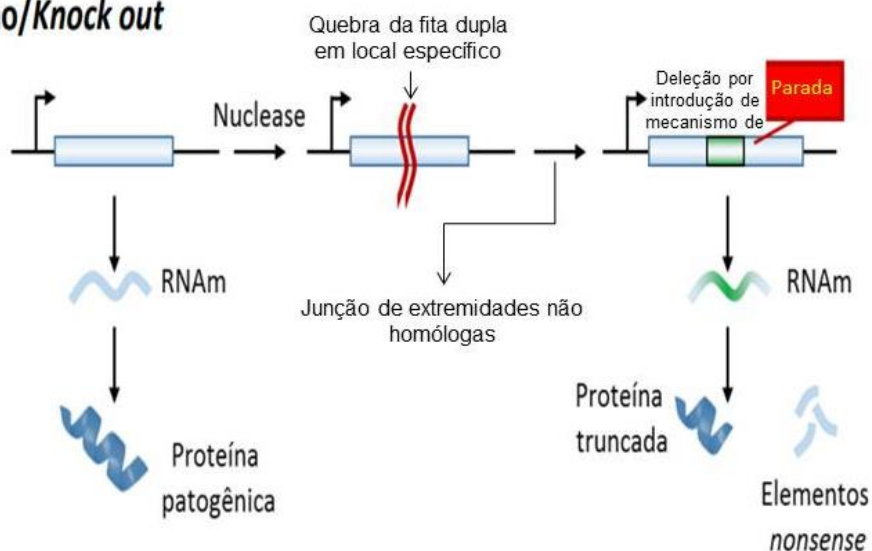
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>OsBADH2</i>	Arroz perfumado
<i>Triticum aestivum</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>MLO</i>	Resistência ao oídio
<i>Hordeum vulgare</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	Transgene	<i>GFP</i>
<i>Glicina max</i>	Nocaut genético	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	<i>FAD2-1A/B</i>	Melhor qualidade do óleo
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nocaut genético	Transformação de protoplastos mediada por peg	<i>Sur A, Sur B</i>	Mutação direcionada
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>Os11N3</i>	Resistência à ferrugem bacteriana

Fonte: Adaptado de RAZZAQ et al., (2019)

### 3.5 Utilizações da ferramenta CRISPR-Cas na agricultura

Os fungos e principalmente os vírus causam uma série de danos e prejuízos às plantações agrícolas. Com isso, a edição genômica por meio da mutação, deleção e inserção (figura 7) é de grande importância na obtenção de espécies agronomicamente melhores.

#### A) Mutação/Knock out



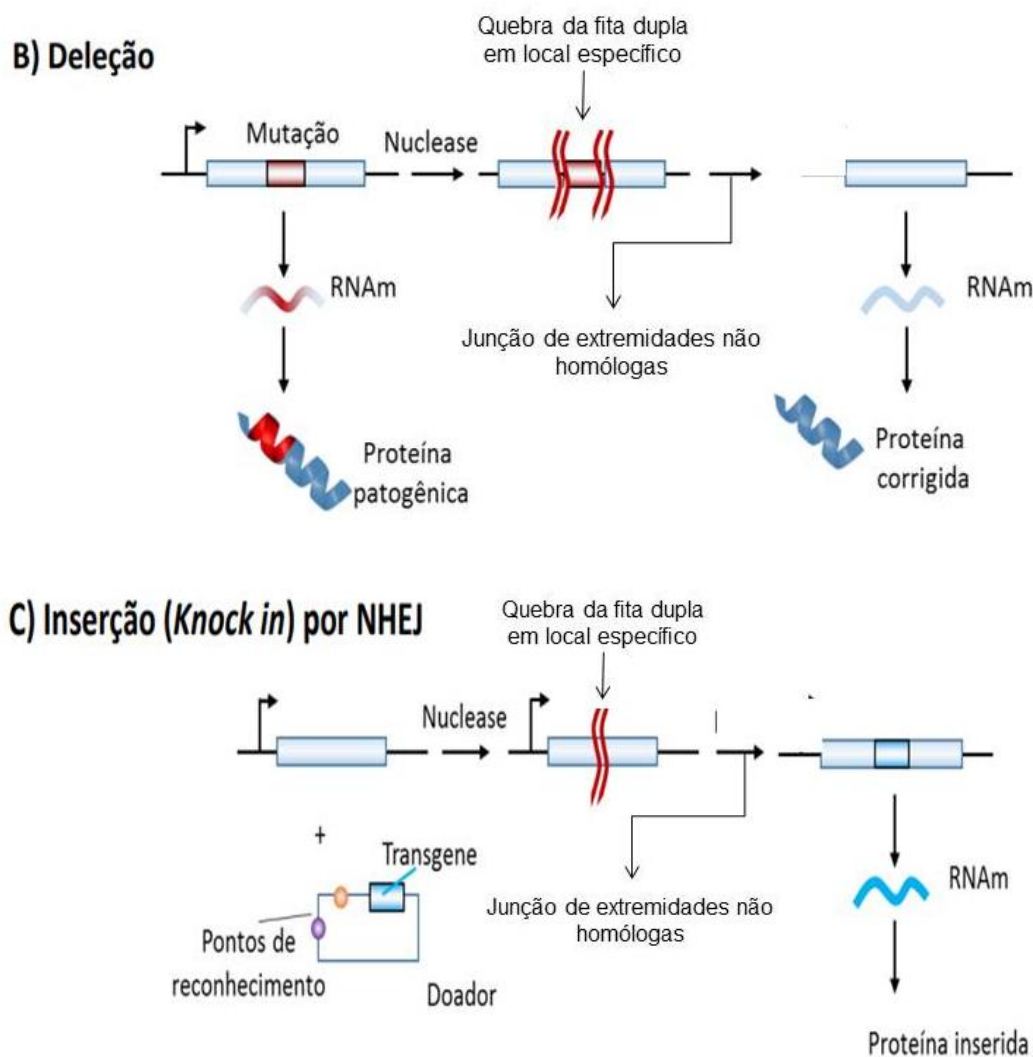


Figura 7 – (A) O reparo por NHEJ (junção de extremidade não homóloga) pode condicionar à inserção ou deleção de sequência em genes, condicionando a formação de códons de parada, promovendo o knock out de tais genes. (B) A indução de duas quebras de fita dupla pode promover a deleção de sequências genômicas por NHEJ, de modo a reparar proteínas mutadas. (C) Transgenes podem ser inseridos por NHEJ em DSBs (quebra da fita dupla de DNA) a partir de doadores que contenham pontos de reconhecimento.

Fonte: Adaptado de LISTIK & CARMO, (2016)

O arroz (*Oryza sativa*) tem uma grande importância alimentícia, econômica e social pelo Brasil e no mundo, favorecendo a geração de emprego e renda. Sua modificação genética é de grande interesse comercial.

Xie & Xang (2013), editaram o gene *OsMPK5* que codifica uma proteína quinase ativada por mitógeno, envolvida na resposta de defesa da planta e estresse abiótico. Análises de bioinformática demonstraram que no genoma do arroz, sete sequências eram similares a sequência-alvo de PS3 e possuíam PAM, estando sujeitas

a atividade da Cas9 e estimaram que 90% dos genes do arroz podia ser alvo de RNA guias.

Sun et al., (2016) buscaram introduzir a resistência a herbicidas. Partindo disso, células de arroz foram co-transfectadas via bombardeamento de biomoléculas com plasmídeos contendo 2 sgRNAs contra sequências do gene *ALS* e oligonucleotídeos de fita-simples contendo sequências as quais se desejava editar, como template de reparo, além da Cas9. Após 10 dias da aplicação de herbicida, as folhas das plantas não editadas começaram a secar, enquanto as folhas das plantas editadas não apresentaram efeito crescendo normalmente.

Também em arroz, o crestamento bacteriano é causado por *Xanthomonas oryzae*, que utiliza o efector *PthXo2* para induzir a expressão do gene na planta hospedeira. Esse gene está relacionado ao transporte de sacarose e parece ser determinante para o processo infeccioso por essa bactéria. Assim, mutações promovidas por CRISPR-Cas9 na região codificante resultou em plantas resistentes a essa infecção (JIANG et al., 2015).

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é alvo de diversos ataques por vírus, fungos e insetos agentes de grandes detrimientos econômicos. Essa fruta tem seu genoma completamente sequenciado tornando-se um ótimo candidato para se testar a edição por CRISPR-Cas (AOKI et al., 2013).

Assim, sob essas condições o gene *SIM1o1* do tomateiro foi escolhido como alvo de deleção utilizando o CRISPR, tendo em vista que este gene é o principal causador da vulnerabilidade abrindo a oportunidade do ataque e infestação do fungo *Oidium neolycopersici*, que é o agente causal da doença do oídio. Como resultados, nas plantas editadas com a deleção demonstraram resistência ao patógeno (NEKRASOV et al., 2017).

Brooks et al., (2014), em tomateiro desenvolveram 2 sgRNAs contra sequências do gene *SIAGO7* (que codifica RNAs interferentes), cuja disfunção leva a formação de folhas em forma de agulha ou enroladas em contrastes com folhas normais achatadas. As plântulas foram infectadas por plasmídeos de *Agrobacterium tumefaciens* contendo a Cas9 e sgRNAs, sendo que 9 semanas depois, 48% das plantas demonstravam fenótipos advindos da edição pela Cas9.

A deleção do gene *SIAGL6*, ainda em tomateiro, gerou frutos partenocárpicos com grande potencial para manufatura de processados. Esta nova cultivar apresentou tolerância a altas temperaturas, e as plantas foram capazes de produzir frutos sob condições de estresse oxidativo (KLAP et al., 2017).

Em um ensaio com cacaueteiro (*Theobroma cacao*) a deleção do gene *TcNPR3*, possibilitou um acréscimo da resistência do tecido foliar à infecção do agente etiológico *Phytophthora tropicalis* (FISTER et al., 2018).

Alagoz et al., (2016) trabalharam com a papoula-dormideira (*Papaver somniferum*) uma das principais plantas aromáticas utilizadas na produção de morfina, tendo uma grande importância biomédica que também se dá pela produção de outros alcalóides como a antitussígena que é uma molécula analgésica. Buscando manipular a biosíntese dessas substâncias, trabalhou-se contra o gene *4OMT2*, envolvido na regulação da produção desses alcalóides. Então as células de folhas de papoula foram transfectadas com vetores de expressão de Cas9 e sgRNA, sendo a transfecção mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Posteriores análises demonstraram uma significativa redução na produção de alcalóides em células transfectadas, em relação a células não-transfectadas.

No trabalho realizado por OKUZAKI et al., (2018) a ferramenta CRISPR-Cas9 foi avaliado em Colza (*Brassica napus*) no gene de ácido graxo dessaturase 2 (FAD2), que codifica uma enzima que catalisa a dessaturação do ácido oleico. Essas modificações revelaram um aumento estatisticamente significativo no teor de ácido oleico em comparação com as sementes do tipo selvagem.

Nessa mesma cultura Huang et al., (2020) pode modificar simultaneamente múltiplas cópias do gene *BnaFAD2* buscando a edição genômica com o sistema CRISPR para desenvolver novas variações nos perfis de ácidos graxos. Como resultado o teor de ácido oleico nas sementes de *B. napus* dos mutantes aumentou significativamente com o maior superior a 80% em comparação com o tipo selvagem de 66%, enquanto os teores de ácido linoleico e linolênico diminuíram proporcionalmente.

Lawrenson et al., (2015) investigaram o uso e os requisitos de especificidade do alvo da edição do genoma Cas9 guiada por RNA em cevada (*Hordeum vulgare*) e

couve (*Brassica oleracea*) visando genes de multicópia, em cevada, o alvo foram duas cópias de *HvPM19* e observaram mutações induzidas por Cas9 na primeira geração de 23% e 10% das linhas, respectivamente. Em couve o direcionamento de *BolC.GA4.a* levou a mutações induzidas por Cas9 em 10% das plantas de primeira geração rastreadas, mostrando que o uso de Cas9 guiado por RNA para gerar mutações em genes-alvo de cevada e couve obtendo transmissão estável dessas mutações.

Em batata (*Solanum tuberosum*) também é possível à edição por CRISPR para a completa eliminação da produção de glicoalcaloides esteroidais, substâncias que desenvolverem sabor amargo causando a diminuição do interesse paliativo, podendo ser tóxicas se ingeridas em grandes quantidades (NAKAYASU et al., 2018).

No Brasil recentemente ocorreu à obtenção de produtos utilizando a tecnologia CRISPR, para obtenção de milho editado geneticamente com maior concentração de amilopectina e cana de açúcar com maior digestibilidade de biomassa vegetal, e maior acúmulo de açúcares para produção de etanol foi avaliado e aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio.

Assim, essa tecnologia de edição vai ganhando espaço no mercado agrícola e abre caminho para novos estudos em novas culturas de importância econômica.com sua aplicação pratica pelo mundo. (Tabela 4).

Tabela 4 – Resumo das aplicações da técnica CRISPR nas principais culturas para melhoria de produtividade e qualidade

Espécies	Tipo de modificação	Técnica de entrega	Gene Alvo	Característica Desejada	Mecanismo de reparo
<i>Triticum aestivum</i>	Nocaut genético	Bombardeio de partículas	<i>TaGW2</i>	Peso do grão	RH
<i>Oryza sativa</i>	Inserção genética	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>OsAAP3</i>	Rendimento de grãos	NHEJ
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>OsCCD7</i>	Alto perfilhamento	NHEJ
<i>Glicina max</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>GmFT2a</i>	Floração atrasada	NHEJ
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>GW5</i>	Peso do grão	NHEJ

<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>Hd2 , Hd4 , Hd5</i>	Título inicial	NHEJ
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>OsSWEET 11</i>	Peso do grão	NHEJ
<i>Solanum lycopersicum</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>SP5G</i>	Ciclo antecipado	NHEJ
<i>Oryza sativa</i>	Inserção genética	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>OsGRF4</i>	Tamanho de grão	NHEJ
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>IPA, GS3, DEPI, Gnl1a</i>	Melhor rendimento	NHEJ
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>GS3 , GW2 , GW5 , T GW6</i>	Peso do grão	NHEJ
<i>Triticum aestivum</i>	Nocaut genético	Bombardeio de partículas	<i>GASR7</i>	Peso do kernel	HDR
<i>Triticum aestivum</i>	Nocaut genético	Bombardeio de partículas	$\alpha$ -gliadina	Baixo teor de glúten	HDR
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>Ceroso</i>	Glutinosidade aprimorada	NHEJ
<i>Solanum lycopersicum</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>lncRNA14 59</i>	prazo de validade longo	NHEJ
<i>Solanum lycopersicum</i>	Inserção genética	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>SGRI, LCY-E, Blc, LCY-B1</i>	Aumento do licopeno	NHEJ
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>SBEIIb</i>	Amilose, resistência ao amido	NHEJ
<i>Glicina max</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>FAD2-1A, FAD2-1B</i>	Melhor qualidade do óleo	NHEJ
<i>Solanum tuberosum</i>	Nocaut genético	Transfecção mediada por PEG	<i>GBSS</i>	Aumentar a amilopectina/amilose	NHEJ

<i>Solanum lycopersicum</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>SIGAD2</i> , <i>SIGAD3</i>	Aumentar o ácido Y-aminobutírico	NHEJ
<i>Zea mays</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>PPR</i> , <i>RPL</i>	Proteína zeína reduzida	NHEJ

Fonte: Adaptado de RAZZAQ et al., (2019)

### 3.6 Sistema CRISPR-Cas9 para resistência a doenças de plantas

Os Vírus, bactérias, fungos, nematoides e insetos são os principais agentes causais indutores de estressores bióticos e redução da produtividade das culturas. (AL-SADI et al., 2012).

A edição genica mediado por CRISPR-Cas9 pode ser empregada diretamente para interromper genes causadores de doenças, desenvolvendo culturas resistentes a doenças, causando a diminuição do uso e dependência dos insumos químicos sintéticos. (Tabela 5).

Tabela 5 – Resumo de culturas resistentes a doenças causadas por fungos fitopatogênicos desenvolvidos via CRISPR-Cas9.

Espécies	Tipo de modificação	Técnica de entrega	Gene Alvo	Característica Desejada	Patógeno	Mecanismo de reparo
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>eIF4G</i>	Resistência contra o vírus esférico do tungro do arroz	Vírus esférico do tungro do arroz	NHEJ
<i>Vitis vinifera</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>VvWRKY52</i>	Maior resistência contra <i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	NHEJ
<i>Gossypium hirsutum</i>	Inserção genética	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>Gh14-3-3d</i>	Resistência à murcha de verticillium do algodão	<i>Verticillium dahliae</i>	NHEJ
<i>Solanum lycopersicum</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>SlJAZ2</i>	Resistente a manchas bacterianas	<i>Pseudomonas syringae</i>	NHEJ
<i>Solanum lycopersicum</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	Sequências de CP e Rep	Maior resistência contra o Tomato yellow leaf curl virus	Vírus do enrolamento da folha amarela do tomate	NHEJ
<i>Solanum</i>	Nocaut	Transformação	<i>SlMlo1</i>	Maior	<i>Oidium</i>	NHEJ

<i>lycopersicon</i>	genético	mediada por <i>Agrobacterium</i>		resistência contra o oídio	<i>neolycopersici</i>	
<i>Triticum aestivum</i>	Nocaut genético	Bombardeio de partículas	<i>EDR1</i>	Maior resistência contra o oídio	<i>Erysiphe cichoracearum</i>	NHEJ
<i>Paraíso cítrico</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>CsLOB1</i>	Resistente ao cancro cítrico	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citrino</i>	NHEJ
<i>Citrus sinensis</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	CsLOB1	Resistente ao cancro cítrico	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citrino</i>	NHEJ
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>OsERF9 22</i>	Resistência contra fungos blastos	<i>Magnaporthe oryzae</i>	NHEJ
<i>Cucumis sativus</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>eIF4E</i>	Ampla resistência a vírus	Vários vírus	NHEJ
<i>Oryza sativa</i>	Nocaut genético	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	<i>OsSWEET13</i>	Resistência contra crestamento bacteriano	<i>Xanthomonas oryzae</i>	NHEJ

Fonte: Adaptado de RAZZAQ et al., (2019)

### 3.7 Vantagens da utilização do sistema CRISPR-Cas

Segundo Dounda & Charpentier, (2014) o mecanismo de clivagem do DNA, a capacidade de reconhecimento de alvos multiplexados e a existência de muitas variantes do sistema CRISPR-Cas9, permite o desenvolvimento de notáveis avanços usando esta técnica econômica e de fácil utilização. Tornando possível a utilização desta tecnologia para direcionar, editar, modificar, regular e marcar de maneira precisa e eficiente o loco de uma ampla variedade de células e organismos.

A utilização de ZFNs para edição genômica em plantas mostrou implicações positivas, em diferentes espécies e com diferentes objetivos. No entanto, existem determinadas barreiras. Tendo em vista ser necessário construir um arranjo de dedo de zinco para cada alvo selecionado (CHEN et al., 2019).

A ferramenta CRISPR-Cas9 utilizado na edição de genes de plantas fez surgir uma inovação no trabalho de melhoramento genético e garantiu mudanças no

progresso da pesquisa em biotecnologia. Em comparação com outras metodologias que regulam o metabolismo das plantas a grande vantagem desta tecnologia reside na competência de alterar regiões específicas do DNA, com baixo custo, tornando possível a obtenção de espécies vegetais melhoradas para ambientes estressantes (QUADROS et al., 2018).

De certo modo essa facilidade de manipular o CRISPR-Cas9 demonstrou uma grande vantagem na produção de vetores para atingir locais alvo ou mesmo genomas extensos com a proteína Cas9 que se mantém inalterada. Esse sistema ainda pode ser capaz de modificar múltiplos locais genômicos simultaneamente, ou seja, utilizar vários RNAs guia em paralelo dentro de uma mesma célula (DOUNDA & CHARPENTIER, 2014).

### **3.8 Considerações éticas de biossegurança da utilização da técnica de CRISPR-Cas**

De acordo com Wang, (2017) o método CRISPR-Cas9 provou ser revolucionário, despontando um imenso potencial para a pesquisa em plantas e também para áreas das ciências médicas, com uma incrível precisão para leitura. É uma técnica interessante que apresenta: baixo custo, fácil manipulação, ampla aplicabilidade, abrindo assim, o caminho para uma verdadeira revolução. Existindo muitas possibilidades de aplicação, como no tratamento de doenças, ou em aperfeiçoamentos genéticos de genes embrióticos, apelidados de “bebês projetados”, entre muitas outras possibilidades.

No começo do sequenciamento do genoma humano, o temor aos desvios indevidos conduziu a consagrar o genoma como “patrimônio comum da humanidade”. A Unesco na Declaração sobre Genoma Humano e Direitos Humanos, o especifica no artigo 1º; acrescentando no artigo 11º que não deve ser permitida qualquer prática que seja contrária à dignidade humana; e no artigo 12º que toda pessoa deve ter acesso aos progressos da biologia, da genética e da medicina em matéria de genoma humano, respeitando sua dignidade e seus direitos (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, 1997).

Esse crescimento exponencial da edição de genomas e sua manipulação de forma facilitada têm resultado em enormes desafios para a bioética, implicando em testes controversos e pouco confiáveis.

O experimento do Chinês He Jiankui com embriões humanos chocou a comunidade científica mundial e despertou os conselhos de ética em pesquisa, cientistas e profissionais para o abismo obscuro de experimentos arriscados em nome de avanços científicos, alertando que experimentos em embriões humanos, poderiam impactar negativamente o futuro da humanidade (HIRSCH; IPHOFEN & KOPORC, 2019).

Por outro lado, os trabalhos realizados com a edição gênica por CRISPR-Cas9 em plantas causam menor polêmica 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 intolerância alimentar e toxicidade, no sentido de garantir um alimento muito mais seguro (QUADROS et al., 2018).

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), órgão governamental vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, responsável pela formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança de OGMs, no estabelecimento de normas técnicas de segurança e de pareceres técnicos referentes à autorização para atividades que envolvam pesquisa e uso comercial de OGMs e seus derivados (CTNBIO, 2021), vem discutindo todas as questões legais que envolvem a engenharia do genoma através da ferramenta de edição CRISPR-Cas9.

A CTNBIO foi favorável à liberação comercial de um microrganismo em um primeiro caso relatado que ocorreu em 2018 com a levedura “Excellomol 4.0” da empresa GlobalYeast, que foi editada através do sistema CRISPR-Cas9. Segundo a CTNBio ela não se enquadrava na categoria de OGM nos termos da Legislação Brasileira de Biossegurança e Resolução Normativa Nº 16 (QUADROS et al., 2018; CTNBIO, 2021).

Portanto, é de suma importante que o Brasil, com urgência, se organize e comece a debater rapidamente estas questões legais, implementando modificações em sua legislação que regulamenta comercialização de OGMs, para assim, se tornar uma

referência a nível internacional. Entretanto, os resultados de todos os trabalhos já executados com a ferramenta CRISPR-Cas9 de forma responsável, devem ser analisados levando em consideração os possíveis impactos causados por embaralhamento gênicos (POLETTI, 2021).

Dessa forma, buscando a garantia de uma alimentação mais segura e barata para a humanidade e os animais, sempre deve ser observado os eventuais impactos para a sociedade e o meio ambiente a fim de reduzir os riscos ou extingui-los o máximo possível para tornar a agricultura mais sustentável.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Como demonstrado nessa revisão bibliográfica, o melhoramento genético de plantas vai evoluindo, ao mesmo tempo, cientistas do mundo foram desenvolvendo ferramentas cada vez mais eficientes pela busca da obtenção de plantas mais produtivas. O funcionamento e aplicabilidade do sistema CRISPR-Cas ainda estão em fase de aperfeiçoamento, porém, em virtude de seus potenciais benefícios, da sua eficácia e das inúmeras possibilidades de aplicação, passa por um contínuo processo de aprimoramento. A sua relativa baixa complexidade e custo permitiu que um grande número de centros de pesquisa ao redor do mundo começasse a explorar a técnica para diversos fins. É necessário investir em pesquisas que elucidem os mecanismos de edição por CRISPR-Cas com mais detalhes, tendo em vista, que se tornará uma ferramenta revolucionária na edição genômica com o passar dos anos.

A tendência da população global é crescer cada vez mais aumentando a demanda alimentar e com isto, a necessidade de se consumir alimentos seguros e saudáveis, cresce na mesma proporção. O sistema CRISPR-Cas atrai pesquisadores, devido a sua elevada eficiência, sua relativa facilidade de utilização e seu futuro promissor. No entanto, esbarra com questões éticas devido a sua ampla utilização na edição de genomas.

Assim, a humanidade necessita de uma manipulação genica responsável, respeitadora e protetora da vida, e não de uma ciência manipuladora, interessada unicamente nos interesses econômicos. Do mesmo modo, agências regulatórias terão que considerar a melhor maneira de fomentar o uso responsável da tecnologia CRISPR-Cas, sem inibir a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico.

Portanto, as possibilidades trazidas com a descoberta do sistema CRISPR-Cas devem enfaticamente servir para a melhoria da saúde e qualidade de vida de toda a população humana.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALAGOZ, Y.; GURKOK, T.; ZHANG, B.; UNVER, T. **Manipulating the Biosynthesis of Bioactive Compound Alkaloids for Next-Generation Metabolic Engineering in Opium Poppy Using CRISPR-Cas 9 Genome Editing Technology.** Scientific Reports, Aug 3;6:30910, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep30910>
- AL-SADI, A.M.; AL-MOQBALI, H.S.; AL-YAHYAI, R.A.; AL-SAID, F.A. **Dados de AFLP sugerem um papel potencial para a baixa diversidade genética da cal ácida (*Citrus aurantifolia Swingle*) em Omã no surto da doença da vassoura de bruxa de cal.** Eufítica. 188 :285-297, 2012. <http://doi:10.1007/s10681-012-0728-7>
- ANZALONE, A.V.; KOBLAN, L.W.; LIU, D. R. **Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors.** Nat Biotechnol Jul;38(7):824-844, 2020. <http://doi:10.1038/s41587-020-0561-9>.
- AOKI, K.; OGATA, Y.; IGARASHI, K.; YANO, K.; NAGASAKI, H.; KAMINUMA, E.; TOYODA, A. **Functional genomics of tomato in a post-genome-sequencing phase.** Breeding science, Kanagawa, 63(1):14-20, 2013. <http://doi:10.1270/jsbbs.63.14>
- AREND, M. C.; PEREIRA, J. O.; MARKOSKI, M. M. **O Sistema CRISPR/Cas9 e a possibilidade de edição genômica para a cardiologia.** Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, 108(1): 81-83, 2017. <http://doi:10.5935/abc.20160200>
- BALTES, N. J.; GIL-HUMANES, J.; VOYTAS, D. F. **Genome engineering and agriculture: opportunities and challenges.** Gene editing in plants. San Diego, 149, 1–26. 2017. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.03.011>
- BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D.A.; HORVATH, P. **CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.** Science. 315:1709–1712, 2007. doi: 10.1126/science.1138140.
- BIBIKOVA, M.; BEUMER, K.; TRAUTMAN, J. K.; CARROLL, D. **Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases.** Science, 300(5620):764, 2003. doi:10.1126/science.1079512

BOCH, J.; SCHOLZE, H.; SCHORNACK, S.; LANDGRAF, A.; HAHN, S.; KAY, S.; LAHAYE, T.; NICKSTADT, A.; BONAS, U. **Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors**. *Ciência*. 326(5959):1509-1512, 2009. doi:10.1126/science.1178811

BOLOTIN, A.; QUINQUIS, B.; SOROKIN, A.; DUSKO, E. S. **Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin**. *Microbiology*. 151:2551–2561, 2005. doi: 10.1099/mic.0.28048-0.

BOLOTIN, A.; QUINQUIS, B.; SOROKIN, A.; EHRLICH, S. D. **Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin**. *Microbiology*,151(Pt 8):2551-2561, 2005. doi:10.1099/mic.0.28048-0

BONAS, ULLA.; STALL, ROBERT. E.; STASKAWICZ, BRIAN. **Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***. *Molecular and General Genetics MGG*,218(1):127-136, 1989. doi:10.1007/BF00330575

BROOKS, C.; NEKRASOV, V.; LIPPMAN, Z.B.; VAN, E. J. **Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System**. *Plant Physiology*, 166(3), 1292–1297, 2014. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>

BROUNS, S.J.J.; JORE, M.M.; LUNDGREN, M.; WESTRA, E.R.; SLIJKHUIS, R.J.H.; SNIJDERS, A.P.L.; DICKMAN, M.J.; MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V.; OOST, J. **Antiviral defense in prokaryotes**. *Science*.;321:960–964, 2008. doi: 10.1126/science.1159689.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, P. N. **Edição de genoma pelo sistema CRISPR-Cas9 e sua aplicação no melhoramento do milho**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Dezembro, ISSN 1518-4277, 2020.

CARROLL, D. **Genome engineering with targetable nucleases**. *Annu Rev Biochem*, 83, 409–439, 2014. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035418>

CHEN, K.; WANG, Y.; ZHANG, R.; ZHANG, H.; GAO, C. **CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture**. Annual Review of Plant Biology,70:667-697, 2019. doi:10.1146/annurev-arplant-050718-100049

Confederação da Agricultura e Pecuária no Brasil. **Agropecuária puxa crescimento do PIB no primeiro trimestre de 2021**. 02 jun. 2021. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/boletins/agropecuaria-puxa-crescimento-do-pib-noprimeiro-trimestre-de-2021>. Acesso em: 31 jun. 2022.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; ZHANG, F. **Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems**. Science, 339(6121):819-823, 2013. doi:10.1126/science.1231143

CONG, L.; RAN, F.A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P.D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L.A. **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas Systems**. Science.;339:819–823, 2013. doi: 10.1126/science.1231143.

DIAS, C. A. P.; DIAS, J. M. R. **O sistema CRISPR/CAS como uma nova ferramenta biotecnológica na edição de genomas: aplicações e implicações**. Revista Ambiente Acadêmico, pp. 81-83, 2018. <https://doi.org/10.5935/abc.20160200>.

DOUDNA, J.; CHARPENTIER, E. **The war on cancer betrayed by nature**. Monthly Archives: v. 10, n. 14, p. e75101421778, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i14.21778

DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. **The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9**. Science.346(6213):1258096, 2014. doi:10.1126/science.1258096

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **O direito à alimentação no quadro internacional dos direitos humanos e nas Constituições**. Rome, 2014.

FERNANDES, P.M.B. **Biotecnologia branca para um mundo verde**. Curitiba: Editora CRV, 2018. 118p.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. **ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering**. Trends in Biotechnology, Amsterdam, v. 31, p. 397-405, 2013. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004

GARNEAU, J.E.; DUPUIS, M.È.; VILLION, M.; ROMERO, D.A.; BARRANGOU, R.; BOYAVAL, P.; FREMAUX, C.; HORVATH, P.; MAGADÁN, A.H.;

MOINEAU, S. **He CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNAT.** Nature.;468:67–71, 2010. doi: 10.1038/nature09523.

GUPTA, M.; DEKELVER, R.C.; PALTA, A.; CLIFFORD, C.; GOPALAN, S.; MILLER, J.C.; NOVAK, S.; DESLOOVER, D.; GACHOTTE, D.; CONNELL, J.; FLOOK, J.; PATTERSON, T.; ROBBINS, K.; REBAR, E.J., GREGORY, P.D.; URNOV, F.D.; PETOLINO, J.F. **Transcriptional activation of *Brassica napus*  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II with an engineered zinc finger protein transcription factor.** Plant Biotechnology Journal,10(7):783-791, 2012. doi:10.1111/j.1467-7652.2012.00695.x

HELLEN, C. M. **Análise *in silico* de seqüências de DNA de regiões genômicas associadas ao sistema CRISPR.** Dissertação (mestrado) 80p. Curitiba, 2019.

HIRSCH, F.; IPHOFEN, R.; KOPORC, Z. **Ethics assessment in research proposals adopting CRISPR technology.** Biochemia Medica, Zagreb, 29(2):020202, 2019. doi:10.11613/BM.2019.020202

HSU, P. D.; LANDER, E.S.; ZHANG, F. **Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering.** Cell,157(6):1262-1278, 2014. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010

HUANG, H.; CUI, T.; ZHANG, L.; YANG, Q.; YANG, Y.; XIE, K.; FAN, C.; ZHOU, Y. **Modifications of fatty acid profile through targeted mutation at *BnaFAD2* gene with CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Brassica napus*.** Theor Appl Genet.133(8):2401-2411, 2020 .doi:10.1007/s00122-020-03607-y

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATURA, A. **Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.** J. Bacteriol.;169:5429–5433, 1987. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987

JANSEN, R.; EMBDEN, J.D .; GAASTRA, W.; SCHOULS, L.M. **Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.** Molecular Microbiology,43(6):1565-1575, 2002. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x

JANSEN, R.; VAN, J.D.A.; GAASTRA, W.; SCHOOLS, L.M. **Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.** Mol. Microbiol.;43:1565–1575, 2002. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x

JIANG, F.; ZHOU, K.; MA, L.; GRESSEL, S.; DOUDNA, J. A. **A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition.** Science,348(6242):1477-1481, 2015. doi:10.1126/science.aab1452

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. **Programmable Dual-RNA - DNA guiado endonuclease na imunidade bacteriana adaptativa.** Ciência, 337(6096):816-821, 2012. doi:10.1126/science.1225829

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. **A Programmable Dual-RNA —Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.** Science.;337:816–821, 2012. doi: 10.1126/science.1225829

KLAP, C.; YESHAYAHOU, E.; BOLGER, A.M.; ARAZI, T.; GUPTA, S.K.; SHABTAI, S.; USADEL, B.; SALTS, Y.; BARG, R. **Tomato facultative parthenocarpy results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function.** Plant Biotechnology Journal,15(5):634-647. 2017. doi:10.1111/pbi.12662

LAWRENSEN, T.; SHORINOLA, O.; STACEY, N.; LI, C.; OSTERGAARD, L.; PATRON, N.; UAUY, C.; HARWOOD, W. **Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease.** Genome Biol. 16, 258, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0826-7>

LISTIK, E.; CARMO, A. C.V. **AS CARACTERÍSTICAS DOS MECANISMOS E SISTEMAS DE EDIÇÃO GENÔMICA,** Revista Acadêmica Oswaldo Cruz, 2016.

LLOYD, A.; PLAISIER, C. L.; CARROLL, D.; DREWS, G. N. **Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis.** Proceedings of the National Academy of Sciences,102(6):2232-2237, 2005. doi:10.1073/pnas.0409339102

LOPES FILHO, J. H.; DA SILVA, V. C. H.; DOS SANTOS, J. C.; DANTE, R. A.; GERHARDT, I. R.; YASSITEPE, J. E.; FERNANDES, F. R. **Introdução à edição**

genômica de plantas. In: **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura** – Brasília, DF: Embrapa, 2020.

MAEDER, M. L.; THIBODEAU-BEGANNY, S.; OSIAK, A.; WRIGHT, D. A.; ANTHONY, R. M.; EICHTINGER, M.; JIANG, T.; FOLEY, J. E.; WINFREY, R. J.; TOWNSEND, J. A. **Rapid “open- -source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification**. *Molecular Cell*,31(2):294-301, 2008. doi:10.1016/j.molcel.2008.06.016

MAKAROVA KS, WOLF YI, ALKHNBASHI OS, COSTA F., SHAH SA, SAUNDERS SJ, BARRANGOU R., BROUNS SJJ, CHARPENTIER E., HAFT D.H. **Uma classificação evolutiva atualizada dos sistemas CRISPR–cas**. *Nat. Rev. Microb.* 13 :722-736, 2015. doi: 10.1038/nrmicro3569

MALI, P.; ESVELT, K. M.; CHURCH, G. M. **Cas9 as a versatile tool for engineering biology**. *Nat Methods*,10(10):957-963, 2013. doi:10.1038/nmeth.2649

MALI, L.; YANG, K.M.; ESVELT, J.; AACH, M.; GUELL, J.E.; DICARLO, J. E. **RNA-guided human genome engineering via Cas9**. *Science*, Washington, 339(6121):823-826, 2013. doi:10.1126/science.1232033

MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. **Metodologia do trabalho científico**. São Paulo: Editora Atlas, 5. ed. - São Paulo : Atlas. Bibliografia. ISBN 85-224-3397-6, 2003.

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Sobre a CTNBio. 09 jun. 2021. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/inicio>. Acesso em: 18 jun. 2022.

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Sobre a CTNBio. 13 abr. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/ctnbio>. Acesso em: 09 jun. 2022.

MOJICA, F. J. M.; DIEZ-VILLASENOR, C.; GARCIA-MARTINEZ, J.; SORIA, E. **Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements**. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2):174-182, 2005. doi:10.1007/s00239-004-0046-3

MOJICA, F.J.M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; SORIA, E. **Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from**

**foreign genetic elements.** *J. Mol. Evol.*;60:174–182, 2005. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3.

MOJICA, F.J.M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; SORIA, E.; JUEZ, G. **Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria.** *Mol.Microbiol*; 36:244–246, 2000. doi: 10.1046/j.13652958.2000.01838.x

MOSCOU, M.J.; BOGDANOVA, A.J. **A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors.** *Ciência.* 326(5959):1501, 2009.. doi:10.1126/science.1178817

NAKAYASU, M.; AKIYAMA, R.; LEE, H. J.; OSAKABE, K.; OSAKABE, Y.; WATANABE, B.; SUGIMOTO, Y.; UMEMOTO, N.; SAITO, K.; MURANAKA, T.; MIZUTANI, M. **Generation of  $\alpha$ -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene.** *Plant Physiology and Biochemistry*,131:70-77, 2018. doi:10.1016/j.plaphy.2018.04.026

NASCIMENTO, J. (2020). **Bioética e tecnologia.** *Revista Batista Pioneira*, v. 9, n. 2 2020.

NEKRASOV, V.; WANG, C.; WIN, J.; CHRISTA, L.; DETLEF, W.; SOPHIEN, K. **Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion.** *Sci Rep* 7, 482, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00578-x>

NIDHI, S.; ANAND, U.; OLEKSAK, P. **Novel CRISPR-Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives.** *Int J Mol Sci.*;22(7):3327, 2021 doi:10.3390/ijms22073327

OKUZAKI, A.; OGAWA, T.; KOIZUKA, C.; KANEKO, K.; INABA, M.; IMAMURA, J.; KOIZUKA, N. **CRISPR/ Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in Brassica napus.** *Plant Physiology and Biochemistry* ,131:63-69, 2018. doi:10.1016/j.plaphy.2018.04.025

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. 11 nov 1997. Disponível em: <http://bit.ly/1uZEttD>. Acesso em: 09 jun. 2022.

OUSTEROUT, D.G.; KABADI, A.M.; THAKORE, P.I.; MAJOROS, W.H.; REDDY, T.E.; GERSBACH, C.A. **Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing**

**for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy.** Nat. Commun.6:6244, 2015. doi: 10.1038/ncomms7244

PAUL, J. W.; Qi, Y. **CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects.** Plant Cell Reports, 35(7):1417-1427, 2016. doi:10.1007/s00299-016-1985-z

PENG, A.; CHEN, S.; LEI, T.; XU, L.; HE, Y.; WU, L.; YAO, L.; ZOU, X. **Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus.** Plant Biotechnol J, 2017.

PENNISI, E. **The tale of the TALEs.**15(12):1509-1519, 2012. doi:10.1111/pbi.1273

POLETTI, I. **Edição genômica mediada por crispr/cas na era do melhoramento genético vegetal de precisão.** Pelotas, 2021.

POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. **CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies.** Microbiology.;151:653–663, 2005. doi: 10.1099/mic.0.27437-0.

PRAMANIK, D.; SHELAKE, R. M.; KIM, M. J.; KIM, J. Y. **CRISPR-mediated engineering across the central dogma in plant biology for basic research and crop improvement.** Mol. Plant14(1):127-150, 2021. doi:10.1016/j.molp.2020.11.002

PURUGGANAN, M. D.; FULLER, D. Q. **The nature of selection during plant domestication.** Naturep. 843–848, 2009. DOI: 10.1038/nature07895

QUADROS, O. F.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, A. A. R.; FERNANDES, P. M. **Edição dirigida do genoma por CRISPR/Cas9: uma nova tecnologia para o melhoramento de plantas.** Incaper em Revista, Vitória, v.9, p. 6 - 15 2018.

RATH, D.; LINA, A.M.; ARCHANA, R.; MAGNUS, L. **The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications.** Biochimie, Amsterdã,117:119-128, 2015. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.025

RAZZAQ, A.; SALEEM, F.; KANWAL, M.; MUSTAFA, G.; YOUSAF, S.; ARSHAD, H. M. I.; HAMEED, M. K.; KHAN, M. S.; JOYIA, F. A. **Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox.**

International Journal of Molecular Sciences. 2019;20(16):4045, 2019. Published 2019 Aug 19. doi:10.3390/ijms20164045

SATHEESH, V.; ZHANG, H.; WANG, X.; LEI, M. **Precise editing of plant genomes – prospects and challenges**. Seminars in Cell & Developmental Biology,96:115-123, 2019. doi:10.1016/j.semcdb.2019.04.010

SGANZERLA, A.; PESSINI, L. **Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas**. Saúde em Debate, v. 44, n. 125 2020. <https://doi.org/10.1590/0103-1104202012519>

SHAN Q.; WANG, Y.; CHEN, K.; LIANG, Z.; LI, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, K.; LIU, J.; VOYTAS, D.F.; ZHENG, X. **Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs**. Mol. Plant.; 6:1365–1368, 2013. doi: 10.1093/mp/sss162

SHAN, Q.; WANG, Y.; LI, J.; ZHANG, Y.; CHEN, K.; LIANG, Z.; ZHANG, K.; LIU, J.; XI, J.J.; QIU, J.L. **Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system**. Nat. Biotechnology, 31(8):686-688, 2013. doi:10.1038/nbt.2650

SHELAKÉ, R. M.; PRAMANIK, D.; KIM, J. Y. **Exploration of plant-microbe interactions for sustainable agriculture in CRISPR era**. Microorganisms 2019 ;7(8):269. Published 2019 Aug 17. doi:10.3390/microorganisms7080269

SMITH, J.; GRIZOT, S.; ARNOULD, S.; DUCLERT, A.; EPINAT, J. C.; CHAMES, P.; PRIETO, J.; REDONDO, P.; BLANCO, F. J.; BRAVO, J.; MONTOYA, G.; PÂQUES, F.; DUCHATEAU, P. **A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences**. Nucleic Acids Research,34(22):e149, 2006. doi:10.1093/nar/gkl720

SUN, Y.; ZHANG, X.; WU, C.; HE, Y.; MA, Y.; HOU, H.; GUO, X.; DU, W.; ZHAO, Y.; XIA, L. **Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase**. Molecular Plant,9(4):628-631, 2016. doi:10.1016/j.molp.2016.01.001

WANG, K. **CRISPR and the future of genome engineering: a bold new world Intersect**: The Stanford Journal of Science, Technology, and Society, Stanford , 2017.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Molecular biology of the gene**. 5th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2004.

WATSON, J. D; CRICK, F. H. C. **A structure for deoxyribose nucleic acid**. *Nature*,171(4356):737-738, 1953. doi:10.1038/171737a0

WIEDENHEFT, B.; STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J.A. **RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea**. *Nature*, 2012;482(7385):331-338, 2012. Published 2012 Feb 15. doi:10.1038/nature10886

WYMAN, C.; KANAAR, R. **DNA double-strand break repair: all's well that ends well**. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto, v. 40, p. 363-383, 2006. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090451

XIE, K.; YANG, Y. **RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR–Cas System**. *Molecular Plant*,6(6):1975-1983. doi:10.1093/mp/sst119

ZHANG, D.; HURST, T.; DUAN, D.; CHEN, S. J. **Unified energetics analysis unravels SpCas9 cleavage activity for optimal gRNA design**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(18):8693-8698, 2019 .2019. doi:10.1073/pnas.1820523116

ZHANG, F.; WEN, Y.; GUO, X. **CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges**. *Hum Mol Genet.*;23(R1):R40-R46, 2014. doi:10.1093/hmg/ddu12