

Agron Science
Instituição Organizadora

**PESQUISAS E AVANÇOS EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR**

Agron Science
Instituição Organizadora

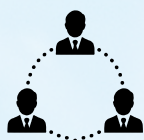
**PESQUISAS E AVANÇOS EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR**



Venda proibida



Open access



Revisado por
pares

EDITOR-CHEFE

Jackson Andson de Medeiros

REVISÃO FINAL

Jackson Andson de Medeiros

CAPA

Jalmir de Medeiros Pereira

Comissão Avaliadora

Aurora Marques Cianciarullo

Daniela Priscila Marchi Salvador

Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar

Gilberto Henrique

Jackeline Maria da Silva

Juliana Mara Serpeloni

Laurival Antonio Vilas-Boas

Phelipe Oliveira Favaron

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Pesquisas e avanços em genética e biologia
molecular [livro eletrônico] / organização
Agron Science. -- Jardim do Seridó, RN :
Agron Science, 2023.
PDF.

Vários autores.
Bibliografia.
ISBN 978-65-999658-0-7

1. Biologia molecular 2. Biologia molecular -
Obras de divulgação 3. Genética I. Agron Science.

23-141869

CDD-576.5

Índices para catálogo sistemático:

1. Genética : Pesquisas : Biologia 576.5

Aline Grazielle Benitez - Bibliotecária - CRB-1/3129



doi.org/10.53934/9786599965807

Todas as opiniões e textos presentes neste livro são de inteira responsabilidade de seus autores e coautores.

Apresentação

O Livro é composto por trabalhos publicados no I Congresso Nacional Online de Genética e Biologia Molecular, foi um evento que trouxe diferentes áreas importantes e atuais dentro da genética e biologia molecular e também incentivou a troca de experiências entre discentes, docentes e empresários, promovendo o desenvolvimento científico e tecnológico da ciência em um ambiente totalmente virtual, eliminando os impedimentos de locomoção de alguns cientistas e procurando elevar a participação de diferentes congressistas de diversos estados.

As áreas contempladas no livro foram: Bioinformática e Biologia Computacional; Citogenética Molecular; Genética do Desenvolvimento; Epigenética; Edição Genética; Regulação da Expressão Gênica; Terapia Genética; Análise Genética; Distúrbios Genéticos; Genética e Doenças Raras; Genoma e Biologia de Sistemas; Genética Médica e Medicina Genômica; Genética de Microrganismos; Genética Molecular; Imunologia Molecular; Farmacogenética e Farmacogenômica; Genética de Populações e Genética Evolutiva; Genética Quantitativa; Ensino em genética e biologia molecular; Genética vegetal.

SUMÁRIO

DOI: 10.53934/9786585062046-1	5
Capítulo 1	5
PRÁTICAS PEDAGÓGICAS E DESAFIOS NO ENSINO DE GENÉTICA ANTES, DURANTE E APÓS A PANDEMIA: REVISÃO DE LITERATURA	5
DOI: 10.53934/9786585062046-2	15
Capítulo 2	15
ESTRATÉGIAS MOLECULARES UTILIZADAS NO CONTROLE DA TRANSMISSÃO DE ARBOVIROSES PELO <i>Aedes Aegypti</i>: REVISÃO DE LITERATURA.....	15
DOI: 10.53934/9786585062046-3	29
Capítulo 3	29
Relevância dos genes RAB38 e ROBO1 na retinopatia falciforme: REVISÃO DE LITERATURA.....	29
DOI: 10.53934/9786585062046-4	39
Capítulo 4	39
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS E APLICAÇÕES NO TRATAMENTO DE DOENÇAS	39
DOI: 10.53934/9786585062046-5	54
Capítulo 5	54
IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS GENÉTICOS PARA A COMPREENSÃO DA SINGULARIDADE DO TRATAMENTO DOS GLIOMAS PEDIÁTRICOS DE ALTO GRAU	54
DOI: 10.53934/9786585062046-6	69
Capítulo 6	69
UMA BREVE RETOMADA TEÓRICA ACERCA DO USO DE JOGOS PEDAGÓGICOS NO ENSINO DE GENÉTICA	69

DOI: 10.53934/9786585062046-7	81
Capítulo 7	81
POLIMORFISMO <i>rs17151919</i> DO GENE <i>LEP</i> : IDENTIFICAÇÃO POR MEIO DA PCR COM INICIADORES ALELO ESPECÍFICOS	81
DOI: 10.53934/9786585062046-8	89
Capítulo 8	89
UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA CRISPR NA TERAPIA DE DOENÇAS AUTOIMUNES: REVISÃO DE LITERATURA	89
DOI: 10.53934/9786585062046-9	102
Capítulo 9	102
FAMÍLIA GÊNICA <i>PATHOGENESIS RELATED-PROTEIN 1 (PR1)</i> E SEU ENVOLVIMENTO NA DEFESA CONTRA FITOPATÓGENOS EM VIRIDIPLANTAE	102
DOI: 10.53934/9786585062046-10	115
Capítulo 10	115
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FATORES GENÉTICOS LIGADOS AO DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DE CODORNAS DE CORTE	115
DOI: 10.53934/9786585062046-11	130
Capítulo 11	130
APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA CRISPR NA PREVENÇÃO, DETECÇÃO E TRATAMENTO DA COVID-19: REVISÃO DE LITERATURA	130
DOI: 10.53934/9786585062046-12	140
Capítulo 12	140
FERRAMENTAS APLICADAS AO ESTUDO DA GENÔMICA EM PLANTAS	140
DOI: 10.53934/9786585062046-13	154
Capítulo 13	154
AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA EM ALÇA(<i>Loop-mediated isothermal amplification, LAMP</i>):UMA REVISÃO SOBRE APLICAÇÕES	154

DOI: 10.53934/9786585062046-14	169
Capítulo 14	169
ANÁLISE DE GENOMAS COMPLETOS DE SARS-COV-2 DE RESIDENTES DO ESPÍRITO SANTO	169
DOI: 10.53934/9786585062046-15	182
Capítulo 15	182
FITOQUÍMICOS E POTENCIAL NUTRACÊUTICO DO BURITI (<i>Mauritia flexuosa</i>): REVISÃO DE LITERATURA	182
DOI: 10.53934/9786585062046-16	190
Capítulo 16	190
AS INTERAÇÕES ENTRE A REVOLUCIONÁRIA NUTRIGENÔMICA E AS DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS: A ALIMENTAÇÃO NO ÂMBITO DA SAÚDE E DA DOENÇA	190
DOI: 10.53934/9786585062046-17	202
Capítulo 17	202
USO DA BIOINFORMÁTICA NO ESTUDO EVOLUTIVO DOS CULICÍDEOS	202
DOI: 10.53934/9786585062046-18	211
Capítulo 18	211
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ANÁLISE DA EXPRESSÃO in sílico DE SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASE (SHMT) EM <i>Jatropha curcas</i> SOB SALINIDADE	211
DOI: 10.53934/9786585062046-19	223
Capítulo 19	223
TÉCNICA DO DNA RECOMBINANTE PARA OBTENÇÃO DO COMPLEXO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS	223
DOI: 10.53934/9786585062046-20	236
Capítulo 20	236
ANÁLISE DO VIROMA DE RNA EM AMOSTRAS DE MORCEGOS <i>DESMODUS ROTUNDUS</i> DE UMA REGIÃO AMAZÔNICA	236

DOI: 10.53934/9786585062046-21	246
Capítulo 21	246
AVALIAÇÃO DO GENE <i>TEK</i> EM RELAÇÃO AO RISCO DE DESENVOLVIMENTO DO GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO JUVENIL: REVISÃO DE LITERATURA.....	246
DOI: 10.53934/9786585062046-22	260
Capítulo 22	260
APLICABILIDADES DA TECNOLOGIA CRISPR NO DIAGNÓSTICO E TERAPIA DO CÂNCER: REVISÃO DE LITERATURA.....	260
DOI: 10.53934/9786585062046-23	277
Capítulo 23	277
SÍNDROME DE EDWARDS PARCIAL ASSOCIADA À DUPLICAÇÃO TERMINAL DO BRAÇO LONGO DO CROMOSSOMO 5: RELATO DE CASO	277

DOI: 10.53934/9786585062046-1

Capítulo 1

PRÁTICAS PEDAGÓGICAS E DESAFIOS NO ENSINO DE GENÉTICA ANTES, DURANTE E APÓS A PANDEMIA: REVISÃO DE LITERATURA

Juliana Aljahara Sousa do Nascimento *; Niksoney Azevedo Mendonça ; Mateus Monteles Vieira ; Juliene Aljahara Sousa Cardoso ; Lucianne Martins Lobato ; Giselly Martins Lobato ; Carlos José Sousa do Nascimento 

**Autor correspondente (Corresponding author) – Email: julianaaljahara4@gmail.com*

Resumo: O ensino de Genética é considerado por muitos professores uma ação que engloba conteúdos difíceis para serem mediados, e isso acontece porque há grande riqueza de detalhes e conceitos complexos; essa problemática acentuou-se nos últimos anos pelo contexto pandêmico. A transmissão de conhecimento científico passou por transformações e, conseqüentemente, precisou ser adaptada com aplicação de práticas pedagógicas que viabilizassem a sistematização do saber elaborado. O estudo foi realizado a partir das ferramentas de pesquisa das plataformas Google Acadêmico, Base de Dados do Scielo, Periódicos Capes e Elsevier, com o uso das palavras chaves: “Genética”. “tempos pandêmicos”. “Ensino e aprendizagem” e “práticas pedagógicas”. As práticas pedagógicas são ferramentas importantes no desenvolvimento crítico dos alunos. Entretanto, alguns desafios são evidentes (já vistos antes mesmo da pandemia), esperados também após a atual conjuntura. Objetivou-se, com esta pesquisa, elencar informações relacionadas ao ensino de Genética em um contexto pandêmico e as práticas mais utilizadas pelos docentes nesse processo de mediação do conhecimento, buscando trazer informações para contribuir com o acervo de conhecimentos já existentes. Concluiu-se que mapa mental, flashcards, jogos de cartas, jogos de perguntas e respostas (Quiz), Modelos didáticos, jogos de tradução proteica e *Padlet* foram as estratégias mais utilizadas. A adoção de tais recursos potencializou a consolidação de aprendizagens coletivas e interações interpessoais. O professor precisa se reinventar e buscar metodologias ativas e práticas para construção do conhecimento e disseminação do saber elaborado de forma acessível, inclusiva e inovadora, de modo que o indivíduo seja a personagem central do processo.

Palavras-chave: ensino; genética; pandemia; práticas pedagógicas

INTRODUÇÃO

O processo de ensino e aprendizagem, há muito tempo, vem passando por modificações para se adaptar aos alunos e aos contextos em que estão inseridos. A Genética é um componente curricular importante para os estudantes do Ensino Médio na disciplina Biologia. Contudo, são baixos os índices de aprendizagem em sua escolarização (1).

Por muito tempo, o ensino de Genética apresentou-se desafiadoramente aos professores devido à sua complexidade e às mudanças que essa ciência vem passando. A partir das descobertas históricas a respeito da Genética, o ser humano foi aperfeiçoando os conhecimentos na área, e está atualmente contida a diversos setores, como: Saúde, Ecologia, Genética molecular, Genética Forense e áreas afins. Nesse sentido, é de fundamental importância que os estudantes, ainda na fase escolar, compreendam os conceitos básicos da Genética - para uma melhor interação com a nossa realidade e a compreensão de sua importância (2).

Em tempos de Covid-19, os professores foram confrontados com o trauma coletivo da perda e com a necessidade de se adaptar a novos arranjos para lidar com a Educação mediada por tecnologias digitais. De um lado, queremos esquecer esse período de luto, de crianças sem acesso à educação e de professores sem capacitação (3). Por força da crise sanitária imposta pela pandemia da Covid-19, as escolas foram fechadas e os professores precisam se apropriar de saberes necessários para atuar em ambientes virtuais de ensino e aprendizagem. Em relação a isso, a Portaria nº 343, de 17 de março de 2020, dispôs sobre a substituição das aulas presenciais por aulas em meios digitais - enquanto durar a situação de pandemia do novo coronavírus-Covid-19 (4).

Após a vacina e a diminuição dos casos, os alunos retornaram para a sala de aula, muito deles, sem o mesmo ritmo de estudo de antes. Considerando a dificuldade da disciplina de Genética e a falta de costume dos alunos com a sala de aula, tal como com os conteúdos, é imprescindível o uso de intervenções. Nos últimos anos, alguns estudos vêm sendo feitos para serem elaboradas estratégias para o processo ensino-aprendizagem de Genética. Considerando a necessidade de adotar estratégias que visam facilitar a abordagem de conteúdos com maior nível de complexidade, alguns estudos mostram a importância de utilizar recursos que vão facilitar e diminuir a dificuldade encontrada ao longo do fenômeno de ensino e aprendizagem pelos professores e alunos.

Segundo Campos et. al. (5), utilizar materiais diversificados pode ser uma forma de contribuir para a aprendizagem significativa e a redução das dificuldades de aprendizagem desses conteúdos. Por exemplo, a utilização de jogos didáticos que potencializam a participação ativa dos alunos e assim estimulam a aprendizagem ativa que auxilia a construção autônoma do conhecimento (5).

Assim, o uso de novas metodologias de ensino, baseadas em um trabalho que permita ao aluno aprender, construir o seu próprio conhecimento e adquirir um pensamento crítico, faz-se necessário (6). Dessa forma, o principal objetivo deste estudo foi abordar os desafios e as práticas pedagógicas no ambiente escolar durante o período pandêmico.

GENÉTICA NA FORMAÇÃO INICIAL DO PROFESSOR, UM PROBLEMA ANTES, DURANTE E APÓS A PANDEMIA

A formação docente e continuada de profissionais da Educação pode ser um dos grandes problemas quando falamos de formação de professores qualificados e aptos para desenvolverem metodologias ativas no contexto do ensino de Genética - problema vivenciado antes, durante e após a pandemia da Covid-19.

Entretanto, durante a pandemia, as dificuldades de se trabalhar essa temática foram mais visíveis devido às grandes restrições sociais que atingiram drasticamente o sistema

escolar. A Genética é considerada uma área do conhecimento extremamente importante, que envolve assimilação de conceitos práticos no âmbito escolar. Segundo Elias et. al. (7), o processo de ensino e aprendizagem em Genética é um desafio que será enfrentado pelos educadores.

Segundo Almeida (8) o que se espera na prática de formação inicial é que os graduados tenham a oportunidade de compreender e aplicar os métodos de ensino, e que possam desenvolver uma ampla gama de conhecimentos, valores e estilos que serão aplicados em suas atividades profissionais. Sousa (9) por exemplo, afirma que os licenciandos em início de carreira não estarão totalmente preparados para a construção do conhecimento, ou seja, é necessário buscar estratégias facilitadoras e uma formação continuada para haver rompimento dessas dificuldades que os estudantes carregam consigo, o que pode gerar a formação de ciclos contínuos, impedindo a formação do conhecimento apropriado.

Entretanto, a educação brasileira, no que diz respeito a formação continuada do professor, apresenta um problema a ser enfrentado devido ao fato de que, na maioria das vezes, a procura por essa formação é objetivada, especificamente, a fim de suprir uma carência na formação inicial ou de acrescentar linhas ao currículo, visando a busca pela progressão na carreira e não pela construção e melhoria do saber elaborado (10).

LIMITAÇÕES NO ÂMBITO ESCOLAR, DESAFIOS NA CONSTRUÇÃO EDUCACIONAL FRENTE À PANDEMIA

As condições de trabalho no processo de ensino e aprendizagem são indispensáveis. Dentre as diversas características para um bom resultado na transmissão do conhecimento elaborado, podemos citar o local de trabalho; antes da pandemia, os professores tinham que se deslocar para as salas de aula e deparavam-se com ambientes com lotação máxima, sem conforto, e em alguns casos, sem ventilação - o que tornava tudo mais difícil. Na maioria das vezes, esses professores não tinham motivação para realizar atividades diferentes, como, por exemplo, a elaboração de recursos didáticos, jogos, dinâmicas, dentre outros.

Essa ausência de condições de trabalho adequadas interfere diretamente no rendimento dos docentes, consequentemente gerava e gera um impacto no trabalho, resultando na diminuição de autonomia do professor e interferindo no seu processo de organização de sua função. As condições de trabalho compõem os requisitos que formam o conceito de valorização docente e elas compreendem aspectos cruciais para a realização profissional (11).

Em 2020, os professores precisaram passar por adaptações pela situação imposta pela pandemia, que levou ao distanciamento social e à execução das atividades de ensino remotamente - que é a EAD. Esta situação acentuou outros problemas que seriam empecilhos para o desenvolvimento dessas atividades e, mesmo não sendo nas escolas, a falta de condições de trabalho ainda era presente, o professor precisou se reinventar em condições ainda piores.

Há ausência dos meios necessários para o pleno desenvolvimento das atividades, como: falta de equipamentos adequados (como computadores, tablets, microfones e câmeras), conexão à rede de internet, formação suficiente para lidar com os programas e os recursos tecnológicos. Ademais, há pouca (ou total) ausência de experiência com

ambientes virtuais e até questões relacionadas ao suporte pedagógico para a realização do trabalho (11).

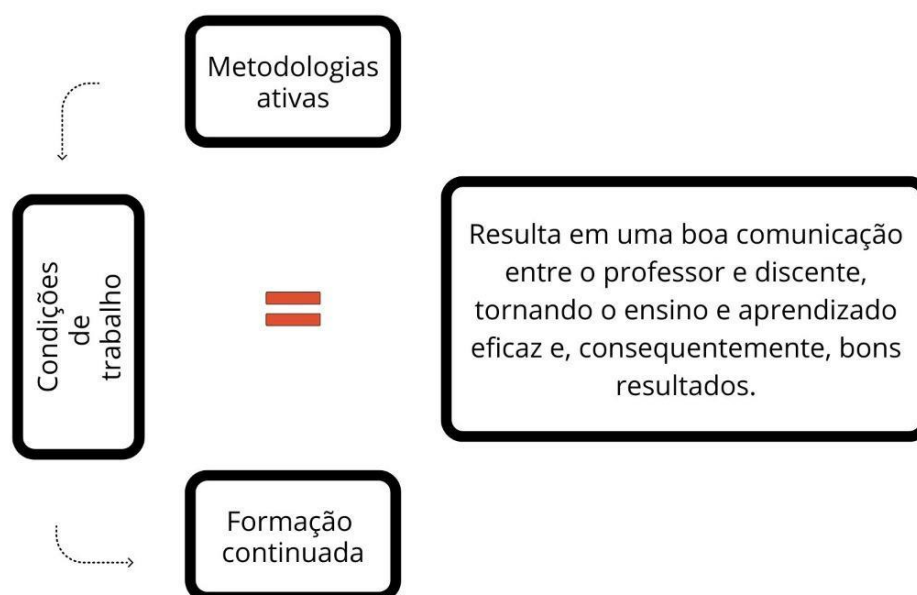


Figura 1 - Sinergia entre condições de ensino adequadas, metodologias ativas e formação continuada
 Fonte: Produção autoral, 2022

PRÁTICAS PEDAGÓGICAS MAIS USUAIS NO ENSINO DE GENÉTICA DURANTE E APÓS A PANDEMIA E SUA IMPORTÂNCIA

As práticas pedagógicas são vistas como importantes ferramentas para construção reflexiva e formação crítica do aluno, pois promovem maior assimilação dos conteúdos considerados difíceis pelos professores, o que permitirá uma maior contextualização de conceitos inseridos na área da Genética, por exemplo. Nesse sentido, é de fundamental importância que os estudantes, ainda na fase escolar, compreendam os conceitos básicos da Genética, para uma melhor interação com a nossa atualidade e a compreensão de sua importância (2).

Diante dessas práticas, a aplicabilidade do método depende não só da disponibilidade do recurso, mas também de um professor atuante e inovador, que instigue o aluno a aprender, estimulando sua interação e, até mesmo, à convivência com os colegas (12). O que adianta ter recurso, e não ter um professor apto e preparado para desenvolver essas práticas pedagógicas? (principalmente no que diz respeito às subáreas da Genética voltadas aos conhecimentos da dinâmica da natureza e da vida, envolvendo e auxiliando nas questões polêmicas que instigam a Ciência (2).

Tornar as aulas mais atrativas, dinâmicas e inseridas na realidade sociológica e tecnológica atuais é algo não só sumariamente importante, mas também extremamente desafiador (8). Os modelos e recursos didáticos são opções eficientes para auxiliar o entendimento de determinados conteúdos considerados mais complexos e abstratos, transformando em assuntos mais atrativos e facilitando o entendimento. Considerando a

necessidade do professor em ministrar o conteúdo de maneira mais clara e objetiva possível, a utilização de recursos didáticos é indispensável, visto que a utilização desses materiais aproxima os alunos do conteúdo, tornando-os mais lúdicos, chamando atenção dos alunos e aguçando o senso crítico dos mesmos.

As atividades que envolveram as práticas pedagógicas foram essenciais durante o período pandêmico - e serão também após a pandemia, pois durante esse período os professores enfrentarão grandes dificuldades para estabelecer a construção do conhecimento, exigindo destes formas alternativas e práticas para disseminação desse saber. Algumas alternativas são observadas no quadro 1.

Quadro 1 - Recursos didáticos mais utilizados no período pandêmico e pós-pandêmico.

Recursos didáticos	Área do conhecimento - Genética	Autor
Jogos de cartas (FlashCards)	Hereditariedade	(BISSOLI; SANTOS; CONDE, 2018)
Jogos de perguntas e respostas (Quiz)	Herança genética	(BISSOLI; SANTOS; CONDE, 2018)
Mapa mental	Hereditariedade	(BISSOLI; SANTOS; CONDE, 2018)
jogo da tradução proteica	Tradução do RNA	(REZENDE; GOMES, 2018)
Modelos didáticos	Replicação do DNA	(REZENDE; GOMES, 2018)
Modelos didáticos	Estrutura química do DNA	(REZENDE; GOMES, 2018)
Cartas do Jogo (Genética em Jogo)	Padrões de herança	(CARVALHO; PEREIRA; ANTUNES, 2021)
Jogos de cartas	Determinação dos alelos	(CARVALHO; PEREIRA; ANTUNES, 2021)
Padlet	Assuntos gerais da genética	(PEREIRA, 2021)

Algumas alternativas são citadas pelos autores Bissoli et. al. (13), como o jogo de cartas - FlashCards, quiz e mapa mental. Nos Flashcards, utilizaram breves descrições do conteúdo de Genética Básica na área de hereditariedade, em forma de perguntas para ajudar os alunos no processo de aprendizagem, um recurso bem interessante para revisão de pré-avaliação. A própria interface dos FlashCards auxilia o aluno a se reconhecer, ou não, determinado conteúdo onde o indivíduo poderá sinalizar como positivo ou negativo (sob grau de dominância dos conteúdos). Caso ele não conheça, poderá também apertar sobre a carta para ter mais informações.

Quando os alunos terminam de usar os Flashcards, o site mostra os itens perdidos e quantos foram perdidos, dando-lhes a opção de ocultar os corretos no momento em que a atividade é reiniciada, para que os alunos possam se concentrar melhor nas dificuldades e.

finalmente, o programa mostra ao professor a média de acertos de cada aluno e a média geral da turma (13).

Além disto, os autores citam também a utilização de quiz como um jogo interativo para se trabalhar assuntos como herança genética e determinação de sexo com a utilização de perguntas de múltipla escolha. Dessa forma, o professor consegue realizar inferências sobre o conhecimento daquele aluno, uma forma eficaz de avaliar e diagnosticar uma turma. O mapa mental se mostra como uma excelente técnica de apresentação de um conteúdo, pois no mapa mental o aluno tem liberdade de montar uma rede de informações com um assunto central. Tal técnica se torna eficiente e interessante para o professor aplicar porque o aluno terá aproximação em estabelecer conexões entre os temas de Genética - dos quais ele estudará, útil na utilização de revisão de conteúdo.

Segundo Rezende et. al. (6), os jogos e os modelos didáticos são fontes de conhecimentos que podem ser usados para trabalhar conteúdos de Genética como estrutura química, tradução e replicação do DNA. Esses recursos são ferramentas importantes no processo de ensino do aluno, onde eles mesmos podem confeccionar seus materiais com auxílio de um professor. Dessa forma, utilizar e aplicar jogos e modelos didáticos em sala de aula auxiliá e possibilitará uma melhor assimilação dos conteúdos teóricos, podendo ser revisados e estudados em um ambiente fora da sala de aula.

Outras formas são citadas por Carvalho et. al. (14), que utilizaram jogos de cartas para trabalhar temas da área de Genética, como: padrões de herança e determinação de alelos. Como resultado, eles perceberam que os jogos estimulam o desenvolvimento de habilidades e competências importantes que não podem ser medidas e/ou quantificadas por meio de testes realizados pelos estudantes. O estudo permitiu concluir que a utilização de ferramentas de apoio ao ensino pelos professores pode tornar o processo mais atrativo e interessante (14).

Pereira (15) cita a utilização do *padlet* no ensino remoto e híbrido como recurso adicional nas aulas de Genética. O *padlet* é uma ferramenta onde o professor tem a liberdade de criar murais e atividades virtuais com a turma. O uso do *Padlet* e o desenvolvimento dessas atividades no ensino híbrido têm sido muito populares e, além de proporcionarem discussão de conteúdo, também têm contribuído para uma escrita mais eficaz do vocabulário de Genética. O uso de ferramentas tecnológicas pode facilitar a troca de ideias entre os alunos e a construção do aprendizado coletivo (15).

INTERMEDIÇÃO DO CONHECIMENTO ELABORADO — CENÁRIOS, OBSTÁCULOS E POTENCIALIDADES

Segundo delineamento da Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional, as ações presentes ao longo do processo de ensino e aprendizagem não devem estar sob restrição única da transmissão de informações — é necessário fundamentar-se, sobretudo, no intento de formar indivíduos com posicionamento ativo e crítico sobre o meio social em que estão presentes. Contudo, para que tal objetivação seja realizada de modo satisfatório, o professor — na função de intermediar do conhecimento científico, precisa acompanhar e desenvolver ações que repassem conhecimentos sob uso de instrumentos metodológicos distintos — elucidando e inserindo novas óticas pedagógicas sob contextualizações e atitude investigativa (1). Por certo, quando restrito a configuração tradicional de transmissão de conhecimento, há indução de desestímulo aos indivíduos.

No atual cenário global de desafios impostos pela crise sanitária e humanitária da COVID-19, as metodologias ativas têm sido grandes aliadas como ferramentas no desenvolvimento de ações de ensino (16). Assim, há realocação dos indivíduos presentes no processo como personagens e centro da objetivação maior da aprendizagem, visto que tal estratégia (amparadas com produções e tecnologias digitais) representam uma vanguarda em forma de intermediação do ensino científico, auxiliando diretamente no processo de obtenção de conhecimentos transversais compartilhados entre os discentes.

Logo, é iminente tensionar e reconfigurar o arcabouço das aulas e momentos diversos de ensino sob o atual cenário, pois é preciso os docentes apropriarem-se do uso de tais ferramentas disponíveis e sujeitá-las a melhoramentos constantes — atribuindo novos valores ao longo de todo o processo ensino-aprendizagem. Assim, ocorrerá estímulo de atitudes críticas, investigativas e reflexivas — consolidando visões e experiências enriquecedoras na totalidade do processo (1).

Atividades pedagógicas distintas desenvolvem-se também nos meios digitais, atualmente presentes em maior porcentagem no desenvolvimento de aulas remotas — possibilitadoras de continuidade da periodicidade constante de ensino e diminuição problemáticas intrinsecamente relacionadas ao aprendizado (sob delimitações do atual cenário pandêmico). Assim, possibilidades e potencialidades são continuamente desenvolvidas nas estruturas de ensino, pois há necessidade de adaptar ações e processos às imposições atuais de interações sociais (17).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura, a nova configuração em que se dão as relações e sinergias nas comunidades envolvidas no complexo mecanismo de ensino e aprendizagem, sugere-se que — sob particularidades da atual conjuntura mundial — prioridades sejam adotadas por instituições de educação e pesquisas de estratégias mais eficientes a serem empregadas, como programas de inclusão digital, cuidados com os dados desenvolvidos (e obtidos), importância dos fatores psicossociais, programação de agendas a fim de dimensionar e influenciar abordagens pedagógicas, formações continuadas para docentes e propostas distintas a serem aplicadas como modo de avaliação dos indivíduos (18).

Assim, as ações de discussão e reflexão oriundas do cenário atual nos possibilitam elaborar rearranjos em métodos e técnicas ativos, sobretudo ao que tangencia o ensino de modo híbrido, evidenciado como potenciais promotores de processo de intermediação de conhecimento elaborado moldado para valorizar o discente, ponderando a periodicidade do processo e autonomia destinada à cada ser ao longo do processo (19).

Informações desenvolvidas ao longo do período letivo agregam muito ao entendimento holístico do atual cenário pandêmico, delineando necessidades recorrentes aos docentes de Ciências nas ações que visam desenvolver melhoramentos a serem implantados nas respectivas práticas cotidianas (20), podendo ser consolidadas atividades inovadoras a fim de implementar estratégias pedagógicas sob múltiplas visões, ressaltando a diversidade de cenários, subjetividades e aptidões dos indivíduos (21; 22)

CONCLUSÕES

Quanto às singularidades do processo de formação do docente, sob o atual cenário de crise sanitária, é imprescindível aplicar metodologias ativas e melhoramentos na qualificação continuada dos intermediadores de conhecimento elaborado, visto que há necessidade de driblar obstáculos de ordens distintas, como a desigualdade social.

Os docentes devem aplicar estratégias pedagógicas, desenvolvendo habilidades distintas ao longo da atividade profissional de cada indivíduo — adotando, assim, ferramentas que facilitem o processo ensino-aprendizagem e superem problemas individuais expressos ao longo da apropriação do conhecimento científico.

Nos cenários pandêmicos e pós pandêmicos, os recursos didáticos mais utilizados (no ensino de Genética) foram: mapa mental, flashcards, jogos de cartas, jogos de perguntas e respostas (Quiz), modelos didáticos, jogo de tradução proteica e *Padlet*. A adoção de tais recursos potencializou a consolidação de aprendizagens coletivas e interações interpessoais.

Os espaços de educação formal e informal devem possuir o mínimo possível para desenvolver atividades de ensino de modo satisfatório. Logo, as condições de trabalho e suporte aos canais de atividades devem receber atenção especial, viabilizando a autonomia de cada docente e permitindo que desenvolvam rearranjos e adaptações ao seu modo de atuação; é de suma importância o estímulo a adaptações contínuas.

O estímulo ao aluno assume papel relevante na promoção da capacidade de contextualização e interações com o cotidiano. Para tal, é de suma necessidade implantar — sob a atual conjuntura — atividades dinâmicas, interativas por intermédio da diversidade e realidade social e tecnológica de cada indivíduo; instituições devem adotar ações de inclusão digital, atenção a questões psicossociais, formação continuada e agendas inovadoras.

REFERÊNCIAS

1. Leal CA, Meirelles RMS, Rôças G. O que estudantes do ensino médio pensam sobre genética? Concepções discentes baseada na Análise de conteúdo. *Revista Eletrônica Científica Ensino Interdisciplinar*. 2019; 5(13): 1-16
2. Coelho MLRA. Uma revisão bibliográfica sobre o ensino de genética no ensino médio. [Tcc]. João Pessoa: Universidade da Paraíba; 2021.
3. Carvalho FM, Faria AL, Brito RO. Formação continuada em tempos de pandemia da Covid-19: desafios e perspectivas de professores para o ensino pós-pandemia. *Research, Society and Development*. 2021. 10(6): 1-9.
4. Brasil. Ministério da Educação. Portaria nº 343, de 17 de março de 2020. Dispõe sobre a substituição das aulas presenciais por aulas em meios digitais enquanto durar a situação de pandemia do Novo Coronavírus - COVID-19. *Diário Oficial União*. 18 de Março 2020; Seção 1:39.
5. Campos R, Menezes MCVA, Araújo M. Ensinar Genética e Evolução por meio de jogos didáticos: superando concepções alternativas de professores de ciências em formação. *Genética na Escola*. 2018; 13:1-14.
6. Rezende LP, Gomes, SCS. Uso de modelos didáticos no Ensino de Genética: estratégias metodológicas para o aprendizado. *Revista de Educação, Ciências e Matemática*. 2018; 8(2): 107-124.

7. Elias MA, Ronquim J. Ensino de genética por meio da interdisciplinaridade entre biologia e planejamento urbano. *Revista Museu Dinâmico Interdisciplinar*. 2020; 24(2): 22-29.
8. Almeida LBM. Os desafios que permeiam os caminhos dos professores do ensino médio: uma abordagem sobre o ensino de genética em escolas do município de Viçosa-MG. [tese]. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa; 2021.
9. Sousa ES. Genética em sala de aula: uma análise das percepções e metodologias empregadas por professores das escolas públicas e estaduais de Jaguaribe Ceará; Conexões - Ciência e Tecnologia. 2019; 10:16-24.
10. Freitas LM, Henz CI, Bolzan DPV, Silveira MN. Políticas públicas para formação continuada de professores no ensino médio. *Políticas Educativas*. 2018; 12(1): 115-134.
11. Oliveira, DA. Condições de trabalho docente e a defesa da escola pública: fragilidades evidenciadas pela pandemia. *Revista USP*. 2020; 127: 27-40.
12. Maia MSD, Jacomelli MK. A importância do ensino especializado, na sala de recursos, como estratégia de aprendizagem na formação da criança com TEA. *Revista Psicologia & Saberes*. 2019; 8(11): 320-337.
13. Bissoli ACF; Santos, GA; Conde SJ. Learning Material design for teaching Genetics while implementing Flipped Classroom. *Revista Ibero-Americana de Estudos em Educação*. 2018; 13(1): 468-478.
14. Carvalho IA, Pereira MB, Antunes JE. Proposta de jogo didático para ensino de genética como metodologia ativa no ensino de biologia. *Revista Eletrônica de Educação*. 2021; 15:1-14.
15. Pereira JA. Padlet como recurso didático no ensino de genética em meio a pandemia: um relato de experiência. *Experiências em Ensino de Ciências*. 2021; 16(3): 1-14.
16. Morán, J. Mudando a educação com metodologias ativas. *Coleção Mídias Contemporâneas. Convergências Midiáticas, Educação e Cidadania: aproximações jovens*. 2018; 2(1): 15-33.
17. Barbosa AT, Ferreira GL, Kato DS. O ensino remoto emergencial de Ciências e Biologia em tempos de pandemia: com a palavra as professoras da Regional 4 da Sbenbio (MG/GO/TO/DF). *Revista De Ensino De Biologia Da SBEnBio*. 2020; 13(2): 379-399.
18. UNESCO. Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura. COVID-19: 10 Recommendations to plan distance learning solutions [Internet]. 2020 [03/08/2022]. Disponível em: <https://en.unesco.org/news/covid-19-10-recommendations-plandistancelearning>.
19. Bacich L, Moran J. Metodologias ativas para uma educação inovadora: uma abordagem teórico-prática. 2. ed. Porto Alegre: Penso, 2018.

20. Borba RC, Texeira PP, Fernandes KDOB, Bertagna M, Valença CR, Souza LHP. Percepções docentes e práticas de ensino de ciências e biologia na pandemia: uma investigação da Regional 2 da SBEnBio. *Revista de Ensino de Biologia da SBEnBio*, 2020; 13(1): 153-171.
21. Levrini O, Levin M, Fantini P, Tasquier G. Orchestration of classroom discussions that foster appropriation. *Science Education*. 2019; 103(1): 206- 235.
22. Levrini O, Levin M, Fantini P. Fostering appropriation through designing for multiple access points to a multidimensional understanding of physics. *Physical Review Physics Education Research*. 2020; 16(2): 1-16.

DOI: 10.53934/9786585062046-2

Capítulo 2

ESTRATÉGIAS MOLECULARES UTILIZADAS NO CONTROLE DA TRANSMISSÃO DE ARBOVIROSES PELO *Aedes Aegypti*: REVISÃO DE LITERATURA

Anderson Henrique da Silva Barbosa *; Ana Vitória Gomes da Silva ; Lucas Kawan Alves de Carvalho ; Rayan Michael dos Santos Soares ; Thaís Marques de Santana ; Thaís Silva de Melo ; Fabiana América Silva Dantas de Souza 

*Autor correspondente (Corresponding author) - Email: faabiana.americasouza@gmail.com

Resumo: O mosquito vetor *Aedes aegypti* transmite importantes arboviroses, como os vírus da Dengue, Zika e Chikungunya. Com uma carga crescente de infecções e o fracasso dos métodos de controle tradicionais, o desenvolvimento de medidas de controle inovadoras tornou-se de suma importância. Diante desta questão, este trabalho de revisão da literatura, visa destacar as principais estratégias moleculares relevantes no controle das arboviroses. Os resultados mostram que há principalmente duas formas utilizadas no controle genético do mosquito: a supressão e a reposição populacional. O primeiro método de controle visa erradicar as populações de mosquitos, enquanto o segundo, visa trocar as atuais populações de vetores por mosquitos transgênicos resistentes a patógenos. Estima-se que, dentro de 20 anos, a edição de mosquitos por CRISPR/Cas9, provavelmente, será a tecnologia mais promissora para prevenção e controle de vetores de arboviroses, devido sua acessibilidade, baixo custo, e eficiência na edição de genomas. De acordo com os dados encontrados, é possível concluir que, quando estiver totalmente desenvolvida, essa nova tecnologia poderá apoiar os esforços globais de saúde pública destinados a reduzir a transmissão, mortalidade e morbidade das arboviroses.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; chikungunya; CRISPR; dengue; zika

INTRODUÇÃO

A disseminação de arboviroses se apresenta como uma grave problemática de saúde pública, afetando diversas pessoas ao redor do mundo. Estima-se que mais de 700.000 indivíduos morrem por ano em decorrência de doenças transmitidas por vetores de arbovírus (1). À exemplo das populações mais impactadas por este impasse, é notório que a maior incidência de arboviroses se dá em locais onde as alterações climáticas são perceptíveis, aliando-se a influência dos baixos índices de desenvolvimento humano (2,3).

Os métodos tradicionais de controle de organismos vetores baseiam-se no uso de inseticidas, demonstrando resultados relativamente consideráveis, principalmente, no

combate à Malária, sendo aplicável também para vetores de Dengue, Zika, Chikungunya e outras patologias transmitidas por insetos (4). Entretanto, a abordagem com o uso de inseticidas já não é mais indicada, visto que a resistência adquirida por insetos vetores pode comprometer os esforços para o controle das doenças supracitadas (5).

Devido a crescente busca por métodos de erradicação de arbovirose, várias abordagens a nível celular e molecular foram desenvolvidas. Dentre as principais metodologias, destaca-se a CRISPR/Cas9, visto a sua eficácia na edição genômica de mosquitos do gênero *Aedes* (1). Outras técnicas incluem o desenvolvimento de vacinas, dentre as quais destaca-se a abordagem baseada em eVLP (partículas virais envelopadas); há também o método *Wolbachia*, que proporciona infecção por cepas de *Wolbachia* sp. em mosquitos, impossibilitando o desenvolvimento da prole; e, por fim, as variações da CRISPR/Cas9, como por exemplo, a tecnologia de Gene Drive (6–8).

Apesar do sucesso das técnicas de manipulação molecular, estudos alertam para potenciais impactos das estratégias genômicas utilizadas para controle populacional de mosquitos-vetores (9). As pautas éticas, com enfoque na conservação e preservação biológica, discutem os riscos da inclusão de mosquitos geneticamente modificados no ambiente, além da possibilidade de alterações ecológicas mediante a redução populacional dos insetos-alvo (10). Portanto, é preciso haver análises criteriosas antes da implementação prática destes métodos.

Considerando a alta quantidade de técnicas de manipulação gênica, faz-se necessário analisar as especificidades e perspectivas associadas às metodologias biotecnológicas de controle populacional de mosquitos-vetores que possuem importância médica, em especial, o *Aedes aegypti*. Deste modo, este trabalho aborda, através de uma revisão de literatura, as principais estratégias moleculares utilizadas para erradicar arbovirose, bem como os aspectos éticos e ambientais que permeiam estes métodos.

ESTRATÉGIAS GENÉTICAS PARA CONTER A TRANSMISSÃO DE ARBOVIROSES PELO *Aedes aegypti*

Existem várias estratégias para o combate às arbovirose transmitidas pelo *Aedes aegypti*, e uma delas é a JAK/STAT, que funciona como um transdutor de sinal e ativador de transcrição. Esta técnica é uma via de sinalização que controla o desenvolvimento da imunidade viral em mamíferos e invertebrados. A via JAK/STAT age através do silenciamento do gene mediado por RNAi do inibidor da proteína do STAT ativado (PIAS) e objetiva tornar os mosquitos mais resistentes à infecção por DENV (11). Todavia, mosquitos transgênicos mostraram que os níveis de infecção por DENV 2 e DENV 4 não apresentam diminuição significativa, portanto, esta abordagem transgênica pode não ser suficiente para interromper completamente a propagação do vírus (8).

Outra estratégia para combater os arbovírus é a técnica de MicroRNAs (miRNA). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes, capazes de regular a expressão de genes pós-transcrição, e atuam degradando ou suprimindo a tradução de moléculas-alvo (12). Esta estratégia possibilita que os genes causadores da DENV 3, CHIKV e ZIKV sejam suprimidos e, com isso, o silenciamento genético dos genes e do genoma pode resultar em uma diminuição na expressão gênica, fazendo com que os vetores percam a capacidade de se infectar com os agentes virais mencionados (13). Além disso, o uso de miRNAs sintéticos

também induz a resistência antiviral dos mosquitos vetores contra os vírus DENV-3 e CHIKV (14).

O CRISPR/Cas9 para nocaute gênico é mais um tipo de técnica para combate aos arbovírus. O nocaute de genes é uma estratégia genética que permite o bloqueio da expressão de um gene específico no organismo. Este método foi implementado em mosquitos fêmeas, e fez com que elas perdessem a funcionalidade em proteínas utilizadas no voo, como a actina (*AeAct-4*) e miosina (*myo-fem*), que normalmente estão expressas no músculo da asa da fêmea. A completa falta destes genes faz com que todas as fêmeas não sejam capazes de usar as asas para locomoção (15). Uma vez que as fêmeas dependem do voo para realizar suas necessidades fisiológicas diárias, como acasalar e se alimentar do sangue de um hospedeiro, a incapacidade de voar dificulta a transmissão de patógenos.

Com o desenvolvimento do sistema CRISPR/Cas9, muitos organismos diferentes podem ter seus genomas alterados (16). A técnica CRISPR/Cas9 pode ser usada para interromper o sexo nas isoformas das fêmeas de *Aedes aegypti* (*AedsxF1* e *AedsxF2*). Como resultado desta estratégia, o percentual de fecundidade da fêmea diminui enquanto a taxa de dificuldade na eclosão aumenta, e a fertilidade da fêmea se torna cada vez mais comprometida. Estes resultados dão a entender que as abordagens por meio de controle genético são fundamentais para a diminuição da proliferação de doenças arbovirais (17). As principais pesquisas com estratégias de controle de arbovirose estão postas na tabela 1.

Tabela 1 - Pesquisas envolvendo estratégias para conter a transmissão de arbovirose pelo *Aedes aegypti*

Vírus	Estratégia	Metodologia	Referência
DENV2/4	Super expressão de componentes no caminho JAK/STAT	<i>piggyBac</i>	Jupatanakul <i>et al.</i> , (11)
DENV3/CHIKV	RNAs sintéticos direcionados ao genoma do vírus, desencadeando imunidade antiviral de miRNA	<i>Mariner Mos1</i>	Yen <i>et al.</i> , (14)
ZIKV	RNAs sintéticos direcionados ao genoma do vírus, desencadeando imunidade antiviral de miRNA	<i>piggyBac</i>	Buchman <i>et al.</i> , (13)
DENV1-4 ZIKV CHIKV	Nocaut de genes especificamente expressos em mosquitos fêmeas associadas aos músculos de voo incluindo actina (AeAct-4) e miosina (myo-fem), geramos de perda de função	CRISPR/Cas9 para nocaut gênico	O'Leary e Adelman, (15)
DENV1-4	<i>A. aegypti</i> projetado para expressar anticorpo de fragmento variável de cadeia simples (scFv) anti-DENV, baseado em 1C19, para fornecer proteção contra todos os quatro sorotipos de DENV, neutralizando-os	Gene drive baseado em CRISPR/Cas9	Noor <i>et al.</i> , (10)
DENV1-4 ZIKV CHIKV	Rompimento das isoformas específicas da fêmea, AedxF1 e AedxF2, ambas expressas apenas em mosquitos fêmeas	Controle genético utilizando CRISPR/Cas9	Ranian <i>et al.</i> , (17)

ABORDAGENS BASEADAS EM *WOLBACHIA*

Wolbachia pode ser definida como um gênero de bactérias intracelulares que estão presentes em vários artrópodes, mas geralmente não são encontradas em *A. aegypti* (18,19). Com isso, a abordagem baseada em *Wolbachia* se trata de uma estratégia de controle biológico, em que mosquitos machos infectados com a bactéria são soltos na natureza e encontram uma população que não possui a cepa de *Wolbachia* utilizada nos testes (9). Deste modo, o controle da população de mosquitos ocorre quando um macho infectado por determinada cepa de *Wolbachia* realiza a cópula com a fêmea selvagem e não-infectada, possibilitando a geração de ovos que não irão eclodir (20).

Além disso, o método *Wolbachia* também está baseado na tecnologia de supressão populacional, e tem como fonte de experimento um inseto estéril. Este tipo de método busca a eliminação do inseto vetor no intuito de impedir a geração de prole capaz de transmitir agentes virais de interesse médico (8). Para tanto, além das técnicas de infecção do mosquito macho, existe a intenção de tornar estéreis as fêmeas férteis, visto que ao analisar a compatibilidade na geração de novos descendentes, as fêmeas representam a fonte principal para o desencadeamento do patógeno, pois a geração de ovos viáveis acontece tanto no

cruzamento com machos selvagens não-infectados como com aqueles que possuem a cepa de *Wolbachia* no organismo (21).

Adicionalmente, existe técnica de modificação populacional baseada em *Wolbachia*, que tem como objetivo ativar, na população de mosquitos, fatores hereditários que reduzem a transmissão de patógenos por meio da interação direta com o RNA viral ou através da aplicação de genes que bloqueiam os vírus-alvo (9). Através deste método, a transmissão de arboviroses como a dengue diminuiu de forma significativa onde a estratégia baseada em *Wolbachia* foi implementada (22,23).

SUPRESSÃO POPULACIONAL PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS

Uma das formas de supressão populacional consiste em uma técnica proveniente de transgenia, que tem como objetivo levar o mosquito fêmea à esterilidade, visto que as fêmeas se mostram como maior fonte veicular de propagação das doenças (8). Porém, este método pode levar ao extermínio dos mosquitos e gerar uma reação em cadeia, devido ao surgimento posterior da busca por domínio de outros nichos próximos aos insetos. Ainda assim, dentro das abordagens de controle encontradas, existem fatores que levam a um favoritismo mediante a efetividade e melhor chance de sucesso. A abordagem transgênica se mostra mais efetiva, apresentando inúmeras possibilidades de otimização, diferente da *Wolbachia*, que para ser efetivada, necessita da classificação da espécie em seu tipo e a cepa que determina a possibilidade de anulação de uma prole portadora do patógeno (9).

Outra estratégia é a tecnologia de liberação de inseto portador de gene dominante letal (RIDL), que funciona como um método alternativo de supressão populacional e consiste na aplicação de um gene mortífero no mosquito-alvo (1). Ao ser liberado no ambiente, o mosquito transgênico irá copular com um indivíduo da população selvagem, resultando em uma prole fraca, que morrerá nas fases de larva ou pupa (24). Desse modo, a população dos mosquitos de interesse irá entrar em declínio.

ESTRATÉGIAS DE EFETORES ANTIVIRAIS PARA REPOSIÇÃO POPULACIONAL DE *Aedes Aegypti*

Ao ser infectado por um agente específico, o mosquito tem o seu sistema de defesa ativado e o mecanismo de RNAi atua como principal efector antiviral, proporcionando a degradação do RNA patogênico e, consequentemente, impedindo a replicação do vírus no corpo do vetor (25). Com base nisto, a estratégia genética utilizada para reposição populacional consiste na exploração desta ferramenta imunológica. No intestino de insetos transgênicos utilizados em teste, ocorre a expressão de um RNA invertido-repetido (IR) derivado do DENV 2 prM através de enzimas produzidas na região digestória, causando a codificação da sequência de RNA. Em seguida, o IR transcrito simula o RNA viral, que por sua vez é processado pelo mecanismo RNAi do mosquito e transformado no siRNA do DENV, possibilitando a destruição de partículas virais presentes no organismo (8).

O estudo de Franz *et al.* (26) foi pioneiro na utilização de caracteres imunológicos do *A. aegypti* para fins de controle através da reposição populacional. Através desta estratégia, mais de 90% dos mosquitos transgênicos testados em laboratório não apresentaram infecção por DENV2 e não foram capazes de transmitir o vírus. No entanto,

outros mecanismos antivirais também foram utilizados em estratégias de controle e estudos laboratoriais mais recentes, demonstrando grandes probabilidades de sucesso (11,27,28). Dentre os mecanismos para além da via RNAi, existem as vias JAK-STAT, TOLL e IMD (25).

Há também a estratégia que se baseia no uso de ribozimas. Estas organelas demonstraram a capacidade de detectar e atingir proteínas estruturais do RNA viral, especialmente em estudos com CHIKV (29). Sendo assim, as ribozimas usadas nesta estratégia podem ser um excelente método para o desenvolvimento de mosquitos transgênicos que, obviamente, são resistentes a vários arbovírus (8). Logo, estes mosquitos mostram resistência a todos os DENV, apresentando assim uma redução significativa de infecção por vírus no intestino médio (13). Vale ressaltar que as técnicas baseadas no uso da via RNAi e ribozimas se apresentam como promissoras, embora não tenham causado a redução completa da infecção pelos vírus no organismo do vetor (30).

TECNOLOGIAS GENE DRIVE PARA *Aedes aegypti*

As abordagens baseadas no método Gene Drive permitem a prevalência de genes selecionados especificamente para uma população. Esta tecnologia age no controle da disseminação de arboviroses uma vez que, em muitos casos, ocorre a morte de insetos vetores por meio da ação de genes letais. Os vírus transmitidos por mosquitos colocaram mais de 3 bilhões de pessoas em situações de risco e afetaram diretamente a saúde da população mundial, e apesar de existirem estudos e testes emergentes com vacinas para prevenção, a carência de recursos que possam agir diretamente nesta problemática ainda é uma realidade (8).

O Gene drive consiste na propagação de determinada característica em uma população de mosquitos, através de genes aplicados por manipulação genética, influenciando a hereditariedade ao longo de várias gerações (31). Entre os métodos de reposição populacional, é possível destacar o uso Gene Drive para este fim, que teve recepções mistas ao ser imaginado como uma ferramenta de controle utilizável contra pestes (32). Ademais, o Gene Drive é mediado pelo CRISPR/Cas9, auxiliando na redução da transmissão do DENV por *A. aegypti*. Esta ferramenta pode ser planejada para expressar anticorpos (anti-DENV) baseados em 1C19, que fornecem proteção contra os quatro subtipos do vírus da Dengue e os neutralizam no mosquito. Com isso, os mosquitos se replicam, e o sistema CRISPR/Cas9 permite a transmissão deste genótipo para as futuras gerações (10).

O Elemento Genético Egoísta, ou *Selfish Gene Element* (SGE), é um padrão de herança, sendo um termo utilizado para definir uma das ações do Gene Drive. Ele tem como finalidade a transmissão de um padrão de mudanças para toda a população escolhida, gerando controle sobre a espécie e a seus caracteres hereditários (8). Diante da necessidade de ações imediatas, foram adaptados vários tipos de SGEs para o *A. aegypti*, como por exemplo, o gene MEDEA, que pode matar a prole das fêmeas que possuem este gene letal (33).

MODELOS DE REPOSIÇÃO POPULACIONAL DO *Aedes aegypti*

Tendo em vista os métodos utilizados para combater as doenças causadas pelo vetor *Aedes aegypti*, existe dentro dessas técnicas a disparidade entre a efetividade e a tentativa de gerar controle, consumada em um possível real descontrole ecossistêmico, isso porque a redução populacional dos mosquitos que utiliza inseticidas acaba englobando outras espécies de insetos que também são atingidas com seu uso, e esse efeito de redução gera um confronto com as cadeias alimentares e ecossistemas terrestres (8,34). Diante disto, surge a necessidade da prática de reposição populacional, que visa a substituição do inseto, caracterizando a modificação genética do mosquito, para que não se gere uma prole com as mesmas características genéticas que levam a disseminação de doenças (34).

A aplicação em campo das técnicas de reposição populacional depende especificamente de modelos que oferecem detalhes da ecologia dos vetores e das variáveis abióticas que podem influenciar na densidade populacional dos insetos-alvo (35). Dentre os modelos que avaliam a probabilidade de sucesso das estratégias moleculares, destacam-se o MGDive (Mosquito Gene Drive Explorer) e o MGDive 2 como alguns dos mais promissores, possuindo diversas vantagens em comparação aos modelos SkeeterBuster e SLiM (35,36). O sistema MGDive possui a capacidade de estimar a funcionalidade dos diferentes sistemas de Gene Drive baseando-se em variáveis importantes como a história natural do vetor, aspectos hereditários e o tamanho populacional de mosquitos-alvo, bem como a dimensão das regiões nas quais os vetores estão inseridos (8).

TECNOLOGIAS DE CONTROLE DO VETOR *Aedes aegypti* COM MAIORES PROBABILIDADES DE SUCESSO NO COMBATE DAS ARBOVIROSES

Entre todas as tecnologias para o controle de vetores, a CRISPR/Cas-9 foi avaliada como a técnica mais promissora no controle das arboviroses em 20 anos (1), excluindo-se o uso de inseticidas e outros métodos tradicionais por causarem danos diretos à biodiversidade e não oferecerem controle efetivo (9). O CRISPR/Cas-9 é um primoroso método de edição genética, baseado em um sistema de imunidade bacteriano no combate à infecções (37). Outras alterações nos genes de mosquitos do gênero *Aedes* já foram feitas com nucleases efectoras de TAL (TALENs) e as nucleases de dedo de zinco (ZFNs), mas estas técnicas não apresentaram eficácia e eficiência equivalente ao CRISPR/Cas-9 (1). O ranking das principais tecnologias de provável sucesso no futuro está disposto na tabela 2.

Outra tecnologia de destaque é a Técnica de Inseto Estéril (SIT), que consiste na liberação de mosquitos machos esterilizados por meio de radiação ionizante. A SIT é uma estratégia emergente e bastante poderosa, podendo ser aplicada de forma a complementar outras abordagens de controle já existentes (38). Além de afetar os machos, a SIT também pode induzir a esterilidade em fêmeas. Uma vez que a cópula com os machos estéreis não irá resultar em descendentes, o uso da SIT ocasiona o declínio da população de vetores (39).

Tabela 2: Ranking das tecnologias de controle de vetores com maior probabilidade de sucesso em minar as doenças arbovirais nos próximos vinte anos.

Estratégias	Tecnologias	Probabilidade sucesso (%)
Mosquitos editados por genes	CRISPR/Cas-9	16,5%
	esterilização de inseto (SIT)	15,1%
	liberação de insetos que carregam uma letalidade dominante	9,9%
	letalidade específica feminina (sem voo)	3,1%
	Outros	3,9%
Modificação de comportamento por meio de tecnologias	<i>Wolbachia</i> (bloqueio de transmissão de vírus)	11,1%
	<i>Wolbachia</i> (redução da população)	4,4%
	distorção da razão sexual através da endonuclease de retorno	2,1%
	Outros	1,2%
Inseticidas	agentes sinérgicos misturados com inseticidas	5,0%
	tratamento com inseticida residual	2,9%
	inseticidas moleculares	2,7%
	roupas tratadas com inseticida	1,2%
	cortinas tratadas com inseticida	0,8%
	Outros	1,9%
Repelentes	repelentes botânicos	3,3%
	repelente espacial	2,7%
	óleos essenciais como repelente	1,7%
	repelente de oviposição	1,4%
	fungos entomopatogênicos	0,6%
	Outros	1,5%
Armadilhas para mosquitos	Grávida autocidaovitrampa	2,6%
	Abordagem de auto disseminação	1,3%
	iscas de açúcar tóxicas atraentes	1,1%
	Armadilhas sentinelas	1,0%
	Outros	1,2%

CABRAL *et al.*, 2019, modificado.

É importante destacar o método *Wolbachia*, que também se apresenta como uma abordagem de provável sucesso no futuro. Através de *Wolbachia*, a contaminação por arbovírus é reduzida no organismo do vetor, provavelmente, pela ação que a bactéria exerce na diminuição de lipídios e proteínas do citoesqueleto do mosquito, inibindo a infecção por agentes virais que necessitam das moléculas supracitadas para se estabelecer (40). Em adição, *Wolbachia* apresenta características que conferem certas vantagens ao método, como o bloqueio do agente patogênico e grande eficiência na inviabilização reprodutiva nos mosquitos-alvo, tornando-se um método ecologicamente equilibrado (34).

O uso de vacinas eVLP também apresenta grande potencial de sucesso, pois os especialistas acreditam que esta técnica seja a mais eficaz nos próximos anos (1). Ademais, os profissionais acreditam que nenhum método de intervenção será capaz de combater as arboviroses isoladamente, sendo assim, as políticas públicas precisam aliar as abordagens de controle com as estratégias vacinais (41). Todavia, a vacinação baseada em eVLP ainda

apresenta limitações, podendo sofrer influência de variáveis ambientais internas ou externas, que afetam a integridade da vacina e comprometem a resposta imune; portanto, apesar de ser uma excelente candidata para o controle de arbovirose, esta técnica necessita de mais estudos e avanços para implementação (42).

POSSÍVEIS LIMITAÇÕES DA ABORDAGEM BASEADA EM CRISPR

O CRISPR, como ferramenta de modificação genética, se mostrou como algo revolucionário nas possibilidades que oferece, graças a fatores como sua eficiência e flexibilidade, mas como toda nova descoberta científica, ele apresenta dois cenários aos pesquisadores: avanços e possíveis ameaças (10). O CRISPR pode ser uma forma bastante efetiva para erradicar doenças, mas é necessário se atentar a eventuais problemas que podem ocorrer ao se trabalhar diretamente com ferramentas de modificação celular e molecular. Através da edição genética, é possível que ocorram modificações ou até mutações que não estavam nos planos do cientista. Estas alterações imprevisíveis são os efeitos “*Off-Target*” (43).

Pesquisar ferramentas de modificação genética envolve bastante cuidado e necessita de um bom planejamento prévio. É preciso considerar e avaliar os fatores limitantes do sistema antes de aplicar o CRISPR em campo, e alguns destes riscos em potencial são justamente os instáveis efeitos *Off-Target*, que são um dos pontos mais preocupantes quando se trata de ferramentas de edição genética (44). Quando ocorre numa edição genética decorrente do CRISPR, o efeito “*Off-Target*” não pode ser facilmente detectado apenas com os algoritmos computacionais (45).

O peso destes efeitos pode ser pior do que se imagina ou talvez até ínfimo, porém, eles têm forte potencial de modificarem o resultado do experimento. Os efeitos *Off-Target* são eventos imprevisíveis, sendo um fator crítico para trabalhos que visam modificações genéticas tão específicas (46). E também não se deve esquecer dos efeitos que essas modificações teriam nos ecossistemas. Geralmente, os experimentos iniciais com mosquitos geneticamente modificados são feitos em laboratórios contidos, com o objetivo de impedir que qualquer espécime escape, todavia, não é possível ter a certeza do que pode ocorrer a todo momento (10).

PERSPECTIVAS FUTURAS

O método *Wolbachia* e as abordagens baseadas em CRISPR se mostram como técnicas inovadoras, apresentando um custo-benefício relativamente positivo para implementação e grande potencial no combate às arbovirose transmitidas por *A. aegypti* (9). Ademais, tecnologias como o CRISPR exibem grande eficiência devido a especificidade e precisão na edição de genes, tornando-se uma ferramenta revolucionária e consistente (10).

No entanto, questões éticas e sociopolíticas que envolvem o tema demonstram tendências críticas a potenciais problemas que podem advir da aplicação de CRISPR e *Wolbachia*, bem como outras estratégias, dentre as quais pode-se citar a criação de imunizantes contra os arbovírus. O desenvolvimento de vacinas apresenta complicações práticas, como por exemplo, a dificuldade em atingir uma cobertura vacinal suficiente e os

altos preços de implementação (1). Além disto, a participação e apoio do público gera incerteza, visto que as populações poderão ser afetadas de formas ainda desconhecidas, sendo necessário mais engajamento entre cientistas e comunidade (47,48).

Não obstante, estudos sugerem que o uso de métodos em nível celular e molecular serão excelentes aliados no combate às arbovirose (45,49). Com o avanço de testes laboratoriais, as técnicas de modificação genética de *A. aegypti* vem ganhando popularidade na comunidade científica, sendo possível estimar os efeitos da transgenia a longo prazo, incluindo a possibilidade de ocorrer mutações e aquisição de resistência ao método por parte do vetor (8).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O CRISPR tem se provado uma ferramenta de edição de grande importância nas atuais descobertas da engenharia genética, e um grande passo no desenvolvimento da biotecnologia. Com o passar do tempo era esperado seu uso em diversos assuntos que poderiam resultar em grandes avanços para a humanidade, e toda a teoria e os experimentos já colocados em prática atrás de uma maneira de combater vetores de doenças como o *Aedes aegypti*, é algo muito bem-vindo. Ainda há pesquisas a serem feitas e problemas a serem resolvidos, sem contar as questões éticas que acabam se tornando algo presente no momento em que se decide “esculpir a vida”. Mas, em suma, a humanidade entrou em um terreno da compreensão da vida onde cada passo deve ser feito com cuidado, e com as trilhas certas cada vez mais avanços a esperam.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Pernambuco - *Campus* Mata Norte, que tem sido essencial para nossa formação; ao Laboratório de Biotecnologia da UPE - *Campus* Mata Norte (LABIOTEC UPE CMN), e por último, mas não menos importante, ao Grupo de Pesquisa, Extensão e Informação: ProBioTec, liderado pela Prof.^a Dr.^a Fabiana América S. D. Souza, primordial para aquisição de novos conhecimentos científicos, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Pereira Cabral B, da Graça Derengowski Fonseca M, Mota FB. Long term prevention and vector control of arboviral diseases: What does the future hold? *Int J Infect Dis.* 2019;89:169–74.
2. Mordecai EA, Ryan SJ, Caldwell JM, Shah MM, LaBeaud AD. Climate change could shift disease burden from malaria to arboviruses in Africa. *Lancet Planet Health.* 2020;4(9):e416–23.
3. Robert MA, Stewart-Ibarra AM, Estallo EL. Climate change and viral emergence: evidence from Aedes-borne arboviruses. *Curr Opin Virol.* 2020;40:41–7.

4. Thomas MB. Biological control of human disease vectors: a perspective on challenges and opportunities. *BioControl*. 2018;63(1):61–9.
5. Ferguson NM. Challenges and opportunities in controlling mosquito-borne infections. *Nature*. 2018;559(7715):490–7.
6. Weeratunga P, Rodrigo C, Fernando SD, Rajapakse S. Control methods for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Cochrane Infectious Diseases Group, editor. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2017.
7. Boigard H, Cimica V, Galarza JM. Dengue-2 virus-like particle (VLP) based vaccine elicits the highest titers of neutralizing antibodies when produced at reduced temperature. *Vaccine*. 2018;36(50):7728–36.
8. Williams A, Franz A, Reid W, Olson K. Antiviral Effectors and Gene Drive Strategies for Mosquito Population Suppression or Replacement to Mitigate Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti*. *Insects*. 2020;11(1):52.
9. Wang GH, Gamez S, Raban RR, Marshall JM, Alphey L, Li M, et al. Combating mosquito-borne diseases using genetic control technologies. *Nat Commun*. 2021;12(1):4388.
10. Rashed Noor, Masuma Afrin Taniya, Jessica Das Senjuti. CRISPR/Cas9-Mediated Gene Drive to Prevent the Replication of Dengue Virus in the Mosquito Vectors to Reduce the Impact of Dengue Epidemic in Bangladesh. *Appl Microbiol Theory & Technol*. 2021;63–8.
11. Jupatanakul N, Sim S, Angleró-Rodríguez YI, Souza-Neto J, Das S, Poti KE, et al. Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus. Olson KE, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1):e0005187.
12. Dexheimer PJ, Cochella L. MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:409.
13. Buchman A, Gamez S, Li M, Antoshechkin I, Li HH, Wang HW, et al. Engineered resistance to Zika virus in transgenic *Aedes aegypti* expressing a polycistronic cluster of synthetic small RNAs. *Proc Natl Acad Sci*. 2019;116(9):3656–61.
14. Yen PS, James A, Li JC, Chen CH, Failloux AB. Synthetic miRNAs induce dual arboviral-resistance phenotypes in the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Commun Biol*. 2018;1(1):11.
15. O’Leary S, Adelman ZN. CRISPR/Cas9 knockout of female-biased genes *AeAct-4* or *myo-fem* in *Ae. aegypti* results in a flightless phenotype in female, but not male mosquitoes. Benoit JB, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(12):e0008971.

16. Zhan T, Rindtorff N, Betge J, Ebert MP, Boutros M. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Semin Cancer Biol.* 2019;55:106–19.
17. Ranian K, Kashif Zahoor M, Zulhussnain M, Ahmad A. CRISPR/Cas9 mediated sex-ratio distortion by sex specific gene editing in *Aedes aegypti*. *Saudi J Biol Sci.* 2022;29(4):3015–22.
18. Ross PA, Turelli M, Hoffmann AA. Evolutionary Ecology of *Wolbachia* Releases for Disease Control. *Annu Rev Genet.* 2019;53(1):93–116.
19. Zhang H, Lui R. Releasing *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* to prevent the spread of dengue virus: A mathematical study. *Infect Dis Model.* 2020;5:142–60.
20. Laura de Sene Amâncio Zara A, Maria dos Santos S, Synthia Fernandes-Oliveira E, Gomes Carvalho R, Evelim Coelho G. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol E Serviços Saúde.* 2016;25(2):1–2.
21. Zheng X, Zhang D, Li Y, Yang C, Wu Y, Liang X, et al. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature.* 2019;572(7767):56–61.
22. O'Neill SL, Ryan PA, Turley AP, Wilson G, Retzki K, Iturbe-Ormaetxe I, et al. Scaled deployment of *Wolbachia* to protect the community from dengue and other *Aedes* transmitted arboviruses. *Gates Open Res.* 2019;2:36.
23. Ryan PA, Turley AP, Wilson G, Hurst TP, Retzki K, Brown-Kenyon J, et al. Establishment of wMel *Wolbachia* in *Aedes aegypti* mosquitoes and reduction of local dengue transmission in Cairns and surrounding locations in northern Queensland, Australia. *Gates Open Res.* 2019;3:1547.
24. Qsim M, Ashfaq UA, Yousaf MZ, Masoud MS, Rasul I, Noor N, et al. Genetically Modified *Aedes aegypti* to Control Dengue: A Review. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2017;27(4):331–40.
25. Lee WS, Webster JA, Madzokere ET, Stephenson EB, Herrero LJ. Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasit Vectors.* 2019;12(1):165.
26. Franz AWE, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, Blair CD, Beaty BJ, James AA, et al. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(11):4198–203.
27. Angleró-Rodríguez YI, Tikhe CV, Kang S, Dimopoulos G. *Aedes aegypti* Toll pathway is induced through dsRNA sensing in endosomes. *Dev Comp Immunol.* 2021;122:104138.

28. Russell TA, Ayaz A, Davidson AD, Fernandez-Sesma A, Maringer K. Imd pathway-specific immune assays reveal NF- κ B stimulation by viral RNA PAMPs in *Aedes aegypti* Aag2 cells. Sunil S, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2021;15(2):e0008524.
29. Mishra P, Furey C, Balaraman V, Fraser M. Antiviral Hammerhead Ribozymes Are Effective for Developing Transgenic Suppression of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. Viruses. 2016;8(6):163.
30. Reid WR, Olson KE, Franz AWE. Current Effector and Gene-Drive Developments to Engineer Arbovirus-Resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for a Sustainable Population Replacement Strategy in the Field. Reisen W, editor. J Med Entomol. 2021;58(5):1987–96.
31. Alphey LS, Crisanti A, Randazzo F (Fil), Akbari OS. Standardizing the definition of gene drive. Proc Natl Acad Sci. 2020;117(49):30864–7.
32. Wedell N, Price TAR, Lindholm AK. Gene drive: progress and prospects. Proc R Soc B Biol Sci. 2019;286(1917):20192709.
33. Marshall JM, Akbari OS. Gene Drive Strategies for Population Replacement. In: Genetic Control of Malaria and Dengue [Internet]. Elsevier; 2016. p. 169–200.
34. Yen PS, Failloux AB. A Review: Wolbachia-Based Population Replacement for Mosquito Control Shares Common Points with Genetically Modified Control Approaches. Pathogens. 2020;9(5):404.
35. Wu SL, Bennett JB, Sánchez C. HM, Dolgert AJ, León TM, Marshall JM. MGDriVE 2: A simulation framework for gene drive systems incorporating seasonality and epidemiological dynamics. Marz M, editor. PLOS Comput Biol. 2021;17(5):e1009030.
36. Sánchez C. HM, Wu SL, Bennett JB, Marshall JM. MGD riv E: A modular simulation framework for the spread of gene drives through spatially explicit mosquito populations. Golding N, editor. Methods Ecol Evol. 2020;11(2):229–39.
37. Taning CNT, Van Eynde B, Yu N, Ma S, Smagghe G. CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. J Insect Physiol. 2017;98:245–57.
38. Oliva CF, Benedict MQ, Collins CM, Baldet T, Bellini R, Bossin H, et al. Sterile Insect Technique (SIT) against *Aedes* Species Mosquitoes: A Roadmap and Good Practice Framework for Designing, Implementing and Evaluating Pilot Field Trials. Insects. 2021;12(3):191.
39. Ranathunge T, Harishchandra J, Maiga H, Bouyer J, Gunawardena YINS, Hapugoda M. Development of the Sterile Insect Technique to control the dengue vector *Aedes aegypti*

- (Linnaeus) in Sri Lanka. Hasaballah AI, editor. PLOS ONE. 2022;17(4):e0265244.
40. Reyes JIL, Suzuki Y, Carvajal T, Muñoz MNM, Watanabe K. Intracellular Interactions Between Arboviruses and Wolbachia in *Aedes aegypti*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:690087.
 41. Achee NL, Gould F, Perkins TA, Reiner RC, Morrison AC, Ritchie SA, et al. A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. Halstead SB, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(5):e0003655.
 42. Deng F. Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. *J Immunol Sci*. 2018;2(2):36–41.
 43. Wang DC, Wang X. Off-target genome editing: A new discipline of gene science and a new class of medicine. *Cell Biol Toxicol*. 2019;35(3):179–83.
 44. Kistler KE, Vosshall LB, Matthews BJ. Genome Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep*. 2015;11(1):51–60.
 45. Macias V, Ohm J, Rasgon J. Gene Drive for Mosquito Control: Where Did It Come from and Where Are We Headed? *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(9):1006.
 46. Peng R, Lin G, Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J*. 2016;283(7):1218–31.
 47. Callies DE. The ethical landscape of gene drive research. *Bioethics*. 2019;33(9):1091–7.
 48. Resnik DB. Ethics of community engagement in field trials of genetically modified mosquitoes. *Dev World Bioeth*. 2018;18(2):135–43.
 49. Kumar Mahto K, Prasad P, Kumar M, Dubey H, Ranjan A. Role of CRISPR Technology in Gene Editing of Emerging and Re-emerging Vector Borne Disease. In: *Mosquito Research - Recent Advances in Pathogen Interactions, Immunity, and Vector Control Strategies* [Internet]. IntechOpen; 2022.

DOI: 10.53934/9786585062046-3

Capítulo 3

Relevância dos genes RAB38 e ROBO1 na retinopatia falciforme: REVISÃO DE LITERATURA

Ana Rafaela Carvalho Monte¹ *; Ana Carolina Lima Camargo² ; Gabrielle Maria Giovanna da Silva Gonçalves ; Thiago Adalton Rosa Rodrigues ; Júlia Nicoliello Pereira de Castro ; Sueli Matilde da Silva Costa ; Mônica Barbosa de Melo¹ 

Resumo: A anemia falciforme (AF) é a doença mais comum dentre as doenças falciformes (DF) que são caracterizadas por uma mutação de ponto no gene que codifica a globina beta da hemoglobina. As complicações oftalmológicas podem ocorrer nas DF e incluem anormalidades na conjuntiva, infartos orbitários, retinopatia e hemorragia retiniana. A retinopatia falciforme (RF) ocorre devido à vaso-oclusão da microvasculatura ocular, podendo levar a um processo de neovascularização que eventualmente se desdobra em hemorragia vítrea e descolamento de retina causando perda de visão. A RF é dividida em não proliferativa (RNP) e proliferativa (RFP). A RFP pode afetar até 20% dos pacientes. Esta revisão tem como objetivo apresentar a relação da retinopatia falciforme com os genes *Roundabout Guidance Receptor 1 (ROBO 1)* e *RAB38*, Member RAS Oncogene Family, uma vez que estão associados a angiogênese e proliferação celular, vias importantes para o desenvolvimento da doença. Até o momento, há poucos estudos relacionando os genes *RAB38* e *ROBO1* com a retinopatia falciforme, principalmente na sua forma proliferativa. Sendo assim, esta revisão apresenta uma visão dos principais mecanismos moleculares desses genes associados à retinopatia falciforme proliferativa.

Palavras-chave: Anemia falciforme, expressão gênica, Retinopatia Falciforme.

1. INTRODUÇÃO

As doenças falciformes (DF) são um grupo de hemoglobinopatias hereditárias caracterizadas por uma mutação no gene que codifica a subunidade β -globina. Nesse grupo de DF, a anemia falciforme (AF) é a mais comum, sendo uma doença autossômica recessiva hereditária, causada pela substituição de uma base nitrogenada adenina por timina (GAG - GTG) no códon 7 do cromossomo 11p15.5.7, da β -globina (1).

Essa substituição resulta na troca do aminoácido ácido glutâmico por valina, dando origem a uma hemoglobina alterada denominada hemoglobina S (HbS) (2). Quando ocorre a substituição nos dois alelos (homozigose), origina-se a anemia falciforme. Já no traço falciforme o indivíduo heterozigoto apresenta um único gene de

hemoglobina afetado (HbS) sendo o outro gene normal (HbA), ocorrem manifestações leves ou até mesmo não observáveis (1).

Na anemia falciforme, durante a desoxigenação que ocorre com a passagem dos eritrócitos pela microcirculação, a substituição do ácido glutâmico hidrofílico pela valina hidrofóbica resulta na interação com outros resíduos também hidrofóbicos na cadeia da β -globina de outra molécula de HbS desoxigenada³. Essa interação origina polímeros que se alongam em fibras helicoidais. Os polímeros, quando agrupados, enrijecem e fazem com que as células desenvolvam o formato de foice, além de ativar cascatas de várias outras anormalidades celulares. Devido a polimerização, ocorrem eventos de vaso-oclusão bem como anemia hemolítica devido à fragilidade dos glóbulos vermelhos (1).

A polimerização da hemoglobina S é reversível quando no início, mas conforme as repetições dos ciclos de desoxigenação ocorrem, as alterações nas bicamadas lipídicas e nas proteínas da membrana eritrocitária começam a interferir em vários outros aspectos da fisiologia das hemácias (3). Esses numerosos eventos levam ao aumento da hemólise e a interação dos eritrócitos com as células endoteliais, leucocitárias e plaquetárias (1). A hemólise tem como resultado a liberação da hemoglobina livre na circulação levando a redução do óxido nítrico, substância vasodilatadora, produzida pelas células endoteliais que regula o tônus vascular (3). A diminuição da disponibilidade do óxido nítrico contribui para a vasoconstrição favorecendo potencialmente a vaso-oclusão e, portanto, participando da fisiopatogênese de manifestações clínicas da doença falciforme (1).

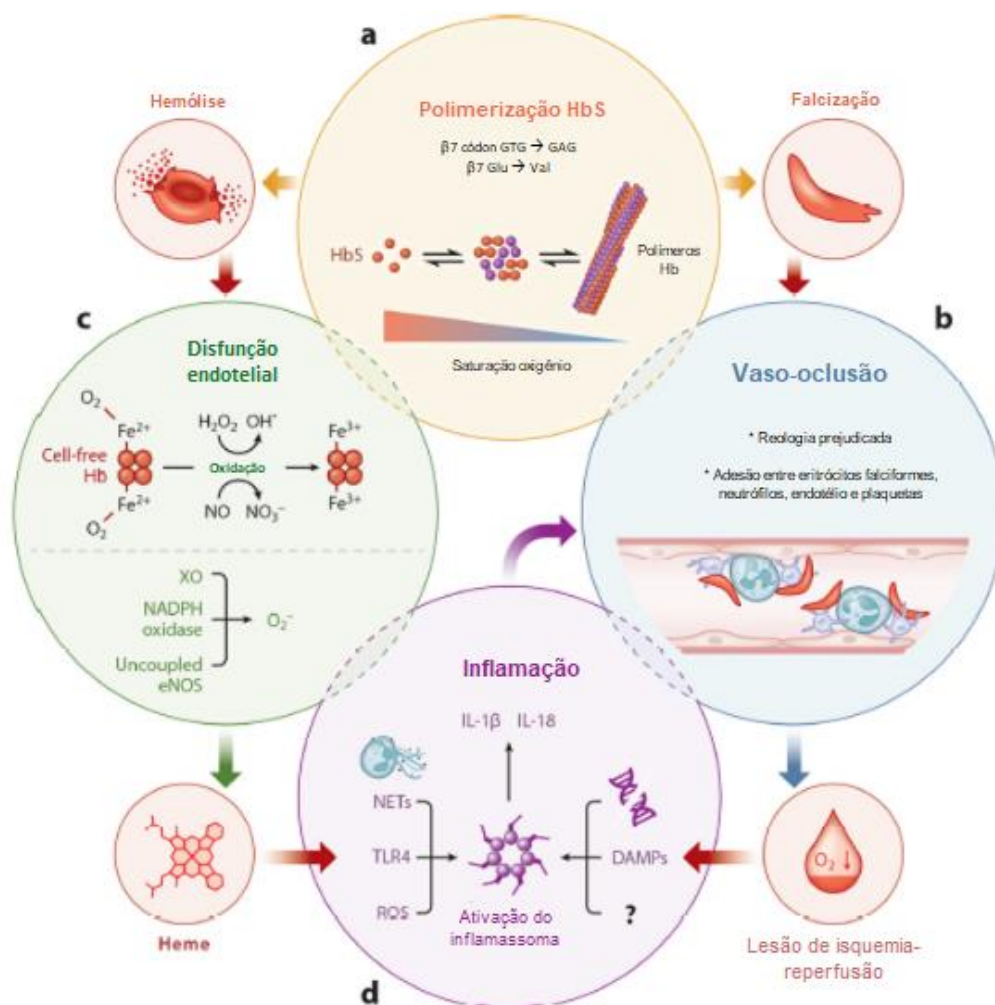


Figura 01. Fisiopatologia molecular da doença falciforme. **(a)** Polimerização da Hemoglobina. Um polimorfismo de um único nucleotídeo no gene da β -globina acarreta na substituição de ácido glutâmico por valina na sétima posição na cadeia da β -globina. Após a desoxigenação, as moléculas de hemoglobina alterada (HbS) polimerizam para formar feixes. Os feixes de polímeros resultam em falcização de eritrócitos. **(b)** reologia prejudicada do sangue e agregação de eritrócitos falciformes com neutrófilos, plaquetas e células endoteliais para promover a estase do fluxo sanguíneo, conhecido como vaso-oclusão e resulta em lesão de isquemia-reperfusão. Os feixes de hemoglobina (Hb) também promovem a hemólise ou lise dos eritrócitos, liberando Hb livre de células na circulação sanguínea, sendo uma Hb oxigenada (Fe^{2+3-}) e metemoglobina (Fe^{3+}). **(c)** Isso resulta em Hb livre entrando na corrente sanguínea. A hemoglobina pode reagir com o peróxido de hidrogênio através da reação de Fenton para formar o radical livre hidroxila – também chamado HO2 e a metemoglobina, que é o ferro no estado Fe^{3+} . Além disso, NADPH oxidase, xantina oxidase (XO) e óxido nítrico desacoplado endotelial (eNOS) geram radicais livres de oxigênio para promover a disfunção endotelial. A metemoglobina (Fe^{3+}) é degradada para liberar heme livre, um dos principais padrões moleculares associados ao dano dos glóbulos vermelhos (DAMP); **(d)** Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação do receptor TLR4, produção de armadilha de neutrófilos extracelular (NET), liberação de DAMPs derivados de tecidos ou células, DNA e outros fatores desconhecidos. A lesão da heme livre ou I-R pode contribuir para a inflamação estéril, ativando a via do inflamassoma em vasos sanguíneos e células inflamatórias para liberar IL-1 β . Finalmente, a inflamação estéril promove ainda mais a oclusão vascular por meio de uma alça de retroalimentação que promove a adesão de neutrófilos, plaquetas e células endoteliais. Adaptado do Sundd, P., et al, 2019.

A anemia falciforme é considerada a patologia genética mais comum no mundo, com incidência de 25% a 40% nos países africanos. A população brasileira é uma mistura de três grupos genéticos, índios americanos, europeus e africanos. O gene da hemoglobina S é muito comum nas Américas e no Brasil, sendo este último mais comum nas regiões sudeste e nordeste. Na África equatorial, onde 40% da população é portadora, a prevalência da doença falciforme atinge 2% a 3% da população. No Brasil, a anemia falciforme atinge entre 0,1% e 0,3% da população negra, e distribui-se heterogeneamente, tendo evidência principalmente nos estados da Bahia, Maranhão e Piauí. A prevalência do traço falciforme é maior nas regiões Norte e Nordeste, entre 6% e 10%, enquanto que nas sul e sudeste é de 2% a 3%, heterozigotos AS alternam de 1 a 3% (4).

De acordo com o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para anemia falciforme do Ministério da Saúde de 2018, 4% da população brasileira tem traço falciforme e entre 25.000 a 50.000 pessoas tem anemia falciforme (HbSS) ou na condição de heterozigose composta ou dupla (SC, SE, SD, S β -talassemia). Em 2018 podia variar de 50.000 a 100.000 casos (5).

Estudos têm demonstrado que o genótipo HbSS causa a doença sistêmica mais grave do que os genótipos HbSC e S β -talassemia, enquanto os genótipos HbSC e S β -talassemia apresentam maior incidência de manifestações oculares, incluindo retinopatia falciforme proliferativa (RFP), podendo levar ao comprometimento visual progressivo em 10 a 20% dos olhos afetados (5).

2. Retinopatia falciforme

Diferentes órgãos podem ser acometidos pela anemia falciforme, como pulmões, coração, fígado e rins, e também estruturas oculares (5). Dentre as alterações oftalmológicas causadas pela anemia falciforme, as alterações retinianas são consideradas as mais importantes na doença ocular afetada pela AF (6).

A retinopatia falciforme é causada pelo bloqueio dos vasos sanguíneos na microvasculatura do olho, e dependendo de sua localização e do tecido afetado pode levar a distúrbios visuais, com surgimento de alterações orbitárias, conjuntivais, papilares e retinianas, que podem levar a perda progressiva da visão (7). Pode ser dividida em dois tipos: retinopatia falciforme não proliferativa (RP) e retinopatia falciforme proliferativa (RPF). A forma proliferativa pode ser a principal causa de perda progressiva da visão nesses pacientes, afetando 10% a 20% dos olhos acometidos (8).

A oclusão arteriolar marca o início da patogênese e geralmente ocorre nas áreas periféricas da retina. É considerado um estágio inicial da retinopatia e não significa necessariamente que o paciente evoluirá para o estágio de RFP. Tortuosidade, dilatação e formação de microaneurismas na rede capilar também são observados na fase inicial da RF (8).

Na RF, além das lesões hiperpigmentadas em hemorragias profundas ou sub retinianas (chamadas *black sunburst*), podem aparecer pequenas hemorragias intra retinianas, possivelmente derivadas da necrose isquêmica da parede do vaso, denominadas *salmon-patches* (9). Na retinopatia falciforme proliferativa (RPF), os neovasos periféricos da retina assumem uma forma frondosa, chamada de *sea fan* (8).

A isquemia causada por oclusão repetida de pequenos vasos é considerada a causa mais provável de angiogênese. Apesar de terem a mesma gênese, a retinopatia falciforme

proliferativa e não proliferativa têm evoluções diferentes. Goldberg desenvolveu uma classificação de alterações progressivas na retina, divididas em 5 categorias de acordo com a ordem de aparecimento e a gravidade da doença (10).

O estágio I é caracterizado por oclusão arteriolar periférica, causada pelo acúmulo de hemoglobina falciforme, que leva à hipóxia retiniana e rearranjo dos capilares adjacentes, acidose e hiperosmolaridade, podendo levar à trombose. No estágio II, ocorre a anastomose arteriovenosa periférica (*hairpin loop*) e tem início do brotamento de neovasos que, ao tentar unir a retina vascular com avascular, sofre dilatações levando a distúrbios circulatórios que causam a remodelação vascular que ocorre em resposta à fase I (10).

No estágio III, a neovascularização (*sea fan*) ocorre possivelmente devido à liberação de fatores angiogênicos na retina isquêmica periférica. Com a neovascularização em *sea fan* formada, o estágio III é subdividido com base em um ensaio clínico prospectivo de observação versus fotocoagulação retiniana, levando em consideração o tamanho do *sea fan*, hemorragia, fibrose e visibilidade dos vasos. Os vasos recém-formados são considerados frágeis, imaturos e aderentes ao gel vítreo, o que facilita a ocorrência de hemorragia vítrea, levando ao estágio IV (10). O sangramento repetido leva ao aumento da tensão vítrea retiniana, que pode promover descolamento de retina regmatogênico ou tracional. Quando esse sangramento atinge o eixo visual, desenvolvem-se sintomas e distúrbios visuais. Com eventos hemorrágicos recorrentes, a tração induzida pelo tecido fibroglial e a adesão vítrea à neovascularização aumentam, levando à ruptura, descolamento de retina e perda de visão, estágio final da retinopatia falciforme proliferativa (estágio V). A formação e a tração da membrana resultam de alterações degenerativas no vítreo que superam a neovascularização permeável (10).

A retinopatia falciforme não proliferativa corresponde aos estágios I e II, enquanto a RFP corresponde aos estágios III, IV e V (11). A RFP pode ocorrer em crianças, mas ocorre principalmente na faixa etária entre 15 e 29 anos (12). A regressão espontânea da neovascularização foi relatada em 20% a 60% dos casos (13).

Curiosamente, em homozigotos HbS e heterozigotos compostos HbSC, existe uma relação inversa entre a gravidade da doença sistêmica e a gravidade da retinopatia. Pacientes com anemia falciforme apresentam mais complicações sistêmicas, incluindo múltiplos eventos vaso-oclusivos e danos secundários a órgãos (14). Pacientes heterozigotos têm menos complicações sistêmicas, mas a neovascularização da retina tem maior frequência e início mais precoce (10). A prevalência de RFP é de 32,8% na hemoglobinopatia SC, 14% na S β -talassemia e 2,6% na SS (15). Em um estudo observaram que a incidência de RFP é cinco vezes mais frequente em pacientes com genótipos HbSC em relação aos pacientes HbSS, e conforme a idade aumenta, se torna mais comum o surgimento dessa complicação (14). Outros estudos relatam que pacientes acima de 35 anos, têm maiores riscos de desenvolver RFP do que pacientes mais jovens, apresentando maiores riscos de perda da visão (estágio III – IV), indicando que a idade é um fator de risco para a RFP (16).

No Brasil, cerca de 20% dos negros são heterozigotos para alfa-talassemia. A heterozigosidade composta com outros tipos de hemoglobina também modula a polimerização da HbS (17). A hemoglobina C (HbC) é a variante estrutural mais comum e juntamente com a HbS (β S β C) leva a um perfil clínico diferente da anemia falciforme

($\beta S\beta S$), resultando em um quadro clínico relativamente benigno, mas com alta prevalência de complicações tromboembólicas, necrose de papilas renais e retinopatia (18). A razão exata pela qual indivíduos com o genótipo $\beta S\beta C$ têm mais problemas oculares não é conhecida (19). Acredita-se que os níveis de células falciformes, hematócrito e viscosidade sanguínea tenham um papel importante nessa diferença (20).

Um estudo recente foi realizado por nosso grupo comparando o perfil de expressão gênica obtido pelo sequenciamento de RNA de células endoteliais formadoras de colônia (CEFC) isoladas de sangue de pacientes com genótipos HbSS com e sem retinopatia, e de pacientes HbSC com e sem retinopatia falciforme. Após isolamento, cultura, caracterização das CEFCs, extração de RNA, sequenciamento e análise dos resultados, foi identificada uma lista de genes diferencialmente expressos, destacando-se a expressão significativa do gene *ROBO1* em pacientes com genótipo SC ($\log_2\text{FoldChange} = 4,3$, $\text{FDR} = 1,35 \times 10^{-11}$) com RFP, e super expressão do gene *RAB38* ($\log_2\text{FoldChange} = 3,296$, $\text{FDR} = 2,4 \times 10^{-6}$) em pacientes com genótipo SS com RFP. Embora pesquisas já tenham vinculado tais genes aos processos de invasão, migração, angiogênese e proliferação celular, mecanismos envolvidos na retinopatia, este estudo tenta vincular tais genes à fisiopatologia da retinopatia falciforme.

3. *RAB38*

O gene *Ras-Related Protein Rab-38 (RAB38)*, está localizado no cromossomo 11, banda q14.2. Este gene está envolvido na regulação da transdução de sinal e processos celulares, incluindo crescimento e diferenciação celular, sendo o principal deles a regulação do transporte e migração de vesículas intracelulares (22). O RAB38 é encontrado em certos organismos, em certas organelas subcelulares e desempenha um papel importante na reprodução celular, endocitose, transdução de sinal e desenvolvimento (23). A subfamília RAB32 consiste em duas proteínas, RAB32 e RAB38, e é conhecida por regular o tráfego de membrana mediada por endossomos de organelas relacionadas ao lisossomo. RAB32 e RAB38 são geneticamente e estruturalmente similares (22).

RAB38 é uma proteína GTPase envolvida na regulação da proliferação celular e sobrevivência celular em tumores. Nos últimos anos, o papel do RAB38 tem sido associado à regulação de diferentes aspectos da progressão tumoral, migração celular, invasão, proliferação, comunicação com células estromais e desenvolvimento de resistência a drogas (23).

Lopes e colaboradores, estudaram os mecanismos de biogênese do melanossoma em células epiteliais pigmentares da retina (RPE). Eles observaram em camundongos que o papel do Rab38 na biogênese do melanossoma nas células do RPE impede a prenilação (a adição de moléculas hidrofóbicas à proteína) e resulta em apenas proteínas citosólicas, tornando-as inativas e instáveis (23). Com a perda da atividade de Rab38, a tirosinase é degradada após sair da rede trans-Golgi (TGN), indicando que Rab38 e Rab32 controlam uma etapa no transporte de enzimas melanogênicas do TGN para melanossomos imaturos.

4. *ROBO1*

Os ROBOS (*Roundabout Guidance Receptor*) são uma família de proteínas transmembranares altamente expressas em neurônios do sistema nervoso central (SNC). Eles consistem em cinco domínios de Ig e três domínios de fibronectina tipo III (FN3) em sua região extracelular, seguido por uma região transmembranica e um domínio citoplasmático intracelular (24). Foram identificados quatro receptores ROBO em vertebrados (*ROBO 1- 4*). Embora tenham domínios citoplasmáticos distintos, seus domínios Ig1 e Ig2 são altamente conservados e acredita-se que sejam responsáveis por mediar a interação ROBO-SLIT (24).

O sistema Slit/Robo é um sistema ligante/receptor conservado que normalmente produz quimiorrepulsão e está envolvido na regulação da orientação e ramificação axonal, além da migração de células neuronais durante o desenvolvimento do SNC. O SLIT2 é um componente pró-angiogênico que induz a formação de novos vasos sanguíneos em tecidos angiogênicos e pode regular positivamente e negativamente a angiogênese ligando-se a ROBO1 e ROBO4, respectivamente (25).

O *ROBO1* é um dos quatro genes que codificam o receptor Roundabout (ROBO), e regula vários processos biológicos ligando-se a fendas de proteínas secretadas (Slit 1-3). O seu papel é bem estudado na orientação axonal, e na sinalização Slit-Robo, devido a sua importância na neurogênese, angiogênese, proliferação celular e organogênese (26).

Huang e colegas examinaram os padrões de expressão de *Robo1* e *Robo4* em vasos da retina usando camundongos C57BL/6J. Eles observaram a expressão de Robo4 em vasos da retina, células ganglionares e camadas de fotorreceptores durante o desenvolvimento da retina. Embora alta expressão de Robo1 tenha sido observada em diferentes estágios do desenvolvimento vascular da retina, eles sugeriram que Robo1 desempenhava um papel importante na neovascularização da retina. Dados tem mostrado níveis de expressão significativamente mais altos de Robo1 em retinas de camundongos com modelo de retinopatia da prematuridade (ROP) induzida por oxigênio (27-29). A ROP é caracterizada por isquemia local e neovascularização pré-retiniana. Rama e colegas observaram evidências genéticas para um importante papel da sinalização Slit2 através de Robo1 e Robo2 na neovascularização ocular patológica e de desenvolvimento (28). Além disso, foi relatado que a angiogênese induzida por VEGF também requer a presença de Robo1 (28).

5. Conclusões

Sendo a retinopatia falciforme, principalmente na sua forma proliferativa, considerada a afecção ocular de maior importância clínica nas doenças falciformes e a maior causa da perda de visão dos indivíduos acometidos pela doença, torna-se necessário a melhor compreensão da doença e de seus mecanismos.

Como na maior parte das complicações nas doenças falciformes, é atribuída à vaso-oclusão o início do comprometimento retiniano. Em contraste com a maior parte das outras comorbidades falciformes, entretanto, a retinopatia está sujeita à regressão espontânea e exibe sua gravidade em aparente relação inversa ao quadro sistêmico.

Tais peculiaridades fazem da retinopatia falciforme um modelo de estudo de grande interesse para a compreensão dos complexos processos intrínsecos envolvidos nessa complicação falciforme. Dessa forma, essa breve revisão demonstra que muito já

sabemos sobre as doenças falciformes contudo há muito ainda para investigarmos sobre os mecanismos moleculares e manejos das complicações oculares decorrentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), ao programa de pós-graduação Clínica médica e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF, Vichinsky EP. Sick cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Mar 15; 4:18010. doi: 10.1038/nrdp.2018.10.
2. Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*. 1956 Oct 13;178(4537):792-4. doi: 10.1038/178792a0. PMID: 13369537.
3. Kapoor S, Little JA, Pecker LH. Advances in the Treatment of Sick Cell Disease. *Mayo Clin Proc*. 2018 Dec;93(12):1810-1824. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.08.001. Epub 2018 Nov 7.
4. Soares, Leonardo Ferreira et al. Prevalência de hemoglobinas variantes em comunidades quilombolas no estado do Piauí, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva* [online]. 2017, v. 22, n. 11, pp. 3773-3780. ISSN 1678-4561. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172211.04392016>.
5. Ministério da saúde secretaria de atenção à saúde secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos portaria conjunta no 05, de 19 de fevereiro de 2018. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Da Doença Falciforme. <http://portalms.saude.gov.br/protocolos-e-diretrizes>.
6. Vilela, Rosana Q. B.; Bandeira, Denise M. and Silva, Maria Alexandra E.. Alterações oculares nas doenças falciformes. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. [online]. 2007, vol.29, n.3, pp.285-287. ISSN 1516-8484. Doi: 0.1590/S1516-84842007000300018.
7. Abdalla Elsayed MEA, Mura M, Al Dhibi H, Schellini S, Malik R, Kozak I, Schatz P. Sick cell retinopathy. A focused review. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2019 Jul;257(7):1353-1364. doi: 10.1007/s00417-019-04294-2.
8. Luty, G. A. & McLeod, D. S. Angiogenesis in Sick Cell Retinopathy. *Retin. Choroidal Angiogenes*. 389–405 (2008) doi:10.1007/978-1-4020-6780-8_20.
9. Bonanomi MTB. Alterações oculares na doença falciforme. In: Anvisa. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. 1ª edição. 2002.
10. Goldberg MF. Classification and pathogenesis of proliferative sickle retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1971 Mar;71(3):649-65. doi: 10.1016/0002-9394(71)90429-6
11. Manfredini, V., Castro, S. & Wagner, S. A fisiopatologia da anemia falciforme. *Hemoglobin* 4–7 (2007).

12. David, Renato Cunha; Moraes Junior, Haroldo Vieira de and Rodrigues, Márcio Penha Morterá. Alterações oculares e eletroretinográficas na doença falciforme. *Arq. Bras. Oftalmol.* [online]. 2011, vol.74, n.3, pp.190-194. ISSN 0004-2749. Doi:10.1590/S0004-27492011000300009.
13. Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr.* 1992 Mar;120(3):360-6. doi: 10.1016/s0022-3476(05)80897-2. PMID: 1538280.
14. Downes SM, Hambleton IR, Chuang EL, Lois N, Serjeant GR, Bird AC. Incidence and natural history of proliferative sickle cell retinopathy: observations from a cohort study. *Ophthalmology.* 2005 Nov;112(11):1869-75. doi: 10.1016/j.ophtha.2005.05.026.
15. Clarkson JG. The ocular manifestations of sickle-cell disease: a prevalence and natural history study. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1992;90:481-504. PMID: 1494832; PMCID: PMC1298447.
16. Saidkasimova S, Shalchi Z, Mahroo OA, Shunmugam M, Laidlaw DA, Williamson TH, Howard J, Mohamed MD. Risk factors for visual impairment in patients with sickle cell disease in London. *Eur J Ophthalmol.* 2016 Aug 4;26(5):431-5. doi: 10.5301/ejo.5000767.
17. Bianchetti E, Bates SJ, Nguyen TTT, Siegelin MD, Roth KA. RAB38 Facilitates Energy Metabolism and Counteracts Cell Death in Glioblastoma Cells. *Cells.* 2021 Jun 30;10(7):1643. doi: 10.3390/cells10071643.
18. Wang H, Jiang C. RAB38 confers a poor prognosis, associated with malignant progression and subtype preference in glioma. *Oncol Rep.* 2013 Nov;30(5):2350-6. doi: 10.3892/or.2013.2730. Epub 2013 Sep 10.
19. Lopes VS, Wasmeier C, Seabra MC, Futter CE. Melanosome maturation defect in Rab38-deficient retinal pigment epithelium results in instability of immature melanosomes during transient melanogenesis. *Mol Biol Cell.* 2007 Oct;18(10):3914-27. doi: 10.1091/mbc.e07-03-0268.
20. Stewart MW. The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology. *Mayo Clin Proc.* 2012 Jan;87(1):77-88. doi: 10.1016/j.mayocp.2011.10.001.
21. Ortiz-Sandoval CG, Hughes SC, Dacks JB, Simmen T. Interaction with the effector dynamin-related protein 1 (Drp1) is an ancient function of Rab32 subfamily proteins. *Cell Logist.* 2014 Oct 2;4(4):e986399. doi: 10.4161/21592799.2014.986399. PMID: 25767741; PMCID: PMC4355727.
22. Coll M, Ariño S, Martínez-Sánchez C, Garcia-Pras E, Gallego J, Moles A, Aguilar-Bravo B, Blaya D, Vallverdú J, Rubio-Tomás T, Lozano JJ, Pose E, Graupera I, Fernández-Vidal A, Pol A, Bataller R, Geng JG, Ginès P, Fernandez M, Sancho-Bru P. Ductular reaction promotes intrahepatic angiogenesis through Slit2-Roundabout 1 signaling. *Hepatology.* 2022 Feb;75(2):353-368. doi: 10.1002/hep.32140. Epub 2021 Dec 15.
23. Scala M, Accogli A, Allegri AME, Tassano E, Severino M, Morana G, Maghnie M, Capra V. Familial ROBO1 deletion associated with ectopic posterior pituitary, duplication of the pituitary stalk and anterior pituitary hypoplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2019 Jan 28;32(1):95-99. doi: 10.1515/jpem-2018-0272.

24. Zhao Y, Yang JY, Thieker DF, Xu Y, Zong C, Boons GJ, Liu J, Woods RJ, Moremen KW, Amster IJ. A Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry (TWIMS) Study of the Robo1-Heparan Sulfate Interaction. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2018 Jun;29(6):1153-1165. doi: 10.1007/s13361-018-1903-4. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29520710; PMCID: PMC6004239.
25. Rama N, Dubrac A, Mathivet T, Ní Chárthaigh RA, Genet G, Cristofaro B, Pibouin-Fragner L, Ma L, Eichmann A, Chédotal A. Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization. *Nat Med.* 2015 May;21(5):483-91. doi: 10.1038/nm.3849. Epub 2015 Apr 20.
26. Kong Y, Sun B, Han Q, Han S, Wang Y, Chen Y. Slit-miR-218-Robo axis regulates retinal neovascularization. *Int J Mol Med.* 2016 Apr;37(4):1139-45. doi: 10.3892/ijmm.2016.2511. Epub 2016 Feb 29. Retraction in: *Int J Mol Med.* 2016 Dec;38(6):1947.
27. Duarte DA, Rosales MA, Papadimitriou A, Silva KC, Amancio VH, Mendonça JN, Lopes NP, de Faria JB, de Faria JM. Polyphenol-enriched cocoa protects the diabetic retina from glial reaction through the sirtuin pathway. *J Nutr Biochem.* 2015 Jan;26(1):64-74. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.09.003. Epub 2014 Oct 2. PMID: 25448608.
28. Promsote W, Powell FL, Veean S, Thounaojam M, Markand S, Saul A, Gutsaeva D, Bartoli M, Smith SB, Ganapathy V, Martin PM. Oral Monomethyl Fumarate Therapy Ameliorates Retinopathy in a Humanized Mouse Model of Sickle Cell Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2016 Dec 10;25(17):921-935. doi: 10.1089/ars.2016.6638
29. ICite NI of HO of PA (NIH)-. Results for sickle cell disease, retinopathy [Internet]. Available from: <https://icite.od.nih.gov/analysis>
30. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol.* 2019 Jan 24;14:263-292. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30332562; PMCID: PMC7053558.

DOI: 10.53934/9786585062046-4

Capítulo 4

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS E APLICAÇÕES NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

Letícia Cabral Ventura *; João Pacifico Bezerra Neto 

*Letícia Cabral Ventura - leticia.ventura@upe.br

Resumo: Peptídeos antimicrobianos (AMPs – *Antimicrobial Peptides*) nos últimos anos ganharam crescente interesse entre cientistas, profissionais de saúde e empresas farmacêuticas devido ao seu potencial terapêutico. São proteínas de baixo peso molecular com ampla gama de atividades antimicrobianas e imunomoduladoras contra bactérias infecciosas (Gram positivas e Gram negativas), vírus e fungos. A incapacidade dos microrganismos de desenvolver resistência contra a maioria dos peptídeos antimicrobianos os tornou um produto eficiente que pode impactar muito a nova era dos antimicrobianos, visto que a resistência dos patógenos aos antibióticos apresenta-se como uma problemática de relevância mundial. Além disso, esses peptídeos também demonstram maior eficácia, alta especificidade, diminuição da interação medicamentosa, baixa toxicidade, diversidade biológica e propriedades de ataque direto. Diversos estudos voltam-se para a realização de ensaios clínicos para a aplicação desses peptídeos como potenciais medicamentos terapêuticos. Mais de 60 drogas peptídicas já chegaram ao mercado e várias centenas de novos peptídeos terapêuticos estão em desenvolvimento pré-clínico e clínico. Os AMPs mostram-se eficazes na intervenção terapêutica de diversas doenças, tais como infecções locais, dermatite atópica e úlcera no pé diabético. O design racional pode ser usado ainda para modificar as propriedades químicas e físicas dos peptídeos existentes. Nesse sentido, a presente revisão tem como objetivo discutir a diversidade, a classificação, a função e o mecanismo de ação dos AMPs, as variadas aplicações terapêuticas na prática clínica, bem como o seu uso para o desenho de fármacos.

Palavras-chave: bioinformática; biotecnologia; desenho racional de peptídeos; fármacos; tratamento

INTRODUÇÃO

Peptídeos antimicrobianos, do inglês *Antimicrobial Peptides* (AMPs), nos últimos anos ganharam crescente interesse entre cientistas, profissionais de saúde e empresas farmacêuticas devido ao seu potencial terapêutico. Distribuídos em todos os reinos da vida, os AMPs são um componente indispensável das defesas do hospedeiro (1). São proteínas de baixo peso molecular com ampla gama de atividades antimicrobianas e imunomoduladoras contra bactérias infecciosas (Gram positivas e Gram negativas), vírus e fungos (2), que consistem em peptídeos catiônicos predominantemente curtos com uma grande variedade de estruturas e alvos (1). Sua classificação leva em consideração suas propriedades físico-químicas como carga líquida, conteúdo estrutural secundário e solubilidade. Possuem

cadeias laterais hidrofóbicas e hidrofílicas que permitem que essas moléculas sejam solúveis em ambientes aquosos. Dentre os AMPs mais abundantes e difundidos na natureza, os peptídeos alfa-helicoidais catiônicos são capazes de perturbar a membrana citoplasmática bacteriana causando morte celular por choque osmótico (1).

Sabendo que a resistência de patógenos aos medicamentos tradicionais compreende um grave problema de saúde pública, sendo a resistência microbiana resultante de um fenômeno natural de adaptação dos patógenos aos compostos antimicrobianos. A incapacidade dos microrganismos de desenvolver resistência contra a maioria dos peptídeos antimicrobianos tornou estes um produto eficiente que pode impactar muito a nova era dos antimicrobianos. Além disso, esses peptídeos também demonstram maior eficácia, alta especificidade, diminuição da interação medicamentosa, baixa toxicidade, diversidade biológica e propriedades de ataque direto (2).

Desta forma, dada a resistência cada vez maior de vários patógenos às terapias antimicrobianas existentes, os AMPs surgem como potenciais agentes terapêuticos (1). Mais de 60 drogas peptídicas já chegaram ao mercado e várias centenas de novos peptídeos terapêuticos estão em desenvolvimento pré-clínico e clínico (3). Esta revisão sistemática tem como objetivo demonstrar a história, a diversidade, a classificação, a função e o mecanismo de ação dos AMPs, evidenciando as aplicações terapêuticas recentes desses peptídeos, no tratamento de doenças e no desenvolvimento de novos fármacos.

HISTÓRIA E DIVERSIDADE

Os AMPs, mais recentemente conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro, são encontrados em praticamente todas as formas de vida. Compreendem moléculas produzidas por todos os organismos, desde bactérias até plantas, incluindo organismos vertebrados e invertebrados (3). Em bactérias, os AMPs beneficiam espécies individuais, matando outras espécies bacterianas que podem competir por nutrientes e pelo mesmo nicho ambiental. Os AMPs bacterianos conhecidos como bacteriocinas são classificados em duas categorias: lantibióticos e não lantibióticos. Os lantibióticos são AMPs que contêm o aminoácido não natural lantionina. A nisina, um lantibiótico, é ativo contra uma variedade de bactérias Gram-positivas com uma concentração inibitória mínima (CIM) na faixa nanomolar (4). Outras bacteriocinas, como a mersacidina, também foram estudadas para seu possível uso contra bactérias Gram-positivas resistentes a antibióticos (3).

A maioria dos AMPs relatados até o momento são de origem eucariótica, como plantas, animais e fungos (3). Desde 1885, fluidos como sangue, suor, saliva, plasma, secreções de glóbulos brancos e extratos de grânulos têm sido valorizados por suas propriedades antimicrobianas. No entanto, não foi até 1981 que Hans Boman relatou que a hemolinfa da mariposa da seda (*Hyalophora cecropia*) continha AMPs conhecidos como cecropinas (4). O campo cresceu ainda mais quando Rober Leher, Shunji Natori e Michael Zasloff isolaram e descreveram defensinas a partir de macrófagos de mamíferos (5) (), sacrotoxinas em larvas de moscas (6) e magaininas da pele de sapos *Xenopus laevis* (7) (), respectivamente.

Sabe-se que em eucariotos, os AMPs desempenham um papel importante na imunidade inata. As plantas, por exemplo, não possuem imunidade adaptativa (ou seja, imunidade mediada por células B e células T) e, portanto, os AMPs desempenham um papel

fundamental na proteção contra infecções por bactérias e fungos nesses organismos, sendo encontrados em folhas, flores, sementes e tubérculos (3). Semelhante às plantas, os invertebrados não possuem um sistema imunológico adaptativo e, portanto, são completamente dependentes do sistema imunológico inato para proteção contra infecções. Os AMPs podem ser encontrados na hemolinfa, hemócitos (células do sangue), fagócitos (glóbulos brancos) e células epiteliais dessas espécies (8). Os AMPs de vertebrados podem ser isolados de uma variedade de células, como grânulos de glóbulos brancos (fagócitos, neutrófilos, macrófagos, células natural killer), tecido epitelial situado na boca, pulmões ou pele e fluidos corporais (9). Os dois grupos mais proeminentes de AMPs em vertebrados são as catelicidinas e as defensinas.

CLASSIFICAÇÃO

A diversidade de AMPs naturais dificulta sua classificação (10). Desta forma, os peptídeos são classificados de acordo com sua fonte, sua atividade e com a espécie rica em aminoácido (11).

Com relação a fonte, podemos classifica-los em:

- (i) AMPs de Mamíferos: Compreendem peptídeos como as catelicidinas, defensinas e peptídeos de defesa do hospedeiro humano (HDPs), que atuam na proteção frente infecções microbianas (11);
- (ii) Derivados de Anfíbios: atuam na proteção dos anfíbios frente patógenos, sendo as rãs, onde as o grupo com a maior diversidade de AMPs, tendo como peptídeo mais famoso o magainin (11).
- (iii) Derivados de Insetos: peptídeos sintetizados principalmente em corpos gordurosos e células sanguíneas, contribuindo para a forte adaptabilidade do grupo, onde a Cecropina é a família mais famosa de AMPs nos insetos (10).
- (iv) Derivados de Microrganismos: obtidos a partir de microrganismos como bactérias e fungos, incluindo peptídeos famosos como a nisina, gramicidina de *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus brevis* (11).
- (v) AMPs bacteriófagos/virais: proteínas fágicas, incluindo endolisinas (lisinas), peptidoglicano e hidrolases associadas a virions (VAPGHs), depolimerases e holinas, exibem atividade antibacteriana (11).

Quanto à atividade, podem ser classificados em:

- (i) Peptídeos Antibacterianos: responsáveis por grande parte da AMPs e têm um amplo efeito inibitório sobre bactérias patogênicas comuns, como *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Vibrio parahaemolyticus* (11).

(ii) Peptídeos Antifúngicos (AFPs): atuam diante de infecções fúngicas com maior resistência aos medicamentos. A classificação mais aceita é baseada na origem do peptídeo: natural, semissintético ou sintético. Muitos AFPs demonstraram excelentes atividades antifúngicas contra fungos patogênicos, como *Aspergillus*, *Candida albicans* e *Aspergillus flavus* (1).

(iii) Peptídeos Antivirais (AVPs): atuam diante dos vírus inibindo a ligação do vírus e fusão com a membrana celular, ou ainda destruindo o envelope do vírus, e inibindo a replicação do vírus (12).

(iv) Peptídeos anticancerígenos membranolíticos (ACPs): oferecem novas perspectivas para o desenvolvimento de drogas anticancerígenas, com efeitos oncolíticos dos ocorrendo por mecanismos membranolíticos ou não membranolíticos (1).

(v) Peptídeos Antiparasitários: efeito de morte em parasitas que causam doenças como como malária e leishmaniose e AMPs como catelicidina, temporinas SHd apresentam alta atividade de inibição contra parasitas (11). Em pesquisas recentes, o Epi-1, um AMP sintético marinho, pode inibir notavelmente *Trichomonas vaginalis*, destruindo sua membrana (11).

Em termos da abundância de aminoácidos, podem ser classificados em:

(i) Peptídeos Antimicrobianos Ricos em Prolina (PrAMPs): estes AMPs se comportam diferentemente de outros AMPs, ou seja, eles entram citoplasma pelo transportador de membrana interna SbmA em vez de matar bactérias através da destruição da membrana (13). Uma vez no citoplasma, os PrAMPs têm como alvo os ribossomos e bloquear a ligação do aminoacil-tRNA à peptidiltransferase centralizar ou prender fatores de liberação de decodificação no ribossomo durante o término da tradução para interferir na síntese de proteínas (13).

(ii) Peptídeos Antimicrobianos Ricos em Triptofano e Arginina: O triptofano (Trp), como um aminoácido não polar, tem um notável efeito na região de interface da bicamada lipídica, enquanto Arg, como um aminoácido básico, confere carga peptídica e ligação de hidrogênio interações, que são propriedades essenciais para combinar com o componente aniônico abundante da membrana bacteriana (13).

(iii) Peptídeos Antimicrobianos Ricos em Histidina: Os AMPs ricos em histidina mostram boa atividade de permeação de membrana. HV2 é um AMP rico em histidina que aumenta a permeabilidade das membranas celulares bacterianas, causando ruptura da membrana e morte. Além disso, o HV2 inibe movimento de forma dependente da concentração e mostra um forte efeito anti-inflamatório, inibindo a produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) (14).

(iv) Peptídeos Antimicrobianos Ricos em Glicina: AMPs ricos em glicina, como atacinas e dipterocinas, existem amplamente na natureza. Um AMP rico em glicina derivado de catelicidinas de salmonídeos ativa mecanismos microbicidas mediados por fagócitos, que diferem do mecanismo de AMPs convencionais (11).

(v) Peptídeos Antimicrobianos Ricos em Cisteína: apresentam pontes de dissulfeto intramoleculares. Ex: defensinas, drosomicinas, taquiplesinas, polifemusina, mitilina e gomesina. Presentes em insetos, limulídeos (Merostomatas), moluscos e aracnídeos (15).

ESTRUTURA DOS AMPs

Os peptídeos antimicrobianos podem ser divididos em quatro categorias com base em suas estruturas, incluindo peptídeos lineares α -helicoidal, β -sheet peptídeos, tanto α -hélice quanto β -sheet peptídeos, AMPs cíclicos e incomuns ou complexos e AMPs não- $\alpha\beta$ (10).

Os AMPs α -helicoidais são os mais abundantes na natureza e foram isolados de inúmeras espécies, incluindo plantas, insetos, anfíbios, peixes e mamíferos. Vários estudos revelaram que a estrutura α -helicoidal desses AMPs é altamente dependente da interação com as membranas alvo. Esta mudança conformacional após a interação segrega os resíduos hidrofílicos dos resíduos hidrofóbicos, com o peptídeo assumindo uma estrutura anfipática essencial para a atividade de direcionamento da membrana (15).

Com relação aos AMPs de folha β consistem em pelo menos duas fitas β com muitas estruturas lineares adotando uma conformação semelhante a um grampo β [168]. A maioria dos membros desta família contém resíduos de cisteína conservados que formam pontes dissulfeto críticas para sua conformação e funções. A atividade antimicrobiana é geralmente atribuída aos resíduos catiônicos e cadeias laterais hidrofóbicas expostas nas folhas β antiparalelas (1).

Existe ainda, uma classe de AMPs $\alpha\beta$, que contém α -hélices e folhas β , e membranas fortemente direcionadas. Os membros mais proeminentes são as defensinas de plantas e insetos que têm atividade antifúngica devido a interações com esfingolípídeos da membrana fúngica ou membranas microsomais (16). Já com relação aos AMPs não- $\alpha\beta$, também chamados de peptídeos estendidos ou de alça, estes não possuem estruturas de α -hélice e folha β , sendo então classificados como peptídeos ricos em triptofano, ricos em prolina e ricos em glicina (10).

Por fim, temos os AMPs cíclicos e incomuns ou complexos, podendo ser agrupados como uma quinta classe de AMPs. Além disso, este grupo pode ser subclassificado com base na topologia cíclica (cabeça-cauda ou cabeça-lado-cadeia) e ligações cruzadas (por exemplo, tioéter ou ligações dissulfeto) (1, 10).

MECANISMOS DE AÇÃO

Diferentemente dos antibióticos tradicionais, os AMPs catiônicos interagem com as membranas celulares bacterianas através da neutralização da carga, e penetram ainda mais através das membranas bacterianas e causam a morte bacteriana, reduzindo a possibilidade de resistência bacteriana aos medicamentos (17). Além disso, esses peptídeos são mais eficientes que os antibióticos tradicionais. Eles exibem suas vantagens sobre os antibióticos

convencionais com atividades antibacterianas, antifúngicas e antivírus de amplo espectro. Eles também são potentes, com rápida capacidade de matar germes e baixa concentração bactericida, até mesmo eficazes em cepas tradicionais resistentes a antibióticos, e ainda têm efeitos sinérgicos com antibióticos típicos para neutralizar endotoxinas (18). Além disso, esses AMPs são seguros, sem efeitos colaterais tóxicos ou menos, e difíceis de induzir resistência bacteriana aos medicamentos em comparação com os antibióticos convencionais (10).

Além de seu amplo espectro de atividades antimicrobianas, apresentam boa estabilidade térmica e boa solubilidade em água. São moléculas pequenas com baixo custo sintético, relação estrutura-atividade simples e sensibilização fraca ou baixa (19). Eles podem ser amplamente utilizados no desenvolvimento de medicamentos. Por exemplo, o AMP daptomicina, foi aprovado e comercializado em 2003 como um peptídeo antibacteriano aniônico para tratar infecções de pele causadas por bactérias Gram-positivas. Este peptídeo mostrou até mesmo seus efeitos inibitórios em bacilos tifóides altamente resistentes a drogas e *Staphylococcus aureus*. Os AMPs permeabilizantes de membrana representam uma nova terapia potencial contra micróbios resistentes a medicamentos que resultam em mais morbidade e mortalidade, e podem ser aplicados clinicamente como uma estratégia para superar a resistência frequente de muitos micróbios comuns aos antibióticos convencionais.

Sejam de plantas ou de mamíferos, os peptídeos antimicrobianos podem distinguir o hospedeiro dos seus alvos microbianos. Estudos indicam que a disparidade estrutural das membranas procarióticas e eucarióticas contribui para a seletividade do AMP (20). Apesar das diferenças estruturais significativas em organismos procarióticos, os AMPs são conhecidos por estabelecer interação na membrana desses patógenos. Dentre os principais mecanismos e modelos descritos para os AMPs, destacam-se:

- **Mecanismo de Cell Wall Targeting:** Os AMPs (bacitracina e vancomicina) podem se ligar seletivamente ao lipídio II, uma molécula precursora da síntese da parede celular, e inibir a síntese da parede celular. A camada de peptidoglicano é essencial para a integridade e sobrevivência das bactérias (21).
- **Mecanismo de Membrane Targeting:** A carga líquida do cátion é um fator importante na interação inicial com a membrana carregada negativamente. A maioria dos AMPs são peptídeos catiônicos, enquanto as superfícies G⁺ e G⁻ contêm ácido teicóico e lipopolissacarídeos, respectivamente. Portanto, uma carga líquida negativa é gerada na superfície da membrana. Consequentemente, os AMPs catiônicos têm atração eletrostática inicial, fornecendo a base para o próximo passo para destruir a estrutura da membrana ou entrar na célula para desempenhar um papel. Com o aumento do conteúdo molecular peptídico, a atração eletrostática e a penetração dos AMPs que se ligam à membrana celular são fortalecidas, e então as moléculas peptídicas se difundem e pré-montam livremente na superfície da membrana (21).
- **Modelo de barril:** Inicialmente, as moléculas de peptídeos monômeros podem sofrer alterações conformacionais e ser limitadas à inserção no núcleo hidrofóbico da membrana. Quando o peptídeo atinge uma certa concentração limite, os oligômeros são formados entre

as moléculas de monômero AMP e posteriormente inseridos no núcleo hidrofóbico. Este processo deve proteger a superfície hidrofílica dos AMPs de entrar em contato com a parte hidrofóbica da íntima. A região hidrofóbica da cadeia peptídica está voltada para a membrana e interage com o lipídio da membrana, enquanto a região hidrofílica está voltada para o lado interno da parede do barril para formar um lúmen do canal (10, 21).

- **Modelo Toroidal:** Em alta concentração, os AMPs inseridos verticalmente na bicamada lipídica induzem as moléculas de fosfolipídios da membrana a se curvarem para dentro e formar poros. A cadeia peptídica está inserida na interface hidrofílica e hidrofóbica e disposta no lado interno do poro com a cabeça da bicamada lipídica (10, 21).
- **Modelo tapete:** O modelo tapete é um mecanismo de ação que não forma poros. Nele os peptídeos se inserem no núcleo hidrofóbico da membrana, porém se orientam em paralelo à superfície da membrana, recobrimo-a como um tapete. Uma forte interação eletrostática entre os grupos fosfolipídicos de cabeça polar carregados negativamente e o peptídeo catiônico, realizam uma distorção na estrutura da membrana, permitindo a chegada de peptídeos adicionais. À medida que o peptídeo atinge o seu limiar, a desintegração da membrana ou a lise celular é induzida (10).
- **Modelo detergente:** Esta é uma versão estendida do modelo tapete na qual o peptídeo interage através de um mecanismo semelhante ao modelo do tapete, levando ao colapso catastrófico da membrana. As moléculas peptídicas formam micelas com a membrana fragmentada de forma semelhante à ação de um detergente. A repartição abrangente da membrana permite que o citoplasma extravase, resultando na morte celular (22).
- **Modelo Shai-Matsuzaki-Huang:** Este modelo propõe que a interação dos peptídeos que aderem à face extracelular da membrana plasmática tenha a capacidade de tracionar a bicamada, reduzindo a sua espessura, e permitindo a formação de poros transitórios. Neste modelo, algumas moléculas de peptídeos podem atravessar os poros, alcançando a face interna da membrana e outros elementos intracelulares do microrganismo (21).

APLICAÇÃO DOS AMPS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

Uma série de peptídeos com atividade antimicrobiana segue em vários estágios de análise e desenvolvimento, com possíveis aplicações clínicas incluindo atividade anticancerígena, imunomoduladora, cicatrização de feridas, como drogas carreadoras de substâncias, adjuvantes de vacinas, reguladores da defesa inata e agentes pró e anti-inflamatórios (10).

- **AMPs e Câncer:** Nos tratamentos contra o câncer, os quimioterápicos tradicionais não conseguem diferenciar as células cancerígenas das células normais e simultaneamente matar ambas, resultando em efeitos colaterais graves. Os AMPs catiônicos podem atingir especificamente certas células cancerígenas e inibir o crescimento dessas células cancerígenas enquanto não são prejudiciais às células normais. Muito provavelmente, esses peptídeos são potenciais novas drogas anticancerígenas sem ou com baixos efeitos

colaterais tóxicos. Esses peptídeos catiônicos afetam principalmente a sobrevivência das células cancerígenas por meio do direcionamento da membrana celular, organela, lisossomo, núcleo, DNA cromossômico e citoesqueleto (23).

AMPs na Oftalmologia: Olhos humanos são propensos a serem infectados por vários organismos, incluindo bactérias e fungos em que *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus* spp., e *Candida albicans* são os patógenos mais relevantes (24). Embora AMPs como Lactoferricina B, Protegrin-1 exibiu atividade antimicrobiana contra essas bactérias patogênicas, sua aplicação no campo da oftalmologia é apenas uma etapa teórica (25). Com a popularidade das lentes de contato e o aumento de casos de infecções oculares relacionadas, peptídeos antimicrobianos mostraram boas perspectivas de aplicação em oftalmologia (26).

- **Tratamento de infecções locais:** Vários peptídeos têm sido utilizados no tratamento de infecções locais (27). Um peptídeo NEUPREX (rBPI21, opebacan) é uma preparação injetável de rBPI21 usada no tratamento de pacientes pediátricos submetidos à cirurgia cardíaca aberta e pacientes com queimaduras graves (28). Peptídeos derivados da pele de anfíbios, e. aliteserina, brevinina, ascapfina, pseudina, cassinatuerina e temporina têm sido eficazmente utilizadas no tratamento de infecções locais causadas por estirpes de bactérias resistentes a múltiplas drogas e cepas de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* sp. (29). P113 é outro peptídeo que ocorre naturalmente na saliva, que apresenta alta atividade in vitro contra *Candida albicans* e patógenos Gram-positivos e Gram-negativos de ocorrência comum, também está sendo usado na forma de enxaguatório bucal para o tratamento da candidíase oral em pacientes com HIV (30).
- **Dermatite atópica (DA):** A DA é uma doença inflamatória crônica da pele altamente prevalente, caracterizada pela interação complexa entre a ruptura da barreira da pele e a desregulação imunológica (31). Desde o primeiro relatório em 2006, descrevendo uma mutação de perda de função no gene que codifica a proteína filagrina de agregação de filamento (FLG), o papel do FLG na patogênese da DA baseada em barreira foi extensivamente pesquisado (31). Dentro da epiderme da pele humana, FLG é um componente indispensável do complexo de diferenciação epidérmica. FLG gera fator de hidratação natural (NMF) e desempenha um papel crítico na função da barreira epidérmica (32). AMPs são considerados uma resposta rápida e de primeira linha do sistema imune inato a patógenos microbianos. Juntamente com seus efeitos antimicrobianos, os AMPs também exercem efeitos imunomoduladores induzindo a migração, proliferação e diferenciação celular, regulando a produção de citocinas/quimocinas, melhorando a angiogênese e a cicatrização de feridas e sustentando a função de barreira da pele (33).
- **Úlcera do pé diabético (DFU):** A DFU é uma complicação devastadora, afetando cerca de 15% dos pacientes diabéticos e representando uma das principais causas de amputações não traumáticas. Notavelmente, o risco de infecção mista bacteriana-fúngica é elevado e altamente associado à necrose da ferida e resultados clínicos ruins (34). O

controle de infecção polimicrobiana deve ser considerado para o gerenciamento eficaz de DFU. Além de sua reconhecida atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus e fungos, alguns AMPs também desempenham papéis importantes na cicatrização de feridas, promovendo migração e proliferação celular, angiogênese, produção de quimiocinas e citocinas e cicatrização de feridas. fechamento (34, 35).

- **Terapia em infecções virais:** O sucesso da infecção in vivo após a entrada de patógenos requer a evasão e subversão de múltiplas barreiras imunológicas. Altamente abundantes e amplamente distribuídas, as defensinas modulam as respostas imunes, desempenhando assim um papel central na imunidade inata (36). As defensinas demonstraram proteção contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus influenza A (IAV), adenovírus humano (HAdV), coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARSC), vírus do papiloma (HPV), vírus sincicial respiratório (RSV) e vírus do herpes simples (HSV) (37). As defensinas podem bloquear a infecção viral através da ação direta nas partículas virais ou interferir indiretamente em vários estágios do ciclo de vida viral (37), também podem modificar a resposta imune inata a infecções virais, incluindo: modulação de células T, recrutamento de macrófagos e células dendríticas para locais de infecção, cicatrização de feridas e angiogênese, diferenciação e maturação de células dendríticas, indução da produção de células pró-inflamatórias, citocinas por macrófagos, mastócitos e queratinócitos, e regulação das vias de morte celular (38).
- **Envolvimento de AMPs em Doenças Respiratórias:** As infecções no trato respiratório inferior estão envolvidas em doenças pulmonares inflamatórias crônicas, como fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crônica. Em pacientes com fibrose cística com infecção por *P. aeruginosa*, esse organismo produz AMPs, como piocinas, que inibem o crescimento de seus competidores mais próximos (39). Assim, os mesmos AMPs poderiam ser usados como agente terapêutico para minimizar os efeitos da infecção, além de erradicar outros patógenos suscetíveis (39).
- **Peptídeos Inibidores da Lipase Pancreática:** Uma das estratégias farmacológicas para neutralizar esses problemas é a inibição lipídica da dieta. A enzima lipase pancreática hidrolisa 50-70% da gordura derivada de alimentos no organismo humano e sua inibição é explorada pelo medicamento Orlistat usado no tratamento da obesidade. No entanto, no tratamento a longo prazo, essa estratégia pode causar efeitos colaterais, como danos pancreáticos e toxicidade gastrointestinal (40). Por esse motivo, a busca de novos compostos capazes de inibir a lipase pancreática, sem exercer efeitos colaterais, representa uma necessidade ainda viva no combate a esses distúrbios. Vários AMPs foram identificados até agora que são capazes de mostrar essa atividade, que depende da estrutura e composição de aminoácidos do peptídeo. CQPHPGQTC, EITPEKNPQLR e RKQEEDEDEEQRE são três peptídeos de β -conglitinina de soja purificada que demonstraram inibir a lipase pancreática (41).
- **Peptídeos com atividade antioxidante:** O estresse oxidativo, causado por um desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em

células e tecidos, pode promover doenças como obesidade, diabetes e doenças cardíacas. Um número crescente de AMPs antioxidantes foi identificado de diferentes fontes, incluindo animais, plantas e insetos (42). As propriedades antioxidantes peptídicas são geralmente expressas como eliminação de radicais livres, atividade de quelação de íons metálicos e inibição da peroxidação lipídica (41). Por exemplo, Zhang et al. mostraram que o peptídeo VYLPR tem um efeito protetor no dano celular induzido por H₂O₂ (células HEK-293) (43). Além disso, Liang et al. investigaram peptídeos antioxidantes derivados de um hidrolisado de proteína de sementes de *Moringa oleifera* e demonstraram seus efeitos protetores em células hepáticas de Chang expostas a danos oxidativos por H₂O₂ (42).

- **AMPs e Colite:** O valor terapêutico da administração oral de lactoferrina é ressaltado por sua capacidade de melhorar a colite induzida por DSS de forma dose-dependente em ratos (44). Após o tratamento oral com lactoferrina bovina, a expressão colônica de citocinas anti-inflamatórias, IL-4 e IL-10 é aumentada, enquanto a expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1 β e IL-6, os danos histológicos e os níveis de MPO são melhorados (44). Tal tratamento oral com lactoferrina bovina tem efeitos benéficos semelhantes à colite TNBS em ratos (45). A lactoferrina derivada da lactoferrina e a lactoferrampina demonstraram matar a *Entamoeba histolytica* e isso pode ajudar a reduzir o uso do antibiótico metronidazol, que está associado a vários efeitos colaterais (45).

DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

Os antibióticos são medicamentos essenciais utilizados no tratamento de bactérias patogênicas, mas seu uso prolongado contribui para o desenvolvimento e disseminação de microrganismos resistentes aos medicamentos. Portanto, a questão da resistência aos antibióticos tornou urgente a busca de alternativas aos antibióticos convencionais, com novos modos de ação e menos predispostos à resistência bacteriana. Os AMPs têm despertado grande interesse como potenciais antibióticos de próxima geração, uma vez que são pequenas proteínas bioativas, produzidas naturalmente por todos os organismos vivos, e representam a primeira linha de defesa contra fungos, vírus e bactérias. A indústria farmacêutica está tentando resolver este problema procurando novas moléculas com atividade antibiótica ou modificando/melhorando as já existentes (47).

Os princípios de PK e PD que determinam a resposta aos AMPs antimicrobianos podem fornecer aos médicos informações úteis sobre os regimes de dosagem corretos. A farmacocinética (PK) é definida como o movimento de drogas através do corpo, enquanto a farmacodinâmica (PD) é definida como a resposta biológica do corpo às drogas. Dosler e colegas (48) investigaram as atividades in vitro de AMPs, isoladamente e em combinação com antibióticos (daptomicina, linezolida, teicoplanina, ciprofloxacina e azitromicina) contra biofilmes de MRSA padrão e clínicos, mostrando que os AMPs melhoram a eficácia farmacocinética in vitro de antibióticos tradicionais. Schmidt e colegas (49) mostraram que os AMPs (Onc72 e Onc112) atingem vários órgãos dentro de 10 minutos após a administração intravenosa e intraperitoneal e os experimentos de PK explicam a alta eficácia in vivo dos AMPs, indicando seu uso potencial para o tratamento de infecções do trato urinário.

Poucos estudos analisaram as propriedades de AMP PK/PD em relação a doenças não bacterianas. Xu e colegas (50) usaram modelos *in vitro* e *in vivo* para estudar a absorção e potencial atividade antioxidante e o metabolismo *in vivo*, respectivamente, de WDHHPQLR derivado da proteína de colza. Koeninger e colegas (51) mostraram que o hBD2 apresenta uma boa tolerabilidade e entra rapidamente na corrente sanguínea em um modelo de colite experimental após sua administração subcutânea. Assim, além de ser bem tolerado *in vivo*, pode não apenas agir localmente, mas também ter efeitos sistêmicos. Vários outros peptídeos bioativos foram descobertos nos últimos anos, mas suas propriedades PK/PD ainda são desconhecidas. Portanto, é necessário aumentar os estudos para determinar a eficácia PK/PD dos AMPs também em doenças não bacterianas.

Conforme descrito na literatura, as formas farmacêuticas em ensaios clínicos em andamento englobam gel e hidrogel tópicos, creme tópico, solução à base de álcool polivinílico para administração no leito da ferida, hidrogel à base de ácido hialurônico para administração no sítio cirúrgico, soluções orais e enxaguante bucal (52). A administração tópica de antimicrobianos na pele oferece muitas vantagens, pois oferece uma alta carga local do antimicrobiano. Os AMPs destinados a tratar infecções crônicas de pele e tecidos moles não devem (i) ser absorvidos da ferida ou do local da infecção para a circulação sistêmica; (ii) despertar a sensibilização alérgica. As administrações tópicas de AMPs demonstraram não estar isentas de efeitos colaterais sistêmicos, uma vez que o transporte do fármaco também pode ocorrer através das camadas da pele e pelos folículos pilosos. Além disso, o aumento da estabilidade contra a degradação enzimática precisa ser avaliado quando os peptídeos são desenvolvidos para fins clínicos (52, 53, 54).

CONCLUSÕES

Peptídeos antimicrobianos constituem um hotspot de pesquisa global, mas muitas questões-chave em design e aplicação precisam ser resolvidas com urgência. A interação multidisciplinar de disciplinas como biologia, ciência dos materiais, química, bioinformática, informática molecular e farmácia podem desenvolver ainda AMPs prospectivos. Simulação dinâmica, simulação de membrana celular e muito mais métodos estão sendo aplicados para estudar o mecanismo de AMP. Como entender melhor a correlação entre AMPs e vários alvos em vez de conduzir a pesquisa experimental pode melhorar os projetos experimentais para obter demonstrações sistêmicas e científicas mais fortes. As principais estratégias capazes de aprimorar a eficiência terapêutica dos AMPs podem incluir: (i) construir precursores para reduzir a citotoxicidade e melhorar estabilidade da protease, (ii) usando AMPs em combinação com agentes antibacterianos existentes, (iii) induzindo a expressão correta de AMPs com drogas apropriadas e usando engenharia probiótica como vetores para expressar AMPs. Ademais, o custo de fabricação de AMPs é estimado em cerca de US \$50-400 por grama de aminoácido produzido por SPSS (Síntese de Peptídeos em Fase Sólida). Portanto, a engenharia biotecnológica ou a fermentação devem oferecer alternativas mais baratas. Assim, abordagens naturais avançadas devem ser consideradas com o objetivo de aumentar a produção de moléculas alternativas. Nesse sentido, os AMPs são considerados agentes antimicrobianos promissores para a produção de antimicrobianos de nova geração. Embora existam vários obstáculos a serem superados para aplicações clínicas, os AMPs naturais e sintéticos ainda são fontes atrativas para as empresas

farmacêuticas. A fim de facilitar o desenvolvimento comercial de antibióticos peptídicos, é razoável focar em pequenos peptídeos.

REFERÊNCIAS

1. Bin Hafeez A, Jiang X, Bergen PJ, Zhu Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11691.
2. Boparai JK, Sharma PK. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett.* 2020;27(1):4-16.
3. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006;19:491–511.
4. fSteiner H, Hultmark D, Engström Å, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature.* 1981;292:246–248.
5. Patterson-Delafield J, Szklarek D, Martinez R.J, Lehrer R.I. Microbicidal cationic proteins of rabbit alveolar macrophages: amino acid composition and functional attributes. *Infect. Immun.* 1981;31:723–731.
6. Okada M, Natori S. Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem. J.* 1983;211:727–734.
7. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84:5449–5453.
8. Jenssen H, Hamill P, Hancock R.E.W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006;19:491–511.
9. Bhattacharjya S. NMR Structures and Interactions of Antimicrobial Peptides With Lipopolysaccharide: Connecting Structures to Functions. *Curr. Top. Med. Chem.* 2016;16:4–15.
10. Silva CAS. Peptídeos Antimicrobianos de Espécies da Família Euphorbiaceae: Identificação Estrutural e Funcional [doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2019.
11. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* 2020;11:582779.
12. Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Donovan DM, Rodríguez A, García P. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: Potential new enzybiotics. *Crit. Rev. Microbiol.* 2013;39:427–434.
13. Mattiuzzo M, Bandiera A, Gennaro R, Benincasa M, Pacor S, Antcheva N, et al. Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Mol. Microbiol.* 2007;66:151–163.
14. Dong N, Wang C, Zhang T, Zhang L, Xue C, Feng X, et al. Bioactivity and bactericidal mechanism of histidine-rich β -hairpin peptide against Gramnegative bacteria. *Intern. J. Mol. Sci.* 2019;20:3954.

15. Ayroza G. Peptídeos Antimicrobianos do Veneno de *Avicularia juruensis* (Mygalomorphae, Theraphosidae) [mestrado]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2012.
16. Uggerhøj LE, Poulsen TJ, Munk JK, Fredborg M, Sondergaard TE, Frimodt-Møller N, Hansen PR, Wimmer R. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides: Do's and don'ts. *Chem Bio Chem*. 2015;16:242–253.
17. Wang G. Improved methods for classification, Prediction, And design of antimicrobial peptides. *Methods Mol. Biol*. 2015;1268:43–66.
18. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014;6:25-64.
19. Senturk S. Evaluation of the Anti-endotoxic Effects of Polymyxin-E (Colistin) in Dogs with Naturally Occurred Endotoxic Shock. *J Vet Pharmacol Ther*. 2005;28(1):57–63
20. Carvalhero, MCM. Desenho de um novo peptídeo antimicrobiano ultracurto guiado por ferramentas computacionais [mestrado]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2022.
21. Lazzaro BP, Zasloff M, Rolff J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science*. 2020;368:eaau5480.
22. Luo Y, Song Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11401.
23. Tornesello A.L, Borrelli A, Buonaguro L, Buonaguro F.M, Tornesello M.L. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. *Molecules*. 2020;25:2850.
24. Chung P.Y, Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *J. Microbiol. Immunol. Infect*. 2017;50:405–410.
25. Santos, MA. Síntese e determinação da estrutura de peptídeos antimicrobianos intragênicos de proteínas humanas [doutorado]. Brasília: Universidade de Brasília; 2022.
26. Silva NC, Sarmiento B, Pintado M. The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2013;41:5–10.
27. Khan SA, Lee C-S. Recent progress and strategies to develop antimicrobial contact lenses and lens cases for different types of microbial keratitis. *Acta Biomater*. 2020;113:101–118.
28. Conlon JM, Sonnevend A. Clinical applications of amphibian antimicrobial peptides. *J. Med. Sci*. 2011;4(2):62–72.
29. Migoñ D, Neubauer D, Kamysz W. Hydrocarbon stapled antimicrobial peptides. *Protein J*. 2018;37(1):2–12.
30. Yu K, Lo JC, Yan M, Yang X, Brooks DE, Hancock RE, Lange D, Kizhakkedathu JN. Anti-adhesive antimicrobial peptide coating prevents catheter associated infection in a mouse urinary infection model. *Biomaterials*. 2017;116:69–81.
31. Kraft MT, Prince BT. Atopic dermatitis is a barrier issue, not an allergy issue. *Immunol. Allergy Clin. N. Am*. 2019;39:507–519.

32. Fujii M. Current understanding of pathophysiological mechanisms of atopic dermatitis: Interactions among skin barrier dysfunction, immune abnormalities and pruritus. *Biol. Pharm. Bull.* 2020;43:12–19.
33. Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, Suzuki Y, Tamari M, Otsuka F, Fujieda S, et al. Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population: A family and case–control study. *J. Hum. Genet.* 2008;53:615–621.
34. Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Chieosilapatham P, Ogawa H. Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. *Exp. Dermatol.* 2017;26:989–998.
35. Meng L, Guo X, Yang X, Liu H, Yu M, Wu Y, Zhu Z. Human α defensins promote the expression of the inflammatory cytokine interleukin-8 under high-glucose conditions: Novel insights into the poor healing of diabetic foot ulcers. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2019;33:e22351.
36. Holly M.K, Diaz K, Smith J.G. Defensins in Viral Infection and Pathogenesis. *Annu. Rev. Virol.* 2017;4:369–391.
37. Park MS, Kim JI, Lee I, Park S, Bae JY, Park MS. Towards the Application of Human Defensins as Antivirals. *Biomol. Ther.* 2018;26:242–254.
38. Findlay F, Proudfoot L, Stevens C, Barlow PG. Cationic host defense peptides; novel antimicrobial therapeutics against Category A pathogens and emerging infections. *Pathog. Glob. Health.* 2016;110:137–147.
39. González-García M, Ständker L, Otero-González AJ. Péptidos antimicrobianos en infecciones respiratorias multiresistentes. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 2019;71:e343.
40. Cheung BMY, Cheung TT, Samaranayake NR. Safety of Antiobesity Drugs. *Ther. Adv. Drug Saf.* 2013;4:171–181.
41. Lunder M, Bratkovič T, Kreft S, Štrukelj B. Peptide Inhibitor of Pancreatic Lipase Selected by Phage Display Using Different Elution Strategies. *J. Lipid. Res.* 2005;46:1512–1516.
42. Liang LL, Cai SY, Gao M, Chu XM, Pan XY, Gong KK. Purification of Antioxidant Peptides of Moringa Oleifera Seeds and Their Protective Effects on H₂O₂ Oxidative Damaged Chang Liver Cells. *J. Funct. Foods.* 2020;64:103698.
43. Zhang B, Wang H, Wang Y, Yu Y, Liu J, Liu B, et al. Identification of Antioxidant Peptides Derived from Egg-White Protein and its Protective Effects on H₂O₂-induced Cell Damage. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 2019;54:2219–2227.
44. Togawa J, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Nakajima A, Ueno N, Saito T, Sekihara H. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17:1291–1298.
45. Grubman A, Kaparakis M, Viala J, Allison C, Badea L, Karrar A, et al. The Innate Immune Molecule, NOD1, Regulates Direct Killing of Helicobacter Pylori by Antimicrobial Peptides. *Cell. Microbiol.* 2010;12:626–639.
46. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial Peptides: General Overview and Clinical Implications in Human Health and Disease. *Clin. Immunol.* 2010;135:1–11.

47. Moretta A, Scieuzo C, Petrone AM, Salvia R, Manniello MD, Franco A, Lucchetti D, Vassallo A, Vogel H, Sgambato A, Falabella P. Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:668632.
48. Dosler S, Mataraci E. In Vitro Pharmacokinetics of Antimicrobial Cationic Peptides Alone and in Combination With Antibiotics Against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Peptides.* 2013;49:53–58.
49. Schmidt R, Ostorházi E, Wende E, Knappe D, Hoffmann R. Pharmacokinetics and *In Vivo* Efficacy of Optimized Oncocin Derivatives. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016;71:1003–1011.
50. Xu F, Zhang J, Wang Z, Yao Y, Atungulu GG, Ju X, et al. Absorption and Metabolism of Peptide WDHHPQLR Derived From Rapeseed Protein and Inhibition of HUVEC. *J. Agric. Food Chem.* 2018;66:5178–5189.
51. Koeninger L, Armbruster NS, Brinch KS, Kjaerulf S, Andersen B, Langnau C, et al. Human β -Defensin 2 Mediated Immune Modulation as Treatment for Experimental Colitis. *Front. Immunol.* 2020;11:1-16.
52. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. *Drug Discov. Today.* 2010;15:40–56.
53. Lam PL, Lee KKH, Wong RSM, Cheng GYM, Bian ZX, Chui CH, et al. Recent Advances on Topical Antimicrobials for Skin and Soft Tissue Infections and Their Safety Concerns. *Crit. Rev. Microbiol.* 2018;44:40–78.
54. Pfalzgraff A, Brandenburg K, Weindl G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. *Front. Pharmacol.* 2018;9:1-23.

DOI: 10.53934/9786585062046-5

Capítulo 5

IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS GENÉTICOS PARA A COMPREENSÃO DA SINGULARIDADE DO TRATAMENTO DOS GLIOMAS PEDIÁTRICOS DE ALTO GRAU

Raquel Furlani Rocon Braga *; Aléxia Stefani Siqueira Zetum ; Daniel Stoffle Trancoso ; Karine Martins Torres ; Matheus Correia Casotti ; Iúri Drumond Louro ; Débora Dummer Meira 

*Raquel Furlani Rocon Braga – Email: raquelroconbraga@outlook.com

Resumo: Gliomas Pediátricos de Alto Grau (pHGGs) apresentam uma taxa de sobrevida baixa quando não tratados, porém, tal tratamento levanta questões sobre o risco em relação à toxicidade e à qualidade de vida da população infantil pós intervenções terapêuticas, especialmente pelo fato de serem indivíduos em que o sistema nervoso central ainda está em desenvolvimento. Como as terapias que obtiveram sucesso são recentes, os possíveis danos a longo prazo ainda são pouco documentados, e o êxito esperado é dificultado em vista que os pHGGs manifestarem resistência a certos tratamentos tradicionalmente eficazes em Gliomas de Alto Grau em Adultos (aHGGs), sendo um dos principais pontos que distinguem os cânceres nas diferentes faixas etárias. Esta revisão engloba as bases estudadas até a atualidade a respeito da discrepância - principalmente a genética - entre os Gliomas Pediátricos de Alto Grau e os Gliomas de Alto Grau em Adultos, a fim de elucidar as diferenças mutacionais e de microambiente que apontam ainda mais sobre as divergências desses tumores, representando um passo importante para alcançar um diagnóstico mais preciso e intervenções padronizadas: mais eficazes e menos danosas.

Palavras-chave: Glioma de alto grau. Tumor pediátrico. Mutação. Resistência.

INTRODUÇÃO

Assim como em adultos o câncer infantil se refere a um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células mutadas, contudo, essas células mutadas possuem, predominantemente, natureza embrionária (1). Segundo Gröbner, 2018 (2), aproximadamente 50% dos tumores primários em crianças podem apresentar um potencial de ter um evento genético como alvo, ou seja, quando o assunto é câncer infantil, torna-se necessário um olhar particular acerca de sua causalidade e características específicas. Segundo o instituto A.C. Camargo (3), “na criança, o câncer é formado por uma célula que não amadureceu como deveria e começou a se multiplicar de forma

desordenada”. Essa afirmativa traz a reflexão de que, ainda que existam semelhanças na histologia com relação ao câncer em adultos, o câncer pediátrico possui um perfil molecular com diferenças significativas (4), e observar a influência de eventos genéticos (3) no desenvolvimento desta doença evidencia a necessidade de que seja realizado um perfil individualizado de cada paciente para que aumente a acurácia do diagnóstico e a busca por uma terapia mais efetiva e menos danosa (2).

Apesar das melhorias no tratamento do câncer pediátrico, que atualmente apresentam taxa de cura de até 80% (2), as neoplasias malignas ainda constituem a terceira principal causa de morte entre crianças e adolescentes (5), sendo os tumores de Sistema Nervoso Central (SNC) os mais frequentes e responsáveis pela maior taxa de mortalidade (6, 7). Ainda que a compreensão acerca desses tumores tenha avançado de forma significativa, por meio do estudo e desenvolvimento de terapias guiadas por medicamentos de precisão (6), algumas neoplasias cerebrais raras permanecem desafiadoras pelo seu microambiente e localização de difícil alcance, tanto cirúrgico como farmacológico, além de seus complexos e característicos mecanismos (8).

Dentro desse panorama, o tratamento atual para a neoplasia, apesar de ser constituído por regimes terapêuticos intensos, ainda não é curativo na maioria dos casos, sendo responsável infelizmente por causar danos (6) na maioria das crianças que sobrevivem, dada sua alta toxicidade e localização do tumor, fazendo com que estas acabem precisando conviver com sequelas como incapacidades mentais, toxicidades em órgãos e cânceres secundários (2). Com sobreviventes de câncer pediátrico que chegam à vida adulta, os efeitos colaterais e complicações de longo prazo se tornam aparentes, o que aponta a necessidade de busca por fármacos específicos para os pacientes pediátricos, principalmente ao se observar que o número de fármacos aprovados para esse público é significativamente menor quando comparado às aprovadas para os adultos, devido às necessidades e considerações específicas para a terapia em crianças (9). Logo, é possível perceber que, apesar de em alguns casos a sobrevida conferir uma realidade no tratamento, muitas vezes ela confere um alto preço, principalmente quando são observadas a qualidade de vida dos sobreviventes e os riscos de recidiva (10).

Ao avaliar de forma lógica essas sequelas, pode-se perceber que um fator importante no tratamento de tumores cerebrais na infância é o desenvolvimento cerebral ainda em conclusão. Questões relacionadas aos cânceres infantis dificultam a terapia por detalhes como a maior possibilidade desses tumores serem relacionados com *upregulation* e *downregulation* da expressão de proteínas e, com isso, expressar alvos não específicos e pouco identificáveis (9). No tratamento de malignidades de SNC, é preciso ser cuidadoso e precioso para que o tratamento não afete o desenvolvimento normal do cérebro, o que causaria efeitos gravíssimos a longo prazo. Conforme apontado por Borgenvik, 2020 (11), não se trata de um experimento comum de bancada, mas de uma análise complexa que requer testes cuidadosos, principalmente ao observar os dados que apontam menor sobrevida em crianças com tumores de SNC em relação a outras neoplasias (12), e a incidência de efeitos deletérios ao longo dos anos superior a 50% (13). Porém, dentre os cânceres ainda descritos por alguns autores como incuráveis e

intrigantes, cujas terapias possuem alta toxicidade e baixa eficácia, é possível citar os Gliomas Pediátricos de Alto Grau (pHGGs), que constituem cerca de 17% dos tumores pediátricos de SNC e uma taxa de sobrevida em 5 anos de apenas 20% (11).

Em prol de resolver essa situação, a busca por tratamentos mais específicos para os pHGGs evidencia que o repertório genético é diferente nos adultos referente às questões histopatológicas e subtipos moleculares (2). Uma das principais considerações são os efeitos colaterais que podem afetar o desenvolvimento do sistema nervoso central, como o surgimento de demência cognitiva, bem como o fato de que fármacos que danificam o DNA ou a radiação podem aumentar os riscos do aparecimento de outras células malignas no futuro (9). Para tanto, alterações de classificações, que indiquem também características histogenéticas, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), trouxeram bastante significância na avaliação das características próprias de cada tumor (14). Essa nova classificação incluiu mutações importantes bem como características moleculares para reclassificar tumores, ao padronizar os termos “tipo” e “subtipo” em vez de “entidade” e “variante”, respectivamente (15).

Dentre as observações dessa nova classificação, está a adoção de uma nova abordagem para classificar os Gliomas, Tumores Glioneuronais e Tumores Neurais, sendo eles divididos em 6 famílias diferentes: Gliomas difusos do tipo adulto; Gliomas difusos de baixo grau do tipo pediátrico; Gliomas difusos de alto grau do tipo pediátrico; Gliomas astrocíticos circunscritos; Tumores glioneuronais e neuronais; e Ependimomas, em que se reconhece as distinções clínicas e moleculares entre os gliomas difusos que ocorrem principalmente em adultos e aqueles que ocorrem principalmente em crianças, divisão esta que deve ser um passo à frente na separação clara desses grupos de tumores biologicamente distintos (15). Portanto, esse trabalho tem como objetivo afirmar a importância, especialmente da Genética, na diferenciação de estudos e tratamentos de Gliomas de Alto Grau em Adultos e Crianças, reforçando a necessidade de elaboração de uma terapia específica e efetiva para Gliomas Pediátricos de Alto Grau e, justificar, com base em estudos genéticos, sua resistência aos tratamentos que são eficazes em Gliomas de Alto Grau em adultos.

GLIOMAS DE ALTO GRAU EM ADULTOS

I- Incidência, mortalidade e diagnóstico

Os gliomas caracterizam um dos tipos mais comuns de tumor do sistema nervoso central em todas as faixas etárias (16, 17), de forma que, em crianças, predominam os tumores de baixo grau, enquanto os gliomas difusos de alto grau são mais comuns em adultos (16, 17). Os gliomas de alto grau (HGGs) abrangem os graus 3 e 4 da OMS e são gliomas de crescimento rápido, que progridem agressivamente e demonstram sintomas graves, como prejuízo extenso na qualidade de vida, prejuízo cognitivo, alterações de memória, linguagem, aprendizado, entre outros (18, 19, 20).

Os dados referentes a esses tumores representaram 85% dentre os novos diagnósticos de tumores cerebrais, com incidência de 5/100.000 pessoas por ano na Europa e América do norte entre os anos de 2007 e 2011 (17, 18), com uma idade média diagnóstica entre 55 e 65 anos (20). Os dados de mortalidade e morbidade referentes aos Gliomas de Alto Grau em adultos (aHGGs) infelizmente permanecem pessimistas, apresentando sobrevida de apenas 15 meses em glioblastomas, subtipo mais comum dentre esses tumores (21).

As técnicas de imagem utilizadas incluem ressonância magnética (RM) e tomografia computadorizada (TC), complementadas por biópsia, em que suas características histopatológicas e moleculares são utilizadas para classificação do tumor (22). O método diagnóstico mais utilizado é a ressonância magnética (20), porém, devido à falta de especificidade biológica para realce do contraste, os resultados podem ser falso-positivos, falso-negativos ou até mesmo inconclusivos (18, 23).

II- Histologia e aspectos da doença

A histologia tumoral é extremamente heterogênea, podendo se assemelhar morfológicamente a células astrocitárias, característica esta que praticamente inviabiliza a possibilidade de ressecção cirúrgica (24). Devido a essa heterogeneidade, a classificação voltada para a histopatologia desses tumores não é capaz de fornecer informações suficientes para estratificação do paciente, sendo a avaliação molecular extremamente relevante para esses tumores (24).

Tal heterogeneidade também é responsável por desafios clínicos persistentes no planejamento do tratamento (25). Embora cada grupo molecular seja composto por diversos subtipos histológicos, havendo uma relação de predominância entre características histológicas e moleculares determinadas, observa-se que as informações moleculares agregam valor prognóstico às histológicas, enquanto as características histológicas não agregam valor às moleculares (26). Ou seja, para um direcionamento terapêutico preciso, é necessária uma avaliação de ambos os parâmetros para determinação prognóstica coerente.

III- Microambiente cerebral

O microambiente tumoral que abrange tumores cerebrais em geral inclui desde células imunes derivadas periféricas até vários tipos de células especializadas residentes em órgãos, que contribuem para a complexa biologia do tumor (27). Exemplo importante dessa afirmativa inclui os macrófagos associados a tumores e microglia (TAMs), que fornecem fatores pró-tumorigênicos, e até mesmo neutrófilos, muitas vezes associados ao desenvolvimento de resistência terapêutica (27).

Além desse certo envolvimento das células imunes na sobrevivência tumoral, a angiogênese também é característica de inúmeros cânceres, sendo característica marcante em glioblastomas, por exemplo (18, 27). Em geral, a vasculatura do glioma de alto grau exibe perfusão, volume sanguíneo e permeabilidade aumentados em comparação com o tecido cerebral normal (18).

O principal gatilho da angiogênese tumoral está relacionado à via de liberação de HIF-1 (fator de hipóxia induzível 1) e cascatas de outros fatores pró-angiogênicos (18).

Esse estado celular hipóxico simula a liberação desses fatores, (fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), angiopoietina-1 e fator de crescimento epidérmico (EGF)), levando à produção de novos vasos, fator este intimamente relacionado a progressão do tumor (28).

IV- Análise das principais mutações e alvos da doença

Diversos estudos apontam a presença de diferentes impressões moleculares em aHGGs, dentre as quais pode-se citar isocitrato desidrogenase (*IDH*) mutante, receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGFR*), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFR*), receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), dentre outras (29). Dentro desse panorama, as alterações genéticas mais frequentes em receptores de tirosina quinase estão direcionadas primeiramente ao fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), seguido pelo receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGFRA*) (30).

Outra alteração característica de aHGGs está associada às variantes da Isocitrato Desidrogenase (*IDH1* e *IDH2*). A identificação dessas mutações frequentes em gliomas adultos teve grande importância atrelada ao tratamento dos tumores de alto grau, já que seu papel na patogênese induz, por meio de uma mutação de ganho de função, a hipermetilação do DNA (31).

A partir desse panorama de mutações, os principais alvos que estão relacionados a esses tumores e os respectivos fármacos estudados para terapêutica são: *IDH*, com estudos envolvendo AGI-5198 e HMS-101; *PDGFR*, com Imatinibe e Dasatinibe e *VEGFR*, cuja terapêutica está associada aos processos de angiogênese e heterogeneidade tumoral, com bevacizumabe (29).

GLIOMAS PEDIÁTRICOS DE ALTO GRAU

I- Incidência, mortalidade e diagnóstico

Os tumores do SNC são os principais responsáveis pelo câncer infantil (32). A incidência de tumores malignos no SNC em crianças de 0 a 14 anos é de aproximadamente 5,84 a cada 100.000 pessoas (33).

Embora relativamente raro na prática pediátrica, os pHGGs contribuem com cerca de 15% de todos gliomas diagnosticados na infância (34). Anualmente, pHGGs afetam 1.1-1.78 crianças a cada 100.000 indivíduos da mesma faixa etária (35). O desfecho em geral é bastante sombrio, visto que as taxas de sobrevida em 5 anos correspondem a menos de 20% (37). Ademais, os pHGGs são responsáveis por mais de 40% das mortes relacionadas a cânceres em crianças (35).

Em geral, as crianças com pHGG desenvolvem sintomas comuns a muitos tumores do SNC (36). A tomografia computadorizada sem contraste é uma ferramenta bastante empregada para o diagnóstico, no entanto, a ressonância magnética (RM) é a mais utilizada em função da sua capacidade de fornecer com precisão a localização do tumor e ajudar a direcionar o planejamento neurocirúrgico. A radiografia do tórax ou

biópsia estereotáxica/intra-operatória também são utilizados para confirmar a localização da lesão e diferenciar a composição do tumor (38).

A natureza heterogênea observada em tumores gliais de alto grau pode convergir para um diagnóstico equivocado (39). Embora a RM seja essencial para o diagnóstico, ela não é capaz de diferenciar pHGGs de outros tumores pediátricos do SNC (40). Novas tecnologias de diagnóstico integrados aos perfis genéticos demonstraram ter um papel importante na obtenção do diagnóstico correto em cânceres do SNC, não sendo diferente para pHGGs (15).

II- Histologia e aspectos da doença

Histologicamente, os pHGGs são bastante similares aos gliomas de alto grau que ocorrem em adultos (41). De acordo com a classificação da OMS para tumores do SNC, os gliomas de alto grau abrangem o grau III (astrocitoma anaplásico) e IV (glioblastoma multiforme), sendo o grau IV clinicamente mais agressivo (42).

As características histológicas dos pHGGs incluem aumento da atividade mitótica, presença de núcleos atípicos, hiperplasticidade e aumento de necrose ou angiogênese (43). As distribuições dos tumores de alto grau parecem variar entre as diferentes faixas etárias dado que, em adultos, os HGGs surgem principalmente no córtex cerebral, enquanto em crianças, esses tumores apresentam-se mais distribuídos (44).

Os sintomas mais comuns em pHGGs podem incluir convulsões, alterações visuais, dores de cabeça e déficits neurológicos (45). O aumento da pressão na microvasculatura responsável pelo surgimento do edema em pHGGs justifica a presença desses sintomas. Além disso, dependendo da localização do tumor no cérebro, diferentes alterações comportamentais podem ser observadas (45). Outrossim, em lactentes, alterações nos padrões alimentares costumam se manifestar com frequência (34).

Diferentes vias de sinalização relacionadas ao HGGs em adultos também foram observadas em pHGGs (46). Essas vias incluem os receptores do tipo tirosina quinase (RTK), as vias de sinalização MAPK/ERK e PI3K/AKT/mTOR ativadas por RAS e via de sinalização do retinoblastoma (RB) regulado por p53 (47). A superexpressão de AKT é comumente observada em gliomas pediátricos enquanto alterações em PI3K são mais observadas em gliomas adultos (48).

III- Microambiente cerebral na infância

Diante de um detalhamento do microambiente dos tumores cerebrais pediátricos, é possível perceber que a presença e a função dos componentes do estroma são menos compreendidas do que quando comparadas aos outros tumores sólidos (49). Múltiplas evidências indicam a célula precursora neural da linhagem oligodendroglial como possível responsável pela origem dos pHGGs (50).

Acredita-se que no cérebro, o estroma tumoral seja composto por células neuronais, astrócitos, elevada vasculatura e micróglia associada ao tumor. Entretanto, pouco se sabe sobre como esses fatores que afetam a maturação do estroma interagem entre si no contexto de um cérebro em desenvolvimento (51). No entanto, como parte do microambiente tumoral, as células imunes inatas que interagem com as células tumorais produzem fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que atuam suprimindo ou favorecendo o crescimento tumoral (52).

Pesquisas emergentes apontam a atividade neuronal elevada como determinante no comportamento das células de gliomas de tal modo que os padrões espaciais e temporais observados nos pHGGs coincidem com a mielinização presente no desenvolvimento do cérebro infantil (53). A hipótese de que a atividade excitatória neuronal estimula o crescimento de tumores promoveu estudos entre interações parácrinas estroma-tumor (54, 55).

Alguns desses estudos indicaram que a estimulação neuronal foi responsável pela secreção de neuroligina 3 solúvel (NLGN3) de células pós-sinápticas, que ativa a via PI3K/Akt-mTOR em células de glioma vizinhas (56, 57). A sinalização de NLGN3 estromal parece induzir a expressão de *NLGN3* endógeno tumoral e promover o crescimento tumoral através de um mecanismo de retroalimentação (57). Presumivelmente, essas observações sugerem os mecanismos pelos quais o pHGG se utiliza da plasticidade do cérebro infantil para o seu desenvolvimento (58).

Outra questão bastante interessante no microambiente tumoral das pHGGs está atrelada à hipóxia, presente na grande maioria dos tumores sólidos (59). Apesar de deletéria em células saudáveis, células cancerígenas, em especial células-tronco tumorais, são capazes de sobreviver em ambientes hipóxicos extremos, reprogramar a expressão de genes envolvidos na proliferação celular, metabolismo e angiogênese, consequentemente, promovendo a expansão tumoral, resistência e adaptação metabólica (59)

IV- Análise das principais mutações e alvos da doença

Apesar da evidente diferença no perfil molecular, alterações genéticas e epigenéticas no pHGGs foram definidas através de análises direcionados a genes frequentemente mutados em HGGs adultos (38). No pHGG mutações missense na cauda H3 da histona K27M e G34R/V são responsáveis por afetar as variantes H3.3 e H3.1 da histona 3, que são codificadas pelos genes *H3F3A* e *HIST1H3B* (53). Até 50% dos pHGGs demonstram mutações somáticas nas variantes da cauda da histona H3 (60), sendo mutações histona *K27M* frequentemente encontrada em tumores que surgem no tálamo, ponte e medula, enquanto a mutação G34R/V é observado com maior frequência em tumores hemisféricos (61).

Mutações em outros reguladores epigenéticos, como os genes de remodelação da cromatina *ATRX* e *DAXX* foram observados em cerca de 15%-25% dos pHGGs (44). *ATRX* está altamente associado a gliomas de alto grau com mutação *H3.3 G34R/V* (62).

Embora a presença de mutações no gene *H3* seja exclusividade em pHGGs, essas mutações correspondem apenas a metade dos casos (60). Diferentes mutações em sítios regulatórios do ciclo celular são observadas nos gliomas pediátricos (63). O ciclo celular é regulado pela proteína supressora de tumor p53 (responsável pela parada do ciclo celular e apoptose em resposta a danos ao DNA), complexo quinase dependente de ciclina-ciclina (CDK-ciclina) e inibidores do ciclo celular. No pHGGs, a via *TP53* é uma das vias que se encontram frequentemente desregulada, correspondendo a aproximadamente 42%-70% dos gliomas pediátricos (44). Ademais, a superexpressão de p53 aparenta estar relacionada com pior prognóstico em pHGGs (64).

O complexo CDK atua permitindo a passagem da célula através do checkpoint G1 do ciclo celular (65). A superexpressão de CDKs em conjunto com a regulação negativa

dos inibidores de CDK pode resultar na proliferação anormal e desenvolvimento do câncer (66). Diferentes mutações presentes nesse complexo já foram correlacionadas ao pHGGs, dentre os quais: *CDK4*, *CDK6*, *CICLINA D1* e *CICLINA D2* (38, 44).

Aberrações genéticas que codificam componentes da via MAPK são constantemente encontradas em pHGGs (44). Essas mutações incluem genes que codificam o receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGF-R*) e os receptores do tipo tirosina quinase (RTKs). Outras mutações frequentemente encontradas em pHGGs associadas ao RTK são a amplificação do gene do fator de crescimento semelhante à insulina - receptor 1 (*IGF1R*), *FGFR1* e do gene *MET* (37, 67). Outras alterações genéticas envolvendo a ativação das vias PI3K-MAPK da RTK que envolviam proteínas a jusante (*NRAS*, *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA*) já foram identificadas em diferentes pHGGs (32).

Cerca de 10-25% dos pacientes com pHGG possuem mutações *BRAF* V600E (44). A resistência tumoral em mutantes de *BRAF* é frequentemente devido a constante reativação da via de MAPK (68), inclusive, o uso de inibidores BRAF em pacientes com pHGG mutante para *BRAF* V600E demonstrou eficácia nos estudos realizados por Mark *et al.* (69).

Menos de 5% dos pHGGs possuem mutações em *IDH1* e *IDH2* (35, 70). Assim, embora mutações nesses genes possam alterar a classificação dos gliomas, eles possuem maior relação com os gliomas encontrados em adultos (70,71). Aparentemente, a mutação *IDH1* está associada a um prognóstico mais favorável em indivíduos com mais de 14 anos (35).

O protocolo padrão no tratamento de gliomas infantis, quando inspirado nos adultos, confere ineficácia à adesão, com dados de mortalidade de 80% em até dois anos (59) decorrente dessas características únicas que compõem esses tumores na infância (72). No entanto, as crescentes descobertas genômicas em pHGGs aumentam as possibilidades de novas abordagens terapêuticas com objetivo de desenvolver métodos direcionados a possíveis vias defeituosas devido às mutações em suas moléculas precursoras (62). Novas investigações do perfil genético em pHGGs demonstram potencial muito promissor para a melhora da sobrevida global e qualidade de vida a longo prazo de crianças diagnosticadas com pHGGs (73).

CONCLUSÕES

As significativas diferenças que separam os gliomas de alto grau adulto e pediátrico estão cada vez mais evidentes através de estudos moleculares das referidas doenças, o que claramente interfere na abordagem terapêutica utilizada para cada tipo de tumor.

Mutações características em genes que codificam as histonas H3.3 e H3.1 apresentam perfil molecular diferenciado em Gliomas Infantis, sendo raramente apresentados em Gliomas Adultos, enquanto mutações nas variantes da isocitrato desidrogenase estão intimamente envolvidas ao mau prognóstico em tumores adultos.

A partir deste apanhado de dados documentados na literatura, é possível descrever diversas divergências entre esses tumores, justificando a extensa presença de resistência

nos pHGGs em relação aos tratamentos preconizados para os aHGGs, que resultam na dificuldade de alcançar terapias eficazes e não tóxicas para os pacientes pediátricos.

Para ultrapassar tais obstáculos decorrentes de padrões genéticos diferenciados, são imprescindíveis mais estudos que tenham como fim explorar esse perfil genético especial dos tumores pediátricos, dada a sua relevância para o desenvolvimento da Medicina de Precisão para obtenção do correto tratamento dos Gliomas Pediátricos de Alto Grau.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Tipos de Câncer: Câncer infantojuvenil. Modificado em março de 2021. [acesso em 11 Mai 2022]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-infantojuvenil>.
2. Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, *et al.* The landscape of genomic alterations across childhood cancers [published correction appears in Nature. 2018 Jul;559(7714):E10]. Nature. 2018;555(7696):321-327. doi:10.1038/nature25480.
3. Costa CML. Diferenças entre câncer infantil e de adultos. A. C. Camargo Cancer Center. Fevereiro de 2018. [acesso em 11 Mai 2022]. Disponível em: <https://www.accamargo.org.br/sobre-o-cancer/noticias/diferencas-entre-cancer-infantil-e-de-adultos#:~:text=Ao%20contr%C3%A1rio%20do%20que%20acontece,infantil%20por%20ano%20no%20Brasil>.
4. Abedalthagafi M, Mobark N, Al-Rashed M, AlHarbi M. Epigenomics and immunotherapeutic advances in pediatric brain tumors. NPJ Precis Oncol. 2021;5(1):34. Published 2021 Apr 30. doi:10.1038/s41698-021-00173-4.
5. Cunningham RM, Walton MA, Carter PM. The Major Causes of Death in Children and Adolescents in the United States. N Engl J Med. 2018;379(25):2468-2475. doi:10.1056/NEJMSr1804754.
6. Madlener S, Gojo J. Liquid Biomarkers for Pediatric Brain Tumors: Biological Features, Advantages and Perspectives. J Pers Med. 2020;10(4):254. Published 2020 Nov 27. doi:10.3390/jpm10040254.
7. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. Neuro Oncol. 2019;21(Suppl 5):v1-v100. doi:10.1093/neuonc/noz150.
8. Beccaria K, Canney M, Bouchoux G, Puget S, Grill J, Carpentier A. Blood-brain barrier disruption with low-intensity pulsed ultrasound for the treatment of

- pediatric brain tumors: a review and perspectives. *Neurosurg Focus*. 2020;48(1):E10. doi:10.3171/2019.10.FOCUS19726.
9. Kattner P, Strobel H, Khoshnevis N, *et al*. Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. *Cancer Metast Rev*. 2019;38(4):673-682. doi:10.1007/s10555-019-09836-y.
 10. Pollack IF, Agnihotri S, Broniscer A. Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions. *J Neurosurg Pediatr*. 2019;23(3):261-273. doi:10.3171/2018.10.PEDS18377.
 11. Borgenvik A, Čančer M, Hutter S, Swartling FJ. Targeting MYCN in Molecularly Defined Malignant Brain Tumors. *Front Oncol*. 2021;10:626751. Published 2021 Jan 28. doi:10.3389/fonc.2020.626751.
 12. Leong E, Ong SK, Jali F, Ramlee N. Childhood Cancer Survival in Brunei Darussalam. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020;21(11):3259-3266. Published 2020 Nov 1. doi:10.31557/APJCP.2020.21.11.3259.
 13. Butler E, Ludwig K, Pacenta HL, Klesse LJ, Watt TC, Laetsch TW. Recent progress in the treatment of cancer in children. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(4):315-332. doi:10.3322/caac.21665.
 14. Soldatelli JS, Oliveira IM, Kneubil MC, Henriques JAP. Gliomas molecular markers: importance in treatment, prognosis and applicability in brazilian health system. *An Acad Bras Cienc*. 2022;94(3):e20211075. Published 2022 Jun 27. doi:10.1590/0001-376520220211075.
 15. Louis DN, Perry A, Wesseling P, *et al*. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*. 2021;23(8):1231-1251. doi:10.1093/neuonc/noab106.
 16. Jones C, Baker SJ. Unique genetic and epigenetic mechanisms driving paediatric diffuse high-grade glioma. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(10):10.1038/nrc3811. doi:10.1038/nrc3811.
 17. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, *et al*. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010 [published correction appears in *Neuro Oncol*. 2014 May;16(5):760]. *Neuro Oncol*. 2013;15 Suppl 2(Suppl 2):ii1-ii56. doi:10.1093/neuonc/not151.
 18. Henriksen OM, Del Mar Álvarez-Torres M, Figueiredo P, *et al*. High-Grade Glioma Treatment Response Monitoring Biomarkers: A Position Statement on the Evidence Supporting the Use of Advanced MRI Techniques in the Clinic, and the Latest Bench-to-Bedside Developments. Part 1: Perfusion and Diffusion Techniques. *Front Oncol*. 2022;12:810263. Published 2022 Mar 3. doi:10.3389/fonc.2022.810263.

19. Acevedo-Vergara K, Perez-Florez M, Ramirez A, *et al.* Cognitive deficits in adult patients with high-grade glioma: A systematic review. *Clin Neurol Neurosurg.* 2022;219:107296. doi:10.1016/j.clineuro.2022.107296.
20. Booth TC, Williams M, Luis A, Cardoso J, Ashkan K, Shuaib H. Machine learning and glioma imaging biomarkers. *Clin Radiol.* 2020;75(1):20-32. doi:10.1016/j.crad.2019.07.001.
21. Ghouzlani A, Kandoussi S, Tall M, Reddy KP, Rafii S, Badou A. Immune Checkpoint Inhibitors in Human Glioma Microenvironment. *Front Immunol.* 2021;12:679425. Published 2021 Jul 9. doi:10.3389/fimmu.2021.679425.
22. Pienkowski T, Kowalczyk T, Garcia-Romero N, Ayuso-Sacido A, Ciborowski M. Proteomics and metabolomics approach in adult and pediatric glioma diagnostics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2022;1877(3):188721. doi:10.1016/j.bbcan.2022.188721.
23. Booth TC, Thompson G, Bulbeck H, *et al.* A Position Statement on the Utility of Interval Imaging in Standard of Care Brain Tumour Management: Defining the Evidence Gap and Opportunities for Future Research. *Front Oncol.* 2021;11:620070. Published 2021 Feb 9. doi:10.3389/fonc.2021.620070.
24. Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012;38(3):271-291. doi:10.1111/j.1365-2990.2011.01238.x.
25. Hu LS, Hawkins-Daarud A, Wang L, Li J, Swanson KR. Imaging of intratumoral heterogeneity in high-grade glioma. *Cancer Lett.* 2020;477:97-106. doi:10.1016/j.canlet.2020.02.025.
26. Gravendeel LA, Kouwenhoven MC, Gevaert O, *et al.* Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res.* 2009;69(23):9065-9072. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2307.
27. Quail DF, Joyce JA. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell.* 2017;31(3):326-341. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.009.
28. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol Neurobiol.* 2020 May;57(5):2461-2478. doi: 10.1007/s12035-020-01892-8. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32152825; PMCID: PMC7170819.
29. Li D, Patel CB, Xu G, *et al.* Visualization of Diagnostic and Therapeutic Targets in Glioma With Molecular Imaging. *Front Immunol.* 2020;11:592389. Published 2020 Oct 30. doi:10.3389/fimmu.2020.592389.
30. Phillips JJ, Aranda D, Ellison DW, *et al.* PDGFRA amplification is common in pediatric and adult high-grade astrocytomas and identifies a poor prognostic group

- in IDH1 mutant glioblastoma. *Brain Pathol.* 2013;23(5):565-573. doi:10.1111/bpa.12043.
31. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, *et al.* 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat Med.* 2012;18(4):624-629. Published 2012 Jan 26. doi:10.1038/nm.2682.
 32. Cacciotti C, Fleming A, Ramaswamy V. Advances in the molecular classification of pediatric brain tumors: a guide to the galaxy. *The Journ of Path.* 2020 Jun 10;251(3):249–61.
 33. Silva da Costa MD, Camargo NC, Dastoli PA, Nicácio JM, Benevides Silva FA, Sucharski Figueiredo ML, *et al.* High-grade gliomas in children and adolescents: is there a role for reoperation? *Journ of Neurosurg: Pediat.* 2021 Feb;27(2):160–9.
 34. Di Ruscio V, Carai A, Del Baldo G, Vinci M, Cacchione A, Miele E, *et al.* Molecular Landscape in Infant High-Grade Gliomas: A Single Center Experience. *Diagnost.* 2022 Feb 1;12(2):372.
 35. Buccoliero AM, Giunti L, Moscardi S, Castiglione F, Provenzano A, Sardi I, *et al.* Pediatric High Grade Glioma Classification Criteria and Molecular Features of a Case Series. *Genes.* 2022 Mar 31;13(4):624.
 36. Ceglie G, Vinci M, Carai A, Rossi S, Colafati GS, Cacchione A, *et al.* Infantile/Congenital High-Grade Gliomas: Molecular Features and Therapeutic Perspectives. *Diagnost.* 2020 Aug 28;10(9):648.
 37. Coleman C, Stoller S, Grotzer M, Stucklin AG, Nazarian J, Mueller S. Pediatric hemispheric high-grade glioma: targeting the future. *Canc and Metast Rev.* 2020 Jan 27;39(1):245–60.
 38. Haase S, Nuñez FM, Gauss JC, Thompson S, Brumley E, Lowenstein P, *et al.* Hemispherical Pediatric High-Grade Glioma: Molecular Basis and Therapeutic Opportunities. *Intern Journ of Mol Sci.* 2020 Dec 17 [cited 2022 Apr 23];21(24):9654.
 39. Taylor C, Ekert JO, Sefcikova V, Fersht N, Samandouras G. Discriminators of pseudoprogession and true progression in high-grade gliomas: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports.* 2022 Aug 2;12(1).
 40. Gonçalves FG, Viaene AN, Vossough A. Advanced Magnetic Resonance Imaging in Pediatric Glioblastomas. *Front Neur.* 2021 Nov 10;12.
 41. Chatwin HV, Cruz Cruz J, Green AL. Pediatric high-grade glioma: moving toward subtype-specific multimodal therapy. *The FEBS Journal.* 2021 Feb 11.

42. Osborn AG, Louis DN, Poussaint TY, Linscott LL, Salzman KL. The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: What Neuroradiologists Need to Know. *Amer Journ of Neurorad.* 2022 Jun 16.
43. Papale M, Ferretti E, Battaglia G, Bellavia D, Mai A, Tafani M. EZH2, HIF-1, and Their Inhibitors: An Overview on Pediatric Cancers. *Fron Pediat.* 2018 Nov 19;6.
44. AlRayahi J, Zapotocky M, Ramaswamy V, Hanagandi P, Branson H, Mubarak W, *et al.* Pediatric Brain Tumor Genetics: What Radiologists Need to Know. *RadioGraphics.* 2018 Nov;38(7):2102–22.
45. Karremann M, Gielen GH, Hoffmann M, Wiese M, Colditz N, Warmuth-Metz M, *et al.* Diffuse high-grade gliomas with H3 K27M mutations carry a dismal prognosis independent of tumor location. *Neuro-Oncology.* 2017 Aug 4;20(1):123–31.
46. Teng J, Lashgari G, Tabet EI, Tannous BA. The natural compound obtusaquinone targets pediatric high-grade gliomas through ROS-mediated ER stress. *Neuro-Oncol Adv.* 2020 Jan 1;2(1).
47. Meel MH, Schaper SA, Kaspers GJL, Hulleman E. Signaling pathways and mesenchymal transition in pediatric high-grade glioma. *Cel and Mol Life Sci.* 2017 Nov 21;75(5):871–87.
48. Erira A, Velandia F, Penagos J, Zubieta C, Arboleda G. Differential Regulation of the EGFR/PI3K/AKT/PTEN Pathway between Low- and High-Grade Gliomas. *Brain Sci.* 2021 Dec 18;11(12):1655.
49. Ross JL, Velazquez Vega J, Plant A, MacDonald TJ, Becher OJ, Hambardzumyan D. Tumour immune landscape of paediatric high-grade gliomas. *Brain.* 2021 Apr 15;144(9):2594–609.
50. Da-Veiga MA, Rogister B, Lombard A, Neirinckx V, Piette C. Glioma Stem Cells in Pediatric High-Grade Gliomas: From Current Knowledge to Future Perspectives. *Cancers (Basel).* 2022;14(9):2296. Published 2022 May 4. doi:10.3390/cancers14092296.
51. Pasqualini C, Kozaki T, Bruschi M, Nguyen THH, Minard-Colin V, Castel D, *et al.* Modeling the Interaction between the Microenvironment and Tumor Cells in Brain Tumors. *Neuron.* 2020 Dec;108(6):1025–44.
52. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Canc Reseac.* 2019 Jul 26;79(18):4557–66.
53. Huchedé P, Leblond P, Castets M. The Intricate Epigenetic and Transcriptional Alterations in Pediatric High-Grade Gliomas: Targeting the Crosstalk as the Oncogenic Achilles' Heel. *Biomedicines.* 2022 Jun 3;10(6):1311.

54. Gillespie S, Kim Y, Geraghty A, Woo P, Monje M. HGG-05. Neuronal Activity Promotes Pediatric High-Grade Glioma Growth Through A Nlgn3-Cspg4 Signaling Axis. *Neuro-Oncol.* 2021 Jun 1;23(Supplement_1):i18–8.
55. Venkatesh HS, Morishita W, Geraghty AC, Silverbush D, Gillespie SM, Arzt M, *et al.* Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature.* 2019 Sep 1;573(7775):539–45.
56. Li Z, Gao W, Fei Y, Gao P, Xie Q, Xie J, *et al.* NLGN3 promotes neuroblastoma cell proliferation and growth through activating PI3K/AKT pathway. *Europ Journ of Pharmac.* 2019 Aug;857:172423.
57. Radin DP, Tsirka SE. Interactions between Tumor Cells, Neurons, and Microglia in the Glioma Microenvironment. *Internat Journ of Mol Sci.* 2020 Nov 11 [cited 2021 Mar 6];21(22):8476.
58. Clarke M, Mackay A, Ismer B, Pickles JC, Tatevossian RG, Newman S, *et al.* Infant High-Grade Gliomas Comprise Multiple Subgroups Characterized by Novel Targetable Gene Fusions and Favorable Outcomes. *Canc Discov.* 2020 Jul 1;10(7):942–63.
59. Fuchs Q, Pierrevelcin M, Messe M, *et al.* Hypoxia Inducible Factors' Signaling in Pediatric High-Grade Gliomas: Role, Modelization and Innovative Targeted Approaches. *Cancers (Basel).* 2020;12(4):979. Published 2020 Apr 15. doi:10.3390/cancers12040979.
60. Malbari F, Lindsay H. Genetics of Common Pediatric Brain Tumors. *Pediatr Neurol.* 2019 Aug.
61. Mosaab A, El-Ayadi M, Khorshed EN, Amer N, Refaat A, El-Beltagy M, *et al.* Histone H3K27M Mutation Overrides Histological Grading in Pediatric Gliomas. *Scient Rep.* 2020 May 20 [cited 2022 Jun 1];10(1):8368.
62. Blionas A, Giakoumettis D, Klonou A, Neromyliotis E, Karydakis P, Themistocleous MS. Paediatric gliomas: diagnosis, molecular biology and management. *Annals of Transl Med.* 2018 Jun [cited 2020 Apr 9];6(12):251–1.
63. Rallis KS, George AM, Wozniak AM, Bigogno CM, Chow B, Hanrahan JG, *et al.* Molecular Genetics and Targeted Therapies for Paediatric High-grade Glioma. *Canc Geno - Prote.* 2022;19(4):390–414.
64. Zheng L, Gong J, Yu T, Zou Y, Zhang M, Nie L, *et al.* Diffuse Midline Gliomas With Histone H3 K27M Mutation in Adults and Children. *Amer Jour of Surg Path.* 2022 Apr 13;46(6):863–71.
65. Bury M, Le Calvé B, Ferbeyre G, Blank V, Lessard F. New Insights into CDK Regulators: Novel Opportunities for Cancer Therapy. *Trends in Cell Biol.* 2021 May 1 [cited 2022 Mar 13];31(5):331–44.

66. Juric V, Murphy B. Cyclin-dependent kinase inhibitors in brain cancer: current state and future directions. *Cancer Drug Resist.* 2020.
67. Ryall S, Tabori U, Hawkins C. Pediatric low-grade glioma in the era of molecular diagnostics. *Acta Neuropathologica Communications.* 2020 Mar 12;8(1).
68. Toll SA, Tran HN, Cotter J, Judkins AR, Tamrazi B, Biegel JA, *et al.* Sustained response of three pediatric BRAFV600E mutated high-grade gliomas to combined BRAF and MEK inhibitor therapy. *Oncotarget.* 2018 Dec 31;10(4).
69. Marks AM, Bindra RS, DiLuna ML, Huttner A, Jairam V, Kahle KT, *et al.* Response to the BRAF/MEK inhibitors dabrafenib/trametinib in an adolescent with a BRAF V600E mutated anaplastic ganglioglioma intolerant to vemurafenib. *Pediat Blood & Canc.* 2018 Jan 30;65(5):e26969.
70. Sumerauer D, Krskova L, Vicha A, Misove A, Mamatjan Y, Jencova P, *et al.* Rare IDH1 variants are common in pediatric hemispheric diffuse astrocytomas and frequently associated with Li-Fraumeni syndrome. *Acta Neuropath.* 2020 Jan 3;139(4):795–7.
71. Yeo KK, Alexandrescu S, Cotter JA, Vogelzang J, Bhawe V, Li MM, *et al.* Multi-institutional study of the frequency, genomic landscape, and outcome of IDH-mutant glioma in pediatrics. *Neuro-Oncol.* 2022 May 23.
72. Rizzo D, Ruggiero A, Martini M, Rizzo V, Maurizi P, Riccardi R. Molecular Biology in Pediatric High-Grade Glioma: Impact on Prognosis and Treatment. *Biomed Res Int.* 2015;2015:215135. doi:10.1155/2015/215135.
73. Roux A, Pallud J, Saffroy R, Edjlali-Goujon M, Debily M-A, Boddaert N, *et al.* High-grade gliomas in adolescents and young adults highlight histomolecular differences from their adult and pediatric counterparts. *Neuro-Oncol.* 2020 Feb 6;22(8):1190–202.

DOI: 10.53934/9786585062046-6

Capítulo 6

UMA BREVE RETOMADA TEÓRICA ACERCA DO USO DE JOGOS PEDAGÓGICOS NO ENSINO DE GENÉTICA

Paula Roberta Costalonga Pereira¹ *; **Maria Gabriela Pissinati Trindade¹ **;
Lucas Evangelista dos Santos¹ ; **Jean Carlos Vencioneck Dutra¹ **; **Maria do Carmo Pimentel Batitucci¹ **

¹Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

*Email: paula.rc.pereira94@gmail.com

Resumo: Ensinar Genética é um desafio para os professores, seja pela quantidade de conceitos teóricos abordados ou a natureza, muitas vezes, abstrata desses conceitos que levam aos alunos a decorarem termos ao invés de verdadeiramente compreendê-los. Os modelos didáticos, com destaque para o uso dos jogos didáticos, surgem como alternativa que podem contribuir para uma construção significativa do conhecimento, pois requerem uma participação ativa do estudante no processo de aprendizagem, sendo uma ferramenta lúdica e motivadora. Portanto, esta pesquisa teve como objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre a utilização de jogos como ferramenta de apoio ao ensino da Genética. Os resultados indicam que essa metodologia tem contribuído para a aprendizagem dos tópicos de Genética e promovido o divertimento, a socialização e uma maior participação dos alunos em sala de aula.

Palavras-chave: Biologia; educação lúdica; ensino de ciências; metodologias ativas de aprendizagem

INTRODUÇÃO

Há alguns anos, o ensino baseado na transmissão do conhecimento, denunciado por Paulo Freire (1) de educação bancária, é alvo de crítica. Como Brighente e Mesquida (2) reforçam, a educação bancária não é libertadora, mas, sim, opressora, pois não busca a conscientização e a criticidade de seus educandos.

Consoante ao disposto, a utilização de metodologias ativas é de suma importância para a construção do saber científico, auxiliando no desenvolvimento de uma visão holística sobre os fenômenos que compõem nossa existência (3). Como um contraponto à *práxis* pedagógica, a escola tradicional não considera os diversos fatores que possam interferir na recepção da informação pelos alunos, onde os professores tornam-se protagonistas durante todo o processo educacional, culminando em uma metodologia de ensino pouco atrativa (4). Portanto, vem-se discutindo a importância de adotar

metodologias de ensino mais dinâmicas, na qual os estudantes sejam os protagonistas da construção de seus conhecimentos.

Quando se fala no ensino das Ciências Naturais, apesar da ciência estar presente no dia-a-dia da sociedade, parece haver um distanciamento entre o conteúdo ensinado pelos professores da realidade dos alunos. Vincular sua relação em sala de aula com o contexto econômico, cultural, social, político e tecnológico e suas aplicações práticas não é o que acontece, dificultando o entendimento e a assimilação do conteúdo por parte dos alunos (5).

Sabe-se que dentre as diferentes áreas da Ciência, o ensino de Genética é um dos mais desafiadores (6), pois envolve conceitos abstratos que os estudantes precisam consolidar para construir uma aprendizagem significativa. Neste viés, nota-se a necessidade de os professores adotarem novas formas de apresentar e debater os conteúdos, buscando adaptá-los e contextualizá-los com a realidade em que os alunos estão inseridos.

A utilização de recursos didáticos surge como uma alternativa que pode contribuir para uma construção significativa do conhecimento, possibilitando aos estudantes relacionar teoria e prática. Dentre esses recursos, destacam-se os jogos didáticos que contribuem para o desenvolvimento de habilidades sociais, emocionais e cognitivas do aluno (7).

A Base Nacional Comum Curricular (BNCC) cita implicitamente os benefícios das metodologias ativas, afirmando:

No novo cenário mundial, reconhecer-se em seu contexto histórico e cultural, comunicar-se, ser criativo, analítico-crítico, participativo, aberto ao novo, colaborativo, resiliente, produtivo e responsável requer muito mais do que o acúmulo de informações (8).

O documento, ainda propõe:

[...] a superação da fragmentação radicalmente disciplinar do conhecimento, o estímulo à sua aplicação na vida real, a importância do contexto para dar sentido ao que se aprende e o protagonismo do estudante em sua aprendizagem e na construção de seu projeto de vida (8).

Portanto, este trabalho teve como objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre a utilização de jogos como ferramenta de apoio ao ensino da Genética. A compilação de informações pode servir como uma fonte de busca atualizada e auxiliar os docentes sobre a eficácia do uso de jogos para o processo de ensino e aprendizagem. Para sua realização, foi feita uma pesquisa na base de dados “Google Acadêmico”, seguindo o percurso teórico-metodológico estabelecido por Franco (9), na qual abrange as etapas de seleção dos trabalhos, leitura flutuante e analítica.

TÓPICOS

A DINÂMICA DOS JOGOS COMO ESTRATÉGIA PEDAGÓGICA

A docência nos permite afirmar que a sala de aula não é uma unidade, pelo contrário: é um ambiente múltiplo, onde cada aluno possui seu próprio ritmo e particularidades na assimilação dos conteúdos. Desta forma, ensinar torna-se um desafio, envolvendo técnicas e metodologias que contribuem para a decodificação de informações, facilitando o processo de ensino-aprendizagem (7,10,11).

Visando alternativas para driblar as práticas convencionais, os jogos e as atividades lúdicas entram em cena como uma estratégia de possibilitar a imersão dos alunos na sequência didática proposta. Romano, Souza e Nunes (12), em seu trabalho com professores da área de Ciências Biológicas e alunos do terceiro ano do Ensino médio, reforçam que, toda atividade que foge do modelo tradicional de ensino, resulta em uma melhor aprovação pelos estudantes. Entretanto, é importante salientar que a aplicação de jogos como ferramenta educacional necessita de objetivos pedagógicos bem definidos e alicerçados em um contexto metodológico (13).

Antes de integrar os jogos à prática docente, é necessário compreender os diferentes conceitos que permeiam esse artefato. Na literatura, é comum nos depararmos com os termos – jogos de entretenimento, jogos sérios (*serious game*), gamificação e jogos de simulação (14,15). Os jogos de entretenimento são os convencionais, com a finalidade básica da diversão e, não necessariamente o compromisso com os requisitos pedagógicos (16). Para tal, os jogos sérios/didáticos cumprem essa função, proporcionando experiências baseadas nas mecânicas dos jogos com o propósito de ensinar conteúdos específicos. Já a gamificação utiliza a lógica dos jogos em contextos fora dos jogos para engajar pessoas, possui inúmeras aplicações na educação, assim como alguns tipos de jogos de simulação (15,17,18).

Nunes, do Canto e Rodrigues (19) descrevem o uso de jogos didáticos como uma ótima ferramenta para suprimir as dificuldades de aprendizagem, capaz de motivar os alunos e auxiliar na simplificação de conceitos complexos. Para além da compreensão de conceitos complexos, os jogos aliados ao ensino apresentam diversas potencialidades, integrando as competências previstas na Base Nacional Comum Curricular (BNCC) conforme apresentado na figura abaixo (Figura 1) (8,20,21).

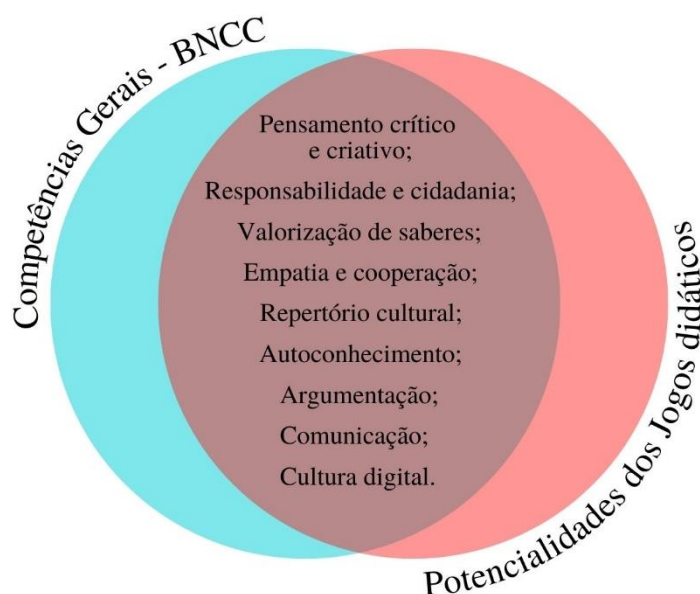


Figura 1 – Diagrama evidenciando os atributos alcançados em uma intercessão entre as competências gerais almejadas pela BNCC, e as potencialidades dos jogos didáticos.

Todos os atributos presentes na intercessão do diagrama da figura 1 são corroborados por uma revisão sistemática da literatura realizada por Tsutsumi et al. (22), analisando vinte e quatro trabalhos sobre a temática em questão. Como resultado, os autores propõem que as metodologias ativas com ênfase em jogos são de fato eficazes para melhorar o desempenho acadêmico e psicopedagógico. Perceberam também, uma predominância na aplicação de jogos eletrônicos, o que de certa forma já era esperado, pois a emergência de novas tecnologias está em todas as esferas da atual sociedade, entranhada no cotidiano da maioria das pessoas. Gadêlha et al. (23) salientam a importância dessas práticas inovadoras e tecnológicas nas dinâmicas que cercam o ensinar e o aprender, oportunizando professores e alunos a transferirem para dentro do espaço pedagógico suas experiências extraescolares, valorizando-as e obtendo melhores resultados, justamente por estarem familiarizados com esse tipo de material.

Nessa perspectiva, autores como Castro et al. (24) defendem que as práticas lúdicas são fatores essenciais no combate à evasão escolar e à reprovação. Este argumento se baseia no pressuposto que esses locais formativos tendem a ser mais agradáveis e atrativos, de modo a minimizar o percentual de desistências e aumentar o engajamento frente a temas complexos a serem estudados, como é o caso da Genética e outras áreas das Ciências Naturais. Desse modo, podemos dizer que os jogos surgem como aliados na proposta de desafiar os jogadores/alunos a superarem cada fase/etapa apresentada na trajetória acadêmica, pois o ato de jogar utiliza dos desejos inerentes ao comportamento humano, como a conquista, competição e o altruísmo (15,25).

ENSINO DA GENÉTICA HOJE

É de conhecimento geral que os estudos na área de genética trouxeram para a sociedade avanços que permeiam muitos campos do conhecimento. Tornou-se comum a população lidar com temas diários no jornal sobre células-tronco, transgênicos, exames de DNA, terapias gênicas, sequenciamento viral, dentre outras temáticas que vão surgindo conforme os estudos nessa área avançam. Desse modo, e diante da importância de compreender as mudanças que acontecem no campo científico, é necessário que a disciplina de Genética seja compreendida de forma efetiva pela comunidade geral, pois a população também deve fazer parte dos debates sobre esses temas tão presentes no cotidiano. Assim sendo, cabe ressaltar que o início da assimilação desses conteúdos ocorre nas instituições de ensino.

Em vista disso, é na escola que irão surgir os mais diversos questionamentos sobre os temas da Genética, e o professor é quem realiza o papel de esclarecer o que foi transmitido de forma muito técnica ou com superficialidade pelos meios de comunicação. Os conceitos adquiridos pelos alunos são trazidos de forma prévia, e é na escola que devem ser transformados em aprendizagem significativa (26).

Todavia, ensinar os conceitos de Genética é uma tarefa difícil e boa parte dos estudantes brasileiros apresentam dificuldades no entendimento dos conceitos dessa disciplina, como a compreensão do papel e estrutura das moléculas de RNA, DNA, bem como das proteínas e ribossomos (27). Tal situação torna-se ainda mais desafiadora quando são introduzidos assuntos como as leis de Mendel, sistema ABO (de tipos sanguíneos) e o quadrado de Punet. Nesse sentido, um dos problemas que podem ocorrer é a compreensão inadequada dessas terminologias, e uma das razões para esse acontecimento é que o ensino de Genética muitas vezes é trabalhado de forma descontextualizada e baseado apenas na memorização de termos (28).

Cabe destacar que além dos problemas relacionados à uma metodologia centrada na definição de conceitos, o que pode ser observado, em alguns contextos, é a abordagem muito superficial dos termos dessa área do conhecimento, e isso pode ser causado pois muitas das descobertas nesse campo são relativamente novas e não foram trabalhadas durante o processo de formação docente de alguns professores. Como bem se sabe, a genética é um tema atual e em constante atualização, com conteúdo abstratos e que exigem muito empenho para serem compreendidos (29).

Nessa conjuntura, é importante salientar que na hora de ensinar o entendimento real dos alunos deve estar em primeiro lugar, e, para isso, é fundamental que haja a problematização dos temas abordados em sala. Logo, o professor deve auxiliar na interpretação dos problemas dispostos, e ainda, associar os conteúdos já adquiridos pelos alunos com o aprendizado do dia a dia (30). É urgente que os discentes tenham uma nova didática, em novos tempos, pois como diz Freire em *Pedagogia da Autonomia*, “o educador que castra a curiosidade do aluno em detrimento da memorização dos conteúdos, tolhe a liberdade do educando, a sua capacidade de aventurar-se” (31).

Por conseguinte, muitas alternativas de ensino têm sido aplicadas em sala de aula para dinamizar e melhorar o aprendizado da disciplina de Genética. Um desses caminhos corresponde a utilização de metodologias ativas pelos professores nas aulas, que permite a exploração de novas competências, além de proporcionar aos estudantes uma nova forma de pensar, ver o mundo e aprender (32). Como a Genética corresponde a uma disciplina em que a compreensão é complexa muitas metodologias, além das aulas expositivas, têm sido implementadas nas escolas como as maquetes, modelos didáticos e os famosos jogos (33).

Nesse sentido, existe uma perspectiva positiva em relação a essas novas didáticas em sala de aula que podem auxiliar o entendimento dos alunos acerca dessa disciplina tão importante e que enfrenta muitas dificuldades para sua compreensão. Para respaldar essa noção de melhora, no trabalho de Corrêa e Silva Júnior (34) é citado que a dinamização dos meios de ensino ajuda no aprendizado dos estudantes, além de proporcionar um envolvimento mais ativo. Esses tipos de metodologias, diferentes das aulas tradicionais, mais lúdicas, podem ser uma ferramenta importante para minimizar as problemáticas do ensino de Genética.

Face ao exposto, relacionando a importância dos jogos no aprendizado e a necessidade de reestruturar o ensino da disciplina de Genética, a fim de promover um maior entendimento dos alunos, o tópico a seguir trata de diversos modelos de jogos, já utilizados no Brasil, em salas de aula de várias escolas. Jogos os quais trouxeram resultados interessantes para a melhoria do ensino-aprendizagem.

EXEMPLOS DE JOGOS PARA O ENSINO DE GENÉTICA NO BRASIL

Ensinar assuntos alta complexidade configura-se como um grande desafio para o processo de efetiva assimilação do conhecimento e, neste contexto, os professores do ensino superior são então desafiados a tornar tais conteúdos mais prazerosos e de fácil compreensão (35). A necessidade de trabalhar conceitos de Genética e de disciplinas correlatas, como a Biologia Molecular e a Biotecnologia, tem favorecido o movimento crescente na busca de ferramentas que possam facilitar o entendimento desses conteúdos, e também favorecer o estabelecimento de conexões entre eles com outras disciplinas (36).

O uso de jogos na sala de aula não apenas favorece a ludicidade, mas também coloca o professor como o mediador do conhecimento ao auxiliar os alunos na assimilação dos conteúdos das aulas teóricas, muitas vezes maçantes e cansativas, de maneira mais efetiva. O ensino da Biologia, e nisso se inclui a Genética, ocorre, na maioria das vezes, de forma passiva e reduzida aos conteúdos de livros didáticos, favorecendo com esta estratégia a diminuição da retenção e evasão (36). Assim, tem-se percebido um aumento do uso dessa ferramenta a cada dia e, também, a diversificação da forma como os jogos são utilizados, pois há uma gama de possibilidades, como os jogos de tabuleiros (trilhas), baralhos/cartas, quizzes e jogos digitais.

Essa diversificação de meios favorece ao aluno e ao professor uma maior facilidade no uso dessa ferramenta, principalmente por recursos didáticos que sejam de baixo custo e de fácil acesso aos participantes, além de trazer uma ludicidade aos conteúdos considerados de menor compreensão. Percebemos que no período da pandemia, alguns autores também justificaram o uso dos jogos como um meio de socialização dos alunos, já distanciados pela circunstância da Covid-19 (37).

Na revisão de atividades aplicadas ou desenvolvidas no formato “jogos” percebemos que são, principalmente, direcionados aos alunos de Ensino Médio e Superior e que envolvem diferentes assuntos da Genética e Biologia Molecular, como por exemplo as leis e padrões mendelianos (38,39), os grupos sanguíneos (38), meiose (40), mutação e síndromes (37,41), além de temas mais específicos como a Biotecnologia e os transposons (42,43).

Quanto aos formatos utilizados, há uma preferência pelos jogos de tabuleiros (trilhas) (35,43–47) e os quizzes produzidos com perguntas e respostas no sentido de apresentação ou fixação dos conteúdos (37) que podem se apresentar no formato que simula os mesmos usados em programas de TV, como é o caso do trabalho de Vasconcelos et. al. (48) e Santos et. al. (49) nos quais os autores se baseiam nos quadros de TV conhecidos como “Passa e Repassa” e “Três Pistas”, respectivamente. Há também os jogos de entretenimento, como o “Monopoly” (50), os jogos RPG (*role-playing game*) “*Dungeons and troubles*” de De Souza, De Souza e Cordeiro (51) e até mesmo os jogos com um caráter investigativo (52,53), que simulam situações que aproximam a prática a um padrão comumente acessado pelos alunos e imprimem uma condição de aventura na execução da atividade.

Em geral, grande parte dos jogos didáticos é tangível, confeccionados com materiais de baixo custo visando um uso mais acessível, reproduzíveis em outras turmas, além de possibilitar a inclusão ou utilização para outros temas, como observado nos jogos “Muta-Ação” (35), “Na trilha dos genes” (44) e “Jogo das três pistas” (49). Entretanto, há profissionais que optam pelos jogos digitais (38, 54). Além disso, há uma verificação após o término das atividades para buscar as opiniões de alunos e/ou professores envolvidos e os autores consideram a partir dessa verificação que a ferramenta é bastante positiva, a exemplo, o jogo didático proposto por Da Silva e colaboradores (46), para o ensino da 1ª lei de Mendel. Após aplicar e avaliar os possíveis impactos do jogo, foi verificada melhora nas respostas corretas (aumento médio de 11%), além de promover melhor relação aluno-aluno, ferramenta que proporcionou melhor interação entre os sujeitos da sala de aula

CONCLUSÕES

A revisão dos trabalhos acerca da utilização de jogos, como ferramenta, no ensino da Genética trouxe resultados que indicam que essa estratégia tem contribuído não somente para a aprendizagem dos tópicos de Genética que são abstratos e encarados por

muitos alunos como complexos, mas ao mesmo tempo, promove o divertimento, a socialização e uma maior participação dos alunos em sala de aula. Nós, e os autores, consideramos que os jogos auxiliaram na ampliação e fixação dos conhecimentos, além de sua reconfiguração na estrutura mental dos alunos, o que pode auxiliar em um melhor entendimento do conteúdo de Genética, sejam eles básicos, como herança mendeliana e meiose, quanto mais específicos (mutação, transposons, PCR)

Percebemos, portanto, que os jogos aliam teoria e prática, aumentam a interação e melhoram a relação entre os alunos por se tratar de uma dinâmica de grupo. Além disso, preparam o aluno para relacionar e acessar tais conteúdos futuramente, cumprindo seus objetivos ao tornar o professor um mediador do conhecimento e não apenas um ‘repetidor’ de conteúdos trazidos nos livros didáticos. Por fim, os jogos propiciam aos alunos uma assimilação mais efetiva dos conteúdos, além de suscitar novas habilidades sociais e de compreensão e contribui para uma aprendizagem mais significativa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (Fapes) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Freire P. *Pedagogia do Oprimido*. 46. Ed Rio Janeiro Paz e Terra. 2005;
2. Brighente MF, Mesquida P. Paulo Freire: da denúncia da educação bancária ao anúncio de uma pedagogia libertadora. *Pro-Posições*. 2016;27:155–77.
3. SASSERON LH. Ensino por investigação: pressupostos e práticas. São Paulo, sd (Apostila Licenciatura em Ciências USP/Univesp Módulo 7 Capítulo 12 p 116-124) Disponível em https://midia.atp.usp.br/plc/plc0704/impressos/plc0704_12.pdf Acesso em. 2018;13.
4. da Conceição AR, Mota MDA, Barguil PM. Jogos didáticos no ensino e na aprendizagem de Ciências e Biologia: concepções e práticas docentes. *Res Soc Dev*. 2020;9(5):e165953290–e165953290.
5. Francisco GCB. *O ensino de Genética: uma abordagem a partir dos estudos sociais da ciência e da tecnologia (ESTC)*. Blumenau Univ Reg Blumenau. 2005;
6. da Silva Félix R, da Silva FB, Gléria ACFC. DIFERENTES OLHARES SOBRE FACILIDADES E DIFICULDADES NO PROCESSO DE ENSINO-APRENDIZAGEM DA BIOLOGIA.
7. Pinto LQ, Pais ACVB, Nóbile FHM, Gabriel GM, Sodero JPT. Descobrimos os Elementos: a elaboração de jogos didáticos como alternativa de ensino. *Brazilian J Dev*. 2021;7(1):2247–53.

8. Brasil. Base Nacional Comum Curricular (BNCC) [Internet]. [cited 2022 Aug 31]. Available from: <http://basenacionalcomum.mec.gov.br/>
9. Franco MLPB. Análise de conteúdo. Vol. 6. Autores Associados; 2020.
10. Pereira VW, Viana FL, Moraes J. Processamento da leitura: decodificação e compreensão. *Let Hoje*. 2019;54(2):108–11.
11. Pozo JI, Crespo MÁG. A aprendizagem e o ensino de ciências: do conhecimento cotidiano ao conhecimento científico. Porto Alegre: Artmed. 2009;5(5).
12. Romano AM, de Lima Souza HM, da Silva Nunes JR. CONTRIBUIÇÃO DO JOGO DIDÁTICO “CONHECENDO OS INVERTEBRADOS” PARA O ENSINO DE BIOLOGIA. *Rev Prática Docente*. 2020;5(1):325–43.
13. Prieto LM, Trevisan M do CB, Danezi MI, Falkembach GM. Uso das tecnologias digitais em atividades didáticas nas séries iniciais. *Renote*. 2005;3(1).
14. Savi R, Ulbricht VR. Jogos digitais educacionais: benefícios e desafios. *Renote*. 2008;6(1).
15. Busarello RI. Gamification: princípios e estratégias. Pimenta Cultural; 2016.
16. Kapp KM. The gamification of learning and instruction fieldbook: Ideas into practice. John Wiley & Sons; 2013.
17. Poffo M, Volani EA. Gamificação para motivar o aprendizado. CIET EnPED. 2018;
18. Silva JB da, Sales GL, Castro JB de. Gamificação como estratégia de aprendizagem ativa no ensino de Física. *Rev Bras Ensino Física*. 2019;41.
19. do Canto CG dos S, Nunes POC, da Silva Rodrigues AC. O lúdico como ferramenta de aprendizagem de leitura e escrita. *Rev eletrônica pesquiseduc*. 2021;13(29):284–99.
20. Rau M. A ludicidade na educação: uma atitude pedagógica. Curitiba: ibpex. 2011;20.
21. Colombo DA. Jogos didáticos como instrumentos de ensino. *Rev Insignare Sci*. 2019;2(3):78–83.
22. Tsutsumi MMA, Goulart PRK, Júnior MDS, Haydu VB, de Oliveira Jimenez ÉL. Avaliação de jogos educativos no ensino de conteúdos acadêmicos: Uma revisão sistemática da literatura. *Rev Port Educ*. 2020;33(1):38–55.
23. Gadêlha GTS, Dantas KAM, de Freitas Rodrigues WCM, Freire ÉJSM, Leite LSGP, Surdi AC. Jogos eletrônicos e suas possibilidades na educação física

- escolar/Uma revisão sistemática/Electronic games and their possibilities in school physical education-A systematic review. *Brazilian J Dev.* 2020;6(6):32950–61.
24. Castro TC, Gonçalves LS. Uso de gamificação para o ensino de informática em enfermagem. *Rev Bras Enferm.* 2018;71:1038–45.
 25. da Costa Barreto CH, Becker ELS, Ghislani TS. Gamificação: uma prática da educação 3.0. *Res Soc Dev.* 2019;8(4):2.
 26. La Luna A. Importância do ensino e aprendizagem de genética para o mundo atual. *Rev Educ.* 2014;17(23).
 27. Pereira AJ, Patricio GS, Alves FGS, Gonçalves JJS, Matoso JR. Modelos didáticos de DNA, RNA, ribossomos e processos moleculares para o ensino de genética do ensino médio. *Rev da SBEnBio, Niterói.* 2014;7:564–71.
 28. Thomas J. Learning about genes and evolution through formal and informal education. 2000;
 29. da Silva CC, Cabral HMM, de Castro PM. Investigando os obstáculos da aprendizagem de genética básica em alunos do ensino médio. *ETD-Educação Temática Digit.* 2019;21(3):718–37.
 30. Dante LR. *Formulação e Resolução de Problemas de Matemática - Teoria e Prática* - Saraiva. 1ª. São Paulo; 2009. 192 p.
 31. Freire P. *Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa.* Editora Paz e terra; 2014.
 32. Siqueira MLG, Altino Filho HV, Dutra ÉDR. ENSINO DA GENÉTICA: UMA PROPOSTA DE ABORDAGEM AO ENSINO MÉDIO. *An do Semin Científico do UNIFACIG.* 2021;(6).
 33. Campos LML, BORTOLOTO TM, FELÍCIO AKC. A produção de jogos didáticos para o ensino de ciências e biologia: uma proposta para favorecer a aprendizagem. *Cad dos núcleos Ensino.* 2003;47:47–60.
 34. Corrêa D, Silva Junior EF. *Ciência vai à escola: o Lúdico na Educação em Ciências.* Univ Fed do Paraná–Museu Ciências Nat. 2010;
 35. Gonçalves TMGTM, Karasawa MMG. “MUTA-AÇÃO: A PROPOSTA DE UM JOGO LÚDICO SOBRE MUTAÇÕES E SÍNDROMES GENÉTICAS NAS DISCIPLINAS DE BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA CLÁSSICA. *Arq do Mudi.* 2021;25(1):44–65.
 36. Campos R, Menezes M da CV de A, Araújo M. Ensinar Genética e Evolução por meio de jogos didáticos: superando concepções alternativas de professores de ciências em formação. *Genética na Esc.* 2018;13(1):24–37.

37. Reis AP, Castro AM, Alves LT, Barbosa BLO, Tristão LF, de Oliveira Melo J. Diversificação do ensino em Genética e Citologia visando melhor aprendizado e diminuição da retenção e evasão. *Brazilian J Dev.* 2021;7(3):25696–709.
38. Marin GRB, Júnior AJV. Contribuições da construção de jogos digitais para o ensino de Genética. *Educitec-Revista Estud e Pesqui sobre Ensino Tecnológico.* 2020;6:e120520–e120520.
39. Santos FM, Dias RS, de Oliveira MD, Costa ICTA, de Souza Fernandes L, Pessoa CR, et al. Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(5):e0007375.
40. Trindade MG, Rezende M, Batitucci M. GAMETUM: UMA PROPOSTA DE ENSINO PARA O APRENDIZADO DA DIVISÃO CELULAR. *An da Sem Biol da UFES Vitória.* 2022;3:11.
41. Degrandi TM, Lick Cordeiro A, De A, Soares A, Cardoso DC, Hass I. “Baralho mutante” para o ensino das alterações cromossômicas numéricas Aneuploidias. *Genética na Esc |.* 2018;13.
42. Meloni JS, Spiegel C, Gomes SAO. Biotecnologia em jogo: estratégia lúdica para o ensino médio. *Genética na Esc.* 2018;13(2):154–83.
43. Gonçalves TM, Karasawa MMG. Na trilha dos Transposons: a proposta de uma atividade lúdica de baixo custo para facilitar a aprendizagem na Genética. *Res Soc Dev.* 2022;11(2):e26811225714–e26811225714.
44. Lovato FL, de Christo TM, Pagliarini DS, da Rosa Costa F, Bartholomei-Santos ML. Na trilha dos genes: uma proposta de jogo didático para o ensino de Genética. *Rev Ensino Bioquímica.* 2018;16(2):5–30.
45. Costa ÁM, da Silva JS, de Mello PAKX, de Nonohay JS. O “Jogo dos Códon”: uma ferramenta para o ensino de Genética. In: 5º Seminário de Educação Profissional e Tecnológica (SEMEPT). 2019.
46. da Silva Teles V, de Souza JS, Dias ES. O lúdico no ensino de genética: proposição e aplicação de jogo didático como estratégia para o ensino da 1ª lei de Mendel. *Rev Insignare Sci.* 2020;3(2):311–33.
47. Maria K, Fontenele S. PCR EM CARTÕES: UMA FERRAMENTA PARA O ENSINO DE BIOTECNOLOGIA.
48. Vasconcelos JF, Brobowski VL, Carlan FA, Lemke CS, Lopes LS. Genética: sabe, passa ou repassa? Jogo Didático sobre a herança da cor da pele. *Rev Insignare Sci.* 2020;3(5):413–23.
49. Santos FS dos, Ferraz DF, Klein AI, Francisco AC de. Jogo das três pistas: uma proposta lúdica para a avaliação dos subsunçores de genética. *Rev Espac.*

2019;39(15):3.

50. Santos JAC, de Lima JR, da Silva APB, de França Melo RK, da Silva VA, da Silva JM, et al. Molécula Imobiliária para o ensino de Genética. Res Soc Dev. 2021;10(4):e10310413890–e10310413890.
51. de Souza RF, de Souza EB, Cordeiro RS. “Dungeons and troubles”: uma proposta de RPG educativo sobre genética para o Ensino Médio. Brazilian J Dev. 2020;6(6):38746–67.
52. da Rocha JAP, Soares LC, Nery JV, Angelo EA. Jogo geneticsy e a identificação genética de pessoas: eu também posso ser um CSI! Rev Eletrônica Ludus Sci. 2021;5.
53. Jogo CSI: simulando a análise de um crime - Ponto Biologia [Internet]. [cited 2022 Aug 31]. Available from: <https://pontobiologia.com.br/jogo-csi-analise-crime/>
54. Do Canto, MGC, Pigatto, AGS. Design de um jogo didático para o ensino de conceitos de genética humana. Educ. Saúde e Tecnol. XXV SEPE. 2021;1(1): 1-20.

DOI: 10.53934/9786585062046-7

Capítulo 7

POLIMORFISMO *rs17151919* DO GENE *LEP*: IDENTIFICAÇÃO POR MEIO DA PCR COM INICIADORES ALELO ESPECÍFICOS

Roberta Luísa Barbosa Leal *; Ana Beatriz Martins Topciu Fonseca ;
Marcos Vinícius Guimarães Soares ; Gabriela Eduardo França de Araujo ;
Kênia Balbi El-Jaick 

*Autor correspondente (Corresponding author) – Email: robertalbleal@gmail.com

Resumo: A nutrigenética estuda os efeitos das variações genéticas na resposta à ingestão de alimentos, demonstrando que os nutrientes possuem efeitos diferenciados em cada indivíduo, em consequência do nosso perfil genético único. A identificação de variantes frequentes na população se torna uma estratégia interessante para uma abordagem de precisão a respeito da expressão gênica em resposta aos alimentos. O gene *LEP* atua em um dos sistemas neuroendócrinos mais importantes, responsáveis pelo controle do apetite, e a variante *rs17151919* vem sendo associada ao fenótipo de obesidade em diversos estudos. Todavia, a falta de técnicas de custo mais baixo, alternativas ao PCR em tempo real e ao sequenciamento de DNA, para a realização dos estudos de correlação genótipo-fenótipo, ainda representa um obstáculo relevante para o desenvolvimento destas pesquisas em muitos países, incluindo o Brasil. Por este motivo, este estudo teve como objetivo desenvolver um teste de genotipagem por meio da amplificação da sequência alvo, por PCR convencional, com a utilização de iniciadores alelo-específicos para a identificação da variante *rs17151919*. Os resultados obtidos por meio do teste elaborado foram comparados com os obtidos por meio do sequenciamento Sanger, em amostras de DNA com genótipos conhecidos, previamente identificados por meio desta técnica. O teste de genotipagem elaborado apresentou alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de identificar com sucesso os genótipos homozigotos e heterozigotos, em todas as amostras de DNA analisadas e, portanto, sugere contribuir de forma expressiva para o avanço das pesquisas que visam o controle e a prevenção da obesidade na população brasileira.

Palavras-chave: obesidade; leptina; nutrição personalizada

INTRODUÇÃO

O gene *LEP* atua em um dos sistemas neuroendócrinos mais importantes responsáveis pelo controle do apetite, ingestão de alimentos e utilização de energia: a via leptina-melanocortina, localizada no hipotálamo (1). *LEP* está localizado no cromossomo 7 (lôcus 7q32.1), é composto por 3 éxons e codifica uma proteína com o mesmo nome,

LEP, que possui uma sequência de 167 aminoácidos. A leptina é um hormônio que medeia a regulação a longo prazo do balanço energético, suprimindo a ingestão de alimentos e estimulando a perda de peso. Mais recentemente, papéis fisiológicos importantes, além do controle do apetite e do gasto energético, foram sugeridos para a leptina, incluindo funções neuroendócrinas, reparadoras, reprodutivas e imunológicas (2). Vários efeitos sistêmicos são atribuídos à leptina, como o controle da massa corporal, o metabolismo de lipídios e glicose, termogênese, angiogênese e o controle dos sistemas hematopoiético, imune, reprodutor e cardiovascular (3; 4).

A deficiência da atividade da leptina ou do seu receptor tem sido descrita como causa monogênica para obesidade grave (5). Strobel e colaboradores (6) encontraram uma mutação com troca de sentido em homozigose (rs104894023; c.313C>T; p.Arg105Trp) em três indivíduos de uma família turca. Todos apresentavam quadro de obesidade mórbida, concentrações muito baixas de leptina sérica, hiperfagia e concentrações elevadas de insulina. Os demais familiares eram heterozigotos ou homozigotos selvagens e apresentavam os níveis de leptina e insulina normais, o que levaram os autores a determinarem que o fenótipo de obesidade expresso por esta mutação apresenta um modelo de herança recessiva. Um estudo de variantes do gene *LEP*, realizado com 210 indivíduos brasileiros, demonstrou que mulheres com a variante rs7799039 em homozigose (GG) possuem oito vezes mais risco de desenvolver a obesidade do que as não-portadoras, sugerindo que variantes nesse gene sejam um potencial preditor de obesidade (7).

A obesidade e a saúde metabólica prejudicada são fatores de risco já estabelecidos para as doenças não transmissíveis como diabetes tipo 2, doença cardiovascular, doenças neurodegenerativas, câncer entre outras (8).

A prevenção é uma estratégia promissora para lidar com esta doença, e pode ser alcançada através de uma melhor compreensão e controle dos fatores que levam à sua manifestação. Assim, a justificativa deste estudo consiste em padronizar um teste, com a utilização de iniciadores alelo específicos, para a identificação da variante rs17151919 do gene *LEP*, reconhecidamente associado à obesidade, que represente uma alternativa de menor custo de execução, e, desta forma, possa contribuir para o avanço das pesquisas na população brasileira, que visam o tratamento e a prevenção da obesidade (e comorbidades), com o auxílio de dietas personalizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

A sequência alvo do gene foi obtida dos bancos de dados de genes (ENSEMBL e NCBI), visando o desenho dos iniciadores para a amplificação específica dos alelos mutante e selvagem da variante *LEP*:rs17151919, considerando os critérios descritos por Vieceli e Siviero (9). Dois pares de iniciadores alelo-específicos (ASO) foram desenhados para a identificação da variante rs17151919 (um par de iniciadores específico para amplificação do alelo mutante e outro específico para amplificação do alelo selvagem).

Para a elaboração do teste de genotipagem, com a temperatura de hibridização mais adequada para a identificação da variante, foram realizadas reações de PCR com gradientes de temperatura a partir de 57°C até 72°C para os respectivos pares de iniciadores, em amostras de dois indivíduos de genótipo previamente conhecido, um

homozigoto selvagem e um heterozigoto. A partir dos resultados obtidos, foi selecionada a temperatura de hibridização dos iniciadores que demonstrou ser específica para identificação dos respectivos alelos mutante e selvagem.

A PCR-ASO com gradiente de temperatura foi realizada a partir de 2 µL de amostra de DNA genômico (20-60ng) 10 µL de master mix (GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix, Promega®), 1 µL de cada primer (20pmol) e 6 µL de H₂O ultrapura, para o volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada no Termociclador T100™ - Bio-Rad® nas seguintes condições: desnaturação 95°C por 3 minutos e 31 ciclos de amplificação (95°C por 1 minuto, 57°C a 67°C por 1 minuto e 15 segundos, 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Nos casos em que uma temperatura mais alta que 67°C se mostrasse necessária para confirmar a amplificação específica do alelo em questão, outra PCR com gradiente de temperatura de 65 a 72°C foi realizada.

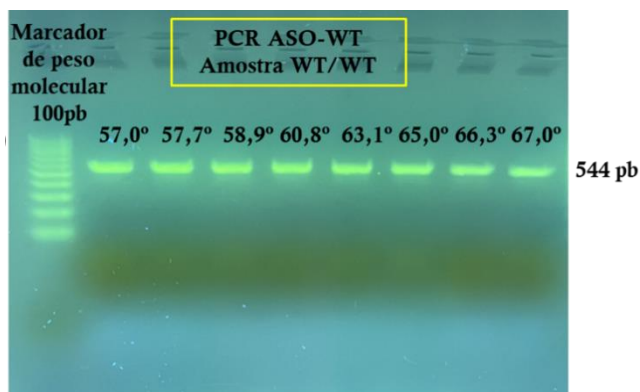
Após o término de cada etapa de amplificação, o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2,5%, com intercalante de DNA UniSafe Dye (20,000x; Uniscience). Um marcador de peso molecular de 100pb (Cellco) foi utilizado para a devida verificação do número de pares de bases de cada sequência alvo amplificada. As imagens foram obtidas com a utilização de um transiluminador UV.

Por fim, considerando a importância de evitar a ocorrência de resultados falso-negativos, quando houvesse ausência da amplificação alelo específica devido à falha na reação de PCR, um outro iniciador foi incluído na reação, resultando na amplificação também de uma segunda sequência alvo do gene, com um número maior de pares de bases, representando desta forma um controle positivo da reação de PCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do primeiro teste realizado por meio da PCR com gradiente de temperatura, com as temperaturas de hibridização a partir de 57°C até 67°C, demonstraram que os iniciadores desenhados para a amplificação específica do alelo selvagem (ASO-WT) da variante *LEP*:rs17151919 apresentou resultados satisfatórios, ou seja, amplificação da sequência alvo de 544pb em todas as temperaturas testadas, em uma amostra conhecida com genótipo homozigoto selvagem, confirmada previamente por sequenciamento do DNA (Figura 1).

Figura 1 – Resultado da PCR com gradiente de temperatura, ilustrando a amplificação da sequência alvo do gene *LEP* com o par de iniciadores alelo-específicos desenhados para a identificação do alelo selvagem de *LEP*:rs17151919 (ASO-WT)



Nota: Os resultados das PCRs ilustrados na figura revelam a especificidade do iniciador, que amplificou a sequência alvo esperada, de 544pb (para identificação do alelo selvagem da variante não sinônima rs17151919 do gene *LEP*), nas temperaturas de hibridização desde 57°C até 67°C.

Após a confirmação da amplificação satisfatória e específica da sequência alvo com o par de iniciadores desenhados para identificação do alelo selvagem, um segundo teste foi realizado para a verificação da temperatura de hibridização mínima para que a amplificação fosse realmente específica para o alelo de interesse, e a temperatura de hibridização máxima na qual a amplificação do alelo de interesse ainda fosse viável.

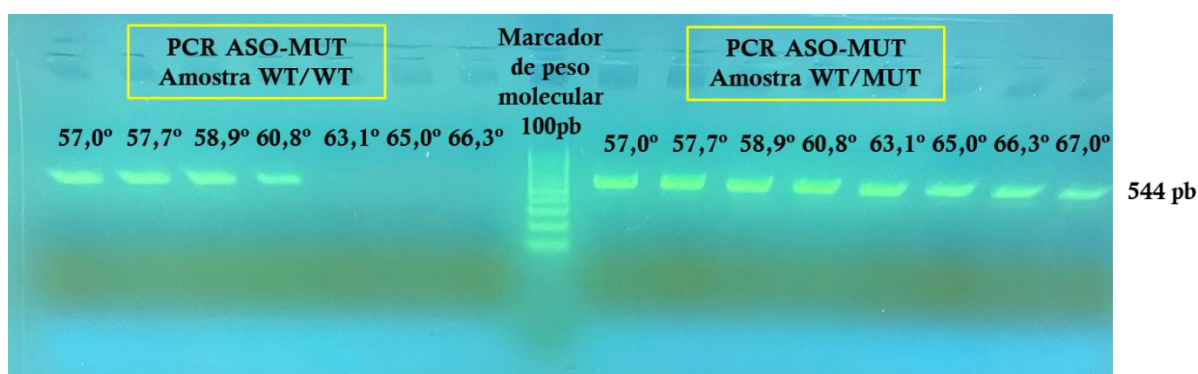
Assim, uma PCR com gradiente de temperaturas de hibridização mais altas (de 65,5°C a 72,0°C) foi feita, utilizando o iniciador ASO-WT para amplificação do alelo selvagem de *LEP*:rs17151919 em uma amostra heterozigota, observando-se os resultados positivos esperados até a temperatura de hibridização de 68,0°C. Da mesma forma, outra PCR com gradiente de temperaturas mais altas (de 65,5°C a 72,0°C) foi feita, utilizando o par de iniciadores específico para amplificação do alelo mutante (ASO-MUT) em uma amostra homozigota selvagem. Considerando a ausência do alelo mutante na amostra homozigota selvagem, e a amplificação específica do alelo mutante pelo iniciador ASO-MUT, era esperado que não ocorresse a amplificação da sequência alvo na amostra testada. Os resultados do teste revelaram satisfatoriamente a ausência de amplificação inespecífica do alelo selvagem com a utilização do iniciador ASO-MUT, confirmando os resultados negativos que eram esperados.

Em resumo, os resultados obtidos a partir das duas PCRs com gradiente de temperatura mostraram que: a) a PCR com o par de iniciadores ASO-MUT desenhados, revelou resultados satisfatoriamente específicos para a amplificação do alelo mutante com a temperatura de hibridização a partir de 65,5°C; b) a PCR com iniciadores ASO-WT, revelou resultados satisfatórios para a amplificação do alelo selvagem com temperaturas de hibridização até 68°C para *LEP*:rs17151919.

Assim, na etapa seguinte, buscou-se determinar a temperatura de hibridização mínima para que a amplificação do alelo variante (com iniciador ASO-MUT) fosse realmente específica para este alelo, ou seja, quando uma amostra que não possui o alelo variante apresente resultados claramente negativos (refletindo a especificidade do teste), e uma amostra que apresente o alelo variante apresente resultados claramente positivos (refletindo a sensibilidade do teste).

Com esta finalidade, uma PCR com gradiente de temperatura foi realizada utilizando o iniciador ASO-MUT para amplificação dos alelos mutantes de *LEP*:rs17151919 em uma amostra heterozigota, observando-se os resultados positivos esperados em todas as temperaturas de hibridização testadas, desde 57,0°C até 67°C. Além desta, outra PCR com gradiente de temperatura foi também realizada utilizando o iniciador ASO-MUT visando a amplificação do alelo mutante de *LEP*:rs17151919 em uma amostra homozigota selvagem (que não possui alelos mutantes). A PCR teste revelou resultados inespecíficos (amplificação de alelos selvagens) até a temperatura de hibridização 60,8°C, e resultados satisfatórios para a amplificação específica do alelo mutante a partir de 63,1°C, quando a PCR realizada com a amostra homozigota selvagem, que não contém alelos mutantes, não revelou mais qualquer amplificação (Figura 2).

Figura 2 – Resultado da PCR com gradiente de temperatura, ilustrando a amplificação das sequências alvo do gene *LEP* com os iniciadores alelo-específicos desenhados para identificação do alelo mutante de *LEP*:rs17151919 em uma amostra homozigota selvagem (que não possui alelos mutantes), em uma amostra heterozigota.



Fonte: O autor (2022).

Nota: A ilustração revela a amplificação inespecífica do alelo selvagem de *LEP*:rs17151919 com a utilização do iniciador específico para o alelo mutante até a temperatura de hibridização de 60,8°C; e a **amplificação específica** do alelo mutante de *LEP*:rs17151919 com a utilização do iniciador ASO-MUT a partir da temperatura de hibridização de 63,1°C. A ilustração revela ainda os resultados positivos que eram esperados para a amplificação do alelo mutante de *LEP*:rs17151919 com a utilização do iniciador específico para este alelo, em uma amostra heterozigota, em todas as temperaturas de hibridização testadas, de 57,0°C até 67,0°C.

A partir deste terceiro teste foi possível verificar a alta especificidade do par de iniciadores específicos para identificação do alelo mutante de *LEP*:17151919 a partir da temperatura de hibridização de 63,1°C.

Entretanto, apesar dos resultados promissores referentes à especificidade do teste de genotipagem, a ocorrência de resultados falso-negativos devido a uma possível falha na reação de PCR, representava ainda um problema que poderia resultar em diminuição da sensibilidade do teste. Por isso, um outro iniciador foi incluído na reação, resultando na amplificação de uma segunda sequência alvo do gene, com um número maior de pares de bases, a fim de representar um controle positivo da reação de PCR. Assim, um novo teste foi realizado em amostras homozigotas selvagens e heterozigotas para testar a amplificação de uma ou das duas sequências alvo: a sequência indicadora da presença do alelo mutante de *LEP*:17151919 (que poderia ser positiva ou negativa), e uma sequência de 855pb que representaria o controle positivo da reação de PCR (que deveria ser sempre positiva, em todas as amostras, confirmando que a reação de PCR funcionou).

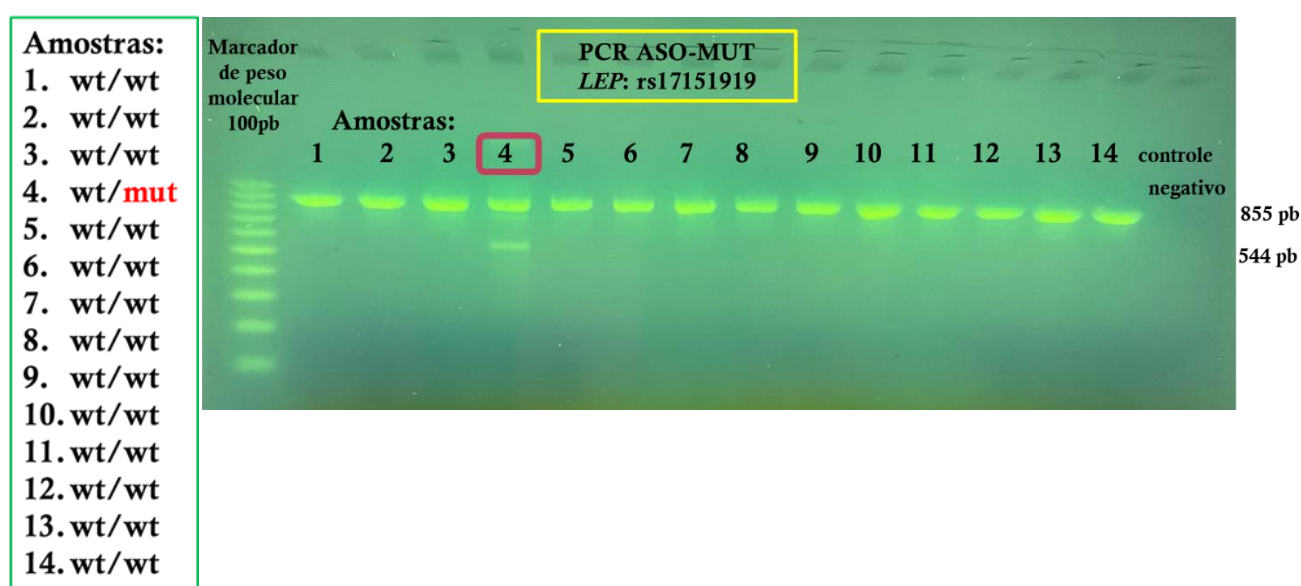
A amplificação dos fragmentos de interesse por meio da técnica de PCR-ASO foi alcançada, mostrando resultados satisfatórios para a identificação de ambos os alelos, mutante e selvagem, da variante *LEP*:rs17151919 (c.280G>A; p.V94M).

Após a etapa de padronização, o teste elaborado foi realizado em 70 amostras de DNA, com genótipos previamente conhecidos, obtidos por meio do sequenciamento Sanger (dados de outros estudos, realizados anteriormente). A análise da sensibilidade e

especificidade do teste de genotipagem foi realizada por Razão de Verossimilhança, a partir da comparação entre os resultados obtidos por meio da PCR-ASO e os dados obtidos por meio do sequenciamento do DNA.

As análises revelaram que os mesmos resultados obtidos por meio do sequenciamento do DNA foram obtidos por meio da PCR ASO-MUT, em todas as amostras testadas, confirmando a alta sensibilidade e especificidade do teste, como o visualizado na Figura 3.

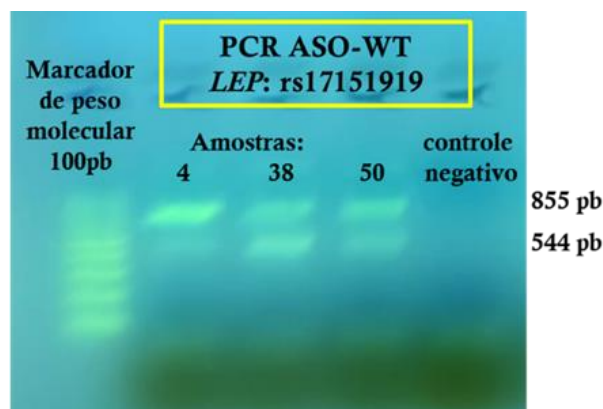
Figura 31 – Resultado do teste de genotipagem elaborado por meio da PCR com um par de iniciadores específico para amplificação do alelo mutante de *LEP*:17151919, identificando corretamente e de forma clara amostras que apresentam ao menos um alelo mutante (gel de agarose a 2,5%)



Concluída a confirmação dos resultados da amplificação dos fragmentos de interesse por meio da técnica de PCR-ASO, mostrando resultados sensíveis e específicos para a identificação do alelo mutante da variante *LEP*:rs17151919 (c.280G>A; p.V94M), o teste da PCR ASO-WT (com iniciadores específicos para os alelos de referência) foi realizado nas amostras com resultados positivos para o alelo mutante, a fim de identificar se os genótipos eram heterozigotos ou homozigotos para o alelo mutante.

Os resultados da amplificação por meio da PCR ASO-WT, para identificação do alelo selvagem de *LEP*:17151919, foram visualizados em gel de agarose 2,5%, em transiluminador UV, e interpretados por pelo menos dois pesquisadores, revelando, da mesma forma que a PCR ASO-MUT, concordância em 100% dos casos com os resultados obtidos por meio do sequenciamento do DNA, confirmando a alta sensibilidade e especificidade do teste (Figura 4), e revelando que todas as amostras positivas para o alelo mutante de *LEP*:rs17151919, eram também positivas para o alelo selvagem, concordando com os resultados do sequenciamento de DNA previamente realizados, que mostraram que todas as amostras testadas possuem genótipo heterozigoto.

Figura 4 - Resultado do teste de genotipagem elaborado por meio da PCR com iniciadores alelo específicos para o alelo selvagem de *LEP*:17151919, identificando corretamente que as amostras com resultados positivos para o alelo mutante, também apresentavam um alelo selvagem (gel de agarose a 2,5%)



CONCLUSÕES

Esses resultados demonstram que o teste genético elaborado a partir do desenho de iniciadores alelo específicos para a identificação da variante rs17151919 do gene *LEP* é capaz de identificar os genótipos dos indivíduos com precisão, de maneira rápida e com custo mais baixo, quando comparados ao diagnóstico molecular realizado por meio da PCR em tempo real e do sequenciamento do DNA, os quais necessitam de kits comerciais e equipamentos de custo mais alto para sua execução, além de recursos humanos especializados.

A possibilidade de diagnóstico precoce da pré-disposição a doenças tão frequentes na população, como a obesidade e a diabetes do tipo 2, é certamente uma importante contribuição para o desenvolvimento de estratégias de prevenção. Neste contexto, é importante ressaltar os benefícios do incentivo ao uso de técnicas de biologia molecular convencionais, como a PCR, principalmente pela robustez e praticidade desta técnica, que pode ser executada na grande maioria dos laboratórios que realizam experimentos de biologia molecular em todo o mundo. Por esse motivo, sugerimos neste estudo o incentivo à utilização de ensaios multiplex iniciadores alelo específicos, os quais podem ser desenvolvidos e adaptados para serem testes mais acessíveis e rápidos, e serem realizados em laboratórios com termocicladores convencionais e menos recursos, permitindo o diagnóstico rápido e específico de possíveis fatores de risco genéticos para a obesidade, e contribuindo para o avanço dos estudos em nutrigenética e de intervenções dietéticas personalizadas, auxiliando na prevenção de doenças e na promoção da saúde.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq). Agradecemos o suporte da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) e do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular (PPGBMC/UNIRIO), e o auxílio das agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

REFERÊNCIAS

1. Larder, R., Lim, C. T., & Coll, A. P. (2014). Genetic aspects of human obesity. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 124, pp. 93–106). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59602-4.00006-X>
2. Friedman, J. M. (2019). Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nature Metabolism*, 1(8), 754-764.
3. Korner, Woods Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770.
4. Adami, G. F., Campostano, A., Marinari, G. M., Ravera, G., & Scopinaro, N. (2002). Night eating in obesity: a descriptive study. *Nutrition*, 18(7-8), 587-589.
5. Guzzardi, M. A., Guiducci, L., Campani, D., La Rosa, F., Cacciato Insilla, A., Bartoli, A., ... & Iozzo, P. (2022). Leptin resistance before and after obesity: Evidence that tissue glucose uptake underlies adipocyte enlargement and liver steatosis/steatohepatitis in Zucker rats from early-life stages. *International Journal of Obesity*, 46(1), 50-58.
6. Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., & Strosberg, A. D. (1998). A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature genetics*, 18(3), 213-215.
7. Hinuy, H. M., Hirata, M. H., Sampaio, M. F., Armaganijan, D., Arazi, S. S., Salazar, L. A., & Hirata, R. D. (2010). Relationship between variants of the leptin gene and obesity and metabolic biomarkers in Brazilian individuals. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 54, 282-288.
8. Petrelli, F., Cortellini, A., Indini, A., Tomasello, G., Ghidini, M., Nigro, O., ... & Zaniboni, A. (2020). Obesity paradox in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis of 6,320,365 patients. *MedRxiv*.
9. Vieceli, F. M., & Siviero, F. (2013). Rotinas de biologia molecular. *Biologia celular e molecular*.

DOI: 10.53934/9786585062046-8

Capítulo 8

UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA CRISPR NA TERAPIA DE DOENÇAS AUTOIMUNES: REVISÃO DE LITERATURA

Willyane Candida Soares de Lima *; Aline Gonçalves de Lima ; João Henrique Domingos dos Santos ; Maria Aparecida Soares Faustino ; Maria Clara da Silva ; Priscila Ramos da Silva ; Fabiana América Silva Dantas de Souza 

*Autor correspondente (Corresponding author) – Email:
Faabiana.amaricasouza@gmail.com

Resumo: As doenças autoimunes formam grupo de desordens que surgem em diversas regiões do corpo, provocando desordem no sistema imunológico e prejuízos nos mecanismos de autotolerância. O CRISPR, tem sido amplamente conhecido como editor de genoma, e é originalmente um sistema imunológico adaptativo de bactérias e archaea, podendo ser aplicado em células eucarióticas para diversos fins, incluindo terapias para doenças raras, genéticas e imunológicas. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi mostrar através de uma revisão de literatura, os avanços da edição gênica com o sistema CRISPR para direcionar terapias às doenças autoimunes. No processo de edição genética com sistema CRISPR, um RNA guia é construído de acordo com os genes de interesse de um determinado DNA. O RNA conduz uma nucleasse, que pode ser a proteína Cas9, até a área que se deseja cortar, dividindo a fita dupla em duas partes, e assim iniciando o processo de reparo, e consequentemente as mudanças desejadas no DNA. Apesar das ressalvas técnicas e éticas ainda encontradas na utilização do CRISPR, em comparação com outras metodologias de edição genética, há vantagens substanciais em prol de sua utilização, tais como, sua viabilidade, facilidade de uso, confiabilidade e precisão, evidências que pressupõem um futuro importante no papel exercido pelo sistema CRISPR no combate à diversas enfermidades autoimunes.

Palavras-chave: CRISPR; doenças autoimunes; terapia gênica

INTRODUÇÃO

As doenças autoimunes constituem grupo de desordens que surgem de um desequilíbrio no sistema imunológico e uma quebra dos mecanismos de autotolerância, que desencadeiam uma cascata de reações imunes contra os próprios tecidos do corpo. Atualmente, os tratamentos para doenças autoimunes incluem imunossuppressores, modificadores da doença através de medicamentos antirreumáticos ou geneticamente modificados para terapia. No entanto, esses medicamentos estão associados a riscos de eventos adversos graves. A possibilidade de aplicação terapêutica do CRISPR-Cas9 vem surgindo com base em vários estudos que vão desde a edição de genes em embrião com

variante genética da linhagem germinativa até entrega *in vivo* em modelos animais de doenças genéticas específicas usando vetores virais ou lipídicos (1).

O CRISPR-Cas9, tem sido amplamente conhecido tecnologicamente como editor de genoma, e é originalmente um sistema imunológico adaptativo de bactérias e archaea e pode ser aplicado em células eucarióticas com RNA guia único (sgRNA) que contém sequência de bases de um gene de interesse ao criar um sgRNA sintético de uma sequência complementar a um gene específico, Cas9, uma nucleasse de DNA guiada por RNA, pode nocautear um gene alvo. O nocaute do gene ocorre durante o reparo através da junção de extremidades não homólogas, respondendo à quebra da fita dupla. Além disso, o nocaute pode ser realizado via recombinação direta homóloga (RDH) se o DNA molde adequado estiver presente (2, 3).

Novas aplicações de nuclease tem o potencial de expandir muito nossa capacidade de manipular ácidos nucleicos, expressão, estrutura e função de proteínas. Tecnologias emergentes, como a edição de bases, ativação ou supressão via fatores de transcrição direcionados ou modificadores epigenéticos a Cas9 e edição de RNA, são novas tecnologias que podem expandir muito nossa capacidade de controlar patologias. Os vetores virais e não virais podem ser empregados para entregar efetores da edição do genoma à célula ou tecido de interesse, incluindo células T, células-tronco hematopoiéticas células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) e células parênquimais (4).

A terapia gênica tem sido muito promissora para tratar e prevenir doenças autoimunes. Através de muitos estudos, cientistas puderam inibir deficiências, ou até mesmo a expressão de determinados genes no tecido ou em células-alvo. Essas doenças maltratam muito as pessoas afetadas, pois atacam órgãos ou outras partes do corpo que acabam debilitando os portadores por uma falha dos mecanismos do sistema imunológico em que o próprio organismo ataca ele mesmo. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo mostrar os avanços encontrados através da edição gênica utilizando o sistema CRISPR para direcionar terapias à doenças autoimunes.

TÓPICOS

O SISTEMA CRISPR E AS DOENÇAS AUTOIMUNES

O sistema CRISPR consiste em Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas Regularmente Inter-espaçadas, geralmente com uma nuclease associada como a Cas9. O CRISPR/Cas9 e outras endonucleases estão presentes em várias aplicações envolvendo terapia gênica na modificação de genes causadores de doenças autoimunes, na triagem genômica funcional em relação a descoberta de genes ativos ou silenciados, bem como na modulação transcricional e na biologia sintética microbianas (5, 6, 4).

Nas doenças autoimunes, o organismo humano considera determinada região do corpo um agente estranho e ataca ele mesmo através do sistema imunológico, por uma falha genética do indivíduo. E para corrigir essa falha, através do sistema CRISPR juntamente com a enzima Cas9, um RNA guia junto com a enzima, são colocados dentro da célula de interesse para mudar o DNA de acordo com a característica que se quer ter como resultado após a retirada da parte defeituosa e o reparo dos nucleotídeos após a quebra da fita dupla

de DNA. A alteração do DNA alvo utilizando o RNA guia com a enzima Cas9, só é possível através de vetores virais e ou nanopartículas, que irão carregar as informações necessárias para a alteração do gene de interesse (1).

Em alguns estudos, foram identificadas citocinas pertencentes à família IL-36 que podem provocar o desenvolvimento de doenças autoimunes como o LES (Lúpus Eritematoso Sistêmico), a artrite reumatoide (AR), doença inflamatória intestinal (DII), a síndrome de Sjögren e a psoríase vulgaris (3). A proteína MYD88 que é codificada pelo gene de mesmo nome, é conhecida por ser ativada por estimulação de IL-36. A partir da inativação da proteína MYD88, por CRIPR-Cas9, houve uma diminuição na atividade dos genes e consequentemente a expressão das citocinas IL-1B e IL-36G (7). Estudos realizados a partir de uma nuclease efetora de ativação, demonstraram a correção de variantes patogênicas de TNFAIP3, fator de necrose tumoral alfa, associado a doenças autoimunes, que podem reverter as expressões relacionadas a doença autoimune (8).

CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC) E CRISPR

Diversos meios de tratamento têm sido estudados com o CRISPR-Cas9, na autoimunidade. Células Tronco Pluripotentes Induzidas (iPSCs) foram produzidas pela adição de antagonista do receptor de interleucina-1 (IL1Ra) ou gene receptor de TNF solúvel usando a edição do gene CRISPR-Cas9 e diferenciadas em cartilagem articular. Foi possível perceber que a resposta inflamatória foi atenuada ao iniciar o feedback negativo dinâmico após a estimulação com citocinas inflamatórias. Os estudos relataram que a cartilagem articular é resistente à degradação tecidual mediada por IL-1alfa pela deleção do receptor de interleucina-1 1 (IL1r1) em iPSCs de camundongos murinos (9).

A edição de genes em Células-tronco Mesenquimais (MSCs) foi usada com CRISPR-Cas9 para orientar a ativação endógena de fatores de transcrição pancreáticos e receptores de quimiocinas MSC. As MSCs foram diferenciadas em células produtoras de insulina substitutas e podem ser transplantadas por meio de expansão e transplante *ex vivo*, mantendo suas propriedades imunomoduladoras (10). Outros estudos ativaram com sucesso a transcrição de insulina humana endógena usando sgRNAs direcionados a múltiplos promotores de insulina e um gene de proteína 160 Cas9-virion deficiente em nuclease (dCas9-VP160) em células T de rim embrionário humano 293 T (HEK293T), Células Hela e fibroblastos humanos (8).

CRISPR E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII)

A Doença Inflamatória Intestinal é uma doença crônica idiopática, ou seja, é de etiologia desconhecida sem causa concreta definida, que justifique o início e o desencadear da doença. Fatores ambientais, estresse oxidativo e fatores imunológicos podem estar relacionados as causas dessa doença. São exemplos dessa patologia, a colite ulcerativa e a doença de Crohn. Para terapia genética em DII foi testado estudos com modelos de células humanas e não humanas. A partir das análises dos dados, os genes JAK2, TL1A, SGK2, PTPN2, c-MYC, HDAC7, IFN- γ e miR-125a foram sugeridos como candidatos apropriados para o tratamento com CRISPR Cas9 (8).

A engenharia de DNA CRISPR avançou e está evoluindo rapidamente, foi utilizado em doenças como anemia falciforme, beta-talassemia ou embriões humanos resistentes ao

HIV. Dada a sua aplicação exponencial em variantes da doença, pode sugerir que é um momento ideal para aprofundar a compreensão da patogênese e tratamento da DII. Principalmente IBD refere-se a duas categorias principais de distúrbios intestinais inflamatórios crônicos recorrentes: colite ulcerativa (UC) e doença de Crohn (DC) (11).

ESTUDOS SOBRE CRISPR E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS USANDO CÉLULAS IMUNES HUMANAS

Matthews et al. (12), investigaram SNP rs6651252 no cromossomo 8 e descobriram que o rs6651252 vive no interior de um elemento potencializador responsivo de DNA, e o elemento ligado à doença aumentam a ligação do fator de transcrição TCF7L2 à região. Então, os autores descobriram que usando o CRISPR-Cas9, o potencializador rs6651252 regula a expressão do c-MYC, e perceberam que os níveis de expressão de MYC, são elevados em pacientes portadores da doença de Crohn, uma doença gastrointestinal que afeta principalmente o intestino delgado (íleo) e o intestino grosso (cólon).

De acordo com os estudos de Li et al. (13), variantes do gene PTPN2 apareceram em pacientes portadores da doença de Crohn. O PTPN2 sofreu uma mutação com perda de função e foi correlacionado com o rs7234029 SNP. Foram utilizadas células de miofibroblastos subepiteliais (SEMF), e o resultado apontou um aumento de PTPN2 no íleo afetado, com relação ao íleo normal. No entanto, a deleção PTPN2 por meio do CRISPR-Cas9 obteve níveis mais altos de fosforilação e proliferação de STAT3 e Erk1/2. Com isso, os estudos indicaram que variantes dos genes PTPN2 e SNP rs7234029 têm fundamental importância para a doença de Crohn. Na tabela 1, observa-se alguns modelos de células humanas utilizando as ferramentas CRISPR-Cas9 em doenças autoimunes.

Tabela 1. Alguns modelos de células humanas usando CRISPR-Cas9 em doenças autoimunes

Doença autoimune	Gene alvo	Resultado	Referência
Artrite reumatoide (AR)	MYC, FOXO1	Ao coletar dados ATAC-seq, Hi-C, Capture Hi-C e RNA-seq nuclear em células T CD4+ estimuladas ao longo de 24 horas, o estudo fornece evidências de que os genes MYC e FOXO1 podem ser fatores causais da AR.	(14)
Doença inflamatória intestinal (DII)	SGK2	A proteína SGK2 foi localizada no citoplasma das células epiteliais do cólon tanto na colite ulcerativa de longa duração quanto de curta duração.	(15)

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)	TNFAIP3	O resultado mostrou que células A20 C103A ou células com rs2230926 polimorfismo aumenta a armadilha extracelular de neutrófilos e frequência aumentada de autoanticorpos para epítomos citrulinados	(16)
Diabetes Mellitus Tipo I	LCK	Demonstraram que o alelo G do SNP rs10914542 de LCK aumenta o risco de DM tipo 1.	(17)
Psoríase	ERAP1	Geraram a linhagem celular de melanoma nocaute ERAP1 e revelaram que a epistasia entre as variantes HLA-C*06:02 e ERAP1 afetam a psoríase.	(18)
Doença celíaca	α - or γ -gliadin	O resultado mostrou que é possível usar o CRISPR-Cas9 para editar α - ou γ -gliadinas e fazer formas seguras de grãos	(19)

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP); Proteína tirosina quinase linfocitária específica (LCK);

ESTUDOS SOBRE CRISPR E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS USANDO CÉLULAS NÃO HUMANAS

Segundo os estudos de Pai et al. (20), sobre Fator de Necrose Tumoral (TNF), membro da família TL1A, camundongos transgênicos TL1A apresentaram Ileíte, inflamação do íleo. Quando utilizaram o neutralizante anti-TL1A, perceberam que a concentração de endocitose bacteriana causada pelo MLCK, que estava presente na borda da escova, havia sido reduzida. Após isso, constataram que as expressões TL1A, IFN γ e MLCK1 e 2 foram reguladas na mucosa de pacientes com DII (Doença Inflamatória Intestinal). Com isso, o estudo comprovou que o aumento de TL1A, IFN γ e MLCK está ligado ao curso de DII.

Eftychi et al. (21), cruzaram NEMOIEC-KO com camundongos IFN γ y/y gerados pelo sistema CRISPR-Cas9, com a finalidade de verificar se IFN- γ pode ter um papel importante na inflamação do Cólon. Descobriram então, que várias citocinas pró-inflamatórias, como Tnf, IL1b e IL6, apresentaram uma diminuição da expressividade nos camundongos nocauteados e apontaram o IFN- γ como fator essencial para a inflamação do Cólon.

Já nos estudos de Friedrich et al. (22), foram utilizadas células colônicas epiteliais (CCE), T84 humano e CMT93 camundongos murino para identificar as funções do HDAC7. Eles também utilizaram camundongos nocauteados que foram gerados através do sistema CRISPR-Cas9, e o resultado revelou que a função das histonas de acetilase (HDAC) foi reduzida em pacientes portadores de DII. A partir dos estudos com camundongos nocaute, compreenderam que o HDAC é primordial na manutenção da barreira intestinal. Alguns modelos de células não humanas utilizando CRISPR-Cas9 em doenças autoimunes, estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Alguns modelos de células não humanas usando CRISPR-Cas9 em doenças autoimunes

Doença autoimune	Gene alvo	Resultado	Referência
Doença inflamatória intestinal (DII)	HDAC7	O resultado mostrou que a função HDAC foi reduzida em pacientes com DII, e de acordo com os camundongos nocauteados, HDAC foram encontrados para desempenhar um papel crucial na manutenção da barreira intestinal.	(22)
Diabetes Mellitus Tipo I	AID/RAD51	AID/RAD51 pode ser um alvo para o tratamento de Pacientes com DM tipo 1.	(23)
Psoríase	Desmoglein 1	Apoiaram um papel de Dsg1 para a diferenciação de epiderme, formação de barreiras e regulação das respostas inflamatórias.	(24)
Doença inflamatória intestinal (DII)	TL1A	O surto de TL1A, IFN γ e MLCK está associado à DII curso de doenças	(20)

CRISPR E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)

Odqvist et al. (16) realizaram um teste de terapia genética em alguns modelos de células humanas com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). A partir dos estudos, os genes A20 DUB e CXorf21 foram sugeridos como candidatos apropriados para o tratamento com

CRISPR-Cas9, e fizeram uma avaliação se TNFAIP3 (A20) deubiquitinase (DUB) aumenta o risco de LES, para isso, usaram CRISPR-Cas9 para fazer monócitos humanos U937 com mutação knock-in C103A inativando A20 DUB. Os resultados exibiram que as células A20 C103A ou células com polimorfismo rs2230926 atraíram aumento da armadilha extracelular de neutrófilos e aumento da frequência de autoanticorpos para epítomos citrulinados. Eles também concluíram que a interrupção do domínio A20 DUB aumenta a suscetibilidade ao LES.

Harris et al. (25), focaram no envolvimento dos genes do quadro de leitura aberta 21 do cromossomo X (CXorf21) no curso da doença do LES, e conduziram experimentos de knockdown de CRISPR-Cas9 in vitro, e perceberam que o knockdown de CXorf21 resultou em uma expressão diminuída de TNF-alfa e IL-6. E assim concluíram que a expressão sexualmente dimórfica de CXorf21 poderia ser um fator de risco para LES.

CRISPR E ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)

Testes de terapia genética foram realizados em modelos de células humanas com EM, a partir disso, o polipeptídeo 39B da RNA helicase DEAD box, e os genes IR7R, IL2RA e TNFRSF1A, foram sugeridos como candidatos apropriados para o tratamento com CRISPR-Cas9. Os demonstraram que a via de resposta imune relacionada a IL7R é crucial na patogênese da EM. O polimorfismo de nucleotídeo único - SNP rs6897932 no exon 6 de IL7R afeta a expressão gênica da proteína solúvel versus a forma ligada à membrana e aumenta o risco de EM. A forma solúvel de IL7R é um fator de risco elevado de EM. O alelo 'C' de rs6897932 está associado à EM melhorando o exon 6 do gene IL7R e aumentando um silenciador de splicing de exon. A descoberta sugere que rs6897932 pode afetar a quantidade da proteína solúvel versus a forma ligada à membrana. As isoformas são importantes para regular a via de sinalização de IL7. Como resultado, tem uma relação direta entre os alelos alternativos rs6897932 e o risco de EM. (26).

Galarza-Munoz et al. (27), revelaram que a interação epistática humana é associada ao risco de EM. A RNA helicase DDX39B, um potente ativador do exon 6 de IL7R e repressor da forma solúvel de IL7R, correlaciona-se fortemente com o risco de EM, e foi demonstrado que a interação epistática entre rs2523506 em DDX39B e rs6897932 em IL7R regula o splicing do exon 6 de IL7R, e a epistasia genética e funcional com o gene IR7R tem relação com o risco de EM.

Estudos mostraram que o gene IL-2RA tem muitas variantes que aumentam o risco de EM, e várias variantes foram associadas aos níveis de sIL 2RA de forma independente. Investigaram ainda, a heterogeneidade genética de IL-2RA em EM e diabetes mellitus tipo 1 (DM1) juntos, que estão relacionados a compartilhar alelos. As variantes de IL2RA contribuíram com o risco de EM e DM1, respectivamente. E, o SNP rs2104286 localizado no íntron 1 de IL2RA foi associado à suscetibilidade da EM (28,27).

Gregory et al. (29), relataram que os agentes bloqueadores de TNF são opções de tratamento eficazes para doenças autoimunes. A investigação sugere que o SNP rs1800693 no gene TNFRSF1A, que codifica o receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1), está associado à EM como variante causal. Os agentes bloqueadores de TNF têm efeitos colaterais que promovem o aparecimento de EM e outras doenças autoimunes, como Artrite

Reumatoide. No entanto, eles relataram um sinal de doença para rs1800693 preditivo de efeitos colaterais.

CRISPR E DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM 1)

Zhu et al. (17), realizaram dois testes, o primeiro com terapia genética em alguns modelos de células humanas com Diabetes mellitus tipo 1, já o segundo com algumas categorias de camundongos, e tomando estes estudos por base, elegeu-se como candidatos apropriados para tratamento com CRISPR-Cas9, o gene AID/RAD51 e o SNP rs10914542 do gene LCK. A pesquisa buscou designar o papel dos SNPs no gene da proteína tirosina quinase linfocitária específica (LCK), e para tal, foram adquiridas amostras de sangue de pacientes com DM tipo1 e utilizaram o CRISPR-Cas9 para conseguir o resultado da LCK SNP. Nas análises obtidas entre SNPs, apenas o SNP rs10914542 teve combinação considerável, então eles comprovaram, que o alelo G do SNP rs10914542 em LCK aumenta a ameaça de diabetes mellitus tipo 1.

Ratiu et al. (23) utilizaram camundongos nocaute do gene da Citidina Desaminase Induzida por Ativação (AID) e encontraram uma possível forma de tratamento que é a AID/RAD51, para pacientes portadores da DM tipo 1, com o intuito de contribuir com a melhoria na qualidade de vida dos mesmos. Em outro estudo, Gerace et al., 2017, mostraram resultado na atividade da transcrição endógena da insulina humana utilizando a fusão de Ativadores Transcricionais (dCas9-VP160) e múltiplos promotores de insulina direcionados a RNAs guias simples (sgRNAs) em células HEK293T, células Hela e fibroblastos humanos. O resultado favorável desse estudo, apoia a proposta de ativação da transcrição de genes endógenos, incluídos no desenvolvimento pancreático, como Pdx-1, NeuroD1, MafA. Quando são combinados com a ativação e manutenção de genes envolvidos na imunomodulação de MSC, a probabilidade de desenvolver terapias provenientes de MSC bem sucedidas para DM1, torna-se um resultado positivo (10).

CRISPR E PSORÍASE

Segundo Arakawa et al. (18), foram realizados dois estudos; um deles buscou testar uma forma de terapia genética em células humanas na psoríase, já o segundo teste almejou analisar o mesmo em camundongos. Foram indicados como pretendentes para o tratamento com CRISPR-Cas9, de acordo com esses estudos, os genes desmogleína 1 e ERAP1. Eles desenvolveram uma ascendência celular de melanoma nocaute ERAP1 e mostraram que a epistasia em conjunto com as variantes HLA-C*06:02 e ERAP1 afeta a psoríase. Foi observado que o gene ERAP1 tem papel essencial no progresso da psoríase, onde a orientação irá incluir a proteína 5 do tipo ADAMTS (ADAMTSL5) e a imunogenicidade dos melanócitos.

Roth-Carter et al. (24), utilizaram camundongos nocaute para desmogleína 1 e constataram que os camundongos usados no teste apresentavam um comprometimento da barreira. A análise de E18.5 da pele de camundongos knockout mostrou que o bloqueio de Dsg1 proporcionará um aumento nas vias para o processo psoriático. Os resultados compreendem um papel de Dsg1, para a separação da camada externa da célula, a epiderme onde a mesma contribui para a destinação de barreiras e normatização de respostas inflamatórias.

CRISPR E DOENÇA CELÍACA (DC)

O sistema de edição de genes CRISPR/Cas9 pode remover ou reduzir as frações tóxicas do glúten, resultando em um trigo sem glúten ou com baixo teor de glúten. O principal desafio agora é explorar totalmente a capacidade de edição do genoma do CRISPR para alterar precisamente os genes da gliadina, suprimindo sua capacidade imunogênica, mantendo sua funcionalidade e propriedades organolépticas (30).

Um estudo utilizou a terapia genética em modelos celulares no que se refere à doença celíaca, que é uma doença autoimune pela intolerância ao glúten, uma proteína encontrada no trigo, aveia, cevada, centeio e seus derivados. Os genes α -gliadina e γ -gliadina foram considerados apropriados para o tratamento com CRISPR-Cas9, e observaram que grãos de trigo possuem proteínas de glúten nos quais podem desencadear a doença celíaca em epítomos imunogênicos. Analisaram as sequências dos genes α - ou γ -gliadinas, e o resultado mostrou que é possível usar o CRISPR-Cas9 para editar α - ou γ -gliadinas e fazer formas seguras de grãos (19).

CRISPR E ARTRITE REUMATÓIDE (AR)

Os pesquisadores usaram a tecnologia de edição do genoma CRISPR-Cas9 para produzir células que secretam uma droga biológica em resposta à inflamação. A droga reduz a inflamação nas articulações ligando-se à interleucina-1 (IL-1), uma substância que muitas vezes promove a inflamação na artrite ativando células inflamatórias em uma articulação. A pesquisa reprogramou os genes nas células-tronco. Em seguida, foi criado um pequeno implante de cartilagem semeando como células sob a pele de ratos. A abordagem permite uma droga seja secretada sempre que houver um surto de inflamação. Em outro estudo envolvendo os mesmos pesquisadores, a construiu foi com o estudo das chamadas células de cartilagem SMART (células-tronco modificadas para terapia regenerativa autônoma), usando tecnologia CRISPR-Cas9 para alterar genes nessas células para que, quando os genes da cartilagem fossem ativados pela inflamação, eles secretam drogas em resposta ao estímulo (31).

Em outra pesquisa, envolvendo edição de genoma de iPSCs com CRISPR-Cas9, foi criado um circuito genético sintético que detecta a alteração dos níveis de citocinas inflamatórias endógenas para desencadear uma resposta terapêutica proporcional. As células foram projetadas em construções cartilaginosas que mostraram rápida ativação e recuperação em resposta à inflamação *in vitro* ou *in vivo*. No modelo murino K/BxN de artrite inflamatória, os implantes de bioengenharia atenuaram significativamente a gravidade da doença medida pela dor nas articulações, danos estruturais e inflamação sistêmica e local. Os implantes terapêuticos evitaram completamente o aumento da sensibilidade à dor e erosões ósseas, uma façanha não alcançável pelos atuais medicamentos modificadores da doença clinicamente disponíveis (32).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados levantados na literatura, foi possível concluir que, a terapia gênica e especialmente o método CRISPR, tornou-se uma abordagem promissora à

medida que nossa compreensão das bases imunológicas e moleculares das doenças autoimunes avançou. Apesar disso, muitos dos estudos sobre o tratamento de doenças autoimunes utilizando CRISPR, foram realizados em estudos celulares até o momento, e portanto, são necessários mais estudos em humanos. Além disso, vários desafios técnicos precisam ser abordados, como atividade fora do alvo, baixa eficiência de reparo direcionada por homologia, entrega dos componentes do sistema CRISPR *in vivo*, possíveis respostas imunes em decorrência de novas abordagens terapêuticas, além de aspectos éticos envolvendo manipulação genética.

Apesar dessas limitações, as evidências atuais mostram o papel promissor do CRISPR na regulação de doenças autoimunes. A crescente capacidade, viabilidade, facilidade de uso e confiabilidade dessa ferramenta, sem dúvida, levarão a novos insights fisiopatológicos e ao aperfeiçoamento de terapias em humano, que num viés ideal inibirá mais potentemente os processos inflamatórios, mas poupará o restante do sistema imunológico. No entanto, para uma substancial melhoria dessas terapias, é necessário pesquisas mais específicas para que seja possível uma entrega segura do sistema CRISPR no organismo humanos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Pernambuco - *Campus* Mata Norte, que tem sido essencial para nossa formação; ao Laboratório de Biotecnologia da UPE - *Campus* Mata Norte (LABIOTEC UPE CMN), e por último, mas não menos importante, ao Grupo de Pesquisa, Extensão e Informação: ProBioTec, liderado pela Prof.^a Dr.^a Fabiana América S. D. Souza, primordial para aquisição de novos conhecimentos científicos, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Yin, H.; Kauffman, KJ; Anderson, DG Tecnologias de entrega para edição de genoma. *Nat. Ver. DrugDescov.* 2017, 16, 387-399.
2. Doudna, J.A.; Charpentier, E. Edição do genoma. A nova fronteira da engenharia genômica com crispr-cas9. *Ciência* 2014, 346, 1258096.
3. Gilbert, LA; Larson, M. H.; Morsut, L.; Liu, Z.; Brar, GA; Torres, S. E; Stern-Ginossar, N.; Brandman, O.; Whitehead, E. H; Doudna, J.A.; et al. Crispr-mediated modular rna-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 2013, 154, 442-451. Hsu, P. D.; Lander, E. S.; Zhang, F. Desenvolvimento e aplicações de crispr-cas9 para engenharia de genoma. *Célula* 2014, 157, 1262-1278.
4. Ewart DT, Peterson EJ, Steer CJ. Gene editing for inflammatory disorders. *Ann RheumDis.* **2019**; 78: 6-15. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-213454.

5. ZETSCHE, B.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O. et al. Cpf1: a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 2015; 163:759-71.
6. VERWAAL, R.; BUITING – WIESSENHAAN, N.; DALHUIJSEN, S. et al. CRISPR/Cpf1 enables fast and simple genome editing of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2018; 35:201-1.
7. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012; 337 (6096): 816–21. DOI:10.1126/science.1225829.
8. Lee, Min Ho et al. Genome Editing Using CRISPR-Cas9 and Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, p. 1-13, January, 2022.
9. Brunger, J.M.; Zutshi, A.; Willard, V.P.; Gersbach, C.A.; Guilak, F. CRISPR/Cas9 editing of murine induced pluripotent stem cells for engineering inflammation-resistant tissues. *Arthritis Rheumatol.* 2017, 69, 1111–1121.
10. Gerace D, Martiniello-Wilks R, Nassif N, Lal S, Steptoe R, Simpson M. CRISPR-targeted genome editing of mesenchymal stem cell-derived therapies for type 1 diabetes: a path to clinical success?. *Biomed Central* 2017; 7,8 [DOI 10.1186/s13287-017-0511-8]
11. Limanskiy V, Vyas A, Chaturvedi LS, Vyas D. Aproveitando o potencial da tecnologia de edição de genes usando CRISPR na doença inflamatória intestinal. *Mundial J Gastroenterol* 2019; 25(18): 2177-2187
12. Matthews, S.M.; Eshelman, M.A.; Berg, A.S.; Koltun, W.A.; Yochum, G.S. The Crohn's disease-associated SNP rs6651252 impacts MYC gene expression in human colonic epithelial cells. *PLoS ONE* 2019, 14, e0212850.
13. Li, C.; Kuemmerle, J. P119 the role of ptpn22 SNP in the pathogenesis of fibrosis in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2019, 25, S57–S58.
14. Yang, J.; McGovern, A.; Martin, P.; Duffus, K.; Ge, X.; Zarrineh, P.; Morris, A.P.; Adamson, A.; Fraser, P.; Rattray, M.; et al. Analysis of chromatin organization and gene expression in T cells identifies functional genes for rheumatoid arthritis. *Nat. Commun.* 2020, 11, 4402.
15. Mokhtar, N.; Den Low, E.N.; Yahaya, A.; Ali, R.A.R. Characterisation of sgk2 gene using CRISPR/Cas9 gene editing tool in ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2019, 34 (Suppl. S3), 274
16. Odqvist, L.; Jevnikar, Z.; Riise, R.; Oberg, L.; Rhedin, M.; Leonardo, D.; Yrlid, L.; Jackson, S.; Mattsson, J.; Nanda, S.; et al. Variações genéticas no domínio a20 de

- fornece um link genético para citrulinização e armadilhas extracelulares de neutrófilos no lúpus eritematoso sistêmico. *Ana Reum. Des.* 2019, 78, 1363-1370.
17. Zhu, Q.; Wang, J.; Zhang, L.; Bian, W.; Lin, M.; Xu, X.; Zhou, X. Lck rs10914542-g alelo associado com diabetes tipo 1 em crianças via hiporresponsividade das células T. *Pediatra Res.* 2019, 86, 311-315.
 18. Arakawa, A.; Vollmer, S.; Arakawa, Y.; Ele, M.; Reeves, E.; James, E.; Prinz, J. Erap1 Regula o Risco de Psoríase por Afetar a Imunogenicidade dos Melanócitos e da Proteína Psoriática Autoantígeno Semelhante a Adamts 5. In *Proceedingsofthe 46th Annual Meeting oftheArbeitsgemeinschaftDermatologischeForschung (ADF)*, Munique, Alemanha, 13–16 de março de 2019 ;Wiley: Munique eu, Alemanha, 2019; págs. E66–E67.
 19. Jouanin, A.; Schaart, JG; Boyd, LA; Cockram, J.; Leigh, FJ; Bates, R.; Wallington, EJ; Visser, RGF; Smulders, MJM Outlook para pacientes com doença celíaca: Rumo ao pão de trigo com glúten hipoimunogênico por edição de genes de famílias de genes alfa e gama-gliadina. *BMC Plant Biol.* 2019, 19, 333.
 20. Pai, Y.-C.; Shih, D.Q.; Targan, S.R.; Turner, J.; Wei, S.C.; Yu, L.C.H. Su1097 t11a-mediated bacterialtranscytosisby a mlcksplicingvariantcontributestoinflammatoryboweldisease. *Gastroenterology* 2020, 158, S-508.
 21. Eftychi, C.; Schwarzer, R.; Vlantis, K.; Wachsmuth, L.; Basic, M.; Wagle, P.; Neurath, M.F.; Becker, C.; Bleich, A.; Pasparakis, M. Temporallydistinctfunctionsofthecytokines il-12 and il-23 drive chroniccoloninflammation in response to intestinal barrierimpairment. *Immunity* 2019, 51, 367–380.e4.
 22. Friedrich M, Ganther J, Breiderhoff T, Rosenthal R, Glauben R, Siegmund B. P063 hdac as versatileregulators of the intestinal epithelialbarrier in inflammatoryboweldisease. *J. CrohnsColitis* 2017, 11, S109.
 23. Ratiu, J.J.; Racine, J.J.; Hasham, M.G.; Wang, Q.; Branca, J.A.; Chapman, H.D.; Zhu, J.; Donghia, N.; Philip, V.; Schott, W.H.; et al. Genetic and small molecule disruption of the aid/rad51 axis similarly protects nonobese diabetic mice from type 1 diabetes through expansion of regulatory b lymphocytes. *J. Immunol.* **2017**, 198, 4255–4267
 24. Roth-Carter, QR; Godsel, L.; Koetsier, JL; Broussard, JÁ; Burks, HE; Fitz, G.; Huffine, AL; Amagai, S.; Lloyd, S.; Kweon, J.; et ai. A deficiência de 225 desmogleína 1 em camundongos knockout prejudica a formação da barreira epidérmica e resulta em uma assinatura genética semelhante à psoríase em e18. 5 embriões. *J. Investigaçao. Dermatol.* 2020, 140, S26.

25. Harris, VM; Koelsch, KA; Kurien, BT; Harley, ITW; Wren, JD; Harley, JB; Scofield, RH A caracterização de cxorf21 fornece informações moleculares sobre a resposta imune de viés feminino na patogênese do sle. *Frente. Immunol.* 2019, 10, 2160.
26. Gregory SG, Schmidt S, Seth, P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF, et al. A cadeia alfa do receptor de interleucina 7 (il7r) mostra associação alélica e funcional com esclerose múltipla. *Nat. Genet.* 2007, 39, 1083-1091.
27. Galarza-Munoz, G.; Briggs, F.B.S.; Evsyukova, I.; Schott-Lerner, G.; Kennedy, E.M.; Nyanhete, T.; Wang, L.; Bergamaschi, L.; Widen, S.G.; Tomaras, G.D.; et al. Human epistatic interaction controls il7r splicing and increases multiple sclerosis risk. *Cell* 2017, 169, 72–84.e13.
28. Maier, L.M.; Lowe, C.E.; Cooper, J.; Downes, K.; Anderson, D.E.; Severson, C.; Clark, P.M.; Healy, B.; Walker, N.; Aubin, C.; et al. Il2ra genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS Genet.* 2009, 5, e1000322.
29. Gregory AP, Dendro CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Manteiga F, Poschmann G, Kaur G, Lambert L, Leach OA et al. O risco genético do receptor 1 de Tnf reflete o resultado da terapia anti-tnf na esclerose múltipla. *Natureza* 2012, 488, 508-511.
30. Verma et al., verma et al. Status and Contribution of CRISPR/Cas9 Based Gene Editing System in the Development of a Low Immunogenic Wheat Variety. *Preprints.* V. 1. 19, Fevereiro de 2020.
31. BORBA, Eduardo Ferreira. Rheumatoid arthritis theated with implanted cells that release drug. *Internacional Journal of Clinical Rheumatology..* (2022) 17(3), 078-079.
32. CHOI, Yun-Rak; COLLINS, Kelsey; SPRINGER, Luke E.; PFERDEHIRT, Lara; ROSS, Alison K.; WU, Chia-Lung; MOUTOS, Franklin T.; HARASYMOWICZ, Natalia S.; BRUNGER, Jonathan M.; PHAM, Christine T. N.; GUILAK, And Farshid. A genome-engineered bioartificial implant for autoregulated anticytokine drug delivery. *Science Advances.* Vol. 7, No. 36. Set, 2021.

DOI: 10.53934/9786585062046-9

Capítulo 9**FAMÍLIA GÊNICA *PATHOGENESIS RELATED-PROTEIN 1 (PR1)* E SEU ENVOLVIMENTO NA DEFESA CONTRA FITOPATÓGENOS EM VIRIDIPLANTAE**

Ana Luíza Trajano Manguiera de Melo¹ *; Cleidiane Macêdo Santos¹ ; Renata Ariel Fragoso Silva¹ ; Mariele Porto Carneiro Leão² ; Antonio Félix da Costa² 
; José Ribamar Costa Ferreira Neto¹ 

¹Univeridade Federal de Pernambuco

² Instituto Agronômico de Pernambuco

*Ana Luíza Trajano Manguiera de Melo (Corresponding author) –
analuizat163@gmail.com

As espécies vegetais são infectadas por vários microrganismos patogênicos que comprometem a sua sobrevivência e aptidão. Como consequência, ocorre redução significativa da produtividade anual das culturas. Em resposta a essa interação biológica nociva, as plantas empregam uma ampla gama de mecanismos de defesa, incluindo a síntese de membros do supergrupo das *Pathogenesis-related proteins* (PR's), para evitar - ou minimizar - os danos ao seu metabolismo. As PR's são componentes centrais da defesa das plantas a estresses bióticos e abióticos e compreendem 17 famílias (PR1-PR17). Entre elas, a PR-1 constitui a principal família de proteínas PR, sendo amplamente sintetizada em resposta ao ataque a uma gama de patógenos. Seus membros promovem o espessamento da parede celular vegetal e sequestram de esteróis da membrana dos patógenos, impedindo a sua proliferação. Muitos trabalhos têm abordado acerca da expressão família gênica PR1 e do seu caráter protetor contra estresses bióticos. No entanto, pouco se discute sobre a influência desses elementos na resposta de defesa de cultivares resistentes e suscetíveis, bem como no que concerne aos mecanismos que potencializam a sua indução durante processos infecciosos. Diante da importância da família PR1, o presente trabalho teve como objetivo fornecer, a partir de trabalhos publicados nos últimos cinco anos, uma visão geral da família *Pathogenesis-related proteins 1* (PR1) e do seu envolvimento na defesa contra patógenos em diferentes espécies pertencentes ao clado Viridiplantae.

Palavras-chave: imunidade vegetal; patógenos; plantas

INTRODUÇÃO

As espécies vegetais são infectadas por vários microrganismos patogênicos que comprometem a sua sobrevivência e aptidão (1). Como consequência, ocorre redução significativa da produtividade anual das culturas, além de representar uma séria ameaça à segurança alimentar nos níveis doméstico, nacional e global (2). Em resposta a essa condição de estresse, as plantas empregam uma ampla gama de mecanismos de defesa, incluindo a síntese de membros do supergrupo das *Pathogenesis-related proteins* (PR's) (3), para evitar ou minimizar os danos ao seu metabolismo.

As PR's são componentes centrais da defesa vegetal a estresses bióticos e abióticos. Tais proteínas compreendem 17 famílias (PR1-PR17) que são classificadas com base em suas semelhanças de sequência, atividades enzimáticas e propriedades estruturais (4). A família PR1 constitui a principal família de proteínas PR, sendo sintetizadas amplamente em resposta ao ataque de vários patógenos e/ou indutores hormonais, como ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (5, 6). Seus membros promovem o espessamento da parede celular vegetal, impedindo o crescimento do patógeno ao bloquear sua entrada nas vias apoplásticas (7). Além disso, atuam no sequestro de esteróis da membrana dos patógenos, promovendo um efeito inibitório no crescimento dos agentes patogênicos, especialmente de organismos fúngicos (8).

Em soja, 20 genes GmPR1 (*Glycine max* PR1) foram regulados positivamente sob pelo menos um estresse biótico causado por fungos (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium virguliforme*, *Phialophora gregata* e *Phakopsora pachyrhizi*), insetos (*Aphis glycines*), nematóides (*Heterodera glycines*, *Rotylenchulus reniformis*), oomiceto (*Phytophthora sojae*) e vírus (soybean mosaic virus) (9). Em outro estudo (10), foi observado em alho (*Allium sativum* L.) uma elevada expressão dos genes AsPR1 (*Allium sativum* PR1), resultando em maior inibição da infecção do fungo patogênico do gênero *Fusarium*. Resultados semelhantes foram encontrados (11) ao identificar o aumento transcricional de genes PR-1 em trigo (*Triticum aestivum*), associados ao maior controle da infecção por *Fusarium equiseti*.

Diante do importante papel molecular desempenhado pela família PR1 em vegetais submetidos a infecções por microrganismos patogênicos, o presente trabalho tem como objetivo fornecer uma visão geral da família *Pathogenesis-related proteins 1* (PR1) e o seu envolvimento na resposta de defesa contra patógenos em diferentes espécies vegetais pertencentes à Viridiplantae, nos trabalhos publicados nos últimos cinco anos.

SELEÇÃO DE ESTUDOS

A presente revisão de literatura foi realizada durante os meses de julho e agosto de 2022, a partir da base de dados ‘PUBMED’, ‘Science Direct’ e ‘Scielo’. Tal ação abrangeu artigos em inglês, português e espanhol publicados nos últimos cinco anos em nível nacional e internacional. Para a realização da pesquisa, foram usados como palavras-chaves: ‘*Pathogenesis related protein 1 and plants*’, ‘*Pathogenesis related-protein 1 and plants response*’, ‘*PR1 and plant pathogen response*’, ‘*PR1 and plant pathogen defense*’. Os critérios de inclusão foram: estudos da família gênica *Pathogenesis related-protein 1* associados aos mecanismos de defesa em Viridiplantae, estudos entre os anos de 2018 a 2022. Já os critérios de exclusão foram estudos não referentes à família *Pathogenesis related-protein 1* em Viridiplantae, estudos não associados a estresses bióticos e revisões de literatura.

DESENVOLVIMENTO

Ao total, por meio das três bases de dados utilizadas, foram encontrados 212 trabalhos durante a mineração de dados (Figura 1). Desses, 194 foram excluídos, dos quais: 64 não abordaram a temática das PR1; 21 se tratavam de revisões de literatura; 48 avaliaram PR1 associadas a estresses abióticos; 17 não avaliaram PR1 em Viridiplantae; 37 excederem a delimitação de período das publicações analisadas; e quatro estudos foram repetidos (Figura 1). Dezoito artigos, portanto, foram escrutinados na presente proposta.

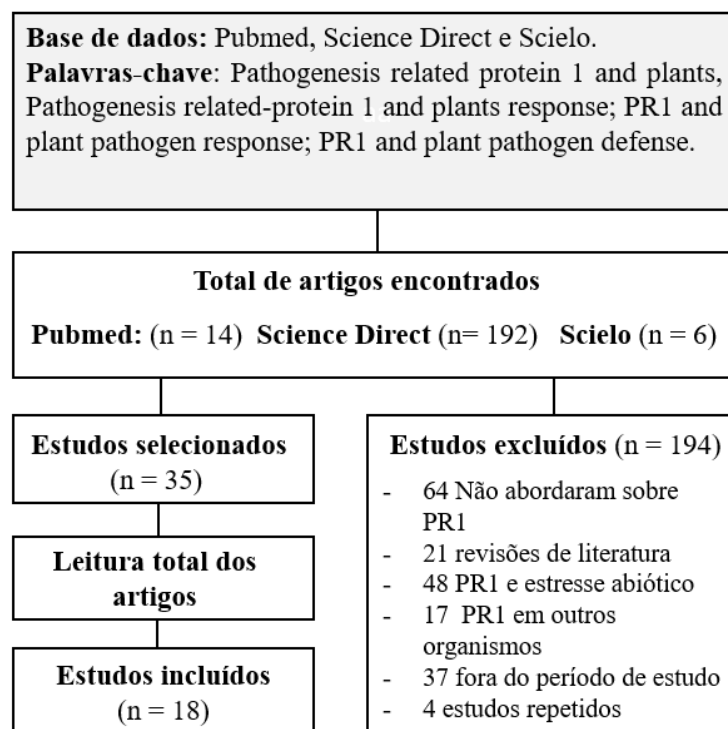


Figura 1 – Representação esquemática da metodologia de busca e inclusão dos estudos avaliados.

ABORDAGENS DOS ESTUDOS ASSOCIADOS À FAMÍLIA PR1 EM VEGETAIS SOB ESTRESSES BIÓTICOS

A Tabela 1 apresenta os 18 artigos incluídos, os diferentes estresses bióticos aplicados nas plantas e os objetivos de cada estudo. Foi observado que as abordagens se dividiram entre a avaliação da expressão de PR1 em variedades de cultivares suscetíveis e resistentes submetidos à infecção por um ou mais fitopatógenos, além da análise da utilização de tecnologias voltadas para promover maior síntese de PR1 durante processos infecciosos.

Tabela 1 – Lista de artigos incluídos, estresses bióticos aplicados e objetivos.

Autores	Estresse biótico	Objetivos
Almeida-Silva & Venancio (2022) (9)	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. virguliforme</i> , <i>Aphis glycines</i> , <i>Heterodera glycines</i> , <i>Rotylenchulus reniformis</i> e <i>Phytophthora sojae</i>	Caracterizar o gene PR-1 da soja (GmPR-1) nos níveis de sequência nucleotídica, estrutural e padrão transcricional em diversos tecidos sob condições de estresse biótico e abiótico.
Anuradha et al. (2022) (12)	<i>Pseudocercospora eumusae</i> e <i>Pratylenchus coffeae</i>	Analisar a família PR-1 de dois genomas da banana (<i>Musa acuminata</i> e <i>M. balbisiana</i>) e avaliar o padrão de expressão em ambas as espécies sob diferentes estresses.
Esmail, Aboulila & El-Moneim (2020) (13)	<i>Puccinia striiformis</i>	Compreender a variação na expressão dos genes PR1 e sua atividade enzimática após a inoculação com <i>Puccinia striiformis</i> em plântulas e adultos de milho (<i>Triticum aestivum</i>).
Chun & Chandrasekaran (2019) (14)	<i>Fusarium andiyazi</i>	Avaliar o potencial das PR1 no controle da murcha causada por <i>Fusarium andiyazi</i> .
Aboulila (2022) (15)	<i>Puccinia striiformis</i> f. <i>sp. tritici</i>	Investigar a resistência sistêmica adquirida (SAR) induzida por cinco fitohormônios diferentes contra <i>P. striiformis</i> f. <i>sp. tritici</i> em variedades de trigo Egípcio e a sua associação com a expressão dos genes PR1 e PR4.
Butassi (2022) (16)	<i>Taphrina deformans</i>	Avaliar os mecanismos moleculares do pessegueiro (<i>Prunus persica</i>) em variedades suscetíveis e resistentes de plantas expostas a infecção pelo fungo <i>Taphrina deformans</i> .

Autores	Estresse biótico	Objetivos
Abbasi & Eslahi (2022) (17)	<i>Rhizoctonia solani</i>	Investigar o padrão de expressão de genes PR1 e a respectiva atividade enzimática em cultivares domesticados e selvagens de cevada (<i>Hordeum vulgare</i>) expostos à infecção por <i>Rhizoctonia solani</i> .
Rabiei et al.(2022) (18)	<i>Alternaria solani</i>	Elucidar os efeitos do ácido hexanóico em variedades de tomates (<i>S. lycopersicum</i>) submetidas à infecção por <i>Alternaria solani</i> .
Luo et al.(2022) (19)	<i>Phytophthora infestans</i>	Investigar os mecanismos moleculares associados à atividade de supressão de fungos oomycetos desempenhada por PR1 em batata (<i>Solanum tuberosum</i>).
Dehghanian et al. (2020) (20)	<i>Meloidogyne javanica</i>	Examinar a indução de resistência ao tomateiro (<i>S. lycopersicum</i>) contra <i>M. javanica</i> e alterações na expressão de genes PR1, após aplicação de salicílico ácido e <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0.
Farrakh, Wang & Chen (2018) (21)	<i>Puccinia striiformis</i> f. <i>sp. tritici</i>	Avaliar a expressão de genes PRs envolvidos em diferentes tipos de resistência do trigo à ferrugem.
Jiang et al. (2022) (22)	<i>Phytophthora capsici</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Erysiphe</i> <i>cucurbitacearum</i>	Investigar a influência o óleo essencial de <i>Litsea cubeba</i> no desenvolvimento da SAR em diferentes espécies vegetais submetidas à infecção do vírus do mosaico do tabaco e doenças fúngicas.
Moghaddam et al. (2019) (23)	<i>Alternaria alternata</i>	Avaliar a resposta de sete genes PRs no genoma de diferentes variedades suscetíveis e resistentes de <i>S. lycopersicum</i> durante a infecção por <i>Alternaria alternata</i> .
Liu et al. (2021) (24)	<i>Alternaria alternata</i>	Investigar o efeito da L-lisina exógena sobre o controle de <i>A. alternata</i> em frutos de pera e avaliar as mudanças de metabolismo de ROS e respostas de diferentes proteínas PRs

Autores	Estresse biótico	Objetivos
Wang et al. (2018) (25)	<i>Phytophthora nicotianae</i> e Vírus do mosaico do tabaco (TMV)	Explorar a estratégia de indução de proteínas PRs em tabaco para combater <i>Phytophthora nicotianae</i> e TMV, com o auxílio de um extrato vegetal de plantas medicinais.
Chaudhary, Singh & Charma (2021) (26)	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Avaliar <i>in vitro</i> a ação de ácido salicílico e ácido β -aminobutírico contra <i>R. solanacearum</i> e sua influência no padrão de expressão de genes PRs em cultivares suscetíveis e resistentes de tomate.
Gao et al. (2020) (27)	<i>Pseudomonas syringae</i>	Analisar a resistência de plantas de tabaco NtabSPL6-2 transgênicas durante a infecção por
Chu et al. (2022) (28)	<i>Acidovorax avenae subsp. avenae</i>	Avaliar os padrões de expressão de ScPR1 em resposta a estresses bióticos e abióticos em dois cultivares de cana-de-açúcar.

Os vegetais avaliados nos estudos e pertencentes à Viridiplantae foram bastante diversificados, porém, majoritariamente de interesse econômico, como: tomate, banana, trigo, tabaco, soja, batata, cevada, cana-de-açúcar e pera. Entre os patógenos utilizados para a aplicação dos estresses bióticos, 17 (65%) foram fungos, quatro (15%) foram nematoides, três (11,5%) foram bactérias, um (3,8%) inseto e um (3,8%) vírus (Tabela 1).

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PR1 EM VARIEDADES DE DIFERENTES CULTIVARES SUSCETÍVEIS E RESISTENTES SUBMETIDOS A ESTRESSES BIÓTICOS

Como mencionado acima, muitos estudos aqui evidenciados avaliaram o perfil de expressão da família PR1 em variedades suscetíveis e resistentes frente à infecção por fitopatógenos (Tabela 1). Tal família destaca-se por ser transcricionalmente induzida por ácido salicílico durante processos infecciosos, compondo as vias responsáveis pelo desencadeamento da RSA (Resistência Sistêmica Adquirida) em plantas (29). Dessa forma, as PR1 consistem em uma família gênica de relevante interesse agrônomo.

Dentre os estudos acima mencionados, Anuradha et al. (12) identificaram que as espécies resistentes de banana (*Musa acuminata* e *M. balbisiana*) apresentaram cinco genes

da família PR1 com a expressão significativamente elevada, quando comparados ao grupo controle, em suas raízes durante a infecção pelo fungo *F. oxysporum cubense*. Em contrapartida, cultivares suscetíveis de ambas as espécies apresentaram expressão reduzida desses mesmos genes, sugerindo, dessa forma, a influência dos genes supracitados no processo de resistência a patógenos dessas plantas durante as interações incompatíveis com o referido fungo.

Nessa mesma linha, em outro trabalho (19), foram identificados 10 genes pertencentes à família PR1 em batata (*S. tuberosum*) dos quais foi possível verificar que as folhas da variedade resistente ‘E3’ apresentaram os 10 genes induzidos e com maiores níveis de expressão durante a infecção por *P. infestans*. A variedade suscetível ‘Desireé’, por sua vez, apresentou indução de oito desses genes. O estudo selecionou três isoformas (*StPR1.2*, *StPR1.3* e *StPR1.8*) para avaliar o seu papel em plantas transgênicas. Foi observado que, nas plantas modificadas e com elevada indução de PR1, a resistência ao fungo foi significativamente maior, com o índice de doença (DI) inferior a 7. Nas variedades selvagens e no grupo de controle, por sua vez, os sintomas foram mais severos, com DI atingindo 80,4 e 80,8, respectivamente.

A expressão de PR1 em cultivares contrastantes em relação à resposta a patógenos também está presente em outro achado da literatura (16), no qual foi observado que PR1 foi induzido nas folhas tanto de variedades suscetíveis como de variedades resistentes de pessegueiro, após 96h de inoculação do fungo *T. deformans*. Uma maior elevação, ainda que sutil, dessa expressão foi relatada para a variedade resistente, porém sem significância estatística.

Sob outra perspectiva, ao avaliarem o papel desempenhado por genes da família PR1 em folhas de trigo submetidas à infecção por *P. striiformis* (21), foi verificado que dois desses elementos gênicos permaneceram induzidos do 1º ao 14º dia após a inoculação do fungo na variedade “high-temperature adult-plant (HTAP)”, durante a interação incompatível. Foi observado, adicionalmente, que ambos os genes apresentaram níveis de expressão significativamente maiores em interações incompatíveis quando comparados a interações compatíveis, sinalizando que esses elementos potencialmente influenciam no comportamento de resistência dessas variedades frente ao ataque de fitopatógenos fúngicos.

Em outro trabalho, que também utilizou cultivares de trigo (13), foi constatado que os cultivares adultos e resistentes “Misr-3” e “Yr-29” apresentaram significativa indução dos genes PR1 após 72h de exposição a *P. striiformis* em comparação com o grupo controle. Tal fato contrastou com a expressão reduzida desses genes para o mesmo período em plântulas desses cultivares, após a inoculação fúngica. Além disso, foi observado que, nos cultivares suscetíveis “Sids-12” e “Avocet-S”, a expressão dos genes PR1 se mostrou induzida nas primeiras 24h, sendo reprimida no período após 72h.

Em conformidade com esses achados, ao avaliar o comportamento de cinco variedades suscetíveis e cinco variedades resistentes de tomate ao fungo *A. alternata* (23), foi observado que em cultivares adultos a expressão do gene PR1 foi elevada em todos os genótipos resistentes inoculados, com maior expressão observada nas variedades “Esfahan local”, “Rio Grande” e “H.a.s 2274”. Nas plantas suscetíveis, a indução do gene PR1 foi observada

apenas nos cultivares adultos “Hedieh” e “Chief Falat”. Em contrapartida, no estágio de plântula o nível de expressão do gene PR1 foi significativamente induzido em todas as variedades resistentes infectadas mesmo após 20 dias de inoculação em comparação com o controle.

Em confronto os resultados supracitados e ainda utilizando variedades de tomate, foi desenvolvido um estudo (26) que, entre os achados obtidos, está a significativa indução de dois genes PR1 (PR1a e PR1b) avaliados em folhas da variedade suscetível “Pusa Ruby” de tomateiro, enquanto esses mesmos genes foram reprimidos na variedade resistente “Hawaii7996”, ambos após 48h e 96h de exposição a *R. solanacearum*. Além disso, maior nível de indução dos genes foi relatado na variedade suscetível “Pusa Ruby”, tratada com 50 μ M SA após 24 e 48h, tanto nas plantas expostas como nas não expostas a infecção por *R. solanacearum*.

Seguindo essa mesma linha, em um trabalho utilizando folhas da cultivar de cana-de-açúcar “ROC22” resistente ao fungo *A. avenae subsp. Avenae* (28), foi encontrada elevada indução ScPR1 24h após a inoculação, com um aumento 11 vezes maior de expressão em comparação ao controle ($p < 0.01$). Em contraste, nas folhas da cultivar “MT11-610”, suscetível ao agente biológico analisado, o nível máximo de expressão do gene foi observado em 48h, com 6,3 vezes aumento de expressão em relação ao controle. No geral, ScPR1 foi expresso mais rápido e em maior nível na cultivar resistente em contraposição a cultivar suscetível, após a inoculação com o patógeno.

Em uma abordagem diferente, ao avaliar o padrão de expressão de PR1 nas raízes de genótipos de cevada submetidos à infecção por *R. solani* (17), foi verificado que os cultivares domesticados “Yusuf” e “Jolgeh” apresentaram elevados níveis de indução do referido gene cinco dias após a infecção por *R. solani* quando comparados ao grupo controle ($p < 0.01$) e aos cultivares selvagens TN374 e S09. Isso indicou que as variedades avaliadas de cevada domesticadas, possivelmente, apresentam maior poder de resposta a *R. solani* que suas contrapartes selvagens.

A partir do exposto, é possível inferir que PR1 potencialmente exerce proeminente influência no aspecto de resistência e suscetibilidade dos cultivares analisados, estando a sua maior indução gênica presente especialmente em variedades resistentes a partir de 24h após a exposição ao patógeno (28, 13, 21, 23), podendo se estender entre o 14º (21) até o 20º dia após a inoculação em algumas espécies (23). Dessa forma, essa família gênica se apresenta como elemento promissor para o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem induzir a sua transcrição, de modo a promover respostas efetivas na defesa vegetal contra organismos patogênicos.

ESTRATÉGIAS PROMOTORAS DE MAIOR INDUÇÃO DE PR1 DURANTE PROCESSOS INFECCIOSOS

Como relatado, muitos estudos abordam a associação existente entre a indução da expressão gênica da família PR1 e a acentuada resposta de defesa vegetal contra fitopatógenos (5). No entanto, de acordo com a literatura (9), alguns agentes invasores são capazes de inibir a expressão da família gênica PR1. Entre os achados do referido estudo,

foi encontrado que *Phytophthora sojae* e *Fusarium virguliforme* reprimiram sistematicamente a expressão dos genes PR-1 em soja (*G. max*), sugerindo que esses fungos podem regular negativamente a transcrição desses genes e influenciar no agravamento da doença. Dessa forma, alguns trabalhos foram desenvolvidos visando explorar potenciais meios de promoção da expressão de PR1 durante processos infecciosos. Entre esses, foi avaliado a expressão de PR1 em folhas de tomate-cereja (*S. lycopersicum*) tratadas com ácido hexanóico (HA) e expostos à infecção por *A. solani* (22). Os autores observaram respectivos aumentos gradativos da expressão do gene em 24, 48 e 72h após a infecção. Além disso, foi constatado que a expressão de PR1 nos tratamentos inoculados com 1mM do HA após 72h de aplicação do fungo foi 57% maior quando comparado ao grupo controle e não tratado com o composto mencionado, havendo diferença significativa entre ambos.

Nessa mesma linha, outro grupo de pesquisa (14) objetivou investigar a expressão de genes PR1 induzidos por nanopartículas de quitosana e a sua implicação em cultivares de tomate-cereja (*S. lycopersicum*) submetidos a infecção por *F. andiyazi* (14). Nas raízes de tomate e quando comparado ao grupo controle ($p < 0.01$), os autores constataram maior indução da expressão de PR1 mediada por nanopartículas de quitosana, 48h após a inoculação do patógeno. A elevação da expressão desses genes também foi significativamente maior quando comparado a inoculação exclusivamente com quitosana. Dessa forma, os resultados apontam para o potencial desses elementos enquanto nanopartículas influenciadoras do processo de resistência sistêmica adquirida da planta por meio da maior ativação de PR1.

De forma semelhante, foi observado que plântulas de tabaco (*Nicotiana glutnosa*) apresentaram maior resistência ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) quando submetida ao tratamento com óleo essencial de citral (*L. cubea*) na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{m}$ (22). O estudo utilizou como biomarcador molecular um gene PR1, identificando que em *N. glutnosa* tratada com 500 $\mu\text{g}/\text{m}$ de citral houve elevado nível de indução desse gene nas suas folhas, 24h após a exposição ao TMV e a *E. cucurbitacearum*, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. À vista disso, o tratamento com citral influenciou no desencadeamento da RSA da planta quando comparado ao controle ($p < 0.01$).

Em conformidade com esses achados e também utilizando tabaco, foram avaliadas as estratégias de defesa da planta contra TMV e *P. nicotianae* (25). Os autores desse estudo observaram que após três aplicações da mistura de extratos das plantas *S. flavescens* e *F. suspense* combinada com agentes químicos, a expressão de PR-1 na espécie submetida à infecção por TMV e *P. nicotianae* aumentou em seis vezes quando comparados ao grupo controle. Ao serem utilizados separadamente, entretanto, tanto o extrato da planta quanto os agentes químicos induziram PR1 de forma menos eficaz. Dessa forma, o estudo demonstrou que o extrato foi capaz de induzir PR1 auxiliando no controle da infecção e apresentando como uma alternativa potencial ao controle das doenças em tabaco.

De forma semelhante, em outro trabalho, foi constatado que ao realizar o tratamento com lisina (0.1 mM) em folhas de pêra infectada por *A. alternata*, houve evidente redução da infecção pelo patógeno fúngico, sendo verificada a diminuição de 43.7 % no diâmetro da lesão após 15 dias de infecção (24). Os autores apontaram que um dos mecanismos

moleculares que, potencialmente, foram envolvidos no controle da doença estiveram associados à maior indução de PR1 mediada pela lisina durante a infecção.

Buscando induzir a expressão de PR1 por meio de hormônios, um recente estudo (15) identificou genes PR1 com elevada indução nas folhas das variedades resistentes de trigo submetidas à infecção por *P. striiformis* e expostas a 1000 µg/m de ácido salicílico, especialmente a partir do 2º até o 7º dia após a infecção, sendo esse resultado significativo quando comparado ao grupo controle. Além disso, também foi constatada significativa e elevada expressão dos transcritos de PR1 nas folhas das variedades suscetíveis e resistentes de trigo [quando expostas a concentração de 150µg/ml ácido abscísico (ABA)], a partir do 1º dia após a infecção por *P. striiformis*.

Seguindo a mesma abordagem de exposição ao ácido salicílico, foi investigado o potencial de defesa de tomates contra *M. javanica* por meio da expressão de PR1, durante o tratamento com o mencionado ácido e *Pseudomonas fluorescens* (rizobactéria que atua como bioagente contra patógenos do solo) (20). Foi evidenciado que as plantas expostas a *M. javanica* e inoculadas com ácido salicílico e *P. fluorescens* apresentaram maiores níveis de indução do gene PR1 após 48h de aplicação do estresse quando comparadas às plantas que foram tratadas exclusivamente com *P. fluorescens* ou ácido salicílico para o mesmo período. Tal diferença foi diretamente implicada na redução da infecção de *M. javanica* no tomateiro.

Sob outra perspectiva e utilizando uma abordagem diferente, foi identificado por meio de outro estudo (27), que o cultivar transgênico *A. thaliana* NtabSPL6-2 apresentou em suas folhas níveis significativamente maiores de indução de PR1 quando comparadas as plantas *A. thaliana* selvagem no 2º dia após a infecção por *P. syringae*. Os achados apontam PR1 como um biomarcador molecular indicativo da melhora da RSA mediada pelo gene inserido, NtabSPL6-2. Esse está envolvido no mecanismo de resposta defesa de *Nicotina benthamiana* contra patógenos.

Como evidenciado, os estudos recentes supracitados apresentaram como enfoque a investigação de meios alternativos que promovam maior expressão de PR1 durante o ataque de fitopatógenos em diferentes vegetais. Alguns achados apontam para resultados positivos utilizando estratégias como aplicação de ácido hexaônico (18), transgenia (27) ou nanopartículas de quitosana (14). Outra metodologia avaliada explorou formas de induzir a expressão de PR1 através da aplicação de diferentes concentrações de hormônios, como ácido salicílico (20, 15), o qual naturalmente induz a transcrição de PR1 m plantas durante estresses bióticos (4).

CONCLUSÕES

Em síntese, por meio do presente estudo, é possível inferir que a expressão dos genes pertencentes à família PR1 em vegetais exerce importante papel no controle de agentes infecciosos, especialmente organismos fúngicos que atingem Viridiplantae. Ademais, foi evidenciada forte associação entre a indução de PR1 e o seu papel na resistência de cultivares pertencentes a diferentes espécies de interesse econômico, como tomate, banana, trigo, tabaco, batata e entre outros. Interessantemente, estudos demonstraram que a indução

desses genes pode se iniciar 24h após a inoculação do patógeno e se estender até o 20º após a exposição ao estresse em alguns vegetais.

Outro aspecto observado diz respeito aos trabalhos encontrados na literatura que visam investigar meios de potencializar a indução de PR1 em plantas durante ataques por fitopatógenos. As metodologias empregadas para esse fim têm se mostrado eficientes e se dividem entre tecnologias com maior grau de complexidade, como o uso nanopartículas de quitosana e transgênicos e, com menor grau de complexidade, tal como a utilização do hormônio ácido salicílico, um indutor natural de PR1 em quadros infecciosos.

A presente revisão contribui para a maior compreensão sobre a importância do papel da família PR1 frente ao combate de organismos patogênicos, bem como para o seu potencial uso enquanto alvo a ser explorado por novas tecnologias voltadas para o melhoramento genético e que buscam ampliar a resistência de cultivares de interesse agrônomo contra diversas doenças.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi desenvolvido com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através da concessão da bolsa de Mestrado.

REFERÊNCIAS

1. Savary S, Willocquet L, Pethybridge S J, Esker P, McRoberts N. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol.* 2019; 3: 430–439.
2. Fones HN, Bebbler DP, Chaloner TM. Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. *Nat Food.* 2020; 1: 455-456.
3. Breen S, Williams SJ, Outram M, Kobe B, Solomon P S. Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1. *Trends in plant science.* 2017; 22: 871–879.
4. Ali S., Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological research.* 2018; 212: 29–37.
5. Irigoyen M L, Garceau DC, Bohorquez-Chaux A. Genome-wide analyses of cassava *Pathogenesis-related (PR)* gene families reveal core transcriptome responses to whitefly infestation, salicylic acid and jasmonic acid. *BMC Genomics.* 2020; 21: 93-104.
6. Jain D, Khurana J P. Role of Pathogenesis-Related (PR): Proteins in Plant Defense Mechanism and Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction. Springer. 2018; 12: 124 - 136.

7. Vandenberg N, Berger DK, Hein I, Birch PR, Wingfield MJ, Viljoen A. Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Mol Plant Pathol*. 2007; 8 :333-41.
8. Kazan K, Gardiner DM. Targeting pathogen sterols: Defence and counterdefence? *PLoS Pathology*. 2012; 13.
9. Almeida-Silva F, Venancio TM. Pathogenesis-related protein 1 (PR-1) genes in soybean: Genome-wide identification, structural analysis and expression profiling under multiple biotic and abiotic stresses. *Gene*. 2022; 809: 146-213.
10. Anisimova, OK, Shchennikova, AV, Kochieva, EZ, Filyushin MA. Pathogenesis-Related Genes of PR1, PR2, PR4, and PR5 Families Are Involved in the Response to *Fusarium* Infection in Garlic (*Allium sativum* L.). *Int. J. Mol. Sci.* **2021**; 22: 66-88.
11. Manghwar H, Hussain A, Ali Q, Saleem MH, Abualreesh MH, Alatawi, A. Disease Severity, Resistance Analysis, and Expression Profiling of Pathogenesis-Related Protein Genes after the Inoculation of *Fusarium equiseti* in Wheat. *Agronomy*. **2021**; 11, 21-34.
12. Anuradha C, Chandrasekar A, Backiyarani S, Thangavelu R, Giribabu P, Uma S. Genome-wide analysis of pathogenesis-related protein 1 (PR-1) gene family from *Musa* spp. and its role in defense response during stresses. *Gene*. 2022;821:146334.
13. Esmail SM, Aboulila AA, El-Moneim DA. Variation in several pathogenesis - Related (PR) protein genes in wheat (*Triticum aestivum*) involved in defense against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2020;112:101545.
14. Chun SC, Chandrasekaran M. Chitosan and chitosan nanoparticles induced expression of pathogenesis-related proteins genes enhances biotic stress tolerance in tomato. *Int J Biol Macromol*. 2019;125:948–54.
15. Aboulila AA. Efficiency of plant growth regulators as inducers for improve systemic acquired resistance against stripe rust disease caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in wheat through up-regulation of PR-1 and PR-4 genes expression. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2022;121:101882.
16. Butassi E, Novello MA, Lara MV. *Prunus persica* apoplastic proteome analysis reveals candidate proteins involved in the resistance and defense against *Taphrina deformans*. *J Plant Physiol*. 2022;276:153780.
17. Abbasi S, Eslahi N. Improved defense responses in modern barley cultivars compared to wild relatives against *Rhizoctonia solani*. *Rhizosphere*. 2022;21:100442.
18. Rabiei Z, Hosseini S, Dehestani A, Pirdashti H, Beiki F. Exogenous hexanoic acid induced primary defense responses in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants infected with *Alternaria solani*. *Sci Hortic*. 2022;295:110841.
19. Luo X, Tian T, Feng L, Yang X, Li L, Tan X, et al. Pathogenesis-related protein 1 suppresses oomycete pathogen by targeting against AMPK kinase complex. *J Adv Res* [Internet]. 2022 [acesso em 19 de agosto de 2022]; Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123222000339>
20. Dehghanian SZ, Abdollahi M, Charehgani H, Niazi A. Combined of salicylic acid and *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on the expression of PR1 gene and control of *Meloidogyne javanica* in tomato. *Biol Control*. 2020;141:104134.

21. Farrakh S, Wang M, Chen X. Pathogenesis-related protein genes involved in race-specific all-stage resistance and non-race specific high-temperature adult-plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in wheat. *J Integr Agric.* 2018;17(11):2478–91.
22. Jiang Y, Ji X, Zhang Y, Pan X, Yang Y, Li Y, et al. Citral induces plant systemic acquired resistance against tobacco mosaic virus and plant fungal diseases. *Ind Crops Prod.* 2022;183:114948.
23. Moghaddam GA, Rezayatmand Z, Nasr Esfahani M, Khozaei M. Genetic defense analysis of tomatoes in response to early blight disease, *Alternaria alternata*. *Plant Physiol Biochem.* 2019;142:500–9.
24. Liu Y, Li Y, Bi Y, Jiang Q, Mao R, Liu Z, et al. Induction of defense response against *Alternaria* rot in Zaosu pear fruit by exogenous L-lysine through regulating ROS metabolism and activating defense-related proteins. *Postharvest Biol Technol.* 2021;179:111567.
25. Wang R, Wang S, Pan W, Li Q, Xia Z, Guan E, et al. Strategy of tobacco plant against black shank and tobacco mosaic virus infection via induction of PR-1, PR-4 and PR-5 proteins assisted by medicinal plant extracts. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2018;101:127–45.
26. Chaudhary G, Singh D, Sharma M. Effect of chemical elicitors on the differential expression pattern of PR genes in susceptible and resistant cultivars of tomato against bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2021;116:101689.
27. Gao H, Zhang L, Zhang KL, Yang L, Ma YY, Xu ZQ. Tobacco NtabSPL6-2 can enhance local and systemic resistances of *Arabidopsis thaliana* to bacterial and fungal pathogens. *J Plant Physiol.* 2020;253:153263.
28. Chu N, Zhou JR, Rott PC, Li J, Fu HY, Huang MT, et al. ScPR1 plays a positive role in the regulation of resistance to diverse stresses in sugarcane (*Saccharum* spp.) and *Arabidopsis thaliana*. *Ind Crops Prod.* 2022;180:114736.
29. Barleen VP, Belkum AV, Summerbell RC, Crous, PW, Thomma BPHJ. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganism develop crosskingdom host jumps?. *FMS Microbiol.* 2007; 31: 239-277.

DOI: 10.53934/9786585062046-10

Capítulo 10

CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FATORES GENÉTICOS LIGADOS AO DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DE CODORNAS DE CORTE

¹*Gleissa Mayone Silva Vogado  0000-0002-7832-1707; ²Luciano Pinheiro da Silva  0000-0001-9342-5232

¹*Autor correspondente (Corresponding author) – Email: gleissamsv@gmail.com

*Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará (UFC)
Fortaleza, CE, Brasil.*

Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil.

RESUMO

As codornas japonesas apresentam diversas características favoráveis para o sistema de produção, como a alta produtividade, rápida taxa de crescimento, maturidade sexual precoce, rápido retorno financeiro e baixo investimento inicial, tamanho corporal pequeno e taxa significativa de produção de ovos em comparação com outras aves domésticas. Sabe-se que características produtivas e reprodutivas se correlacionam geneticamente de maneira oposta para variáveis de interesse econômico em populações de interesse zootécnico. A seleção das codornas para dupla aptidão deve ser estabelecida de maneira a atender a finalidade do sistema de produção. No início da puberdade, o testículo nas aves passa por profundas modificações durante a espermatogênese e estas são muito semelhantes entre as espécies. Dessa forma, o peso testicular pode ser considerado um indicativo de fertilidade, uma vez que a redução no peso normalmente está associada à redução na espermatogênese e, na capacidade reprodutiva das aves, assim como na redução dos níveis de testosterona. Geralmente, as fêmeas possuem o ovário e o oviduto direito atrofiados, sendo que essas estruturas aumentam de tamanho apenas durante a época de reprodução. O fato de essas estruturas estarem atrofiadas de um lado e aumentarem de tamanho somente na época de reprodução é uma adaptação ao voo. Objetivou-se com esta pesquisa, fazer um relato sobre características anatômicas e fatores genéticos ligados ao desenvolvimento reprodutivo de codornas de corte.

Palavras-chave: Coturnicultura; Fertilidade; Maturidade sexual; Reprodução.

INTRODUÇÃO

A produção de codornas de corte e postura tem se desenvolvido de forma expressiva, sendo uma boa alternativa para obtenção de produtos com alto valor nutricional para a população. Além disso, consolida-se cada vez mais, como uma opção econômica satisfatória, em virtude do crescimento do mercado consumidor tanto para

ovos como para carne, e a expansão desta cultura em função dos avanços com a sanidade, nutrição e melhoramento animal (Mori et al., 2005).

As codornas são originárias do norte da África, Europa e da Ásia, pertencendo à Família dos Fasianídeos (Phasianidae) e da Subfamília dos Perdicionidae, mesmo grupo das galinhas e perdizes, respectivamente (Pinto et al., 2002).

Na região do extremo oriente, iniciou-se a domesticação das codornas obtendo-se como resultado, *Coturnix japonica* ou codorna japonesa. Estudos e cruzamentos visando a produção de carne e ovos iniciaram a partir de 1910 (Reis, 1980; Leal Junior, 2006; Bertechini, 2010).

No Brasil, as codornas foram introduzidas em 1959 (Almeida et al., 2013) e tem apresentado um desenvolvimento acentuado nos últimos anos, e mesmo sendo uma atividade, tida como de “fundo de quintal” e de subsistência, passou a ser considerada altamente tecnificada, com resultados promissores aos produtores.

A coturnicultura brasileira é predominantemente voltada para produção de ovos, sendo a codorna japonesa a espécie mais difundida no país. Entretanto, a carne de codorna é considerada uma iguaria e quase que totalmente desconhecida pela população (REIS, 2011). Mostra-se uma excelente estratégia para a segurança e sustentabilidade alimentar de regiões sem muitos recursos naturais, já que esses animais produzem ovos precocemente, iniciando a postura por volta dos 40 dias de idade (Jordão Filho, 2008; Silva, Costa, 2009).

A alta produtividade, rápida taxa de crescimento, maturidade sexual precoce, rápido retorno financeiro e o baixo investimento inicial, bem como o mercado consumidor, que a cada dia procura por carne de qualidade diferenciada, e que tenha um atributo de valor diferenciado, tornam a coturnicultura de corte uma atividade altamente promissora no país (Silva et al., 2009).

A codorna além de, produzir ovos e carcaça de excelente qualidade e valor nutricional, também tem como finalidade a venda dos animais ou até mesmo o uso do esterco como adubo na agricultura, apresenta fácil manejo e baixo custo inicial para implantação, o que a torna uma prática ainda mais rentável e aconselhável. Dentro deste contexto, a coturnicultura destaca-se cada vez mais, com números crescentes e se concretizando no cenário nacional, o que leva à demanda por material genético de qualidade (Medeiros, 2014).

Sabe-se que características produtivas e reprodutivas se correlacionam geneticamente de maneira oposta para variáveis de interesse econômico em populações de interesse zootécnico. Por isso, a seleção das codornas para dupla aptidão deve ser estabelecida de maneira a atender a finalidade do sistema de produção. A seleção na coturnicultura de corte na maioria das vezes é baseada no peso corporal das codornas, pois esta característica é de fácil mensuração. Já a seleção para postura é baseada entre outros fatores, na qualidade e na produção de ovos, como idade a primeira postura, quantidade de ovos produzidos por semana e pelo ciclo de vida da ave. (Silveira, 2018).

FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE AVES: ANATOMIA DAS CODORNAS

O sistema reprodutor das aves é morfologicamente semelhante entre as espécies domésticas e selvagens, apesar de existir uma ampla variedade de hábitos reprodutivos e adaptações comportamentais e morfológicas, principalmente entre as espécies silvestres

(Johnson, 2006). O ciclo reprodutivo das aves está diretamente ligado a fatores ambientais e manejo. Fatores como luminosidade, temperatura e higiene, combinados com uma alimentação balanceada, são essenciais para a reprodução, bem como para todo o ciclo das aves.

Na maioria das espécies avícolas, os indivíduos machos não apresentam órgão copulador, enquanto algumas poucas espécies apresentam um falo rudimentar. Os machos apresentam dois testículos, sendo o testículo esquerdo maior do que o testículo direito, dos quais saem os canais deferentes, que terminam na cloaca. As glândulas genitais acessórias estão ausentes. A transferência dos espermatozoides do macho para o corpo da fêmea se dá através da justaposição das cloacas que ocorre durante a cópula.

Geralmente, as fêmeas possuem o ovário e o oviduto direito atrofiados, sendo que essas estruturas aumentam de tamanho apenas durante a época de reprodução. O fato de essas estruturas estarem atrofiadas de um lado e aumentarem de tamanho somente na época de reprodução é uma adaptação ao voo.

Araújo et al. (2017), citam fatores relacionados a qualidade imunológica de pintainhos de codornas, como a idade da matriz, período de armazenamento e temperatura de armazenamento melhoramento genético, nutrição, manejo sanitário, incubação artificial e o controle da temperatura ambiente são fundamentais para o desenvolvimento do setor de coturnicultura. Dentre esses fatores, a temperatura ambiente do local de criação, é considerada como o principal fator de estresse, e consequentemente responsável pelo sucesso ou fracasso de uma empresa avícola (Sousa et al. 2014).

Reprodução

A atividade reprodutiva das aves é uma consequência da relação de estímulos externos ambientais como fotoperíodo, temperatura, disponibilidade de alimentos, comportamentais, estresse, presença do parceiro, bem-estar e por mecanismos neuroendócrinos (Sobreira et al., 2011). De acordo com Johnson (2006), o fotoperiodismo é considerado um fator ambiental importante na reprodução das aves, responsável por conciliar as estações reprodutivas com a época ótima do ano para a sobrevivência da prole.

Acasalamento

A capacidade de acasalamento tanto em galos quanto em machos de codornas envolve a sincronização de padrões de estímulo-resposta, que evoluiu para garantir a transferência bem-sucedida de sêmen do macho para a fêmea. Os espermatozoides apresentam prolongada sobrevivência no oviduto das aves, o que possibilita a postura de ovos galados por período maior (Mello, 2000).

A idade das fêmeas e machos, são em média 42 e 48 dias de idade, respectivamente, para o acasalamento, sendo que a fertilidade é mantida por volta de 6 meses após início. O sistema de acasalamento comumente utilizado, é a proporção de um macho para cada duas ou três fêmeas, pois propicia maiores índices de eclosão e fertilidade dos ovos, para incubação (Lima et al., 2008). Fabichak (2004) descreve um bom acasalamento com a seguintes características: os machos devem ter órgãos genitais bem desenvolvidos, devem ser espertos, não serem agressivos e cantarem de forma contínua.

HORMÔNIOS LIGADOS AO DESENVOLVIMENTO SEXUAL

Em aves, o desenvolvimento embrionário ocorre fora do corpo da fêmea, sendo então classificadas como ovovíparas. A diferenciação morfológica das gônadas nas aves é regulada pelos níveis séricos de estrógenos, iniciando nas codornas no quinto dia do desenvolvimento embrionário (Mattsson e Brunström, 2017), sendo que o eixo hormonal responsável por todo metabolismo reprodutivo da ave, hipotálamo-hipófise-gônadas, está completamente desenvolvido aos 13 dias de incubação (Rutz et al., 2007).

Na maioria das aves, as características sexuais secundárias (crista, barbela e plumagem) têm sido usadas como indicadores externos do sexo e determinam a maturidade sexual (Biswas et al., 2010). Os sinais da puberdade em codornas macho, é uma espuma formada pela glândula cloacal, e o primeiro ovo produzido pelas fêmeas.

Machos

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) mantêm o crescimento e a diferenciação da maioria dos tipos de células através do controle endócrino, autócrino e parácrino. Eles desempenham um papel crucial na reprodução aviária, pois aceleram a síntese de hormônios esteroides gonadais dependentes da dose, proliferação celular, seleção e inibição do apoptose folicular pela inibição da formação de oligonucleossomos (Johnson et al., 2001).

A sinalização do IGF-I está altamente envolvida na regulação do número final de células de Sertoli durante o período pré-púbere (Pitetti et al., 2013). Ainda na diferenciação de espermatogônias e células de Leydig (Yoon e Roser, 2010), regulação da síntese de DNA espermatogonial (Wang et al., 2014) e um aumento direto/indireto da produção de testosterona em células de Leydig (Yoon e Roser, 2010). Portanto, o sistema IGF afeta significativamente o desenvolvimento e as funções dos órgãos reprodutivos (Fu et al., 2001).

As mudanças de tamanho das gônadas associadas à puberdade são decorrentes do aumento da produção de hormônios esteroides (Ruiz-Cortés, 2012). O aumento do nível de testosterona é um dos primeiros e importantes sinais da puberdade no macho. Além disso, o tamanho da glândula cloacal e a produção de espuma são dependentes de andrógenos e altamente correlacionados positivamente com o tamanho dos testículos, bem como com a atividade sexual em codornas japonesas pré-púberes (Sachs, 1967). A este respeito, tem sido relatado que o tamanho da glândula cloacal é um bom marcador de desenvolvimento gonadal em codornas machos (Ball e Balthazart, 2010). A nutrição e tipo de dieta podem interferir na maturidade sexual de codornas machos, aumentando a expressão de mRNA de IGF-I e IGF-IR no testículo de codornas japonesa e apresentar maior índice de área de glândula cloacal (Khoobbakht et al., 2020).

O IGF desempenha uma ação autócrina e/ou parácrina no testículo (Fu et al., 2001; Yoon e Roser, 2010). A sinalização do IGF-I está altamente envolvida na regulação da função e número final de células de Sertoli durante o período pré-puberal, que tem um papel crucial na futura fertilidade masculina (Pitetti et al., 2013).

Alguns fatores ligados a nutrição podem afetar a expressão gênica da família IGF por meio de fatores de transcrição (Jackson et al., 2008). A deficiência de zinco afeta os sistemas de sinalização da membrana e os segundos mensageiros intracelulares que

coordenam a proliferação celular em resposta ao IGF-I (Macdonald, 2000). Foi relatado que os testículos de camundongos nulos de IGF-I foram reduzidos em tamanho. Além disso, verificou-se que eles possuíam um número menor de células de Leydig. De acordo com este estudo, as concentrações plasmáticas de testosterona foram menores do que as observadas em camundongos selvagens (Griffeth et al., 2014). Os IGFs suportam a espermatogênese por meio da estimulação da síntese de DNA mitótico nos túbulos seminíferos (Söder et al., 1992). Portanto, acredita-se que condições nutricionais, como a suplementação da dieta de codornas machos pré-púberes pode melhorar a sinalização celular envolvida no início da puberdade via aumento da expressão do gene da família IGF.

Fêmeas

Os papéis do sistema IGF no desenvolvimento folicular foram amplamente examinados em mamíferos e aves, e ficou claro que o sistema IGF é o regulador chave para o desenvolvimento e função ovariana (Fu et al., 2001). No entanto, pouco se sabe sobre a ação dos genes do sistema IGF no desenvolvimento do oviduto aviário. Apenas um estudo demonstrou a regulação do desenvolvimento da expressão do gene IGF-I no oviduto de codornas (Kida et al., 1998). O mRNA do IGF-I é produzido mais abundantemente quando o oviduto se desenvolve muito rapidamente, sugerindo que o IGF-I exerce suas ações autócrinas e/ou parácrinas no desenvolvimento desse órgão. A expressão de mRNA de IGF-I aumenta abruptamente quando o peso do oviduto excede 0,05 g e diminuiu rapidamente quando o peso do oviduto é superior a 2,88 g. Este perfil de mRNA de IGF-I no oviduto em desenvolvimento é diferente do observado no testículo de codorna (Fu et al., 2001).

O rápido crescimento do tamanho do oviduto é causado pela proliferação celular e diferenciação do magno (a parte principal do oviduto), e o desenvolvimento posterior (acima de 2,3 g de peso) é causado pelo acúmulo de produtos de secreção como a ovalbumina (Pageaux et al., 1986). Em conjunto, esses resultados sugerem fortemente que o IGF-I desempenha um papel importante na proliferação e diferenciação celular do oviduto de codornas, funcionando como um regulador autócrino e/ou parácrino.

O ovário é importante na reprodução feminina, pois desempenha um papel essencial no desenvolvimento sexual. O desenvolvimento ovariano é mediado principalmente por hormônios sexuais produzidos pelo eixo reprodutivo (Johnson, 2015). O estradiol é liberado pelo ovário e é importante para regular a diferenciação e o desenvolvimento gonadal, promover o desenvolvimento folicular e estimular a reprodução feminina (Elnaga e Abd-Elhady, 2009). O estradiol é sintetizado no ovário pelas principais proteínas e enzimas esteroidogênicas, como a proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR), clivagem da cadeia lateral do citocromo P450 (P450_{scc}), 17 α -hidroxilase (Cyp17), 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD) e citocromo P450 aromatase (P450_{arom}). Além disso, as ações do estrogênio são reguladas por dois tipos diferentes de receptores intracelulares, ER α e ER β (Johnson, 1990; Proszkowiec-Węglarz et al., 2005). A supressão da tireoide em galinhas adultas está associada à redução do peso do ovário e da produção de ovos e até mesmo à interrupção da postura (MCNABB, 2007; PEEBLES et al., 1994).

RELAÇÕES ENTRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS

A criação de codornas japonesas apresenta diversas características favoráveis, dentre as quais podemos destacar a taxa de crescimento rápido, maturidade sexual precoce, intervalo de geração curto, tamanho corporal pequeno e taxa significativa de produção de ovos em comparação com outras aves domésticas (Ozsoy e Aktan, 2011; Narinc et al., 2014; Molino et al., 2015).

A idade é um fator oposto ao sucesso reprodutivo nas aves. A relação da idade com o decréscimo na reprodução é muito bem estudado em galinhas matrizes, levando em consideração fatores principais como: a redução na produção de ovos (Robinson; Hardin; Robblee, 1990); a provável redução da habilidade de reter espermatozoides nas glândulas da junção útero-vagina, local de estocagem dos espermatozoides (FASENKO; ROBINSON; HARDIN, 1992); involução na habilidade de transportar esses espermatozoides para o local de fertilização e a possível redução no número de receptores para espermatozoides na superfície do oócito (Bramwell; Marks; Howarth, 1995).

Analisando um trabalho com codornas, Lopes et al. (2008), obtiveram expressiva variabilidade genética com herdabilidades crescentes ao longo do período de 1 a 42 dias de idade, especialmente a partir dos 14 dias de idade, podendo-se concluir que correlações genéticas entre as diversas idades a seleção já teria sucesso se realizada nas idades mais jovens, exceção ao peso corporal ao nascer e aos sete dias. Isto ocorre, possivelmente, porque na primeira semana de vida, o ambiente de criação exerce influência muito variada sobre os indivíduos.

Quando os dias necessários para produzir os dez primeiros ovos (DN10) são incluídos como critério de seleção, o mérito total das características de produção e crescimento de ovos foi melhorado e apresentou correlação genética favorável com características de produção em codornas japonesas, aumentando a rentabilidade de tais programas de seleção (Mahmoud et al. 2014, 2015).

Ao analisar reprodutores de codornas de postura (japonesas) dos 70 aos 180 dias, Amoroso et al. (2008) relataram que o peso corporal não diferiu entre as idades e obtiveram uma média de $144,47 \pm 15,58$ g, peso relativo testicular de 2,08% e o peso testicular, com média de $3,00 \pm 0,51$, próximas as encontradas nesse trabalho, que foram de $3,59 \pm 0,08$ para codornas de corte e $2,49 \pm 0,05$ para codornas de postura. Clulow e Jones (1982) descreveram que em codornas maduras sexualmente os testículos podem representar cerca de 2,26% do peso vivo dos animais.

Biswas et al. (2007) relataram uma alta e significativa correlação entre o peso testicular e os níveis de testosterona e de índice glandular para a glândula cloacal em codornas japonesas. Dessa forma, o peso testicular pode ser considerado um indicativo de fertilidade, uma vez que a redução no peso normalmente está associada à redução na espermatogênese e, portanto, na capacidade reprodutiva das aves, assim como na redução dos níveis de testosterona.

As aves apresentam uma desigualdade testicular, podendo ser observada nos machos de codornas de corte e de postura. O mais comumente citado em aves, é que o testículo esquerdo seja o maior, mas há exceções e aves com testículos proporcionalmente iguais, assim como espécies com o testículo direito maior (Briskie e Montgomerie 2007).

Friedmann (1927) estudou 169 gêneros de aves silvestres e observou que na maioria dos casos os testículos possuíam tamanho semelhante, mas encontrou espécies em que ora o testículo esquerdo, ora o direito, eram maiores. Em galos, o testículo

esquerdo é maior do que o direito em 67% dos galos, mas apresentam peso semelhante (Hocking 1992). Também nas aves estudadas por Marvan (1969) o testículo esquerdo era maior em 65,3% dos casos. Sobre este aspecto Möller (1994) propôs que a alta qualidade reprodutiva dos machos estava relacionada com uma maior assimetria, no entanto esta hipótese tem sido desconsiderada em trabalhos posteriores em que a habilidade reprodutiva dos machos não esteve associada a presença ou não da assimetria testicular (Birkhead et al. 1998).

Fisiologicamente, de acordo com Froman et al. (2004), a espermatogênese em aves consiste em um processo complexo de proliferação celular, redução haploide e diferenciação celular, sendo que a duração estimada da espermatogênese em codornas é de 12,8 dias, tempo o suficiente para que uma espermatogônia se transforme em 32 espermatozoides.

As características do parênquima testicular nas codornas jovens e adultas estudadas foram também descritas por Froman et al. (2004) em outras espécies, com túbulos seminíferos com uma simples camada de célula de sustentação nos imaturos e em aves adultas encontraram-se com formato irregular alinhados por um epitélio germinativo de múltiplas camadas.

Tanaka e Yasuda (1980) realizaram estudos em galos observando as mudanças histológicas causados nos testículos. Os autores observaram que houve redução de células espermáticas e decréscimo no diâmetro dos túbulos seminíferos, assim como uma rápida redução do peso testicular, insinuando assim, a degeneração dos túbulos seminíferos em aves idosas.

Em codornas já analisadas, tanto nas de corte quanto nas de postura, as médias de altura do epitélio germinativo bem como o diâmetro dos túbulos seminíferos foram semelhantes durante a vida adulta até os 360 dias analisados, não havendo diferença ($P>0,05$), o que pode ser explicado pela constância de 17 horas luz durante a idade adulta, associado ao fato dos machos estarem todo o período com as fêmeas, estimulando a copulação e o comportamento reprodutivo.

Em um estudo com codornas japonesas, Rospigliosi e Figueroa (2003), analisaram os testículos durante as primeiras 8 semanas de vida. Na terceira semana foram descritos espermátócitos primários e espermatogônias nos túbulos seminíferos e com 8 semanas citam que os testículos direito e esquerdo apresentaram comprimento médio de $5,2\pm 1,3\text{mm}$ e $4,5\pm 1,0\text{mm}$, respectivamente, porém sem espermatozoides nos túbulos seminíferos. Os autores não citaram detalhes da criação das aves, o que pode levar variações a consideráveis no surgimento da puberdade e na maturidade sexual das aves.

No início da puberdade, o testículo nas aves passa por profundas modificações durante a espermatogênese e estas são muito semelhantes entre as espécies. Em galos domésticos, as primeiras 5 semanas, os túbulos começam a se organizar, multiplicando as células da camada basal (espermatogônias) e o início da puberdade é caracterizado pelo rápido aumento dos testículos e compleção dos espermatozoides (Johnson, 1986). Em codornas fotoestimuladas, os espermatozoides podem ser detectados aos 26 dias no testículo e aos 30 dias no ducto deferente (Ottinger e Brinkley, 1979). Desta forma podem-se considerar as codornas em puberdade quando são observados espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos. Nos reprodutores estudados, com programa de luz a partir de 35 dias, isso foi observado nos cortes histológicos aos 55 dias.

Correlações genéticas

A importância do estudo das correlações está em avaliar o impacto que a seleção para determinada característica pode causar em outra geneticamente relacionada. A correlação genética entre duas características é a correlação entre os efeitos dos genes que as influenciam. Esta correlação pode ser positiva, quando ambas as características se desenvolvem no mesmo sentido, aumentando ou diminuindo seus valores; ou negativa, quando as características tomarem sentidos opostos, neste caso, ocorre o acréscimo de uma e decréscimo da outra. (Winter, 2005)

De acordo com Winter et al (2006), a característica peso aos sete e aos 28 dias, a correlação genética é moderada e de magnitude superior a 0,45. Quanto ao peso aos 14 dias, o resultado de 0,73 indicou alta correlação genética com o peso aos 28 dias. Entre os P14 e P42, a correlação genética obtida foi de 0,56 e o peso aos 28 dias apresentou alta correlação genética (0,81) com o peso aos 42 dias.

As estimativas descritas por Saatci et al. (2003) para peso aos 7 e 28 dias indicaram altas correlações genéticas (0,82 e 0,94, respectivamente). A relação entre o peso aos 14 dias e peso aos 28 dias encontrada foi 0,90. O peso aos 28 dias e aos 42 dias apresentou valores de correlação genética próximos a 0,81.

Herdabilidades

Alguns trabalhos foram desenvolvidos com intuito de descrever estimativas de herdabilidade para características de desempenho, especialmente para peso corporal de codorna avaliado em diferentes idades.

Avaliando duas linhagens de codornas de corte no período de crescimento, Wenceslau et al. (2007) obtiveram herdabilidades do peso corporal variando de 0,27 a 0,42 para o grupo genético EV1 e de 0,25 a 0,31 para o grupo genético EV2. As estimativas de média a alta magnitude para ambos os grupos genéticos, indicam que as aves podem ser selecionadas em idade inferior a 42 dias e responderão bem à seleção individual.

Bonafé et al. (2007), ao avaliarem duas linhagens de codornas europeias, observaram maiores herdabilidades para peso ao nascer, aos 35 e 42 dias, com valores que variaram de 0,43 a 0,48; concluindo que o número de pesagens poderia ser reduzido na avaliação dos animais e sugerem que a seleção poderia ser realizada aos 35 dias de idade.

Em seu trabalho com codornas de corte, Lopes et al. (2008), obtiveram expressiva variabilidade genética com herdabilidades crescentes ao longo do período de 1 a 42 dias de idade, especialmente a partir dos 14 dias de idade, podendo-se concluir que correlações genéticas entre as diversas idades a seleção já teria sucesso se realizada nas idades mais jovens, exceção ao peso corporal ao nascer e aos sete dias. Isto ocorre, possivelmente, porque na primeira semana de vida, o ambiente de criação exerce influência muito variada sobre os indivíduos.

Akbas et al. (2004) utilizaram modelos de regressão aleatória para estimar parâmetros genéticos em codornas de corte e avaliar a trajetória genética do crescimento. As estimativas de herdabilidade encontradas foram 0,007; 0,39; 0,45; 0,58; 0,61; 0,55; e 0,44, para as sete primeiras semanas de vida, sendo a maior herdabilidade (0,61) observada para peso aos 28 dias de idade. Felipe (2010), ao utilizar também modelos de regressão aleatória, em dois grupos genéticos de codornas de corte (EV1 e EV2),

encontrou para ambos os grupos genéticos valores de herdabilidade que tenderam a ser mais altos no 35º dia de idade (0,30 e 0,23) em relação ao 21º dia de idade (0,15 e 0,15).

CONCLUSÕES

Devem ser realizados estudos, visando avaliar a correlação existente entre as variáveis peso ao nascimento e a idade ao primeiro ovo, já que o aumento do peso corporal na avicultura pode afetar negativamente a fertilidade e aumentar a frequência de ovos inférteis. Assim sendo, as características reprodutivas também devem ser analisadas no ato da seleção, uma vez que estão ligadas a eficiência reprodutiva do animal, sendo a precocidade e a fertilidade, fatores chave para um bom desempenho reprodutivo.

REFERÊNCIAS

1. Móri, C. et al.; Desempenho e rendimento de carcaça de quatro grupos genéticos de codorna para produção de carne. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, p.870-876, 2005.
2. Pinto, R.; Ferreira, A. S.; Albino, L. F. T.; Gomes, P. C.; Vargas, J. G. J.; 2002: Níveis de Proteína e Energia para Codornas Japonesas em Postura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31, 1761-1770.
3. Reis, J. S. 2011: Características da carcaça de uma linhagem de codornas de corte. *Dissertação (Mestrado em Zootecnia)* – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, UFPel.
4. Leal Junior, A. R.; 2006: Efeito da densidade populacional e debicagem sobre a área de fibras musculares (Mm. Gastrocnemius e Pectoralis major) de codornas para corte (*Coturnix* sp). *Dissertação (Mestrado em Zootecnia)* Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de PósGraduação em Ciências Veterinárias, Curitiba.
5. Reis, J. S. 2011: Características da carcaça de uma linhagem de codornas de corte. *Dissertação (Mestrado em Zootecnia)* – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, UFPel.
6. Bertechini, A. G. Situação Atual e Perspectivas Para a Coturnicultura no Brasil. In: IV Simpósio Internacional e III Congresso Brasileiro de Coturnicultura. 2010. Lavras, Minas Gerais.
7. Almeida, T. J. O., de Araújo, V. V., da Silva, A. V., Ferreira, R., Silva, N. D. A. S., Santana, M. D., e Oliveira, V. P., 2013: Evolução da produção de codornas para abate e postura no Brasil. XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX– UFRPE; Recife – PE.

8. Jordão, J.F. Estimativas das Exigências de Proteína e de Energia para Manutenção, Ganho e Produção de Ovos em Codornas. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Zootecnia) -Centro de Ciências Agrárias José Jordão Filho, UFPB, Areia, 2008.
9. Silva, R. M.; Furlan, A. C.; Ton, A. P. S.; Martins, E. N.; Scherer, C.; Murakami, A. E.; 2009: Exigências nutricionais de cálcio e fósforo de codornas de corte em crescimento. Revista Brasileira de Zootecnia, 38, 1509-1517.
10. Medeiros, T. T. B. Desempenho e rendimento de carcaça de codornas de corte originárias de diferentes incubatórios criadas no semiárido Paraibano. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2014.
11. Silveira, L. A. A; efeitos correlacionados da seleção para peso ao nascimento sobre a precocidade em duas populações de codornas de corte. TCC, São João Del Rei-MG, junho, 2018.
12. Johson, P. A. 2006. Reprodução de Aves. p. 691-701. In: Reece, W.O. Dukes. Fisiologia dos Animais Domésticos. 12ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
13. Araújo, I.C.S.D.; Mesquita, M.A.; Café, M.B.; Stringhini, J.H.; Paz, P.H.S.D.; Noletto, R.A.; Leandro, N.S.M. Effect of breeder age and storage conditions of Japanese quail eggs on hatchability, quail neonate quality, and Bursa of Fabricius characteristics. Revista Brasileira de Zootecnia, v.46, n.9, p.731-739, 2017.
14. Sousa, M.S., Ferreira Tinôco, I.D.F., Barreto, S.L.D.T., Amaral, A.G.D., Pires, L.C. & Ferreira, A.S. 2014. Determinação de limites superiores da zona de conforto térmico para codornas de corte aclimatizadas no Brasil de 22 a 35 dias de idade. Rev. Bras. Saúde Prod. Anim. 15(2), 350-360.
15. Sobreira, R.R. et al. Fisiologia reprodutiva das aves. NetSaber - Artigos. 2011. Disponível em: <
http://artigos.netsaber.com.br/resumo_artigo_56882/artigo_sobre_fisiologia-reprodutiva-das-aves.
16. Mello, H.E.S. Aspectos morfológicos das glândulas hospedeiras de espermatozoides na perdiz, *Rhynchotus rufescens* (Temminck, 1815) (aves, Tinamiformes) nas fases do ciclo reprodutivo. 2000. 50f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
17. Lima, M.E.P et al. Codornas – Iniciando a criação. Visçosa, Centro de Produções Técnicas (CTP), 2008.
18. Fabichak, Irineu. Codorna Criação Instalação e Manejo. Editora Livraria Nobel S.A. Ed. 2005.

19. Mattsson, A, Brunstrom B. Effects of selective and combined activation of estrogen receptor α and β on reproductive organ development and sexual behaviour in Japanese quail (*Coturnix japonica*). PLoS One. 2017 Vol. 12(7):e0180548.
20. . Rutz, F.; Ancuti, M. A.; Xavier, E. G.; Roll, V. F. B.; Rossi, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, n. 3, p. 307-317, 2007.
21. Biswas, A.; Ranganatha, O.S; Mohan, J. 2010. The effect of different foam concentrations on sperm motility in Japanese quail. Veterinary Medicine International, 4pages.
22. Johnson, A L. Chapter 28 - Reproduction in the Female. Sturkie's Avian Physiology (Sixth Edition). Pages 635-665. 2001.
23. Pittetti, J.-L., CalveiL, P., Zimmermann, C., Conne, B., Papaioannou, M.D., Aubry, F., Cederroth, C.R., Urner, F., Fumel, B., Crausaz, M., 2013. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. Mol. Endocrinol. Vol. 27, Pages 814–827. 2013.
24. Yoon, M., Roser, J., 2010. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) protects cultured equine Leydig cells from undergoing apoptosis. Animal Reproduction Science 122, 353–358.
25. Wang, S., Wang, X., Wu, Y., Han, C., 2014. IGF-1R signaling is essential for the proliferation of cultured mouse spermatogonial stem cells by promoting the G2/M progression of the cell cycle. Stem Cells Dev. 24, 471–483.
26. Ruiz-Cortés, Z.T., 2012. Gonadal sex steroids: production, action and interactions in mammals. In: Steroids-From Physiology to Clinical Medicine. InTech.
27. Sachs, B.D. Photoperiodic control of the cloacal gland of the Japanese quail. Science. 157, 201–203. 1967.
27. Ball, G.F., Balthazart, J. Japanese quail as a model system for studying the neuroendocrine control of reproductive and social behaviors. Ilar J. 51, 310–325. 2010.
28. Khoobakht, Z.; Mohammad Roostaei-ali Mehr, Mehrdad Mohammadi, Fahimeh Mohammadghasemi, Mohammad Mehdi Sohani, Supplementation of various zinc sources modify sexual development and testicular IGF family gene expression in pre-pubertal male Japanese quail, Research in Veterinary Science, Volume 130, 2020, Pages 87-92, ISSN 0034-5288.

29. Jackson, K.A., Valentine, R.A., Coneyworth, L.J., Mathers, J.C., Ford, D. Mechanisms of Mammalian Zinc-Regulated Gene Expression. Portland Press Limited. 2008.
30. Macdonald, R.S., 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. Journal Nutrition 130, 1500–1508.
31. Griffeth, R.J., Bianda, V., NEF, S. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. Basic Clin. Estados Unidos. Androl. 24, 12. 2014.
32. Soder, O., Bang, P., Wahab, A., Parvinen, M., 1992. Insulin-like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis. Endocrinology. 131, 2344–2350.
33. Johnson, A L. Chapter 28 - Reproduction in the Female. Sturkie's Avian Physiology (Sixth Edition). Pages 635-665. 2015.
34. Kida S, Iwaki M, Nakamura A, et al. Insulin-like growth factor-I messenger RNA content in the oviduct of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*): changes during growth and development or after estrogen administration. Comp Biochem Physiol 1994; 109C: 191–204.
35. Pageaux J.F, Laugier C, Pal D, D’Almeida MA, Sandoz D, Pacheco H. Magnum morphogenesis during the natural development of the quail oviduct: analysis of egg white proteins and progesterone receptor concentration. Biol Reprod 1986; 35: 657–666.
36. Elnaga, S.A.; Abd-Elhady, A.M. Exogenous estradiol: productive and reproductive performance and physiological profile of Japanese quail hens. International Journal Poultry Science, 8 (2009), pp. 634-641.
37. Johnson, AL. Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. Critical Reviews in Poultry Biology. Vol. 2, pp. 319-346. 1990.
38. McNabb, F.M.A. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in birds and its role in bird development and reproduction (Review) Critical Reviews in Toxicology. Vol. 37, Issue 1-2, Pages 163-193. 2007.
39. Ozsoy, A. N., And S. Aktan. 2011. Estimation of genetic parameters for body weight and egg weight traits in Japanese quails. Trends in Anim. Vet. Sci. 2:17–20.
40. Robinson, F. E.; Hardin, R. T.; Robblee, A. R. Reproductive senescence in domestic fowl: effects on egg production, sequence length, and inter-sequence

- pause length. Brazilian Journal of Poultry Science, Campinas, v. 31, n. 4, p. 871-879, 1990.
41. Fasenko, G. M.; Robinson, F. E.; Hardin, R. T. Variability in preincubation embryonic development in domestic fowl. 2. Effects of duration of egg storage period. Poultry Science, Champaign, v. 71, n. 12, p. 2129-2132, 1992.
 42. Bramwell, R. K.; Marks, H. L.; Howart, H. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. Poultry Science, Champaign, v. 74, n. 11, p. 1875-1883, 1995.
 43. Lopes, Michelle et al. Pesos corporais em duas gerações de codornas de corte analisados através de regressão aleatória. In: Congresso de Iniciação Científica, 17, Encontro de Pós-Graduação, 10, Anais... Pelotas-RS: Universidade Federal de Pelotas, 2008.
 44. Mahmoud, B. Y. F., G. Abou Khadiga, And E. A. El-Full Direct and correlated responses to short-term index selection for some economic traits of Japanese quail. Egyptian Poultry Science 34:761– 778. 2014.
 45. Amoroso, I.; Baraldi-Artoni, S. M.; Moraes, V. M. B.; Perecin, D.; Franzo, V. S.; Amoroso, P. Influência da espermatogênese e dos níveis de testosterona no aspecto reprodutivo de codornas. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 37, n. 1, p. 61-66, 2008.
 46. Clulow, J.; Jones, R. C. Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 64, n. 2, p. 259-266, 1982.
 47. Biswas A., Ranganatha O.S., Mohan J. & Sastry K.V.H. 2007. Relationship of cloacal gland with testes, testosterone and fertility in different lines of male Japanese quail. *Animal Reproduction Science* 97:94-102.
 48. Lake P.E. 1981. Male genital Organs, p.1-61. In: King A.S. & Mclelland J. (Eds), *Form and Function in Birds*. Vol.2. Academic Press, London.
 49. Briskie J.V. & Montgomeri E. R. 2007. Testis size, sperm size and sperm competition, p.513-609. In: Jamieson B.G.M. (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds: Phylogeny, morphology, hormones, fertilization*. Vol.6. The University of Queensland.
 50. Friedmann H. 1927. Testicular asymmetry and sex ratio in birds. *Biol. Bull.* 52:197-207.
 51. Marvan F. 1969. Postnatal development of the male genital tract of the *Gallus domesticus* *Anat. Anz.* 124(4):443-462.

52. Möller A.P. 1994. Directional selection on directional asymmetry: Testes size and secondary sexual characters in birds. *Proc. R. Soc. Lond. B* 258:147-151.
53. Birkhead T.R., Fletcher F. & Pellatt E.J. 1998. Testes asymmetry, condition and sexual selection in birds: an experimental test. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265:1185-1189.
54. Froman D.P., Kirby J.D. & Proudman J.A. 2004. Reprodução em aves: Macho e fêmea, p.237-257. In: Hafez B. & Hafez E.S.E. (Eds), *Reprodução Animal*. 7ª ed. Manole, Barueri.
55. Tanaka S. & Yasuda M. 1980. Histological changes in the testis of the domestic fowl after adenohipophysectomy. *Poult. Sci.* 59(7):1538-1545.
56. Rospigliosi J.D. & Figueroa E. 2003. Desarrollo anátomo-histológico del testículo del nacimiento a la madurez sexual de la codorniz (*Coturnix coturnix*) variedad japonesa. *Revta Invest. Vet. Perú* 14(1):74-78.
57. Johnson A.L. 1986. Reproduction in the male, p.432-451. In: Sturkie P.D. (Ed.), *Avian Physiology*. 4th ed. Springer-Verlag, New York.
58. Ottinger M. & Brinkley H.J. 1979. Testosterone and sex related physical characteristics during the maturation of the male Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Biol. Reprod.* 20: 905-909.
59. Winter, E.M.W. Estimção de parâmetros genéticos de características de desempenho, carcaça e composição corporal de codornas para corte (*Coturnix sp.*). 2005. 91f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
60. Winter, E.M.W. Aplicação do método Bayesiano na estimação de correlações genéticas e fenotípicas de peso em codornas de corte em várias idades. *R. Bras. Zootec.*, v.35, n.4, p.1684-1690, 2006.
61. Saatci, M.; Dewi, I.A.; Aksoy, A.R. Application of REML procedure to estimate the genetic parameters of weekly liveweights in one-to-one sire and dam pedigree recorded Japanese quails. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v.120, n.1, p.23-28, 2003.
62. Wenceslau, R.R.; Corrêa, G.S.S.; Corrêa, A.B. et al. Correlação genética e herdabilidade de pesos vivos de codornas de corte avaliados no períodos de crescimento. In: *Simposio Internacional de Coturnicultura*, 3, 2007, Lavras. Anais... Lavras, 2007. p.225.

63. Bonafé, C.M.; Silva, F.G.; Silva, L.P. et al. Estimação de parâmetros genéticos de codornas de corte visando a redução no número de pesagens. In: Simposio Internacional de Coturnicultura, 3, 2007, Lavras. Anais... Lavras, 2007. p.230.
64. Akbas, Y.; Takma, C.; Yaylak, e. Genetic parameters for quail body weights using a random regression model. South African Journal of Animal Science, v.34, p.104-109, 2004.
65. Felipe, V.P. Estudo da interação genótipo-ambiente em codornas de corte. 2010. 57 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas

DOI: 10.53934/9786585062046-11

Capítulo 11

APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA CRISPR NA PREVENÇÃO, DETECÇÃO E TRATAMENTO DA COVID-19: REVISÃO DE LITERATURA

Elym Vitoria Araújo da Silva *; Alison Guilherme da Silva ; Nicole Régia de Lima Lins ; Silvânia Cabral de Oliveira ; Fabiana América Silva Dantas de Souza 

**Autor correspondente (Corresponding author) - Email:
faabiana.americasouza@gmail.com*

APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA CRISPR NA PREVENÇÃO, DETECÇÃO E TRATAMENTO DA COVID-19: REVISÃO DE LITERATURA

Resumo: A COVID-19, doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, tem causado um alerta aos pesquisadores de todo o mundo por oferecer riscos para a saúde pública, se espalhar rapidamente, e ser causadora da síndrome respiratória aguda grave (SRAG). Devido sua rápida disseminação, foi necessário a busca por meios rápidos e eficientes para a prevenção, por meio de produção de vacinas e medicamentos antivirais eficazes, bem como a detecção e tratamento dessa patologia. A técnica CRISPR é uma inovação tecnológica, a qual já tem sido utilizada para o controle de outras doenças, e tem se tornado também uma forte aliada aplicada no combate ao novo coronavírus. Pois essa ferramenta, possibilita a identificação e a edição genética viral de forma eficaz, possibilitando uma conclusão de forma mais rápida, simples de ser utilizada, e de baixo custo, se comparada a outras técnicas tradicionais. Nesse estudo de revisão, discorreremos sobre a aplicação da ferramenta CRISPR perante a infecção ocasionada pelo SARS-CoV-2, bem como suas limitações e perspectivas futuras.

Palavras-chave: COVID-19; CRISPR; edição genética; SARS-CoV-2

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o mundo vem enfrentando uma crise na saúde pública com a chegada do novo coronavírus, que surgiu desde o final do ano de 2019, e causou a COVID-19 (Doença do Coronavírus), acarretando diversos impactos em muitos países (1). Com o surgimento do SARS-CoV-2 (Coronavírus 2 da Síndrome respiratória aguda grave), um quadro pandêmico se estabeleceu, um alerta foi emitido pela Organização

Mundial da Saúde – OMS, à sociedade, o que se exigiu medidas importantes e urgentes em busca do controle da circulação do vírus entre a população, e fazendo-se preciso a busca de meios eficazes para detecção, prevenção e tratamento da doença (2,3).

Diante do cenário pandêmico, se fez de suma importância a ampliação de estudos referentes ao fortalecimento da capacidade de detecção de patógeno, visando à aceleração do desenvolvimento de vacinas e medicamentos antivirais específicos. Perante os desafios durante as etapas de avaliação dos testes clínicos, a ciência buscou soluções eficientes, visando desenvolver e testar intervenções antivirais para controlar a COVID-19 em humanos, e outras diversas variantes que poderiam vir a surgir (4).

Perante estes desafios, os cientistas vêm aprimorando técnicas biotecnológicas já existentes, baseada especificamente na CRISPR/Cas, (a sigla é referente a um Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas e Regulamente Espaçadas, com a ação de proteínas associadas), para a detecção, prevenção e tratamento da doença causada pelo SARS-CoV-2. Essa técnica tem demonstrado eficácia até o dado momento, mostrando-se como um avanço na ciência, pois o desenvolvimento e a aplicação deste sistema têm apresentado realizações notáveis na edição de genes, triagem de genes funcionais, dentre outros (5).

No processo de compreensão do desenvolvimento e fortalecimento de estratégias competentes a serem utilizadas no combate a infecções com potenciais pandêmicos, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura acerca da utilização da ferramenta CRISPR/Cas no controle, prevenção, detecção e tratamento da COVID-19.

APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA CRISPR/CAS EM SARS-COV-2

A CRISPR/Cas é uma técnica de defesa utilizada naturalmente por bactérias e arqueas contra vírus bacteriófagos e plasmídeos que as invadem. Basicamente os DNAs invasores são clivados pelas enzimas Cas, uma porção clivada é então colocada entres sequências CRISPR, as quais são usadas como referência para gerar sequências curtas de RNA (6,7). As sequências direcionam a proteína Cas ao DNA invasor, que será clivado e inativado (8).

Desde o início da pandemia da COVID-19, muitos cientistas voltaram seus esforços para o desenvolvimento de estratégias com CRISPR/Cas para combater o vírus SARS-CoV-2, uma vez que essa técnica demonstra ser uma excelente aliada aos métodos já utilizados no controle de doenças infecciosas (9). Assim, ela pode ser aplicada na prevenção, através do desenvolvimento de vacinas, detecção, bem como na terapia da doença causada pelo novo coronavírus, devido suas diversas possibilidades de uso, a técnica tem mostrado grandes avanços nas pesquisas envolvendo a COVID-19, além de apresentar baixo custo, e pouca exigência tecnológica para sua aplicação (10).

APLICAÇÃO DE CRISPR NA DETECÇÃO DE SARS-COV-2

O vírus SARS-CoV-2 tem causado desequilíbrio na saúde em grande parte da população mundial. As manifestações clínicas são bastantes semelhantes a outras doenças que afetam o sistema respiratório, como, por exemplo, a gripe. Dessa forma, é importante um diagnóstico preciso e rápido para que o tratamento adequado seja prescrito. A técnica

mais utilizada para detecção do vírus, considerada “padrão-ouro”, é a RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real), no entanto, ainda há limitações nessa técnica, como a complexidade e seu elevado valor (11). Assim, são de grande valia novas técnicas que necessitem de menos recursos e apresentem metodologias rápidas e precisas.

Nesse contexto, a técnica CRISPR/Cas tem sido usada para detecção rápida do agente etiológico do SARS-CoV-2, ajudando no combate contra a disseminação do vírus (12). Segundo Zhou *et al.*, (13), se comparada às técnicas tradicionais, a técnica CRISPR/Cas é superior no que se refere a velocidade de detecção, custos, facilidade de uso, sensibilidade e especificidade, o que torna essa ferramenta ainda mais cobiçada para utilização em diversas etapas para o diagnóstico e intervenção de uma doença.

Para fazer a detecção do agente causador da COVID-19, são necessários dois personagens principais: a endonuclease Cas, que quebra o local genômico alvo; e o gRNA, que identifica e direciona a endonuclease. O processo se dá com o corte na região alvo pelo crRNA e as proteínas CRISPR, seguida da complementação dessa região específica com a sequência de crRNA. As proteínas CRISPR são as Cas9, Cas12, Cas13, dessas, as duas últimas são excelentes em clivagem lateral (diferente da Cas9), permitindo a clivagem indiscriminada do ácido nucleico periférico, estando elas ligadas ao alvo (14).

Em um ensaio realizado por Broughton *et al.*, (15), foi feita a transcrição reversa síncrona mais amplificação isotérmica, mediada por loop (RT-LAMP), para material genético retirado de swabs nasofaríngeos ou orofaríngeos em transporte universal, e com seguida detecção de sequências do vírus definidas anteriormente pela proteína Cas12. Depois da clivagem de uma molécula repórter, a constatação do SARS-CoV-2 foi confirmada. Em outro estudo, foram utilizados sinais de fluorescência para detecção do vírus. Nesse método, o gene repórter, que foi clivado pela proteína Cas12a, foi marcado com uma molécula fluorescente, e caso houvesse material genético do SARS-CoV-2, a fluorescência poderia ser vista sob luz à 48 nm (16). Além dos citados, vários outros ensaios foram realizados para detecção do vírus, informações acerca de alguns deles podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1, Estudos de diagnóstico SARS-CoV-2 baseados em CRISPR

CRISPR/Sistema	Plataforma	Tempo de ensaio	Especificidade/Sensibilidade	Referência
CRISPR–Cas13a	SHERLOCK	>60 min	100%/96%	Patchesung <i>et al.</i> , (17)
CRISPR–Cas13a	CREST	110 min	100%/88.8%	Rauch <i>et al.</i> , (18)
CRISPR–Cas13a	SHINE	50 min	100%/90%	Arizti-Sanz <i>et al.</i> , (19)
CRISPR–Cas13a	CRISPR-COVID	40 min	100%/100%	Hou <i>et al.</i> , (20)
CRISPR–Cas12b	STOPCovid	<60 min	98.5%/93.1%	Joung <i>et al.</i> , (21)
CRISPR–Cas12a	SENA	60 min	100%/100%	Huang <i>et al.</i> , (22)
CRISPR–Cas9	TL-LFA	< 60 min	97.1% /100%	Xiong <i>et al.</i> , (23)

CRISPR–Cas12a	CRISPR-FDS	15 min	100%/ 100%	Ning <i>et al.</i> , (24)
CRISPR–Cas12a	CRISPR-ABC	30-40 min	91.2%/ 99.2%	Huang <i>et al.</i> , (22)

VANTAGENS DO CRISPR NA DETECÇÃO DE SARS-COV-2

Devido à sua excepcional sensibilidade, especificidade e confiabilidade, detecção de ácido nucleico direcionada por RNA baseado na nuclease CRISPR/Cas mostrou recentemente potencial para o desenvolvimento de diagnóstico molecular de novo poder tecnológico (25,26). A utilização da CRISPR oferece vantagens em relação as técnicas existentes para detecções de patógenos, dentre as vantagens, é possível destacar a amplificação de sinal isotérmico para detecção rápida de alvos na ausência de um termociclador, além de ser um método acessível e imediato em comparação ao RT- qPCR, pois o sistema CRISPR não requer muita instrumentação ou processos complicados para execução da técnica (14).

A técnica CRISPR é bem mais rápida em comparação a técnica RT-qPCR, pois enquanto a proteína CRISPR leva menos de 40 minutos para a identificação do vírus causador da COVID-19, a outra citada, leva muito mais que isso, correspondendo ao resultado de 24 horas (20). Logo, é válido ressaltar também que os outros métodos requerem combinações específicas de ácidos nucleicos com procedimentos manuais, o que acarretará complicações no procedimento e provoca danos ao meio ambiente (9).

MÉTODOS BASEADOS EM CRISPR/CAS PARA TERAPIA COVID-19

A utilização de terapia convencional para patologias virais inicia com a prevenção da infecção e sua proliferação. Como os vírus se espalham rapidamente, são utilizados medicamentos já existentes para um tratamento mais rápido. As drogas candidatas, para o tratamento da doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, a COVID-19, geralmente tem a finalidade de interromper a função enzimática do vírus, prevenir a ação de endocitose viral, bloquear proteínas virais e consequentemente, auxiliar a imunidade inata e/ou diminuir a resposta inflamatória e replicação do vírus (5).

Contudo, o vírus SARS-CoV-2, sofre mutações rapidamente, o que muitas vezes torna o medicamento ou a vacina ineficaz. Por isso, é necessário novas terapias que se baseiam no direcionamento sequencial do genoma viral, como a ferramenta biotecnológica CRISPR/Cas, que possibilita a identificação do material genético do vírus sendo o DNA ou RNA, e viabilizando seu corte e sua inativação (27). O CRISPR antiviral profilático (PAC-MAN) em células humanas, consegue encontrar e destruir a sequência viral e suas mutações presentes nas células epiteliais do pulmão do ser humano, possibilitando o reconhecimento de mais de 90% dos coronavírus (28).

Outra estratégia viável é a utilização da nuclease de RNA CRISPR-Cas13, que é guiada por RNA de classe 2 do tipo VI, e consegue suprimir com eficácia a expressão gênica inibindo a infecção por coronavírus pós-transcricional. Além disso é uma ferramenta segura, e fácil de usar porque funciona ao nível do RNA (29). Outro estudo teve como objetivo usar a capacidade do sistema CRISPR-Cas13a de editar RNA

com a vantagem de combater o SARS-CoV-2. A Cas13a funciona quando ativado por um crRNA particular que visa em uma sequência específica de RNA de fita simples para clivar o RNA alvo e causar clivagem colateral, resultando na clivagem da sequência de RNA SARS-CoV-2, impedindo assim a síntese de proteínas virais e a replicação viral (30).

Nguyen et al. (31), utilizaram o sistema CRISPR-Cas13d com três RNAs guia para direcionar vários peptídeos de regiões codificadas do material genético do RNA SARS-CoV-2, que foram empacotadas em um vetor de vírus adeno-associado (VAA), a fim de reduzir a chance de resistência. O vírus adeno-associado possui sorotipos altamente específicos para o pulmão, que é um dos principais órgãos que pode ser infectado pelo SARS-CoV-2.

Semelhante a terapia genética, a terapia celular é uma das mais novas intervenções terapêuticas na era CRISPR. A terapia celular é considerada uma forte alternativa para o tratamento da COVID-19, pois os primeiros resultados foram favoráveis e apresentaram melhoras significativas para a saúde, além de também ter apresentado resultados positivos para a infecção por H5N1, vírus da influenza A aviária (32). A utilização de modelos animais contribuirá para simulações *in vivo* e consequentemente, contribuirá para a eficiência das ferramentas baseadas em CRISPR utilizadas para antivirais (33).

APLICAÇÃO DE SISTEMAS CRISPR/CAS NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS E DROGAS

Mediante os estudos realizados, entende-se que os medicamentos antivirais, nem sempre se apresentam de modo eficaz perante doenças infecciosas emergentes. Diante disso, com o surgimento de novas tecnologias, como a CRISPR/Cas, é possível encontrar resultados com mais rapidez e facilidade, causando inibição de replicação viral (34,35). Sun et al. (36), geraram ratos modelos que expressaram a enzima conversora de angiotensina II humana (hACE2) usando a técnica de nocaute Cas9, que foi utilizada para estudar a transmissão e patogênese do SARS-CoV-2 e fornecer uma ferramenta útil para avaliar as vacinas para COVID-19 e drogas terapêuticas.

A vacinação é a intervenções mais econômica de saúde pública para a prevenção e controle de doenças infecciosas, e uma das formas mais eficazes de prevenir a propagação em larga escala de doenças infecciosas. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina geralmente é um processo complexo que requer tempo e dinheiro. O desenvolvimento de vacinas específicas de forma rápida e fácil sempre foi uma preocupação para cientistas, e em resposta a doenças infecciosas emergentes, a CRISPR/Cas9 é uma técnica potencial para impulsionar o progresso no desenvolvimento de vacinas (37).

Desta forma, com o desenvolvimento assistido de medicamentos e triagem alvo, obtêm-se uma facilidade para a geração de alterações nos genomas, tornando-se assim, uma ferramenta facilitadora para a descoberta de vacinas e drogas, permitindo a prevenção de doenças infecciosas existentes e que ainda podem vir a surgir (1).

LIMITAÇÃO DA TECNOLOGIA CRISPR

A técnica CRISPR/Cas tem avançado cada vez mais e sua utilização tem se espalhado entre pesquisadores e profissionais da área saúde. E, apesar de ser muito atraente, esse novo método possui limitações. Uma dessas limitações é dificuldade de identificação da região pela Cas9 no momento da edição genética do indivíduo, o que possibilita uma alteração accidental, podendo resultar em uma patologia como o câncer (1).

Outra limitação importante em se tratando do vírus, é a atividade fora do alvo, podendo gerar mutações virais, o que também é um problema, pois se houverem células infectadas, o tratamento pode se tornar ineficaz. Além disso, o corpo pode possuir imunidade ao sgRNA, assim como a proteína Cas, impedindo a participação apropriada da ferramenta CRISPR/Cas (9,38).

Além do mais, a ferramenta CRISPR desperta preocupações éticas e de segurança acerca de sua prática, levantando discursões sobre até onde ela pode ser permitida, e, como e quando deve ser utilizada. Diante deste contexto, sua aplicação, ainda deve envolver muitos estudos, experimentos e ensaios clínicos para que os riscos sejam amenizados e a ética não seja prejudicada (39).

PERSPECTIVAS FUTURAS

A tecnologia CRISPR promete desempenhar um papel fundamental acerca dos desafios envolvendo novos possíveis cenários pandêmicos. Para tal, é importante esforços e estudos constantes para superar preocupações que envolvem sua eficiência terapêutica, pois essa ferramenta avançada pode evitar reinfecções, imunidade de curto prazo ou resistências virais em comparação a muitos medicamentos e vacinas tradicionais (40).

A tecnologia CRISPR/Cas pode ser utilizada para refinar os coquetéis combinados de células CAR-T, células CAR-NK e anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2. Além disso, a tecnologia CRISPR/Cas é proposta em hipóteses para degradar o RNA viral para encerrar as atividades do SARS-CoV-2. Assim, coquetéis personalizados de imunoterápicos e os sistemas CRISPR Cas contra o COVID-19 como estratégia podem ser uma opção para inibir a progressão da doença e contornar a fuga de imunidade levando em consideração os fatores genéticos. A ferramenta CRISPR/Cas ainda requer muita pesquisa antes que possa ser aplicada clinicamente e com segurança para quebrar o genoma do SARS-CoV-2 *in vivo* com alta eficácia, no entanto, os desafios precisam ser superados para descobrir um sistema de entrega adequado, além de existir questões morais a serem consideradas antes da aplicação clínica (41).

CONCLUSÕES

Tendo como base as literaturas revisadas, é possível considerar a técnica CRISPR como uma excelente oportunidade de avanço para as diversas áreas da ciência. No caso do SARS-CoV-2, a técnica demonstrou melhor eficiência quando comparada a técnicas já utilizadas. Ela tem potencial para ser utilizada em terapias, para detecção, e prevenção da doença causada pelo coronavírus. Por outro lado, ainda há limitações que precisam ser superadas, limitações essas, que podem ser suprimidas através de novos estudos e

pesquisas.

A identificação da patologia mediante a técnica CRISPR talvez seja o avanço mais importante para a COVID-19, uma vez que a rápida detecção da doença é essencial para o controle da mesma. A CRISPR possibilita uma detecção rápida, com alto nível de sensibilidade, e com baixo custo, tornando-a indispensável para aplicação em doenças com características semelhantes a COVID-19. Além da detecção, o uso em terapias e produção de vacinas também se mostraram muito promissoras.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Pernambuco - *Campus* Mata Norte, que tem sido essencial para nossa formação; ao Laboratório de Biotecnologia da UPE - *Campus* Mata Norte (LABIOTEC UPE CMN), e por último, mas não menos importante, ao Grupo de Pesquisa, Extensão e Informação: ProBioTec, liderado pela Prof.^a Dr.^a Fabiana América S. D. Souza, primordial para aquisição de novos conhecimentos científicos, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Ding R, Long J, Yuan M, Jin Y, Yang H, Chen M, Chen S e Duan G. CRISPR/Cas System: a potential technology for the prevention and control of covid-19 and emerging infectious diseases. *Front Cell Infect Micro*. 2022;11: 639108: 1-0.
2. Bustin SA, Nolan T, RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. *Int J Mol. Sci*. 2020;2(8):1-9.
3. Kuna AT, Hanžek M, Vukasovic I, Gabai NN, Vidranki V, Čelap I, et al. Comparison of diagnostic accuracy for eight SARS-CoV-2 serological assays. *Biochem Med*. 2021;31(1):121-33.
4. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrongo R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468(7320):67-71.
5. Najafabadi ZY, Fanuel S, Falak R, Kaboli S, Kardar GA. The Trend of CRISPR-Based Technologies in COVID-19 Disease: beyond genome editing. *Mol Biotec*. [Internet] 2022.
6. Barrangou R, Horvath PA. A decade of discovery: crispr functions and applications. *Nat Microbiol*. 2017;2(7):1792.
7. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. *Nat Ver Microbiol*. 2017;15(3):169-82.
8. Brinkman EK, Chen T, Haas M, Akhatar W, Steensel BV. Kinetics and Fidelity of the Repair of Cas9-Induced Double-Strand DNA Breaks. *Mol Cell*. 2018; 70(5):801-13.
9. Shedman B, Nourazarian A, Hajazimian S, Isazadeh A, Avci CB, Oskouee MA. CRISPR Technology in Gene-Editing-Based Detection and Treatment of SARS-CoV-2. 2022;8(772788):1-11.

10. Ayanoğlu FB, Elçin AE, Elçin IM. Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology. *Turk J Biol.* 2020;44(2):110-20.
11. Carvalho AS, Rabelo DM, Carvalho TR. Diagnóstico de covid – 19 e detecção de variantes por sistema CRISPR: desafios e perspectivas. Luz –MG: Repositório Institucional FASF; 2022.
12. Palaz F, Kalkan AK, Tozluyurt A, Ozsoz M. CRISPR-based tools: alternative methods for the diagnosis of covid-19. *Clin Biochem.* 2021;89:1-13.
13. Zhou L, Peng R, Zhang R, Li J. The applications of CRISPR/Cas system in molecular detection. *J. Cell Mol Med.* 2018;22(12):5807-15.
14. Ganbaatar U, Liu C. CRISPR-Based COVID-19 Testing: toward next-generation point-of-care diagnostics. *Front. Cell Infec Microbiol.* 2021;11(663949):1-11.
15. Broughton JP, Deng X, YU G, Fasching CL.; Servellita V, Singh J, et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020;38(7):870-4.
16. Wang X, Zhong M, Liu Y, MA P, Dang L, Meng Q, et al. Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER. *Sci Bull.* 2020;65(17):1436-9.
17. Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, Aphicho K, Suraritdechachai S, Meesawat P, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nat Biomed Eng.* 2020;4(12):1140-9.
18. Rauch JN, Valois E, Ponce-Rojas JC, Aralis Z, Lach RS, Zappa F, et al. Comparison of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Screening Using Reverse Transcriptase–Quantitative Polymerase Chain Reaction or CRISPR-Based Assays in Asymptomatic College Students. *Jama Netw. Open.* 2021; 4(2):1-12.
19. Arizti-Sanz J, Freije CA, Stanton AC, Petros BA, Boehm CK, Siddiqui S, et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-9.
20. Hou T, Zeng W, Yang M, Chen W, Ren L, Ai J, et al. Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for COVID-19. *Plos Pathog.* 2020;16(8):1-12.
21. Joung J, Ladha A, Saito M, Kim NG, Woolley AE, Segel M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *N Engl J Med.* 2020;383(15): 1492-4.
22. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223): 497-506.
23. Xiong E, Jiang L, Tian T, Hu M, Yue H, Huang M, et al. Yongzhong; ZHU, Debin; ZHOU, Xiaoming. Simultaneous Dual-Gene Diagnosis of SARS-CoV-2 Based on CRISPR/Cas9-Mediated Lateral Flow Assay. *Angew Chem Int Ed.* 2021;60(10): 5307-15.
24. Ning B, Yu T, Zhang S, Huang Z, Tian D, Lin Z, et al. A smartphone-read ultrasensitive and quantitative saliva test for COVID-19. *Sci. Adv.* 2021;7(2):1-11.
25. DING X, Yin K, Li Z, Lalla RV, Ballesteros E, Sfeir MM, et al. Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-19.
26. Lucia C, Federico PB, Alejandra GC. An Ultrasensitive, Rapid, and Portable Coronavirus SARS-CoV-2 Sequence Detection Method Based on CRISPR-Cas12. *BioRxiv.* 2020;1-10.

27. Atzrodt CL, Maknojia I, Mccarthy RD, Oldfield TM, Po J, Ta KT, et al. A Guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus sars-cov-2. *Febs J*. 2020;287(17):3633-50.
28. Abbott TR, Dhamdhare G, Liu Y, Lin X, Goudy L, Zeng L, et al. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. *Cell*, 2020;181(4):865-76.
29. Unniyampurath U, Pilankatta R, Krishnan M. RNA Interference in the Age of CRISPR: will crispr interfere with rnai?. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):1-15.
30. Wang L, Zhou J, Wang Q, Wang Y, Kang C. Rapid design and development of CRISPR-Cas13a targeting SARS-CoV-2 spike protein. *Theranostics*. 2021;11(2): 649–64.
31. Nguyen LT, Smith BM, Jain PK. Enhancement of trans-cleavage activity of Cas12a with engineered crRNA enables amplified nucleic acid detection. *Nature Communications*. 2020;11(1):1-13.
32. Roy R, Srivastava A, Gupta T, Singhal T, Kumar P, Dhir S, Rishi N. CRISPR/CAS System: A revolucionar technique Applied Potentially from diagnosis yo Therapeutics in COVID-19. *Acta Sci Microbiol*. 2022;53-65.
33. Najafabadi ZY, Fanuel S, Falak R, Kaboli S, Kardar GA. The Trend of CRISPR-Based Technologies in COVID-19 Disease: beyond genome editing. *Mol Biotechnology*, 2022;1-16.
34. Settleman J, Sawyers CL, Hunter T. Challenges in validating candidate therapeutic targets in cancer. *Elife*. 2018;7:1-9.
35. Haley B, Roudnicki F. Functional Genomics for Cancer Drug Target Discovery. *Cancer Cell*. 2020;38(1):31-43.
36. Sun SH, Chen Q, Gu HJ, Yang G, Wang YX, Huang XY, et al. AMouse Model of SARS-Cov-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host Microbe* 2020;28(1):124–33.
37. Atasoy MO, Rohaim MA, Munir M. Simultaneous Deletion of Virulence Factors and Insertion of Antigens into the Infectious Laryngotracheitis Virus Using NHEJ-CRISPR/Cas9 and Cre–Lox System for Construction of a Stable Vaccine Vector. *Vaccines*. 2019;7(4):1-15.
38. Kim S, Koo T, Jee H-G, Cho H-Y, Lee G, Lim D-G, et al. CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells. *Genome Res*. 2018;28(3): 367-73.
39. Brokowski C, Adli M CRISPR Ethics: moral considerations for applications of a powerful tool. *J Mol Biol*. 2019;431(1):88-101.
40. Parry P. Covid-19: Hong Kong scientists report first confirmed case of reinfection. *BMJ* 370 [Internet]. 2020: m3340.
41. He X, Zeng XX. Immunotherapy and CRISPR Cas Systems: potential cure of covid-19?. *Drug Des Devel Ther*. 2022;16:951-72.

DOI: 10.53934/9786585062046-12

Capítulo 12

FERRAMENTAS APLICADAS AO ESTUDO DA GENÔMICA EM PLANTAS

Rahisa Helena da Silva^{ID*}; Manassés Daniel da Silva^{ID}; Antonio Félix da Costa^{ID}; Éderson Akio Kido^{ID}

¹Laboratório de Genética Molecular de Plantas – UFPE

²Instituto Agronômico de Pernambuco

*Autor correspondente (Rahisa Helena da Silva) – Email: rahisahelena@gmail.com

Resumo: Desde a descoberta da estrutura do DNA em 1953 por Watson e Crick, através dos dados dos estudos de cristalografia de raios X, obtidos por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins, muito se avançou. O rápido crescimento das tecnologias de sequenciamento (DNA e RNA) proporcionou o surgimento das ômicas. As ômicas correspondem a um campo da Biologia Molecular que geram dados capazes de fornecer visões globais sobre a informação genética contida nos organismos. A genômica tem como objeto de estudo o genoma de um dado organismo de interesse, que inclui regiões codificantes e não-codificantes. Desde a escolha da plataforma de sequenciamento mais adequada, a obtenção de um genoma de referência é um processo que abrange várias etapas. Ainda, considerando a complexidade dos genomas vegetais devido a poliploidia e regiões repetitivas muito extensas, o conhecimento sobre as etapas relativas é de extrema importância. Sendo assim, a disponibilidade de um genoma de referência permite a caracterização dos seus componentes, proporcionando o entendimento de mecanismos moleculares associados a processos de desenvolvimento e adaptação. Portanto, o objetivo do capítulo é apresentar os principais aspectos relacionados com a obtenção de um genoma vegetal, passando pelas etapas a serem seguidas e as ferramentas aplicadas.

Palavras-chave: SEQUENCIAMENTO; BIOINFORMÁTICA; GENOMA; ÔMICAS

INTRODUÇÃO

As ciências ômicas são amplamente aplicadas para entender a organização das bases das funções celulares. As ômicas consistem numa abordagem integrativa que reúne dados de experimentos em larga escala, que incluem a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica (1). Neste capítulo, vamos abordar aspectos relacionados ao estudo da genômica em plantas, além das ferramentas aplicadas e seu papel no entendimento da biologia desses organismos. O aumento da disponibilidade de genomas vegetais está associado ao avanço nas tecnologias de sequenciamento e da bioinformática, proporcionando análises cada vez mais detalhadas de caracteres de importância econômica, tais como resistência a estresses bióticos e abióticos (2). Em plantas, o

primeiro genoma de referência foi obtido de *Arabidopsis thaliana* (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Cinco anos depois, o genoma de arroz foi completado utilizando cromossomos artificiais de bactérias (BACs - *Bacterial Artificial Chromosomes*) e sequenciamento de Sanger (3). Ao final de 2020, 1.031 genomas de referência ou *drafts* tinham sido disponibilizados para 788 espécies de plantas (4) (Figura 1A).

O custo do sequenciamento foi drasticamente reduzido pelas tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS – *Next-generation sequencing*), permitindo um aumento explosivo na quantidade de genomas obtidos (4). Dentre algumas das plataformas NGS, podemos citar: 454 (Roche), SOLiD (*Life Technologies*), HiSeq (Illumina), MiSeq (Illumina) e Ion Torrent (*Life Technologies*). Entretanto, apesar de as técnicas NGS terem proporcionado maior quantidade de informação disponível, a complexidade da montagem devido aos fragmentos *short reads* gerados foi responsável pela menor qualidade da informação obtida (5). Esse é um aspecto importante quando se trata de genomas vegetais, que apresentam regiões repetitivas muito extensas, grande tamanho dos genomas e poliploidia, que constituem grandes desafios para a etapa de montagem (6). Sendo assim, o nível de cromossomos era mais difícil de ser alcançado para essas montagens. Logo, o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de terceira geração, caracterizadas por fragmentos *long reads*, foi essencial para a melhoria da acurácia e contiguidade dos genomas e serem disponibilizados (6) (Figura 1B).

As tecnologias de sequenciamento de terceira geração podem ser divididas em duas abordagens: o sequenciamento *long-read* e a *long-range scaffolding* (7). Dentre as técnicas de sequenciamento *long read*, a que utiliza o método *Single Molecule Real-Time* (SMRT) provido pela Pacific Biosciences' ou PacBio, é a mais utilizada, com tamanho médio de *reads* de 20 Kb. A tecnologia *Synthetic Long-Reads* (SLR), desenvolvida pela Illumina apresenta média de *reads* de até 10 Kb. Um outro exemplo é o MinION desenvolvido pela Oxford Nanopore, que pode gerar *reads* de até 12 Kb (8). A técnica de captura da conformação dos cromossomos (Hi-C) representa uma tecnologia de *long-range scaffolding*, esse protocolo é provido pela *Dovetail Genomics* (www.dovetails.genomics.com) e auxilia bastante na obtenção de montagens em escala cromossômica - (9). Logo, o maior requisito para estudos em genômica é a disponibilidade de um genoma de referência relativo à espécie a ser analisada. Nos tópicos a seguir serão descritas as etapas referentes à obtenção de um genoma de referência.

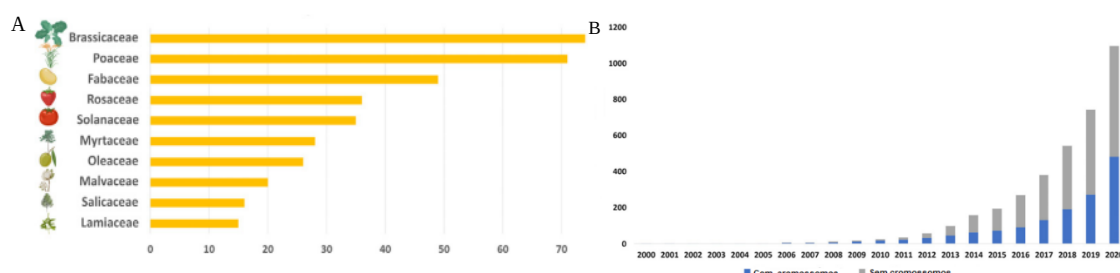


Figura 1 – (A) As dez famílias com mais genomas sequenciados em angiospermas; (B) Número de genomas vegetais sequenciados com montagens a nível de cromossomos ou não desde a disponibilização do genoma de *Arabidopsis thaliana* em 2.000. Adaptado de (4).

CONTROLE DA QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO

A primeira etapa na análise de dados de sequenciamento de alto rendimento é o controle da qualidade. Nessa etapa, é avaliado um conjunto de estatísticas em um arquivo de *reads*, que abrange a contagem de frequência relativa de nucleotídeos em cada posição em um conjunto de leituras, para detectar desvios das frequências esperadas, considerando a distribuição de Phred (10). Esse controle de qualidade também mede a frequência de artefatos que não fazem parte da amostra biológica de interesse, como contaminantes e adaptadores. O início dessa etapa ocorre pela conversão dos dados em formato .SRA (*Sequencing Read Archive*) para o formato .FASTQ por meio da ferramenta *SRA toolkit* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>). Para checagem da qualidade propriamente dita, a ferramenta FastQC é a mais amplamente empregada e permite visualização rápida dos dados e dos possíveis pontos problemáticos dentro do sequenciamento (11). Após o processo de checagem, esses dados devem ser pré-processados para remoção de sequências de baixa qualidade e de artefatos do sequenciamento que podem facilmente comprometer análises posteriores. Essa etapa é conhecida como trimagem. Uma das principais ferramentas empregadas para esse objetivo é o Trimmomatic (12). As principais etapas realizadas são: a trimagem ou remoção de sequências técnicas (ex.: adaptadores e *primers*) e a filtragem da qualidade, que avalia o *score* de qualidade de cada base sequenciada (frequentemente valor de Phred maior ou igual a 25 ou 30) (Figura 2).

MONTAGEM E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE

A montagem de genomas abrange duas abordagens básicas. A primeira é a abordagem de referência, que consiste na utilização de sequências já montadas de organismos taxonomicamente relacionados. A segunda é a abordagem conhecida como *de novo*, que monta sequências de organismos sem a necessidade de sequências anteriormente sequenciadas (13). O emprego de uma das duas abordagens não exclui a outra, de forma que até em casos onde há disponibilidade de genomas de referência, regiões que variam muito no genoma necessitam da abordagem *de novo* (5). A abordagem de referência é bastante utilizada, por exemplo, no re-sequenciamento de genomas para

corrigir erros de montagem ou estender *contigs* já existentes, bem como para identificação de variantes (5). Na abordagem *de novo*, a sequência do genoma é construída através da sobreposição das *reads* sequenciadas, comumente utilizando algoritmos baseados em gráficos. As *short reads* costumam dificultar essa abordagem.

Os principais algoritmos de montagem são: OLC (*overlap-layout consensus*) e o gráfico de Bruijn (DBG) (4). Uma gama de *softwares* montadores já foram desenvolvidos com o objetivo de obter a sequência completa de genomas. Dentre os montadores que seguem a abordagem por referência estão: RECORD (14), AMOSmp (15), ALLPATHS-LG (16) e CAP3 (17). Dentre os montadores para montagem *de novo* podemos citar o Velvet (18), ABySS (*Assembly By Short Sequences*) (19), SPAdes (20) e MaSuRCA (*Maryland Super-Read Celera Assembler*) (21). Há também montadores especificamente construídos para lidar com o processamento de *long reads* que incluem: FALCON (22), NECAT (22), Mecat2 (23) e Canu (24), Raven (25) dentre outros (Figura 2).

Após a montagem é essencial entender a qualidade das sequências obtidas, se a acurácia está baixa ou se existem erros de montagem. Esse processo está relacionado com a obtenção de várias métricas que indicam a qualidade da montagem (26). Dentre elas, a mais conhecida é o N50, que se refere ao tamanho do menor *contig/scaffold* em que metade da montagem está representada. Uma variante do N50 é NG50, que constitui o tamanho do menor *contig/scaffold* que se encontra na metade de um genoma de referência. Outra métrica muito utilizada é o L50, que representa quantos *contigs/scaffolds* foram necessários para alcançar metade do sequenciamento. Dentre os *softwares* desenhados para essa etapa pode-se citar o QUAST (*Quality Assessment Tool for Genome Assemblies*) (27), BUSCO (*Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*) (28) e GenomeQC (29) (Figura 2).

REPEAT MASKING

A natureza altamente repetitiva dos genomas vegetais requer que as regiões de repetição sejam mascaradas. Esse processo é chamado de *Repeat masking*. Resumidamente, as sequências repetitivas abrangem três classes: (1) repetições locais, que incluem repetições simples e em *tandem*; (2) famílias de repetições dispersas, que compreendem os elementos transponíveis; (3) duplicações segmentais (30). Ocorre que a presença de ORFs (*Open Reading Frames*) dentro de transposons (ex.: transposases e transcriptases reversas) pode confundir a etapa de predição de genes na montagem (30). As estratégias aplicadas para identificação de elementos repetitivos abrangem duas grandes categorias: (1) detecção *de novo* e (2) detecção por similaridade.

Basicamente, esse processo ocorre pela busca de características estruturais, tais como domínios associados a transposons, utilizando bancos de dados de elementos repetitivos conhecidos, como o RepBase (<https://www.girinst.org/replib/>) (31) e o TIGR (<https://www.hsls.pitt.edu/>) (32). As ferramentas RepeatMasker (<https://www.repeatmasker.org/>) (33) e RepeatModeler2 (<http://www.repeatmasker.org/RepeatModeler/>) (34) são amplamente empregadas para esse objetivo. RepeatMasker emprega a abordagem de similaridade e utiliza as sequências disponíveis em bibliotecas (ex.: RepBase) para identificar as famílias de repetições em

determinado genoma. RepeatMasker é essencial considerando famílias de repetições já descritas, no entanto a descoberta de novas famílias de elementos repetitivos espécie-específicas requer ferramentas como o RepeatModeler2 que utiliza algoritmos para detecção *de novo* dessas repetições tais como RECON (29) e RepeatScout (35) (Figura 2).

PREDIÇÃO DE GENES E ANOTAÇÃO

A predição de genes é a etapa mais importante da anotação de um genoma. Dois tipos de abordagem estão associados a esse processo: (1) *ab initio* e (2) baseada em similaridade. Na predição *ab initio*, as ferramentas são desenhadas para identificar elementos característicos da estrutura dos genes (ex.: TATA-box, sítios de *splicing*, éxons, íntrons, sítios de iniciação e terminação da tradução). Os preditores *ab initio* utilizam frequentemente *Hidden Markov Model* (HMM) e programação dinâmica (36). Uma grande variedade de *softwares* preditores está disponível, dentre eles pode-se citar FGENESH (37), GeneMark.hmm (38), GENESCAN (39) que apresentam boa performance em plantas (40). A anotação de genomas vegetais também conta com alguns *pipelines* automáticos como TriAnnot (41), Seqping (42), BRAKER (43), MAKER-P (44) e AUGUSTUS (45). O processo de anotação frequentemente utiliza a estratégia de vocabulários controlados. *Gene Ontology* (GO - <http://www.geneontology.org>) é o esquema mais extensivamente utilizado para descrever a função de produtos gênicos (46) (Figura 2).

Essa descrição é feita com base em três ontologias independentes, denominadas: processo biológico, função molecular e componente celular (46). Dentre as ferramentas e recursos que foram desenvolvidos para anotação funcional e mineração de novas sequências através de vocabulários controlados pode-se citar: BLAST2GO (www.blast2go.org) (47), InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) (48), OntoBlast (<http://functionalgenomics.de/ontogate>) (49), AmiGO (<http://amigo.geneontology.org/>) (50), GoBlet (<http://goblet.molgen.mpg.de/>) (51) dentre outros.

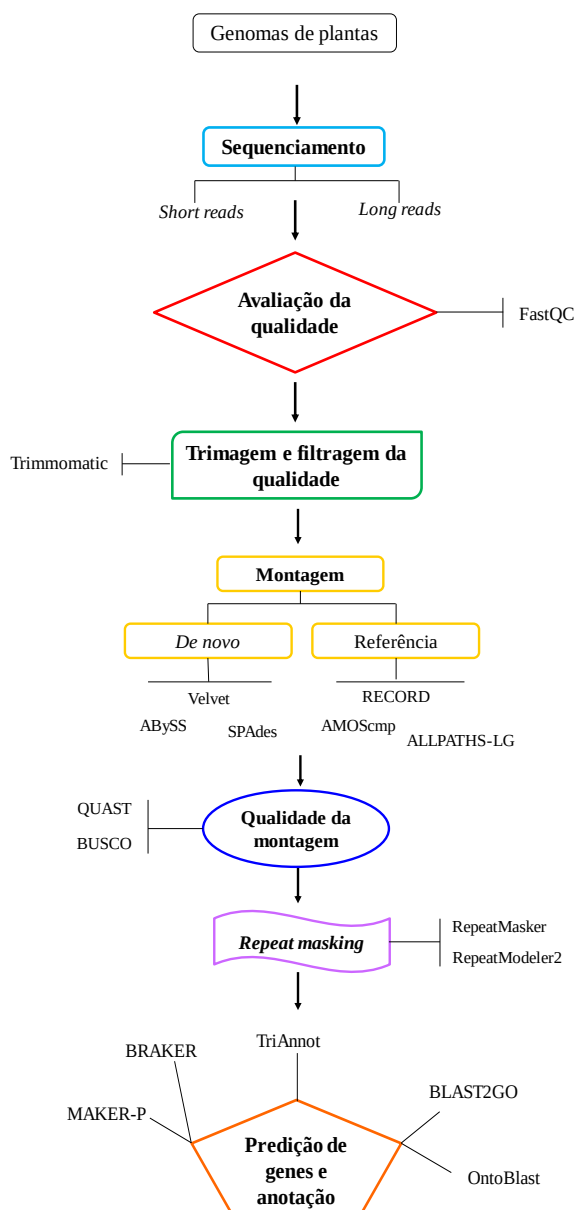


Figura 2 - Representação esquemática de um *pipeline* desenhado para obtenção de um genoma vegetal. As ferramentas relacionadas a cada etapa estão mencionadas ao lado.

ANÁLISES DOWNSTREAM

A etapa conhecida como genômica estrutural é o ponto de partida do processo que visa compreender como as estruturas que compõem o genoma estão organizadas e como contribuem para o desempenho de suas funções. A partir da obtenção do genoma de referência, uma variedade de ferramentas pode ser empregada em análises tais como identificação de genes e de seus ortólogos, avaliação da estrutura gênica, análise filogenética/fenética, localização cromossômica, identificação de elementos *cis*

regulatórios em promotores, dentre outros (Figura 3). Dentre algumas das ferramentas empregadas nessa etapa, pode-se citar:

- TBtools (*Toolkit for Biologists integrating various biological data-handling tools*) abrange mais de 130 funções, que incluem manipulação de arquivos GTF/GFF3, conversão do formato de arquivos, representação gráfica de motivos, domínios e estruturas éxon-ínton, mapeamento de genes em cromossomos, visualização de sintenia, edição e anotação de árvores filogenéticas, visualização de dados de expressão dentre outras (52).

- GSDS (*Gene Structure Display Server*) (http://gsds.gao-lab.org/Gsds_about.php) é um recurso web amplamente empregado para visualização de estruturas éxon-ínton (53).

- PlantPAN (*Plant Promoter Analysis Navigator*) (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/>) é um recurso web para detecção de sítios de ligação de fatores de transcrição (TFBSs), fatores de transcrição correspondentes e outros elementos regulatórios a partir de sequências de promotores (54).

- As ferramentas OrthoFinder (55), OrthoMCL (56) e Inparanoid8 (<https://inparanoid.sbc.su.se/cgi-bin/index.cgi>) (57) são amplamente empregadas para detecção de ortólogos.

- McScanX é utilizado para detecção de eventos de duplicação (segmental, dispersa, proximal e *tandem*), estimar número de eventos WGD (*whole-genome duplication*), detecção de ortólogos colineares e análise de expansão de famílias gênicas (58).

- Os *softwares* MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (59) e Clustal (60) são ferramentas extensivamente utilizadas para realizar alinhamentos múltiplos e construção de árvores fenéticas/filogenéticas.

- Os recursos *online* Evolview (<https://www.evolgenius.info/evolview>) (61) e iTOL (<https://itol.embl.de/>) (62) são empregados para visualização, anotação e edição de árvores.

Existem também as ferramentas voltadas especificamente para análise da estrutura de proteínas, são estas:

- SMART *Simple Modular Architecture Research Tool* (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) é um recurso web para identificação e anotação de domínios de proteínas e visualização de suas arquiteturas (63).

- CDD *Conserved Domain Database* é um banco de dados localizado na *entrez protein* do NCBI, é amplamente utilizado para identificação de domínios conservados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (64).

- PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) é um banco de dados de famílias proteicas que abriga perfis HMM para identificação de mais de 19.000 famílias (65).

- Jalview é um *software* para edição, análise e anotação de alinhamentos múltiplos, além de predição de estruturas secundárias (66).

- MEME *suite* é um servidor *web* para detecção, análise e visualização de assinaturas de sequência (motivos) presentes em um dado *input* (67).

- As ferramentas ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) (68) e JVirGel (<http://www.jvirgel.de/>) (69) computam parâmetros físico-químicos a partir das sequências peptídicas, tais como composição de aminoácidos, ponto isoelétrico e peso molecular.

- As ferramentas CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (70), Wolf Psort (<https://wolfsort.hgc.jp/>) (71) e LOCALIZER (<https://localizer.csiro.au/>) (72) são recursos empregados para identificação das localizações subcelulares de proteínas.

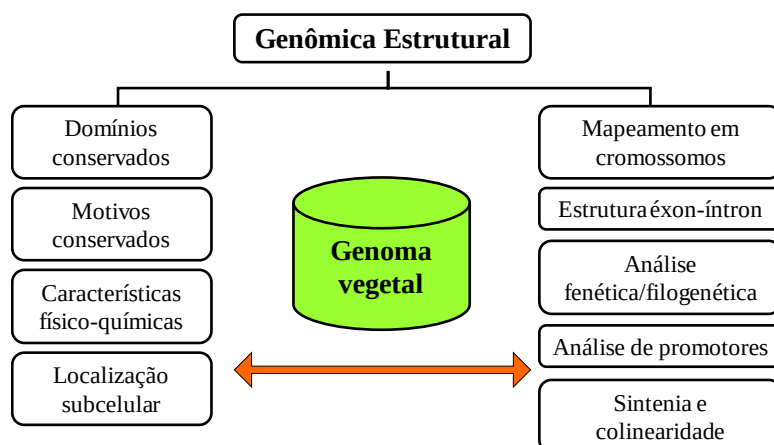


Figura 3 – Representação esquemática evidenciando as análises estruturais que podem ser executadas a partir de um genoma de referência.

CONCLUSÕES

A obtenção de um genoma de referência de alta qualidade confere benefícios em análises genéticas posteriores de caracterização dos elementos que compõem esse genoma bem como, na tomada de decisões em programas de melhoramento. Dentre essas vantagens, a identificação de genes e sua associação com mecanismos moleculares que atuam na variação de traços de interesse econômico, tais como aqueles associados com maior produtividade, qualidade de frutos ou tolerância a estresses bióticos e abióticos. Os dados de estudos genômicos são de fundamental importância pois permitem o melhor entendimento da base genética da diversidade em plantas, além de facilitar a introdução de traços de interesse mediante técnicas de transformação genética para obtenção de variedades superiores.

REFERÊNCIAS

1. Fukushima A, Kusano M, Redestig H, Arita M, Saito K. Integrated omics approaches in plant systems biology 2009.
2. Neale DB, Mart PJ, Torre ARD La, Montanari S, Wei X. Novel Insights into Tree Biology and Genome Evolution as Revealed Through Genomics 2017.
3. Project, International Rice Genome Sequencing. "The map-based sequence of the rice genome." *Nature* 436.7052 (2005): 793-800.
4. Sun Y, Shang L, Zhu Q, Fan L. Twenty years of plant genome sequencing: achievements and challenges. *Trends Plant Sci* 2021;27:391–401.
5. Kyriakidou M, Tai HH, Anglin NL, Ellis D, Strömviik M V. Current Strategies of Polyploid Plant Genome Sequence Assembly 2018;9:1–15.
6. Kersey PJ. ScienceDirect Plant genome sequences: past, present , future 2019:1–8.
7. Jiao W, Schneeberger K. ScienceDirect The impact of third generation genomic technologies on plant genome assembly. *Curr Opin Plant Biol* 2017;36:64–70.
8. Schmidt MH, Vogel A, Denton AK, Istace B, Wormit A, Geest H Van De, et al. De Novo Assembly of a New *Solanum pennellii* Accession Using Nanopore Sequencing 2017;29:2336–48.
9. Lieberman-aiden E. Comprehensive Mapping of Long-Range 2012;289.
10. Phred U, Ewing B, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces 1998:186–94.
11. Andrews S: FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.2010.
12. Bolger ME, Weisshaar B, Scholz U, Stein N, Usadel B, Mayer KFX. Plant genome sequencing - applications for crop improvement. *Curr Opin Biotechnol* 2014;26:31–7.
13. Pop M. Genome assembly reborn: recent computational challenges 2009;10:354–66.

14. Buza K, Wilczynski B, Dojer N. RECORD: Reference-Assisted Genome Assembly for Closely Related Genomes 2015;2015.
15. Pop M, Phillippy A, Delcher AL, Salzberg SL. Comparative genome assembly 2004;5:237–48.
16. Gnerre S, Maccallum I, Przybylski D, Ribeiro FJ, Burton JN, Walker BJ, et al. High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data 2011;108:1513–8.
17. Huang X, Madan A. CAP3 : A DNA Sequence Assembly Program 1999:868–77.
18. Zerbino DR, Birney E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs 2008:821–9.
19. Simpson JT, Wong K, Jackman SD, Schein JE, Jones SJM. ABySS: A parallel assembler for short read sequence data 2009:1117–23.
20. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. and Its Applications to Single-Cell Sequencing 2012;19:455–77.
21. Zimin, AV, Marçais G, Puiu D, Roberts M, Salzberg SL, Yorke, JA (2013). The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics*, 29(21), 2669-2677.
22. Chin C, Peluso P, Sedlazeck FJ, Nattestad M, Concepcion GT, Clum A, et al. Phased diploid genome assembly with single-molecule real-time sequencing 2016;13.
23. Chen Y, Nie F, Xie S, Zheng Y, Bray T, Dai Q. Fast and accurate assembly of Nanopore reads via progressive error correction and adaptive read selection 2020.
24. Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. Canu : scalable and accurate long-read assembly via adaptive k -mer weighting and repeat separation 2017:722–36.
25. Vaser R, Mile Š. Raven: a de novo genome assembler for long reads 2021:2–10.
26. Wajid B, Sohail MU, Ekti AR, Serpedin E. The A, C, G, and T of Genome Assembly 2016;2016.
27. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE Genome analysis QUASt: quality assessment tool for genome assemblies 2013;29:1072–5.

28. Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva E V, Zdobnov EM. BUSCO : assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs 2015;31:3210–2.
29. Manchanda N, Li JLP, Woodhouse MR, Seetharam AS, Lawrence-dill CJ, Andorf CM, et al. GenomeQC: a quality assessment tool for genome assemblies and gene structure annotations 2020:1–9.
30. Bao Z, Eddy SR. Automated De Novo Identification of Repeat Sequence Families in Sequenced Genomes 2002:1269–76.
31. Bao W, Kojima KK, Kohany O. Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. Mob DNA 2015:4–9.
32. Ouyang S, Buell CR. The TIGR Plant Repeat Databases: a collective resource for the identification of repetitive sequences in plants 2004;32:360–3.
33. Chen RAFA, Green P. Using RepeatMasker to Identify Repetitive Elements in Genomic Sequences 2004:1–14.
34. Flynn JM, Hubley R, Goubert C, Rosen J, Clark AG. RepeatModeler2 for automated genomic discovery of transposable element families 2020;117:9451–7.
35. Price AL, Jones NC, Pevzner PA. De novo identification of repeat families in large genomes 2005;21:351–8.
36. Ouyang S, Thibaud-nissen F, Childs KL, Zhu W, Buell CR. Chapter 14 Plant Genome Annotation Methods n.d.;513:263–82.
37. Salamov AA, Solovyev V V. Ab initio Gene Finding in Drosophila Genomic DNA 2000:516–22.
38. Lomsadze A, Ter-Hovhannisyan V, Chernoff YO, Borodovsky M. Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm. Nucleic Acids Res 2005;33:6494–506.
39. Burge C, Karlin S. Prediction of Complete Gene Structures in Human Genomic DNA 1997:78–94.
40. Yao H, Guo L, Fu Y, Borsuk LA, Wen T, Skibbe S, et al. Evaluation of five ab initio gene prediction programs for the discovery of maize genes 2005:445–60.
41. Leroy P, Guilhot N, Sakai H, Bernard A, Choulet F, Theil S. TriAnnot: a versatile and high performance pipeline for the automated annotation of plant genomes 2012;3:1–14.

42. Chan K, Rosli R, Tatarinova T V, Hogan M, Firdaus-raih M, Low EL. Seqping : gene prediction pipeline for plant genomes using self-training gene models and transcriptomic data. *BMC Bioinformatics* 2017;18:1–7.
43. Hoff KJ, Lange S, Lomsadze A, Borodovsky M, Stanke M. BRAKER1: Unsupervised RNA-Seq-based genome annotation with GeneMark-ET and AUGUSTUS. *Bioinformatics* 2016;32:767–9.
44. Campbell MS, Law M, Holt C, Stein JC, Moghe GD, et al. MAKER-P: A Tool Kit for the Rapid Creation, Management, and Quality Control of Plant 2014;164:513–24.
45. Stanke M, Morgenstern B. AUGUSTUS: A web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Res* 2005;33:465–7.
46. Gene T, Consortium O. Gene Ontology: tool for the 2000;25:25–9.
47. Conesa A, Stefan G. Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in 2008;2008.
48. Zdobnov EM, Apweiler R. signature-recognition methods in InterPro 2001;17:847–8.
49. Genetics M. OntoBlast function: from sequence similarities directly to potential functional annotations by ontology terms 2003;31:3799–803.
50. Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S, et al. AmiGO: online access to ontology and annotation data 2009;25:288–9.
51. Groth D, Lehrach H, Hennig S. GOblet: a platform for Gene Ontology annotation of anonymous sequence data 2004;32:313–7.
52. Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, et al. TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. *Mol Plant* 2020;13:1194–202.
53. Hu B, Jin J, Guo A, Zhang H, Luo J. Genome analysis GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server 2015;31:1296–7.
54. Chow C, Zheng H, Wu N, Chien C, Huang H, Lee T, et al. PlantPAN 2 .0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory 2016;44:1154–60.

55. Emms DM, Kelly S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics 2019;1–14.
56. Li L, Jr CJS, Roos DS. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes 2003;2178–89.
57. Sonnhammer ELL, Ostlund G. InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic 2015;43:234–9.
58. Wang Y, Tang H, Debarry JD, Tan X, Li J, Wang X, et al. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity 2012;40:1–14.
59. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 n.d.:0–3.
60. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, Mcwilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2 .0 2007;23:2947–8.
61. Subramanian B, Gao S, Lercher MJ, Hu S, Chen W. Evolview v3: a webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees 2019;47:270–5.
62. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and 2019;47:256–9.
63. Letunic I. SMART: recent updates, new developments and status in 2020 2021;49:2020–2.
64. Marchler-bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, et al. CDD: NCBI’s conserved domain database 2015;43:222–6.
65. Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future 2016;44:279–85.
66. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench 2009;25:1189–91
67. Bailey T and, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization. AAAI Press 1994:3–9.
68. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A(In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005).

69. Hiller K, Grote A, Maneck M, Mu R, Jahn D. two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins 2006;22:2441–3.
70. Yu C, Chen Y, Lu C, Hwang J. Prediction of Protein Subcellular Localization 2006;651:643–51.
71. Horton P, Park K, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Nakai K. WoLF PSORT: protein localization predictor 2007;35:585–7.
72. Sperschneider J, Catanzariti A, Deboer K, Petre B, Gardiner DM, Singh KB, et al. LOCALIZER: subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell. Nat Publ Gr 2017:1–14.

DOI: 10.53934/9786585062046-13

Capítulo 13

AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA EM ALÇA (*Loop-mediated isothermal amplification*, LAMP): UMA REVISÃO SOBRE APLICAÇÕES

Adriane Lenhard-Vidal *; **Iara Liz Rufato Gonçalves** ; **Júlio César Vieira** ;
Eloiza Teles Caldart ; **Maria Letícia Portela** ;
Débora André de Lima Silva ; **Rafaelle Rodrigues** 

*Autor correspondente (Corresponding author) – Email: adrianelv@gmail.com

Resumo: Os métodos de diagnóstico molecular mais utilizados, como: PCR, qPCR e *nested*-PCR, requerem equipamentos caros e sofisticados, bem como recursos humanos altamente qualificados. Essas características limitam o uso dessas técnicas em locais cuja infraestrutura é pouco favorecida, como, por exemplo, os pontos de atendimento dos pacientes, sejam eles humanos ou animais; ou a campo, para diagnóstico em plantas, solo, amostras de água ou produtos de origem animal. A amplificação isotérmica mediada por loop (*Loop-mediated isothermal amplification* - LAMP), uma variação da PCR convencional, utiliza enzima que permite amplificação isotérmica em equipamento portátil e que não exige profissional altamente treinado, visto que a leitura é visual. Além disso, a técnica apresenta alta especificidade, sensibilidade, rapidez e custo reduzido, podendo ser utilizada para uma infinidade de aplicações. Este artigo aborda sobre a técnica e sobre as aplicações em saúde animal, humana e ambiental. Em suma, as limitações da técnica estão relacionadas a dificuldade no desenho dos primers e em tornar a técnica *multiplex*, melhorando ainda mais seu custo-benefício. Apesar de potencial portabilidade, acredita-se que a maior limitação para seu uso em larga escala e diretamente no local de coleta seja a falta de investimentos. Ainda assim, o diagnóstico por meio de LAMP apresenta futuro promissor e seu uso na rotina dos pontos de atendimento e a campo, sendo uma questão de tempo até que seus reagentes se tornem mais acessíveis.

Palavras-chave: ambiente; diagnóstico; fraude; PCR; saúde

INTRODUÇÃO

A amplificação de ácidos nucleicos possui diversas aplicações, desde o diagnóstico de doenças infecciosas até a detecção de distúrbios genéticos. Existem diversas técnicas para que partes do material genético sejam replicadas. Algumas exigem a desnaturação por calor, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), outras são realizadas em uma temperatura constante, como a *Nucleic Acid Sequence-Based*

Amplification (NASBA) e a *Polymerase Spiral Reaction* (PSR), porém diversas outras técnicas já foram descritas (1).

A técnica de amplificação isotérmica mediada por laços ou em alça, também chamada de LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*), foi descrita pela primeira vez em 2000, por Notomi e colaboradores (2). Trata-se de um método com alta especificidade, capaz de amplificar o DNA de forma eficiente e rápida em uma reação onde não há alteração de temperatura (2). Na LAMP utiliza-se uma DNA polimerase que seja capaz de desacoplar a dupla-hélice de DNA à medida que polimeriza uma nova fita, como a *Bst* DNA polimerase e *Bsm* DNA polimerase (1).

Para que essa reação aconteça, são utilizados dois pares de *primers*, internos e externos, capazes de reconhecer seis sequências distintas do DNA alvo (1; 2), conforme esquema apresentado na Figura 1.

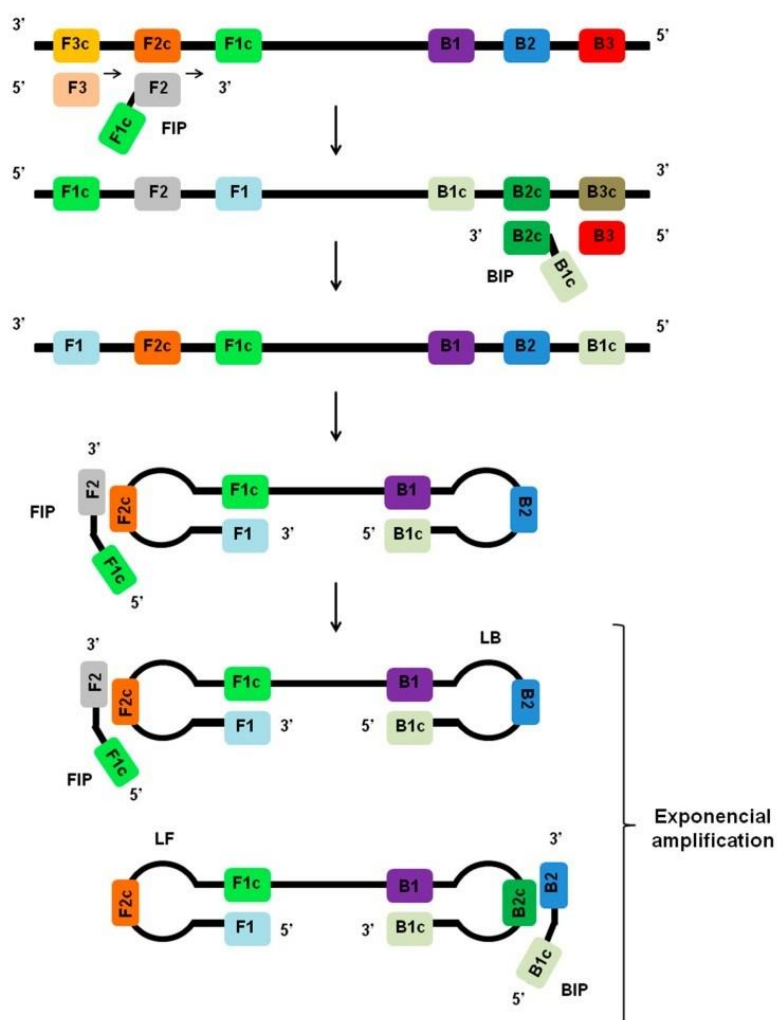


Figura 1 - Princípios da LAMP.
Fonte: Silva, Pardee e Pena, 2019 (3)

No início da reação, os *primers* internos FIP (*Foward Inner Primer*) e BIP (*Backward Inner Primer*), correspondentes às sequências sense e antisense do DNA alvo, ligam-se às regiões F2c ou B2c dentro da região alvo. Nessas regiões F2c e B2 há outras sequências definidas, localizadas fora das extremidades, sendo designadas Fc1 e B1 e F3c e B3. Assim, os *primers* externos F3 e B3 se pareiam externamente aos *primers* internos, servindo como marcador para que a enzima DNA polimerase inicie novamente o processo de polimerização, que foi iniciado na região F2/B2. O *primer* externo F3 hibridiza com a porção F3c do DNA alvo, realizando a síntese de uma fita complementar enquanto desloca a fita de DNA polimerizada pelos *primers* internos. As fitas liberadas ligadas à FIP e BIP são capazes de formar um grampo (ou *loop*) em suas extremidades, pela complementaridade da região, formando estruturas auto-hibridizantes com formato de halteres. Essa estrutura é que dará seguimento na amplificação do DNA alvo, através da hibridização dos *primers* externos às regiões complementares. O resultado da reação é composto por DNAs de haste-alça, de diversos tamanhos e estruturas com múltiplas alças formadas pela repetição do anelamento na sequência alvo da fita. Os produtos de amplificação podem ser detectados por diferentes métodos, como corantes que se ligam nas fitas duplas de DNA, medida de turbidez, irradiação com luz UV, fluorescência em tempo real, eletroforese em gel, uso de câmeras de smartphones ou sistemas de fluxo lateral (2).

A amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP - *Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*) é um método de amplificação de ácido nucleico que amplifica a sequência alvo sob condições isotérmicas com auxílio da enzima transcriptase reversa, assim a técnica induz reações para realização de transcrição reversa (RT) e uma fase de amplificação, não requerendo instrumentos sofisticados. Métodos de detecção molecular, como reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa convencional (RT-PCR convencional) e/ou RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) são amplamente utilizados para diagnosticar vários patógenos. No entanto, o RT-PCR/qRT-PCR convencional requer extração de RNA de amostras de sangue/soro (4).

RT-LAMP é uma alternativa poderosa ao RT-PCR devido à sua alta especificidade e sensibilidade, custo-benefício e rápido retorno de tempo (normalmente 30 minutos a poucas horas) (2). No RT-LAMP, a amplificação do material genético ocorre em constante temperatura e, portanto, testes de diagnóstico baseados em RT-LAMP podem ser realizados em qualquer lugar com recursos básicos, uma vez que requerem apenas um bloco de aquecimento ou um banho de água ajustado para uma única temperatura. Os produtos da reação podem ser analisados por meio de corantes convencionais de intercalação de DNA, eletroforese em gel de agarose, iluminação com luz UV ou fluorescência em tempo real (5).

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) se torna um método de baixo custo para detecção rápida de ácidos nucleicos específicos de alvos. Tem sido usado há muito tempo como uma alternativa à reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa padrão-ouro (qRT-PCR) para monitorar populações de uma variedade de patógenos, especialmente em ambientes com recursos limitados (6).

RT-LAMP para detecção de SARS-Cov-2

Pesquisas sobre coronavírus ganharam grande relevância no meio da comunidade acadêmica, pois são a causa de epidemias recentes, como SARS, MERS e, mais recentemente, COVID-19 (7). Trata-se de uma família de vírus extensa e que está desencadeando processos patológicos em várias espécies de animais, incluindo mamíferos como morcegos e camelos (8). Pertencente à família Coronaviridae, os gêneros que são capazes de causar infecções em humanos são dois: Alphacoronavirus e Betacoronavirus. SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, pertencem ao gênero Betacoronavirus (9).

Métodos imunológicos, clínicos e moleculares estão sendo utilizados para o diagnóstico dessas três síndromes. Entre as metodologias moleculares mais utilizadas estão os testes baseados na detecção de ácidos nucleicos virais, denominados *Nucleic Acid Amplification Tests* (NAAT). Essa metodologia é altamente utilizada quando se busca identificar ou caracterizar determinado tipo de patógeno ou microrganismo, pois através dessa metodologia, confirma a infecção. Desse modo, tornou-se uma ferramenta importante no diagnóstico molecular de SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, uma vez que são componentes virais de fita simples de RNA (10). Os métodos NAAT, como RT-PCR e RT-LAMP, consistem na amplificação de sequências específicas de ácido nucleico com o auxílio de *primers*. Estes, quando emparelhados a uma sequência modelo, fornecem um ponto de partida para a síntese da fita complementar de DNA pela DNA polimerase, possibilitando sua marcação, e viabilizando a visualização da amplificação por meio de fluorescência ou outras técnicas visuais, e até o uso de método quantitativo acoplado (11; 12).

Em 2003, o RT-LAMP foi relatado como um método de diagnóstico rápido e um método fácil para detecção de coronavírus (13; 14), e em 2012 para a detecção do MERS-CoV, se mostrando eficaz para vigilância epidemiológica em casos clínicos suspeitos (15; 16).

O teste RT-PCR para SARS-CoV-2 requer instalações complexas e treinamento elaborado de profissionais, portanto, possui uma capacidade limitada de teste e resultados atrasados. Consequentemente, faz com que técnicas consideradas em desenvolvimento, como RT-LAMP, ganhem força e destaque para uso durante os períodos em que surgem patógenos de alta relevância epidemiológica, como SARS-CoV-2, sendo ótima alternativa ao método RT-PCR (17).

RT-LAMP para detecção de Zika Vírus

O vírus Zika (ZIKV) é o agente etiológico de uma doença transmitida por picadas de insetos vetores infectados, e que pode ser confundida com casos simples de gripe ou virose (18), mas estudos comprovaram que a infecção pelo vírus da Zika está associada a casos mais graves, como a síndrome de Guillain-Barré, a microcefalia em recém-nascidos, bem como outras malformações congênitas (19).

A técnica padrão-ouro para a detecção molecular de ZIKV utilizado atualmente é a reação de transcriptase reversa em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR), mas exige uma infraestrutura laboratorial mais especializada elevando os custos e dificultando sua aplicação (3).

Em 2019, a Fundação Oswaldo Cruz - Recife publicou sobre a técnica RT-LAMP, para detecção do vírus Zika em amostras de mosquitos (*Aedes* e *Culex*) sem necessidade de extração, utilizando primers e enzimas específicas para otimizar o protocolo com uma única etapa, sendo possível identificar o resultado através do olho nu decorrente da mudança de cor (SYBER Green). Sua vantagem é que ele pode ser reproduzido para o diagnóstico molecular do ZIKV em laboratórios com limitação de equipamentos mais sofisticados, além de ter apresentado sensibilidade até 10.000 vezes maior que a qRT-PCR para detecção de ZIKV (3).

LAMP para detecção de patógenos em água, esgoto e outras fontes ambientais

No Brasil, no ano de 2020, foram notificados 292 surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), com 4600 indivíduos doentes, 595 hospitalizados e seis que foram a óbito. Em série histórica de 2012 a 2021, foi observado que a maior parte dos surtos ocorreram em residências (37,7%), 25,2% por ingestão de água contaminada. Dentre os agentes etiológicos, a *Escherichia coli* predominou com 29,6% dos surtos, *Staphylococcus aureus* com 12,9% e *Salmonella* spp. com 12,2%. Bactérias e vírus respondem por cerca de 75% dos surtos (20). Dentre os parasitos mais importantes causadores de DTHA temos: a *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Trichinella* spp., *Ascaris lumbricoides* e *Trypanosoma cruzi* (21).

Lalle et al. (2018) (22) afirmaram que a detecção de *T. gondii* em vegetais por meio técnicas moleculares de baixa sensibilidade (PCR) ou que exigem equipamentos caros (qPCR) limitam a aplicação na rotina. Por isso, padronizaram e validaram um LAMP utilizando tiras de papel que detectam menos de 25 oocistos em 50 g de alface pronto para consumir. Adeyemo et al. (2018) (23) apresentaram estudos de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em diferentes tipos de fontes de água utilizando imunofluorescência direta (IFD), *nested*-PCR e LAMP, sendo que o último método se mostrou mais sensível. Comparando-se IFD e LAMP para o diagnóstico de *Giardia* em água foram observados resultados similares.

A qualidade microbiológica da água costuma ser avaliada por técnicas microbiológicas, o que não permite uma análise rápida, enquanto técnicas moleculares tradicionais auxiliam neste ponto, mas necessitam de ambiente laboratorial especializado, além de muitas vezes ter custo elevado. Assim, o uso de técnicas simples de extração de material genético e de sua análise através de equipamentos portáteis facilitam a análise de contaminantes, como matéria fecal e patógenos em potencial, podendo a técnica muitas vezes ser realizada diretamente no local de coleta. A identificação de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* como indicadores de contaminação fecal de água já foi realizada por LAMP com resultados em uma hora, através de método de extração de DNA em seringa a partir de água fresca e marinha propositalmente contaminadas com os microrganismos (24), além de quantificação através da técnica de Número Mais Provável (NMP) em microchip de ácido polimetacrílico (PMMA), de amostras coletadas em reservatórios, praias, fazendas e esgoto (25).

A cólera é uma doença intestinal aguda causada pela toxina do *Vibrio cholerae*, que pode ser fatal e ainda é prevalente em países em desenvolvimento. O diagnóstico

laboratorial microbiológico pode ser demorado e testes rápidos podem não ser sensíveis ou específicos, sendo as técnicas moleculares alternativas rápidas e satisfatórias a serem utilizadas na avaliação de qualidade da água e em segurança alimentar em regiões endêmicas. A técnica de LAMP mostrou-se eficiente não apenas na detecção do vibrião em água, como também em amostras de fezes humanas e amostras intestinais de peixes e mariscos (26; 27). Quando em condições ambientais desfavoráveis de crescimento, estas bactérias passam por mudanças morfofisiológicas, tornando-se microrganismos viáveis, mas não cultiváveis. A técnica de LAMP supera esta dificuldade, sendo possível detectar o material genético na forma cocóide do *V. cholerae*, mesmo em concentrações baixas (28).

Outros patógenos de seres humanos, outros animais e plantas também já foram identificados por LAMP em diferentes fontes de água ou de esgoto: vírus causadores de diarreia, como Aichivirus A (AiV-A) (29) e Astrovírus humano (HuAstV) (30); algas tóxicas, como *Amphidinium carterae* em ambientes marinhos (31); cianobactérias produtoras de toxina microcistina (32); bactérias causadoras de pneumonia, como *Legionella* spp. (33); diferenciação de *Leptospira* spp. patogênica e não patogênica (34); detecção de *Listeria monocytogenes* (35); e detecção de zoósporos do fitopatógeno *Phytophthora capsici*, um oomiceto devastador de solanáceas e curcubitáceas, altamente resistente à condições ambientais adversas (36).

LAMP para diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária

Zoonoses são doenças naturalmente transmissíveis entre humanos e animais. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, cerca de 60% das doenças infecciosas humanas têm sua origem em animais; pelo menos 75% das doenças infecciosas emergentes dos seres humanos. Revisões de literatura compararam a acurácia LAMP e outros métodos de diagnóstico de zoonoses.

A leptospirose é uma enfermidade mundialmente distribuída causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Gunasegar & Neela (2021) (37) realizaram revisão sistemática e metanálise de 61 estudos, observaram as seguintes sensibilidades combinadas de LAMP e PCR convencional: 0,80 e 0,54, respectivamente. Erber et al. (2022) (38) compararam a LAMP com microscopia e outros métodos moleculares para diagnóstico de leishmaniose visceral. Alta sensibilidade e especificidade de LAMP foi observada (>90%). Moeini-Zanjani et al. (2020) (39) compararam LAMP com PCR convencional para detecção de *Brucella abortus*, sendo o limite de detecção da LAMP de 10 fg/μL de DNA em 36 min, resultado 10 vezes melhor do que a PCR. Por outro lado, Batinga et al. (2018) (40) padronizaram e validaram um LAMP para detecção de *Brucella canis*, e ao comparar cultura, PCR e LAMP, as proporções de positivos foram: 31,57% (18/57), 33,34% (19/57), e 14,03% (8/57), demonstrando que, nesse caso, a performance da LAMP não foi satisfatória.

O diagnóstico rápido e a campo de enfermidades que podem prejudicar exportações de produtos de origem animal no Brasil pode reduzir drasticamente as perdas econômicas. A Doença de Newcastle (DN) é devastadora para a produção de aves (41). Bello et al. (2018) (42) em trabalho de revisão afirmaram que a LAMP tem sensibilidade e especificidade similar a *nested*-PCR, sendo mais simples e barata. A Peste Suína

Africana (PSA) é uma doença de notificação segundo a Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) (41) e uma grande ameaça à suinocultura mundial devido ao rápido contágio e a taxa de mortalidade de 100%. Wang et al. (2019) (43) padronizaram uma LAMP em tempo real e observaram um limite de detecção de 0,1 fg o que equivale a 30 cópias/ μ L, equivalente a qPCR. A febre aftosa é uma doença viral altamente contagiosa de animais de casco fendido. Surtos dessa enfermidade em bovinos levam a enormes perdas econômicas principalmente devido ao abate sanitário obrigatório. Bath et al. (2019) (44) desenvolveram e validaram LAMP precedido de transcrição reversa para uso no campo sem a necessidade de profissional treinado em laboratório. Observaram especificidade >99% e sensibilidade de 79% utilizando-se *swabs* orais sem extração de DNA, rRT-PCR foi utilizado como padrão-ouro.

O estreitamento da relação homem-animal faz com que cada vez mais os pets sejam considerados membros da família, dessa forma a preocupação com a saúde e qualidade de vida deles é cada vez maior. Essa mudança cultural tem aumentado a demanda por testes diagnósticos acurados, com bom custo-benefício e que possam ser realizados em clínicas ou hospitais veterinários. A cinomose é uma doença que acomete cães filhotes não vacinados com alta morbidade e mortalidade, além de ser altamente contagiosa. Cho et al. (2005) (45) validaram um LAMP com transcrição reversa para detectar o vírus causador da cinomose e obtiveram uma sensibilidade e especificidade de 100% e 93,3%, respectivamente. Parthiban et al. (2012) (46) desenvolveram uma LAMP para detecção de parvovírus canino, em que foi realizada comparação com PCR convencional e *nested*-PCR, utilizando 50 amostras clínicas, sendo 19 positivas para PCR convencional, 22 por *nested*-PCR e 26 pela LAMP, que apresentou maior sensibilidade.

LAMP para detecção de patógenos em plantas

A técnica LAMP é aplicada nos estudos ligados à fitopatologia para detecção adequada de fungos, vírus, bactérias, nematoides e fitoplasmas causadores de doenças e, assim, possibilita a elaboração de estratégias adequadas de controle (47).

A primeira aplicação da técnica na área é datada de 2003 e visava detectar o vírus da folha amarela do tomate (TYLCV), da família Geminiviridae, que atinge plantações de tomate (48). Ao longo dos anos, o número de publicações com o tema aumentou, especialmente a partir de 2012. Em geral, os patógenos alvo para aplicação da detecção por LAMP são os vírus e fungos. Para detecção de vírus, que tem como material genético o RNA, utiliza-se uma variante da técnica, a RT-LAMP (49). Outra aplicação é no monitoramento da resistência de fungos aos mais diversos fungicidas. Estudos de resistência a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) e da desmetilação ganharam ênfase a partir de 2018 (50; 51). Há também um crescente número de trabalhos realizados para diagnóstico de bactérias. A publicação precursora visava a detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (52), sendo o gênero *Pseudomonas* com maior número de publicações, juntamente com *Xanthomonas*. Ambos apresentam capacidade de causar doença em todos os estágios de desenvolvimento da planta, tornando-se necessárias medidas de controle imediatas e ressaltando a importância dos estudos em questão (53).

Além da variabilidade dos alvos, os estudos visam ampliar cada vez mais as possibilidades de amostragem, utilizando desde tecidos vegetais e colônias de microrganismos até sementes ou solo (53). A técnica é também objeto de estudo para incorporação em biossensores portáteis de campo (54).

Em suma, na fitossanidade a aplicação da técnica é de grande valia para uma melhor triagem rotineira, com grande aplicabilidade, levando a redução da propagação de doenças e perdas de safra. Assim, melhores estratégias são traçadas para definição e implementação de mecanismos de controle de pragas, com o objetivo final de manter uma viabilidade econômica na produção.

LAMP para detecção de fraudes em produtos de origem animal

A produção de alimentos de origem animal no Brasil cresce a cada ano, a balança comercial indicou um *superavit* em 2021 de 105 bilhões de dólares decorrente das exportações relativas ao agronegócio, sendo que a carne bovina, de frango e suína ocuparam o ranking de maiores valores exportados. A importância econômica desses itens, atrelada a rápida inovação e desenvolvimento de novos produtos e o surgimento de novas demandas de consumidores mais exigente e com maior poder aquisitivo, motiva a adulteração de produtos de origem animal no sentido de aumentar a lucratividade, podendo acarretar redução da qualidade nutricional e até da segurança dos alimentos, além de danos ao consumidor (55). Para solucionar esse problema se faz necessário o estabelecimento de uma técnica custo-efetiva, sensível, específica, de fácil e rápida execução e reproduzível nos diferentes laboratórios oficiais e particulares Brasil afora. A técnica de LAMP apresenta as qualidades acima referidas e, ainda, permite a realização dos testes a campo com o uso de equipamentos portáteis (55).

Em estudo recente, Jawla et al. (2021) (56) desenvolveram e padronizaram um teste de fluxo lateral baseado em LAMP para a detecção de DNA bovino. O teste apresentou limite de detecção de 1% de mistura. Wang, Zhu & Wang (2020) (57) padronizaram uma reação de LAMP com detecção visual para identificar adulteração por carne de asno, a especificidade foi testada frente a outras seis espécies animais, inclusive cavalo, com limite de detecção de 1%. Sul, Kim & Kim (2019) (58) desenvolveram uma LAMP direta para detecção de carne de frango em equipamento portátil, a especificidade foi testada frente a 23 espécies animais e o limite de detecção foi de 0,1% para carne crua e 1% para carne tratada por calor ou pressão. Cai, Kong e Chu (2020) (59) desenvolveram um LAMP em tempo real para detecção de DNA suíno. A amplificação não apresentou reatividade cruzada com outras 11 espécies, a reação demorou 20 minutos e o limite de detecção foi de 1,76 pg/ μ L de amostra de DNA extraído.

O leite é um produto de alto valor nutricional e consumido mundialmente. A prática de adulteração nesse produto e seus derivados é a mais comum, sendo que a substituição de um leite mais caro por outro de menor valor agregado é a mais praticada (60). Yu et al. (2021) (61) desenvolveram uma LAMP em tempo real baseada em chip microfluídico para detectar simultaneamente leite de vaca, camelo, cavalo, cabra e iaque. A técnica leva 90 minutos e apresentou excelente sensibilidade e especificidade, detectando 2,5% de mistura. Kim & Kim (2017) (62), desenvolveram um método de LAMP duplex em tempo real que não exige extração de DNA para detectar leite de vaca

e cabra a campo, utilizando um sistema portátil. O alvo da amplificação foi o gene mitocondrial citocromo b que demonstrou especificidade para outras 13 espécies animais com alta sensibilidade, detectando 2% de mistura. Deb et al. (2016) (63) padronizaram uma técnica para detectar DNA de bovinos em carne ou leite comercializados como sendo de búfalos. O tempo necessário para obter o resultado foi de uma hora quarenta minutos e o teste pode detectar até 5% de mistura.

Apesar de largamente consumido no Brasil, principalmente na semana santa, poucas pessoas sabem que o bacalhau não é uma espécie de peixe, e sim, uma forma de preparo de algumas espécies de peixe, como *Gadus morhua*, *Gadus macrocephalus* e *Gadus ogac*. Alguns comerciantes ilegais confundem os consumidores oferecendo produtos oriundos de espécies com características similares (64). Li et al. (2021) (65) desenvolveram uma técnica para identificar três espécies de bacalhau e duas espécies de peixe oleoso e concluíram que a técnica pode ser aplicada para reduzir os problemas de rotulagem e adulteração de pescados. O salmão do Atlântico (*Salmo salar*) é uma espécie de pescado com alto valor agregado devido a suas características nutricionais contendo proteína e gordura saudáveis; além disso, a demanda tem sido cada vez maior devido a popularização de produtos que utilizam o filé de salmão cru, como sushis e sashimis. Qiuping et al. (2022) (66) compararam diferentes métodos de extração de DNA e concluíram que influenciam no resultado da LAMP, principalmente o quesito pureza. Xiong et al. (2020) (67) padronizaram uma LAMP e uma PCR, a especificidade foi confirmada frente a 12 espécies de pescados, já a sensibilidade foi cerca de dez vezes maior na PCR quando comparada à LAMP. Ao testar as técnicas em amostras comerciais o resultado foi igual, sendo que a LAMP é uma técnica mais rápida e portátil.

CONCLUSÕES

Os estudos revisados nesta pesquisa apresentaram resultados positivos e sugerem um futuro otimista, representando uma ferramenta promissora para a detecção do material genético de interesse. Na maioria de suas aplicações, o uso de LAMP na rotina é uma questão de tempo, até que seus reagentes se tornem mais acessíveis.

A LAMP é uma técnica robusta, com resultados visíveis a olho nu e que não é afetada por inibidores e contaminantes usuais da PCR. É simples em comparação aos demais ensaios moleculares, mas reproduz o desempenho dos mesmos ou, ainda, apresenta maior sensibilidade e especificidade.

Apresenta como característica um fluxo de trabalho descomplicado, com reagentes e dispositivos de detecção de baixo custo, de caráter muitas vezes portátil. Portanto, traz consigo o potencial de diminuir custos nos laboratórios de diagnóstico molecular, além de viabilizar a execução em locais sem instalações ou mão de obra especializada, inclusive a campo. Além disso, muitas vezes apresenta redução no tempo até a obtenção dos resultados quando comparada às técnicas padrão ouro ou outras técnicas moleculares.

Considerando-se detecção de patógenos, LAMP apresenta vantagens principalmente quando se trata de microrganismos não cultiváveis, de difícil isolamento ou que apresentam dificuldades para manutenção do cultivo *in vitro*.

Sua principal dificuldade está no desenho dos primers e em tornar a técnica *multiplex*, melhorando ainda mais seu custo-benefício. Apesar de potencial portabilidade, acredita-se que a maior limitação para uso dessa técnica em larga escala e direto no local de coleta será a falta de investimentos.

AGRADECIMENTOS

À prof.^a Dr.^a Juliana Morini Küpper Cardoso Perseguini, curso de especialização em Biologia Molecular da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela supervisão. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Zatti MS. Métodos de amplificação isotérmica e algumas aplicações. Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016. Available from: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/43139>
2. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
3. Silva SJRD, Pardee K, Pena L. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review. *Viruses.* 2019 Dec 23; 12(1):19. doi: 10.3390/v12010019.
4. Sano S, Fukushi S, Yamada S, Harada S, Kinoshita H, Sugimoto S, et al. Development of an RT-LAMP Assay for the Rapid Detection of SFTS Virus. *Viruses.* 2021 Apr 16; 13(4): 693. doi: 10.3390/v13040693.
5. Quyen TL, Ngo TA, Bang DD, Madsen M, Wolff A. Classification of Multiple DNA Dyes Based on Inhibition Effects on Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Prospect for Point of Care Setting. *Front Microbiol.* 2019 Oct 15;10:2234. doi: 10.3389/fmicb.2019.02234.
6. Newman CM, Ramuta MD, McLaughlin MT, Wiseman RW, Karl JA, Dudley DM, et al. Initial evaluation of a mobile SARS-CoV-2 RT-LAMP testing strategy. *medRxiv* [Preprint]. 2021 Feb 27:2020.07.28.20164038. doi: 10.1101/2020.07.28.20164038.
7. Čivljak R, Markotić A, Kuzman I. The third coronavirus epidemic in the third millennium: what's next? *Croat Med J.* 2020 Feb 29;61(1):1-4. doi: 10.3325/cmj.2020.61.1.
8. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):747-756. doi: 10.1080/22221751.2020.1745095.
9. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Mar;19(3):155-170. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
10. Oliveira BA, Oliveira LC, Sabino EC, Okay TS. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2020 Jun 29;62:e44. doi: 10.1590/S1678-9946202062044.

11. El-Tholoth M, Bau HH, Song J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry. *ChemRxiv* [Preprint]. 2020 Feb 19. doi: 10.26434/chemrxiv.11860137.
12. Zhang Y, Ren G, Buss J, Barry AJ, Patton GC, Tanner NA. Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride. *Biotechniques*. 2020 Sep;69(3):178-185. doi: 10.2144/btn-2020-0078.
13. Poon LL, Leung CS, Tashiro M, Chan KH, Wong BW, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Chem*. 2004 Jun;50(6):1050-2. doi: 10.1373/clinchem.2004.032011.
14. Hong TC, Mai QL, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol*. 2004 May;42(5):1956-61. doi: 10.1128/JCM.42.5.1956-1961.2004.
15. Shirato K, Yano T, Senba S, Akachi S, Kobayashi T, Nishinaka T, et al. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Viol J*. 2014 Aug 8;11:139. doi: 10.1186/1743-422X-11-139.
16. Lee SH, Baek YH, Kim YH, Choi YK, Song MS, Ahn JY. One-Pot Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Detecting MERS-CoV. *Front Microbiol*. 2017 Jan 9;7:2166. doi: 10.3389/fmicb.2016.02166.
17. Kashir J, Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Med Hypotheses*. 2020 Aug;141:109786. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109786.
18. Domingos IM. Políticas Sanitárias no combate ao Vírus Zika. *Percurso*. 2017; 2(21): 186-200.
19. Soares A, Santos FR, Melo LM, Negreiros NF, Silva ACRA. Associação do Zika Vírus com os casos de microcefalia no Brasil. *Rev Eletr Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium*. 2019; 4:20-28.
20. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema de Informação em Saúde Animal. [2022]. Available at: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/epidemiologia/portugues>
21. Zolfaghari Emameh R, Purmonen S, Sukura A, Parkkila S. Surveillance and diagnosis of zoonotic foodborne parasites. *Food Sci Nutr*. 2017 Nov 12;6(1):3-17. doi: 10.1002/fsn3.530
22. Lalle M, Possenti A, Dubey JP, Pozio E. Loop-Mediated Isothermal Amplification-Lateral-Flow Dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad. *Food Microbiol*. 2018 Apr;70:137-142. doi: 10.1016/j.fm.2017.10.001.

23. Adeyemo FE, Singh G, Reddy P, Stenström TA. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Trop.* 2018 Aug;184:15-28. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.01.011.
24. Lee S, Khoo VSL, Medriano CAD, Lee T, Park SY, Bae S. Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple DNA extraction and portable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR methods. *Water Res.* 2019 Sep 1;160:371-379. doi: 10.1016/j.watres.2019.05.049.
25. Fu J, Chiang ELC, Medriano CAD, Li L, Bae S. Rapid quantification of fecal indicator bacteria in water using the most probable number - loop-mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) approach on a polymethyl methacrylate (PMMA) microchip. *Water Res.* 2021 Jul 1;199:117172. doi: 10.1016/j.watres.2021.117172.
26. Xu M, Fu H, Chen D, Shao Z, Zhu J, Alali WQ, Chen L. Simple Visualized Detection Method of Virulence-Associated Genes of *Vibrio cholerae* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Front Microbiol.* 2019 Dec 20;10:2899. doi: 10.3389/fmicb.2019.02899.
27. Chen D, Liang Z, Ren S, Alali W, Chen L. Rapid and Visualized Detection of Virulence-Related Genes of *Vibrio cholerae* in Water and Aquatic Products by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Food Prot.* 2022 Jan 1;85(1):44-53. doi: 10.4315/JFP-21-182.
28. Chamanrokh P, Colwell RR, Huq A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1. *Can J Microbiol.* 2022 Feb;68(2):103-110. doi: 10.1139/cjm-2021-0142.
29. Lee JY, Kim JH, Rho JY. Development of Rapid and Specific Detection for the Human Aichivirus A Using the Loop-Mediated Isothermal Amplification from Water Samples. *Indian J Microbiol.* 2019 Sep;59(3):375-378. doi: 10.1007/s12088-019-00803-3.
30. Lee JY, Rho JY. Development of diagnostic method for human Astrovirus with rapid, specific and high sensitivity using loop-mediated isothermal amplification method. *Korean J Agric Sci.* 2020; 47(1): 173-182. doi: 10.7744/kjoas.20200009
31. Wang L, Chen GF, Zhang CY, Wang YY, Sun R. Rapid and sensitive detection of *Amphidinium carterae* by loop-mediated isothermal amplification combined with a chromatographic lateral-flow dipstick. *Mol Cell Probes.* 2019 Feb;43:72-79. doi: 10.1016/j.mcp.2018.11.001.
32. Ramya M, Kayalvizhi M, Haripriya G, Rathinasabapathi P. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in water samples using loop-mediated isothermal amplification targeting *mcyB* gene. *3 Biotech.* 2018 Sep;8(9):378. doi: 10.1007/s13205-018-1402-0.
33. Olabarria G, Eletxigerra U, Rodriguez I, Bilbao A, Berganza J, Merino S. Highly sensitive and fast *Legionella* spp. in situ detection based on a loop mediated isothermal amplification technique combined to an electrochemical transduction system. *Talanta.* 2020 Sep 1;217:121061. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121061.
34. Monica NI, Rathinasabapathi P, Ramya M. Development of real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) method for sensitive and rapid

- detection of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira*. *Lett Appl Microbiol*. 2019 Feb;68(2):196-203. doi: 10.1111/lam.13108.
35. Nathaniel BR, Ghai M, Druce M, Maharaj I, Olaniran AO. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay targeting *lmo0753* gene for detection of *Listeria monocytogenes* in wastewater. *Lett Appl Microbiol*. 2019 Oct;69(4):264-270. doi: 10.1111/lam.13200.
 36. Hudson O, Waliullah S, Hand J, Gazis-Seregina R, Baysal-Gurel F, Ali ME. Detection of *Phytophthora capsici* in Irrigation Water using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Vis Exp*. 2020 Jun 25;(160). doi: 10.3791/61478.
 37. Gunasegar S, Neela VK. Evaluation of diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) compared with polymerase chain reaction (PCR) for *Leptospira* spp. in clinical samples: a systematic review and meta-analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021 Jul;100(3):115369. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115369.
 38. Erber AC, Sandler PJ, de Avelar DM, Swoboda I, Cota G, Walochnik J. Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocols: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*. 2022 Jan 24;15(1):34. doi: 10.1186/s13071-021-05133-2.
 39. Moeini-Zanjani A, Pournajaf A, Ferdosi-Shahandashti E, Gholami M, Masjedani F, Khafri S, Rajabnia R. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and conventional PCR tests for diagnosis of common *Brucella* species. *BMC Res Notes*. 2020 Nov 13;13(1):533. doi: 10.1186/s13104-020-05377-8.
 40. Batinga MCA, de Lima JTR, Gregori F, Diniz JA, Muner K, Oliveira TMFS, Ferreira HL, Soares RM, Keid LB. Comparative application of IS711-based polymerase chain reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for canine brucellosis diagnosis. *Mol Cell Probes*. 2018 Jun;39:1-6. doi: 10.1016/j.mcp.2018.02.003.
 41. World Animal Health Information System (WAHIS portal). Animal Health Data. 2022. Available at: <https://www.woah.org/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/disease-data-collection/world-animal-health-information-system/>
 42. Bello MB, Yusoff K, Ideris A, Hair-Bejo M, Peeters BPH, Omar AR. Diagnostic and Vaccination Approaches for Newcastle Disease Virus in Poultry: The Current and Emerging Perspectives. *Biomed Res Int*. 2018 Aug 5;2018:7278459. doi: 10.1155/2018/7278459.
 43. Wang D, Yu J, Wang Y, Zhang M, Li P, Liu M, Liu Y. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and visual LAMP assay for detection of African swine fever virus (ASFV). *J Virol Methods*. 2020 Feb;276:113775. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.113775.
 44. Bath C, Scott M, Sharma PM, Gurung RB, Phuentshok Y, Pefanis S, et al. Further development of a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of foot-and-mouth disease virus and validation in the field with use of an internal positive control. *Transbound Emerg Dis*. 2020 Nov;67(6):2494-2506. doi: 10.1111/tbed.13589.
 45. Cho HS, Park NY. Detection of canine distemper virus in blood samples by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Vet Med B Infect*

- Dis Vet Public Health. 2005 Nov;52(9):410-3. doi: 10.1111/j.1439-0450.2005.00886.x
46. Parthiban M, Divya KC, Kumanan K, Bargavi DS. A rapid and highly reliable field-based LAMP assay of canine parvovirus. *Acta Virol.* 2012;56(1):71-4. doi: 10.4149/av_2012_01_71.
 47. Tomlinson J., Boonham N. Potential of LAMP for detection of plant pathogens. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.* 2008. 3(66): 1-7. doi: 10.1079/PAVSNNR20083066
 48. Fukuta S, Kato S, Yoshida K, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *J Virol Methods.* 2003 Sep;112(1-2):35-40. doi: 10.1016/s0166-0934(03)00187-3.
 49. Panno S, Matić S, Tiberini A, Caruso AG, Bella P, Torta L, Stassi R, Davino AS. Loop Mediated Isothermal Amplification: Principles and Applications in Plant Virology. *Plants (Basel).* 2020 Apr 6;9(4):461. doi: 10.3390/plants9040461.
 50. Fan F, Yin WX, Li GQ, Lin Y, Luo CX. Development of a LAMP Method for Detecting SDHI Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 2018 Aug;102(8):1612-1618. doi: 10.1094/PDIS-12-17-1933-RE.
 51. Chen S, Schnabel G, Yuan H, Luo C. LAMP detection of the genetic element 'Mona' associated with DMI resistance in *Monilinia fructicola*. *Pest Manag Sci.* 2019 Mar;75(3):779-786. doi: 10.1002/ps.5178.
 52. Li X, Nie J, Ward L, Madani M, Hsiang T, Zhao Y, De Boer SH. Comparative genomics-guided loop-mediated isothermal amplification for characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J Appl Microbiol.* 2009 Sep;107(3):717-26. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04262.x.
 53. Neves CG. Souza Júnior IT, Barros DR. Amplificação isotérmica mediada por loop para detecção de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP).* 2022; 28: 7-34. doi: 10.31976/0104-038321v270001.
 54. Ali Q, Ahmar S, Sohail MA, Kamran M, Ali M, Saleem MH, et al. Research advances and applications of biosensing technology for the diagnosis of pathogens in sustainable agriculture. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021 Feb;28(8):9002-9019. doi: 10.1007/s11356-021-12419-6.
 55. Hong E, Lee SY, Jeong JY, Park JM, Kim BH, Kwon K, Chun HS. Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. *J Sci Food Agric.* 2017 Sep;97(12):3877-3896. doi: 10.1002/jsfa.8364
 56. Jawla J, Kumar RR, Mendiratta SK, Agarwal RK, Kumari S, Saxena V, Kumar D, et al. Paper-based loop-mediated isothermal amplification and lateral flow (LAMP-LF) assay for identification of tissues of cattle origin. *Anal Chim Acta.* 2021 Mar 15;1150:338220. doi: 10.1016/j.aca.2021.338220.
 57. Wang y, Zhu K, Wang D. Visual detection of donkey-derived ingredients by loop-mediated isothermal amplification with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol sodium salt. *J Food.* 2020; 18(1): 240-244. doi: 10.1080/19476337.2020.1740326
 58. Sul SY, Kim MJ, KIM HY, Development of a direct loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and simple on-site detection of chicken in

- processed meat products. *Food Control*. 2019; 98: 194-199. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.11.025
59. Cai S, Kong F, Xu S. Detection of porcine-derived ingredients from adulterated meat based on real-time loop-mediated isothermal amplification. *Mol Cell Probes*. 2020 Oct;53:101609. doi: 10.1016/j.mcp.2020.101609
 60. Poonia A, Jha A, Sharma R, Singh HB, Rai AK, Sharma N. Detection of adulteration in milk: A review. *Int J Dairy Technol*. 2017; 70: 23-42. doi: 10.1111/1471-0307.12274
 61. Yu W, Chen Y, Wang Z, Qiao L, Xie R, Zhang J, et al. Multiple authentications of high-value milk by centrifugal microfluidic chip-based real-time fluorescent LAMP. *Food Chem*. 2021 Jul 30;351:129348. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129348.
 62. Kim MJ, Kim HY. Direct duplex real-time loop mediated isothermal amplification assay for the simultaneous detection of cow and goat species origin of milk and yogurt products for field use. *Food Chem*. 2018 Apr 25;246:26-31. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.014.
 63. Deb R, Sengar GS, Singh U, Kumar S, Alyethodi RR, Alex R et al. Application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Cow Components Adulterated in Buffalo Milk/Meat. *Mol Biotechnol*. 2016 Dec;58(12):850-860. doi: 10.1007/s12033-016-9984-4.
 64. Armani A, Guardone L, Castigliengo L, D'Amico P, Messina A, Malandra R, et al. DNA and Mini-DNA barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market. *Food Control*. 2015; 50: 589-596. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.025
 65. Li H, Xie R, Yu W, Wang N, Chen A. Rapid identification of cod and oil fish components based on loop-mediated isothermal amplification. *Agriculture*. 2021; 545: 737209. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737209
 66. Qiuping L, Yinghao C, Wenjie X, Xiaowen C, Min C, Xiaohui X, et al. Rapid identification of Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) using self-quenching fluorogenic approach. *J Food Composition Anal*. 2022; 105: 104224. doi: 10.1016/j.jfca.2021.104224
 67. Xiong X, Huang M, Xu W, Cao M, Li Y, Xiong X. Tracing Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Processed Fish Products Using the Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and PCR Assays. *Food Anal Methods*. 2020; 13: 1235-1245. doi: 10.1007/s12161-020-01738-y

DOI: 10.53934/9786585062046-14

Capítulo 14

ANÁLISE DE GENOMAS COMPLETOS DE SARS-COV-2 DE RESIDENTES DO ESPÍRITO SANTO

Milenna Machado Pirovani *; Renata Torezani ;

Greiciane Gaburro Paneto 

*Autor correspondente (Corresponding author) – Email:
milennapirovani@hotmail.com

O novo coronavírus teve o seu início na cidade chinesa de Wuhan, no ano de 2019, e logo se tornou um vírus emergente responsável por levar a humanidade a uma grave crise sanitária global. O nome do vírus que causa a doença é SARS-CoV-2. A diversidade deste acontece, principalmente, por três motivos já estudados: (I) A enzima RNA polimerase, dependente de RNA, responsável pela replicação do seu material genético, não segue a sequência genética com total fidelidade; (II) como consequência do primeiro item, este possui frequência elevada de recombinação homóloga do RNA; (III) os coronavírus possuem genomas grandes, sendo que o seu tamanho pode variar de 26 a 31 kb. Então, por conta desses motivos, há uma grande capacidade para se mutar. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi, por meio da bioinformática, detectar mutações do SARS-CoV-2 presente em amostras de residentes do estado do Espírito Santo. As amostras foram obtidas a partir do banco de dados GISAID e alinhadas e analisadas com auxílio de softwares e linguagem de programação em Python. Até maio de 2022 foi possível obter 1990 amostras, destas, os sítios que mais sofreram mutações foram: 241, 3037, 14408, diversos sítios na região spike, 28278, 28881, 28882, 28883, além das inserções: AACA. Mutações nestes sítios comumente ocorrem ao redor do mundo. A maioria das amostras pertenciam a variante Delta, mas também há números significantes da variante Gamma, Zeta e Omicron. Tratou-se de um estudo *in silico* e os resultados deste estudo contribuem para o melhor entendimento da pandemia no Espírito Santo.

Palavras-chave: Bioinformática; Coronavírus; Mutação; Pandemia; SARS-CoV-2

INTRODUÇÃO

O novo coronavírus teve o seu início na China, no ano de 2019, na cidade de Wuhan. Se tornou responsável por uma emergência sanitária que levou a humanidade a uma grave crise sanitária global. Em poucos meses, o número de casos foram subindo rapidamente nos países asiáticos, que ultrapassou a barreira de outros continentes, evoluindo para uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional, decretada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no dia 30 de janeiro de 2020 e, posteriormente, para uma pandemia no dia 11 de março de 2020 (1; 2). O primeiro caso de COVID-19 que foi confirmado no Brasil ocorreu no dia 26 de fevereiro de 2020 (3). Atualmente, em 2022, os casos confirmados no Brasil já ultrapassaram o número de 13 milhões (4).

Conforme houve a evolução de casos pelo mundo, estudos demonstraram que o vírus da Síndrome Aguda Respiratória Grave (SARS-CoV-2), causador da doença covid-19, sofria mutações muito frequentes (5; 6). A diversidade do coronavírus (CoV) acontece, principalmente, por três motivos já estudados: (I) A enzima RNA polimerase, dependente de RNA, responsável pela replicação do seu material genético, não segue a sequência genética com total fidelidade, o que gera elevadas taxas de mutação para os nucleotídeos replicados (o que os torna plásticos); (II) como consequência do primeiro item, o CoV possui frequência elevada de recombinação homóloga do RNA; (III) Os CoVs possuem genomas grandes, sendo que o seu tamanho pode variar de 26 a 31 kb. Isso contribui para uma maior plasticidade. Por conta desses três motivos, os CoVs foram levados a uma maior diversidade de genótipos e cepas, além de novas espécies que possuem a capacidade de se adaptar a novos nichos ecológicos e hospedeiro, conforme aconteceu com a pandemia causada pelo SARS-CoV-2, que foi um grande surto zoonótico (7; 8).

O genoma do SARS-CoV-2 codifica proteínas estruturais e não estruturais. As principais proteínas estruturais são: a proteína spike, também conhecida como proteína S, proteína de envelope, também chamada de proteína E, proteína de nucleocapsídeo (proteína N) e a proteína de membrana (proteína M). O envelope viral é formado pela proteína E e M, enquanto que a proteína N forma o conteúdo genético. O genoma tem duas regiões importantes que representam 2/3 de todo seu tamanho, o ORF1a e ORF1b. É nessas regiões que as proteínas não estruturais, também responsáveis pela replicação viral, são codificadas. São justamente essas proteínas acessórias que interrompem a resposta imune inata do hospedeiro (9).

Além dessas proteínas estruturais, o SARS-CoV-2 também possui proteínas não estruturais (NSPs), que são ativadas após a entrada do vírus na célula, a partir de poliproteínas de proteases virais. Essas proteases virais tem a função de liberar os NSPs para que o mesmo faça seu trabalho intracelular. Ao todo são 16 NSPs (9).

A bioinformática vem sendo utilizada para diversas análises nos últimos anos, incluindo a genômica, transcriptômica, proteômica, ciências da saúde e desenvolvimento de novos fármacos. O termo “bioinformática” é bastante amplo, abordando conhecimentos das ciências biológicas e da ciência da computação, utilizando linguagens de programação, como o R, Python e Perl, ou utilizando softwares ou banco de dados que foram desenvolvidos para esse tipo de análise (10; 11; 12; 13; 14). Desse modo, por facilitar a análise de variantes e mutações do SARS-CoV-2, o objetivo deste trabalho foi utilizar as ferramentas da bioinformática para detectar mutações do vírus causador da covid-19 presente em amostras de indivíduos residentes no estado do Espírito Santo.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho ocorreu em 5 etapas, como consta na figura 1. A primeira etapa foi a aquisição das sequências, por meio do banco de dados GISAID (<https://www.gisaid.org/>). Foram selecionadas apenas amostras do estado do Espírito Santo, de genomas completos depositados no período de 01 de janeiro de 2020 a 20 de maio de 2022. A sequência de referência do vírus SARS-CoV-2 de Wuhan (China) foi obtida no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), depositada por Wu et al. (2020). A segunda etapa constou no alinhamento das sequências, que foi dividido em duas partes:

inicialmente fez-se um alinhamento no software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, <https://www.megasoftware.net/>) pelo algoritmo MUSCLE, com uma amostragem parcial, objetivando a visualização dos SNPS e GAPS mais frequentes, que era anotado um recorte da sequência de códons nos quais as mutações ocorriam. Nesta etapa também foi possível visualizar se uma mutação era sinônima ou não (e posteriormente este dado foi confrontado com *script* em Python).

Para o alinhamento com todas as amostras foi utilizado o MAFFT version 7 online (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), que é relativamente mais rápido que o MEGA. O alinhamento pelo MAFFT utilizou-se o Clustal e, igualmente ao MEGA, as amostras foram alinhadas juntamente com a amostra referência.

Após realizado os alinhamentos, ocorreu a análise dos mesmos. A análise no MEGA ocorreu de forma mais visual e manual, enquanto que o alinhamento gerado pelo MAFFT foi submetido em um *script* em python por meio da biblioteca BioPython version 1.79 (2021), utilizando o *Jupyter Notebook* (<https://jupyter.org/>) como ambiente de desenvolvimento integrado (IDE – *Integrated Development Environment*). O *script* pode ser visualizado na figura 2. O recorte das sequências dos códons nos quais ocorriam as mutações também foram implementados neste script para a verificação da frequência de mutação em todas as amostras. As saídas deste *script* foram copiadas para uma planilha Excel 2016 e os dados foram consolidados em gráficos.

Por fim, para análise das linhagens, que ocorreu após a análise do alinhamento, foi adquirida uma tabela que a própria plataforma GISAID oferece, contendo as linhagens de cada sequência depositada no banco de dados, que contém uma coluna para a nomenclatura oficial da OMS (*Gamma, Delta, Omicron, etc.*) e outra coluna com as nomenclaturas disponíveis no Pango (<https://cov-lineages.org/>). Os dados desta tabela foram consolidados no Excel 2016, analisados e gerados gráficos.

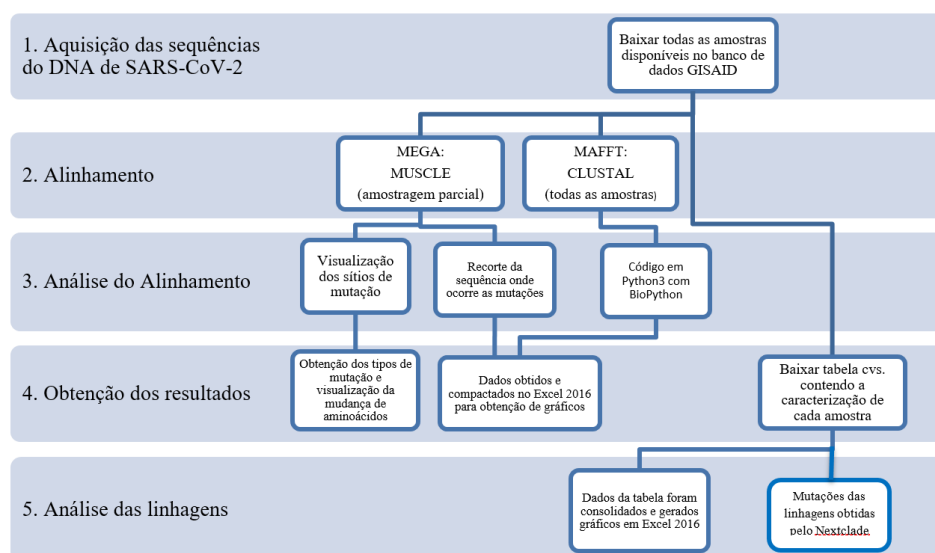


Figura 1 – Fluxograma do método adotado neste projeto.

```
In [ ]: from Bio import SeqIO
from Bio.Seq import Seq
from Bio import AlignIO
from Bio.pairwise2 import *

#Adicionando o arquivo fasta sem estar alinhado
for i in SeqIO.parse('Adicione o diretório onde se encontra o arquivo', 'informe o tipo de arquivo(fasta)'):
    print(len(i), i.id) #imprime o tamanho de cada amostra e o id

#Cada amostra terá um tamanho diferente, pois a mesma não foi alinhada.
#Assim é possível fazer um comparativo das amostras antes do alinhamento e depois

In [ ]: #adicionando o alinhamento
alinhamento = list(AlignIO.read(open('Adicione o diretório onde o alinhamento se encontra'), 'informe o tipo de alinhamento (clu:
len(alinhamento) #imprime o tamanho do alinhamento, ou seja, a quantidade de amostras
#neste caso, imprimiria 1991, pois foi o quantitativo deste trabalho

In [ ]: #conferindo se as amostras estão do mesmo tamanho
for a in alinhamento:
    print(len(a), a.id) #Antes cada amostra tinha um tamanho diferente, agora todas devem apresentar o mesmo tamanho

In [ ]: #encontrando as mutações
#REGIÃO DA MUTAÇÃO C 3037 T, sequência com a mutação (T)
for d in alinhamento:
    print('tattgtattgtctttttaccctcc' in d) #irá retornar TRUE para amostras que não tem mutação e FALSE para as que tem
#verificando se este recorte acontece em outra região do genoma
mutacao = d.seq
list(mutacao)
print(mutacao.count('tattgtattgtctttttaccctcc')) #deve retornar 1 para TRUE e 0 para FALSE.
#se retornar outros números (2, 3, 4) é porque há repetição deste recorte em outra posição do genoma

In [ ]: #verificando se as mutações são sinônimas ou não
original = Seq('ttt')
amino = original.translate()

mutacao = Seq('tgt')
amino2 = mutacao.translate()
print("Antes havia este aminoácido:", amino, "...e foi substituído por este:", amino2)
```

Figura 2 – Script em Python utilizado neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas e analisadas 1990 (hum mil e novecentos e noventa) amostras do genoma completo de SARS-CoV-2 de pessoas infectadas residentes do estado do Espírito Santo, disponíveis no banco de dados GISAID, de 01 de janeiro de 2020 até o dia 20 de maio de 2022. Além destas, também foi obtida a amostra referência de Wuhan, China, para alinhamento, totalizando 1991 (mil e novecentos e noventa e uma) amostras. Destas, 18 pertenciam a região Noroeste do estado, 25 da Nordeste, 24 da Centro-oeste, 98 da região do Rio-Doce, 31 da Sudoeste-serrana, 19 da Central-serrana, 1626 da Metropolitana, 36 da região do Caparaó, 63 da Central-Sul e 47 da região do Litoral-Sul. Das 1990 amostras, apenas 3 não continham informações do local de coleta, apenas relatando serem do estado do Espírito Santo (Figura 3).

Após as amostras serem obtidas do banco de dados, as mesmas foram submetidas ao alinhamento pelo software MEGA. Por este alinhamento foi possível observar algumas mutações em sítios específicos. Na figura 4, cada linha pontilhada equivale a uma amostra obtida no GISAID, enquanto que a sequência visualizada no topo da imagem equivale à amostra original (referência) obtida no NCBI. Os pontos significam que a sequência se mantém igual à que está no topo. Pode-se visualizar que a maioria das amostras apresentaram mutação de C/T no sítio 3037 (nesta imagem). Ao todo, foram identificadas 37 mutações por este software, que estão destacadas em vermelho na tabela 1.

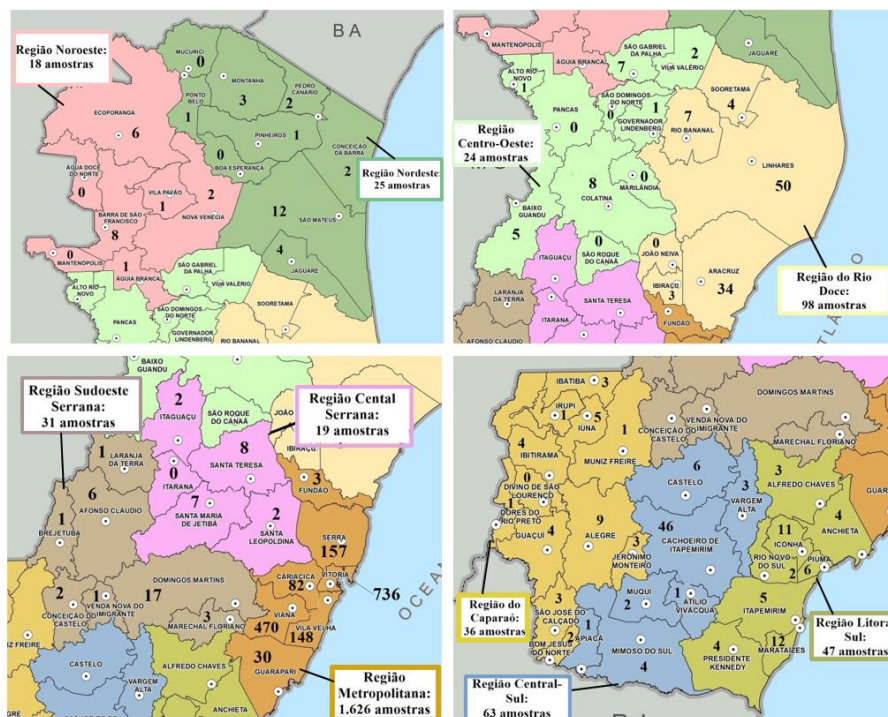


Figura 3 – Locais de origem das amostras obtidas e analisadas neste trabalho a partir do banco de dados GISAID. A numeração indica o número de amostras de cada município. Fonte: Mapa do IJSN editado pelo autor.

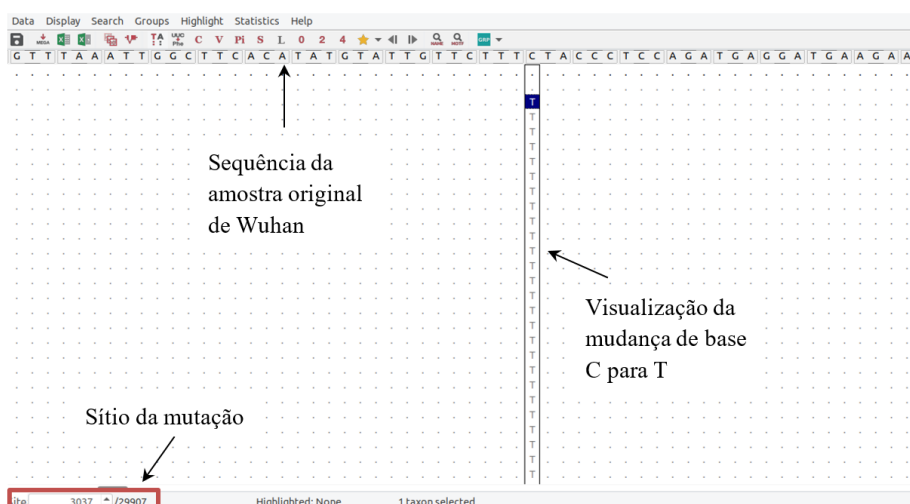


Figura 4 - Alinhamento obtido pelo software MEGA para visualização dos polimorfismos. Fonte: Os autores (2022).

Tabela 1 – Exemplo de tabela

Sequência	Sítio de Mutação	Alteração de Base
TGTGTGGCTGTCACCTCGGCTGCAT	100	C/T
ACATCTAGGTTTCGTCCGGGTGTG	241	C/T
CCGCAAGGTCTCTCTTCG	628	T/C
TATGTATTGTTCTTCTACCTCC	3037	C/T
TATGCCTTATTTCTTTACTTTATT	6781	C/T
AGTTAATGTTTAGCTTGGTT	10667	T/G
CTTGACACTCGTTTATAAAGT	11417	G/T
ACCTGTATCAAAGTAGCCAC	11824	C/T
AGTAGCCACTGTACAGTC	11833	C/T
CATAAACAAACCTTTGTGAAGA	12053	C/T
TATTAAAGGATTAACAACCT	12964	A/G
AACAGAAGTGCCTGCCAATTC	13045	G/T
TATGTGGAAAGGTTATGGCTG	13396	A/C
TTGTAGAAAAACCAGATATA	13944	C/T
GTGTTCCACCTACAAGTTTT	14408	C/T
GCTATGCACGCTGCTTCTGGT	14585	C/T
TACAAACAGAAC	21621	C/A
ATTACCC	21638	C/T
ATTTGTAAATGATCCATTTTT	21974	G/T
AAATCTTAGGGAATTGTGTT	22132	G/T
GCAAACCTGGAAAGATTGCTGA	22812	A/C
CGGTAGCACACCTTGTAAATGG	22998	C/A
TAATGGTGTGAAGGTTTTAA	23012	G/A
CCAACCCACTAATGGTGTGG	23063	A/T
TCTTTATCAGGATGTTAACTG	23403	A/G
AGGGGCTGAACATGTCAACAA	23525	C/T
TCTTGCTGCTACTAAAATGTC	24642	C/T
CAGAGCGCTTCAAAAATCATA	25572	C/T
AGTACAGACACTGGTGTGAA	26061	T/A
GATTACATCATAAACCTCATA	27299	C/T
AACAACTAAAATGT	28278	A/T
AAACG----AACAAA	28263 a 28266	---- / AACA
AAATGTCTGATAATGGACCCC	28284 a 28286	GAT/CTA
CTCTCACTCAACATGGCAAGC	28451	A/G
CTGGGCCAGAAAGCTGGACTTC	28632	G/T
GCAGTAGGGGAACCTT	28881 a 28883	GGG/AAC
AGGAACTAATCAGACAAGGAA	29152	T/C

Obs. Alguns recortes de sequência são maiores que outro devido a presença de outras mutações próximas ao sítio.

Os sítios que mais obtiveram mutações foram: 241, 3037, 14408, 21621, 21974, 22132, 22812, 22998, 23012, 23063, 23403, 23525, 24642, 28278, 28881, 28882, 28883 e a inserção AACA também foi frequente em quase 20% das amostras (347 amostras), entre os sítios 28263 a 28266. A contagem das mutações pode ser visualizada na figura 5. Destas mutações, 70,27% eram não-sinônimas, 24,32% sinônimas e 5,40% houve a

mudança da trinca de nucleotídeos para um *stop códon*. Tanto a mutação C241T quanto a C3037T são exemplos de mutações sinônimas (15). C241T trata-se de uma mutação de alta frequência, que já foi identificada no mundo inteiro, apresentando frequência global superior a 95%, o que é compatível com os resultados apresentados neste trabalho, já que 99,89% das amostras apresentavam mutação neste sítio. Apesar de ser uma mutação sinônima, são descritos efeitos secundários na estrutura do RNA, o que influencia na taxa de replicação e, por conseguinte, na infecção viral. Não há mudança significativa na estrutura secundária, porém a mutação C241T altera uma alça de haste (SL4), que em situações de SNP simples ou duplo, pode reduzir a replicação viral (16; 17). Além disso, esta mutação também está associada aos clados 20A e 20B (18). A mutação C100T também se encontra nesta região 5'UTR e está bastante associada à linhagem B.1.1.28 (19; 20).

Já em relação à mutação C3037T, apesar de sua frequência global ser maior que a C241T, já que esta mutação causa uma mudança de códon (TTC>TTT) sendo mais frequente na cepa do SARS-CoV-2 (21; 17), ainda não há muitos estudos que mostram exatamente qual o seu impacto. Existem algumas hipóteses de que esta mutação, em associação com a C241T, C14408T e A23403G, influenciam em sua patogenicidade, infectividade ou na adaptabilidade ao hospedeiro do SARS-CoV-2, além disso, todas essas mutações são características do clado G. Ademais, o sítio 3037 foi exposto como sítio hipermutável de baixa adequação, juntamente com o 11074 (22; 17; 23).

A mutação C14408T resulta em uma alteração em P323 para leucina de RNA polimerase dependente de RNA. Esta por sua vez, tem função, juntamente com a P322, de terminar a hélice 10 e gerar uma volta seguida por uma folha beta. A leucina nesta posição forma interações hidrofóbicas que cria uma variante de maior estabilidade para NSP12. Esta mutação está associada à evolução do genoma e maior densidade de mutação, podendo estar agindo de forma sinérgica com a mutação A 23403 G (24; 21). Já a mutação A 23403 G resulta em uma mutação da proteína spike D 614 G. Esta mutação está associada ao aumento da infecção viral, pela lógica de que quanto menos houver liberação de spikes, maior será a incorporação em pseudovírus e aumento da carga viral. Diversos experimentos *in vitro* conseguiram provar a infectividade desta mutação, o que pode ser levado em consideração para o desenvolvimento de vacinas a base de RNA (25; 26; 23).

A mutação G28881A e G28882A são não-sinônimas, mudando uma arginina para uma lisina e a mutação G28883C troca uma glicina por uma arginina, isso favorece para uma carga mais positiva à proteína N, havendo a hipótese de que essas mutações podem modificar a flexibilidade molecular desta proteína (21; 27). Inclusive, relatos de que a mutação G28883C (G 204 R) gera uma mutação de nucleocapsídeo capaz de aumentar a infectividade e virulência do SARS-CoV-2 (28). A proteína N tem função estrutural e essencial para o vírus, pois realiza a regulação do metabolismo celular infectado e no empacotamento do genoma viral, possuindo função importante na replicação e transcrição (29).

As mutações não-sinônimas nos sítios: C21621A (T20N), C21638T (P26S), G21974T (D138Y), G22132T (R190S), C23525T (H655Y), A22812C (K417T), G23012A (E484K), A23063T (N501Y), C24642T (T1027I) são todas na região da proteína S.

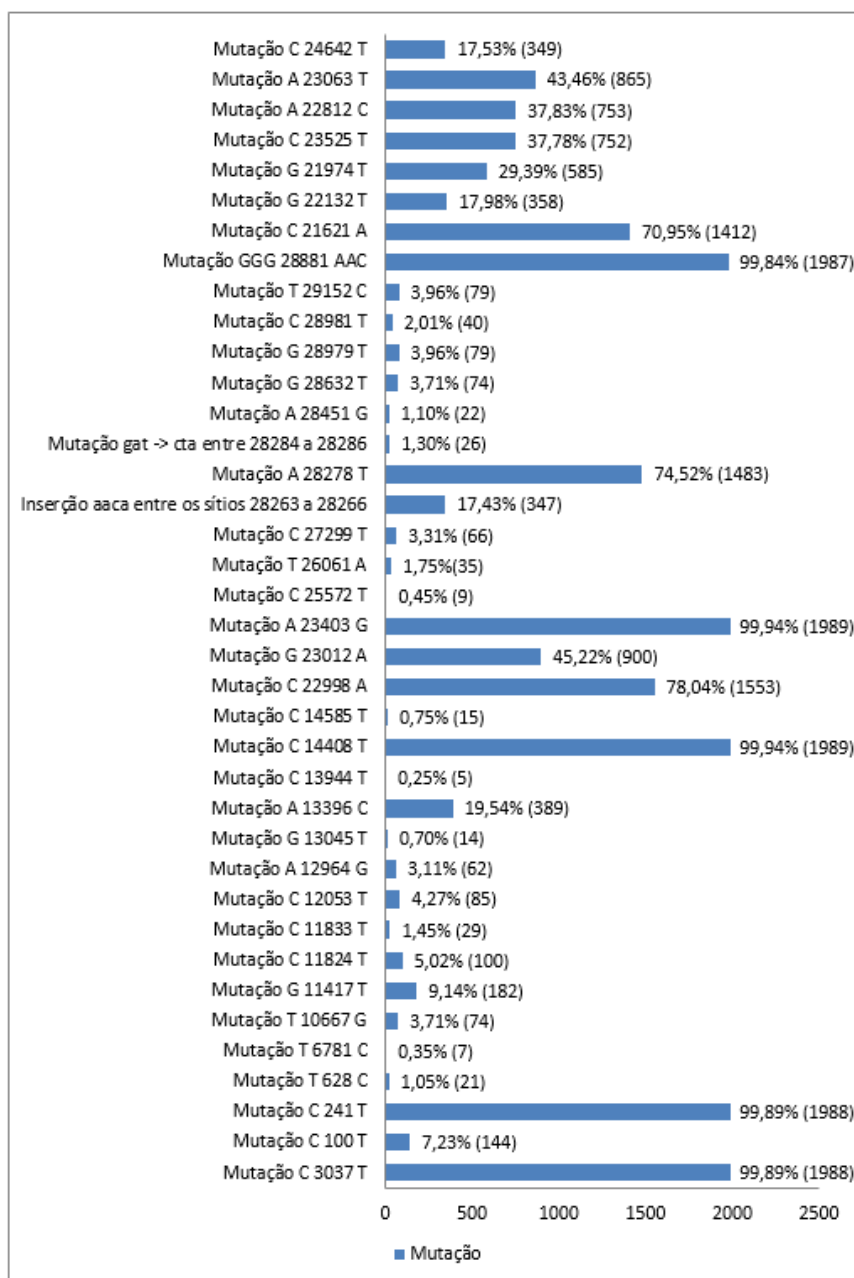


Figura 5 – Sítio das principais mutações e frequência absoluta e relativa observada nas sequências alinhadas do SARS-CoV-2 utilizadas neste estudo. Fonte: Os autores (2022).

Das amostras analisadas, a maioria das que foram obtidas pelo GISAID pertenciam à linhagem AY.99.2 e AY.99.1 (ambas delta), sendo 26,13% e 22,11%, respectivamente. Existem também muitas amostras pertencentes às linhagens P.1

(Gamma (14,57%)), BA.1 (Omicron (9,39%)) e BA.1.1 (Omicron (5,12%)), sendo estas a de maiores números, porém também foram encontradas amostras com as linhagens: AY.100, AY.101, AY.122, AY.13, AY.36, AY.5.1, AY.5.4, AY.43, AY.3, AY.46.3, AY.34.1.1, AY.6, AY.25, AY.4, AY.44, AY.118, AY.129, AY.124, AY.26, AY.9.2, P.1.2, P.1.4, P.1.9, P.1.14, P.1.11, P.1.12, P.1.7, P.2, P.7, B.1.1.7, B.1.1.28, B.1.1.33, B.40, BA.1.15, BA.1.14.1, BA.1.14.2, BA.1.14, BA.1.17, BA.1.17.2, BA.1.1.18, N.9 e N.8 (Figura 6).

A subdivisão de linhagem AY.99.2 possui mutação em A1306S, P2046L, V2930L, T3255I, T3646A, T4087I em ORF1a, P314L, G662L, A1918V em ORF1b, T19R, L452R, T478K, D614G, D950N em S, S26L em ORF3, I82T em M, V82A, T120I em ORF7a, G215C em N (30). Um estudo realizado no Rio de Janeiro também relatou dominância das sublinhagens AY.99.2 em relação a AY.99.1 (o que também é visualizado neste trabalho) (31). O AY.99.2 difere do AY.99.1 pela mutação C4927T (32).

A linhagem P.1 possui algumas mutações na proteína S que são características, como L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y e T1027I quando comparada com a sua ancestral B.1.1.28 (33). A BA.1 possui 11 mutações que são compartilhadas também em suas sublinhagens, como a G339D, S373P, S375F, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q4934, Q498R e N501Y. Estas mutações contribuem de forma significativa na transmissão em potencial e evasão imune do hospedeiro do vírus (34).

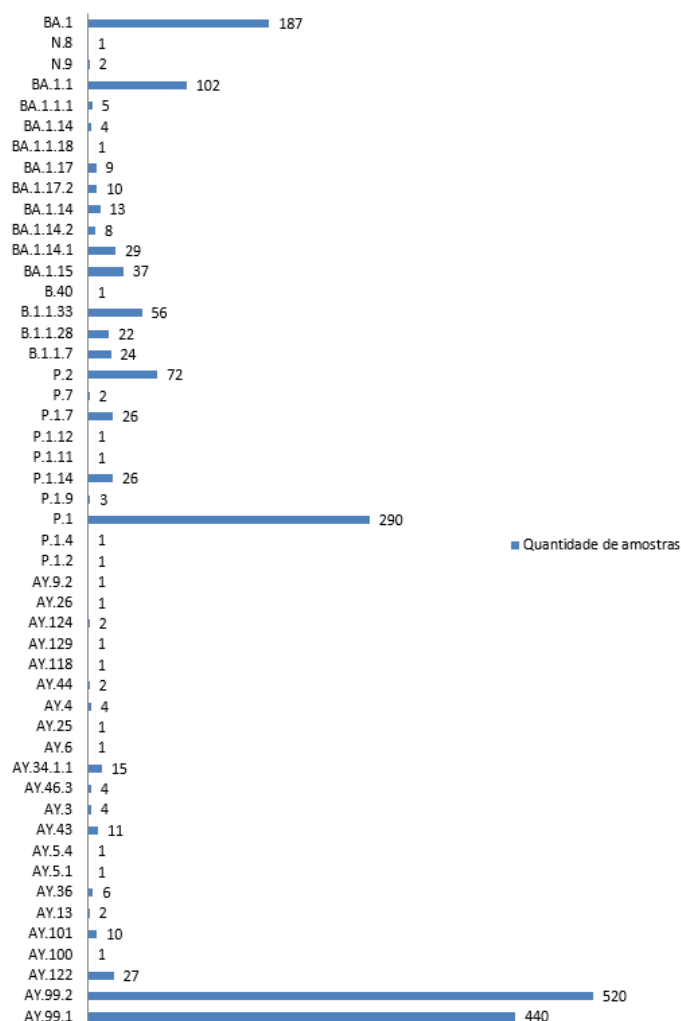


Figura 6 – Linhagens e suas respectivas ocorrências de amostra utilizadas neste estudo.
Fonte: Os autores (2022).

CONCLUSÕES

Tratou-se de um estudo *in silico*, na qual as mutações encontradas foram coerentes com o que está descrito na literatura, principalmente os sítios de alta frequência global (C100T, C241T, C3037T). Foram observados que muitas mutações ocorreram na região da proteína S, assim como tem sido estudado desde o início da pandemia. Existem algumas mutações que são descritas como características de certas linhagens, como a mutação não-sinônima T20N (C21621A), associada a linhagem P.1 (*Gamma*), porém, neste estudo, esta mutação foi encontrada em mais amostras que correspondiam a esta linhagem (70,95% das amostras continham esta mutação, mas apenas 14,57% das amostras pertenciam a linhagem P.1). O mesmo ocorre com a N501Y (A23063T), descrita como característica da linhagem P.1, porém com uma frequência bem maior quando analisada a quantidade de amostras que são provenientes desta linhagem. Isto demonstra que estudos mais específicos a respeito da evolução do vírus e quais realmente caracterizam suas linhagens devam ser desenvolvidos.

Ademais, existem muitas mutações encontradas que ainda não há muito de suas origens e funcionalidades descritas em literatura. Apesar de que a maioria não apresenta uma frequência alta em relação ao número de amostras, isto deve ser reconsiderado, já que as mutações podem interferir diretamente à eficácia de vacinas, terapias utilizadas para a covid-19 e até mesmo ao desenvolvimento da doença no paciente.

AGRADECIMENTOS

A todos os colaboradores e cientistas que depositaram os genomas no banco de dados GISAID, que foi vital para o desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization: WHO. Statement on the meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV) [Internet]. Who.int. World Health Organization: WHO; 2020. Available from: [https://www.who.int/news-room/detail/23-01-2020-statement-on-the-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/23-01-2020-statement-on-the-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))
2. WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [Internet]. www.who.int. 2020. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

3. Candido DDS, Watts A, Abade L, Kraemer MUG, Pybus OG, Croda J, et al. Routes for COVID-19 importation in Brazil. *Journal of Travel Medicine*. 2020 Mar 23;27(3).
4. Ministério da Saúde. Coronavírus Brasil [Internet]. covid.saude.gov.br. Available from: <https://covid.saude.gov.br/>
5. Benito LAO, Lima R da C, Palmeira AM de L, Karnikowski MG de O, Silva ICR da. Variantes do vírus SARS-COV-2 causadoras da COVID-19 no Brasil. *Revista de Divulgação Científica Sena Aires*. 2021 Mar 28;205–19.
6. Freitas ARR, Giovanetti M, Alcantara LCJ. Emerging variants of SARS-CoV-2 and its public health implications. *InterAmerican Journal of Medicine and Health* [Internet]. 2021 Feb 8 [cited 2021 May 17];4. Available from: <https://www.iajmh.com/iajmh/article/view/181>
7. Woo PC, Lau SK, Yuen K. Infectious diseases emerging from Chinese wet-markets: zoonotic origins of severe respiratory viral infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2006 Oct;19(5):401–7.
8. Woo PCY, Lau SKP, Huang Y, Yuen K-Y. Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. *Experimental Biology and Medicine*. 2009 Oct;234(10):1117–27.
9. Mallick R, Duttaroy AK. Structural, molecular biology and the immunopathology of SARS-CoV-2: An updated review. 2020 Jul 6.
10. Ferrari RC, Gastaldi, VD. Precisamos falar sobre Bioinformática. Universidade de São Paulo: VIII Botânica no Inverno. Capítulo 20, p. 246-262. 2018.
11. Lehueur T de P, Melo HCS. BIOINFORMÁTICA APLICADA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS. *Psicologia e Saúde em debate* [Internet]. 2018 Dec 12 [cited 2022 Aug 23];4(Suppl1):55–5. Available from: <http://www.psicodebate.dpgpsifpm.com.br/index.php/periodico/artic/e/view/401>
12. Andrade JV, Colucci YS, Gonçalves MG, Simões JPC, Carneiro DO, Shibuya CM, Siqueira AP. Participação em um curso de Bioinformática Aplicada a Oncologia Molecular: Relato de Experiência. Sistema eletrônico de administração de conferências. Vol. IV. 2019. Available from: <https://conferencia.fagoc.br/index.php/trabalhosfagoc/MOSTRAUNIFAGOCIV/paper/view/1072>
13. Lourenço DA, Choupina A. Bioinformática aplicada à caracterização de íntrons. *Adolescência: Revista Júnior de Investigação* [Internet]. 2019 [cited 2022 Aug 23];6(1):62–70. Available from: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/20452>
14. Pereira NG, Oliveira LF, Ortega JR, Versiani MS, Oliveira AME, Xavier AREO, Xavier, MAS. Bioinformática Como Ferramenta Na Análise De Epitopos Antigênicos No Design De Vacinas Contra Anaplasma Marginale, Leishmania Spp., Sars-Cov-2 E Toxina De Clostridium Septicum. *BJD*. 2019; 7(4).

15. Yang X, Dong N, Chan EW-C, Shen S. Identification of super-transmitters of SARS-CoV-2. medRxiv. 2020. 144-149.
16. Picot S, Marty A, Bienvenu A-L, Blumberg LH, Dupouy-Camet J, Carnevale P, et al. Coalition: Advocacy for prospective clinical trials to test the post-exposure potential of hydroxychloroquine against COVID-19. One Health. 2020 Apr;100131.
17. Mercatelli D, Giorgi FM. Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations. Frontiers in Microbiology. 2020 Jul 22;11.
18. Raghav S, Ghosh A, Turuk J, Kumar S, Jha A, Madhulika S, et al. Analysis of Indian SARS-CoV-2 Genomes Reveals Prevalence of D614G Mutation in Spike Protein Predicting an Increase in Interaction With TMPRSS2 and Virus Infectivity. Frontiers in Microbiology. 2020 Nov 23;11.
19. de Souza UJB, dos Santos RN, Campos FS, Lourenço KL, da Fonseca FG, Spilki FR. High Rate of Mutational Events in SARS-CoV-2 Genomes across Brazilian Geographical Regions, February 2020 to June 2021. Viruses. 2021 Sep 10;13(9):1806.
20. Phylogenetic relationship of SARS-CoV-2 sequences from Amazonas with emerging Brazilian variants harboring mutations E484K and N501Y in the Spike protein [Internet]. Virological. 2021. Available from: <https://virological.org/t/phylogenetic-relationship-of-sars-cov-2-sequences-from-amazonas-with-emerging-brazilian-variants-harboring-mutations-e484k-and-n501y-in-the-spike-protein/585>
21. Justo Arevalo S, Zapata Sifuentes D, Huallpa CJ, Landa Bianchi G, Castillo Chávez A, Garavito-Salini Casas R, et al. Global Geographic and Temporal Analysis of SARS-CoV-2 Haplotypes Normalized by COVID-19 Cases During the Pandemic. Frontiers in Microbiology. 2021 Feb 17;12.
22. Demir Ab, Benvenuto D, Abacioğlu H, Angeletti S, Ciccozzi M. Identification of the nucleotide substitutions in 62 SARS-CoV-2 sequences from Turkey. TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY. 2020 Jun 21;44(3):178–84.
23. Xi B, Jiang D, Li S, Lon JR, Bai Y, Lin S, et al. AutoVEM: An automated tool to real-time monitor epidemic trends and key mutations in SARS-CoV-2 evolution. Computational and Structural Biotechnology Journal. 2021;19:1976–85.
24. Eskier D, Karakulah G, Suner A, Oktay Y. RdRp mutations are associated with SARS-CoV-2 genome evolution. PeerJ [Internet]. 2020 Jul 21 [cited 2020 Oct 1];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7380272/>
25. Biswas SK, Mudi SR. Spike protein D614G and RdRp P323L: the SARS-CoV-2 mutations associated with severity of COVID-19. Genomics & Informatics. 2020 Dec 31;18(4):e44.
26. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 Spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. Cell [Internet].

- 2020 Jul;182(4). Available from: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(20\)30820-5](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(20)30820-5)
27. Ugurel OM, Ata O, Turgut-Balik D. An updated analysis of variations in SARS-CoV-2 genome. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*. 2020.
 28. Wu H, Xing N, Meng K, Fu B, Xue W, Dong P, et al. Nucleocapsid mutations R203K/G204R increase the infectivity, fitness, and virulence of SARS-CoV-2. *Cell Host & Microbe* [Internet]. 2021 Dec 8 [cited 2022 Mar 24];29(12):1788-1801.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34822776/#:~:text=Our%20work%20suggests%20that%20the>
 29. Kang S, Yang M, Hong Z, Zhang L, Huang Z, Chen X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2020 Apr;10(7).
 30. Gualarte JS, da Silva MS, Mosena ACS, Demoliner M, Hansen AW, Filippi M, et al. Early introduction, dispersal and evolution of Delta SARS-CoV-2 in Southern Brazil, late predominance of AY.99.2 and AY.101 related lineages. *Virus Res* [Internet]. 2022 [cited 2022 Aug 23];198702–2. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/global-literature-on-novel-coronavirus-2019-ncov/resource/pt/covidwho-1655224>
 31. Lamarca AP, Almeida LGP de, Francisco Junior R da S, Cavalcante L, Brustolini O, Gerber AL, et al. Phylodynamic analysis of SARS-CoV-2 spread in Rio de Janeiro, Brazil, highlights how metropolitan areas act as dispersal hubs for new variants. 2022 Jan 17.
 32. Romano CM, de Oliveira CM, da Silva LS, Levi JE. Early Emergence and Dispersal of Delta SARS-CoV-2 Lineage AY.99.2 in Brazil. *Frontiers in Medicine* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 7];9:930380. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35783651/>
 33. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido D da S, Mishra S, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*. 2021 Apr 14;eabh2644.
 34. Kumar S, Karuppanan K, Subramaniam G. Omicron (BA.1) and sub-variants (BA.1.1, BA.2, and BA.3) of SARS-CoV-2 spike infectivity and pathogenicity: A comparative sequence and structural-based computational assessment. *Journal of Medical Virology*. 2022 Jun 16;

DOI: 10.53934/9786585062046-15

Capítulo 15

FITOQUÍMICOS E POTENCIAL NUTRACÊUTICO DO BURITI (*Mauritia flexuosa*): REVISÃO DE LITERATURA

Juliana Rodrigues Santana¹ *; **Marcos Roberto Vitória Cristino¹ **; **Ketlen Faião¹ **; **Tiago Barcelos Valiatti² **; **Luís Fernando Polesi³ **; **Gabrieli Oliveira Folador³ **; **Gisele Teixeira de Souza Sora³ **.

¹Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas Amazônicos (PPGAA) UNIR; ²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Infectologia (UNIFESP);

³Docentes de Engenharia de Alimentos e Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas Amazônicos (PPGAA) UNIR.

*Autor correspondente- E-mail: ju_julianasantana@hotmail.com

Resumo

O conhecimento do valor nutricional e terapêutico de uma alimentação saudável tem levado ao aumento global do consumo de frutas e vegetais. O potencial nutracêutico tem sido atribuído aos compostos bioativos presentes na composição dos alimentos, capazes de modular vias metabólicas atuando na prevenção de patologias crônicas degenerativas e cardiovasculares decorrentes do estresse oxidativo. A busca por fontes fitoquímicas relevantes tem chamado a atenção da comunidade científica para a espécie *Mauritia flexuosa*, conhecida popularmente como buriti. Esse fruto considerado um alimento funcional, possui importantes bioativos em sua composição, a saber, carotenoides, flavonoides, vitaminas, ácidos graxos entre outros componentes antioxidantes. Pesquisas tem mostrado que os constituintes do buriti desempenham ação quimiopreventiva, antiplaquetária, anti-inflamatória, antibacteriano e cardioprotetor, portanto, tem grande potencial biológico a ser explorado industrialmente. No entanto, o principal desafio é dar visibilidade a esse valioso fruto amazônico, tornando demais pesquisadores e a sociedade em geral cientes do potencial desse fruto nativo. Diante disso, realizou-se uma revisão bibliográfica de artigos nacionais e internacionais pesquisados nas principais bases de dados científicas, onde foram compiladas informações sobre propriedades bioativas e nutracêuticas do buriti. Os compostos da classe dos polifenóis foram os fitoquímicos majoritários encontrados no fruto investigado, mostrando que o buriti é fonte viável de matéria-prima para uso nos setores farmacêutico, cosmético e alimentício. As pesquisas realizadas tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro* evidenciam o potencial nutracêutico do buriti na prevenção e tratamento doenças que representam grave problema de saúde pública, entre elas dislipidemia e hiperglicemia.

Palavras-chave: antioxidantes; bioativos; frutas amazônicas.

INTRODUÇÃO

Os fitoquímicos são substâncias que apresentam atividade biológica em tecidos celulares capaz de gerar uma resposta benéfica à saúde humana (1,2). Também conhecidos como bioativos, esses compostos atuam amenizando ou inibindo o estresse oxidativo, causado por moléculas instáveis e altamente reativas, que oxidam proteínas, lipídios e DNA, ocasiona mudanças na estrutura de células saudáveis, constituindo o principal fator para o desenvolvimento de patologias (3,4,5).

Doenças crônicas não transmissíveis, a exemplo de diabetes, neoplasias, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas têm sido associadas aos danos causados pelo excesso de radicais livres, os quais são produzidos durante o metabolismo celular ou por fatores exógenos (6). Contudo, os fitoquímicos quando ingeridos regularmente e em quantidade significativas, inibem o processo de oxidação protegendo os sistemas biológicos dos danos causados pelas reações oxidativas (3,4,5).

Os compostos bioativos são encontrados em diversos alimentos como frutos, vegetais, óleos e cereais (2). A busca por fontes relevantes desses fitoquímicos tem chamado a atenção para o bioma amazônico, onde estima-se encontrar cerca de 44% da diversidade de frutos nativos. Esses frutos têm contribuído no ramo da ciência nutrigenômica em razão do crescente reconhecimento de seu valor funcional, nutricional e terapêutico, apresentando como principais fitoquímicos de sua composição, os compostos fenólicos, vitaminas e carotenoides, e por isso tem despertado o interesse em muitos campos da área científica e tecnológica além das indústrias farmacêuticas, cosméticas e nutracêutica de alimentos (2,7).

Dentre tais espécies encontra-se a *Mauritia flexuosa*, fruto nativo e exótico popularmente conhecido como buriti, miriti, palmeira-do-brejo e aguaje, esse fruto possui propriedades químicas e biológicas a serem exploradas (6,8,9). O buriti pertence à família das *Arecaceae*, se desenvolve em áreas alagadas, possui grande importância ambiental, econômica e social, visto que é proveniente de atividade extrativista (9,10).

A presença de diversos compostos bioativos na composição do buriti, a exemplo de carotenoides, flavonoides e ácidos graxos insaturados, concede ao fruto e seus derivados significativo valor nutricional e terapêutico. Estudos realizados em testes *in vitro* e *in vivo* caracterizam potenciais propriedades antimicrobiana, anticâncer, antioxidante, cicatrizante, cardioprotetora e fotoprotetora do buriti (11,12). Costa et al., (13), relatam que as moléculas constituintes do óleo do buriti são fontes viáveis para o desenvolvimento de medicamentos de combate a Covid-19 e ademais, é encontrada em larga escala e com baixo custo industrial. Demais pesquisadores complementam que o buriti é um valioso suplemento alimentar para portadores de diabetes mellitus, e diante de tais propriedades, sugerem a viabilidade desse fruto para o desenvolvimento científico de novos fármacos (14).

Nessa perspectiva, com intuito de ampliar o conhecimento e dar maior visibilidade a esse fruto amazônico não convencional o objetivo deste trabalho é compilar informações sobre os constituintes fitoquímicos presentes na composição do buriti e suas propriedades nutracêuticas no organismo humano, já comprovadas cientificamente.

Mediante utilização dos termos buriti e *Mauritia flexuosa*, foram realizadas buscas de artigos nacionais e internacionais publicados nas seguintes plataformas científicas: PubMed, scielo, google acadêmico, portal periódicos capes e science direct. Artigos encontrados em duplicidade nas bases de dados científicas, ou que não estavam relacionados com a atividade biológica, terapêutica e nutricional do fruto investigado, foram descartados

da seleção. Os artigos incluídos nesse trabalho foram selecionados seguindo o seguinte critério: texto completo mostrando o perfil fitoquímico e/ou ação nutracêutica da espécie *Mauritia flexuosa*. Após leitura criteriosa, as informações mais relevantes foram compiladas e cruzadas para compor essa revisão bibliográfica.

BURITI (*Mauritia flexuosa*)

O fruto buriti (Figura 1) possui formato globoso alongado, medindo cerca de 4-7 cm de comprimento e 3-5 cm de diâmetro. Seu epicarpo possui escamas rombóides de cor marrom-avermelhado, o mesocarpo (polpa) carnoso de cor laranja é rica em óleos e o endocarpo que reveste a semente é esponjoso, fino e com cor oscilando entre branco e amarelo (9,10,15).



Figura 2 - Representa frutos buriti (*Mauritia flexuosa*). Fonte: autores

O buriti é consumido principalmente pela população indígena, que fabrica o “vinho do buriti”. Além disso, devido as características e sabores peculiares, esse fruto também é utilizado para extração do óleo (rico em carotenóides), como também para fabricação de doces, geleias, picolés, sorvetes, cremes e na forma de farinha é utilizado para a preparação de massas de panificação e cookies (14).

Diversas pesquisas mostram que o buriti possui alto valor nutricional, devido apresentar elevada quantidade de macronutrientes em 100g do fruto. A avaliação da composição centesimal expõe a proporção de componentes de cada substância do alimento, os quais são responsáveis por sintetizar antioxidantes, fornecendo inúmeras propriedades nutracêuticas à saúde humana (15,16). A tabela 01 apresenta a composição centesimal da polpa do buriti.

Tabela 2. Composição centesimal (100g) da polpa do buriti (*Mauritia flexuosa*).

Umidade	36,84	54,35	59,69	63,93
Lipídeos	43,76	18,16	20,92	13,85
Proteínas	5,19	1,30	2,97	2,10

Carboidratos	11,50	25,53	7,28	8,25
Cinzas	2,71	0,66	1,04	0,94

Fonte: autores

Diferenças quanto a composição centesimal da polpa do buriti encontradas em diversos estudos podem ser explicadas pela variação do grau de amadurecimento, armazenamento do fruto, processo de extração, clima, solo, região de cultivo, época de colheita, além do tipo de amostra analisada (*in natura* ou desidratada).

PERFIL FITOQUÍMICO E NUTRACÊUTICO

O buriti é uma valiosa fonte polifenóis que podem variar de acordo com cor, estágio de maturação dentre outros fatores (20). Esses metabólitos secundários, englobam um enorme e variado grupo de compostos químicos e são organizados de acordo com o número de subunidades de fenol que estão aderidos a molécula.

Demais compostos bioativos também estão presentes na composição deste fruto, concedendo-o inúmeras propriedades nutricionais e terapêuticas (12). Na tabela 2 é descrito os principais fitoquímicos e atividade biológica já comprovados quanto a saúde humana.

Tabela 2. Fitoquímicos e atividade nutracêutica do buriti (*Mauritia flexuosa*).

Carotenoides	Betacaroteno, Alfacaroteno Licopeno, luteína	Tratamento de feridas, queimaduras, picadas de animais peçonhentos; Vermífugo	(8,15,20)
Flavonoides	Vitexina, Catequina, epicatequina, Quercetina, Miricetina, Rutina, luteolina, Kaempferol, proantocianidinas	Desempenham ação Antioxidantes, antitumoral, anti- inflamatória, antimicrobiana, antiviral Ação gastroprotetiva	(15,20,21)
Vitaminas	Retinol Tocoferol Ácido ascórbico	Potencial para prevenir o colesterol LDL e xeroftalmia	(15,20,22)
Ácidos fenólicos	Ácido caféico, ácido clorogenico, ácidos p- cumárico, ferúlico, protocatecuico e quínico, oleico	Efeito antibacteriano frente a <i>Staphylococcus áureos</i> , <i>enterobacter aeruginosas</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Bacillus subtillis</i> .	(15,20,21,23)

Fonte: autores

O buriti é detentor da maior quantidade de carotenoides, particularmente betacaroteno, quando comparado a análises feitas com outros alimentos, a exemplo da cenoura, tucumã e bacuri (24). A ação antioxidante dos fitoquímicos presentes na composição do buriti faz desse fruto um valioso alimento funcional (11,24).

Aquino et al., (22) foram os pioneiros a constatarem a eficiência metabólica do buriti na redução do perfil lipídico, atuando na diminuição dos níveis de colesterol LDL e triglicerídeos nos indivíduos avaliados. Em outro estudo, Aquino et al., (24) relatam que o consumo de produtos à base do buriti é uma alternativa para atenuar os casos de hipovitaminose A, sendo uma estratégia eficaz sua utilização em refeições escolares.

Mas além de reduzir a dislipidemia, e a deficiência de vitamina A os fitoquímicos presentes na composição do buriti previnem doenças cardiovasculares e atuam como cicatrizantes, antialérgicos, antiglicêmico, cardioprotetores e vasodilatadores (12,15,23). A tabela 3 descreve algumas pesquisas que já comprovaram em testes *in vivo* e *in vitro* tais propriedades do fruto.

Tabela 3. Propriedades biológicas do buriti (*Mauritia flexuosa*)

Efeitos do óleo de <i>Mauritia flexuosa</i> no perfil de colesterol e status de vitamina A e E de ratos	Ratos	Óleo da polpa	In vitro	Melhora do perfil lipídico	(22)
Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti <i>Mauritia flexuosa</i>	Ratos	Óleo da polpa	In vitro	Antibacteriana e cicatrizante	(23)
Atividade antioxidante in vitro e in vivo do fruto do buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>)	Ratos	Polpa do fruto	In vitro In vivo	Alta atividade antioxidante	(11)
Atividade antiplaquetária e antitrombótica in vitro e in vivo do buriti	Camundongo	Casca do fruto	In vivo	Antitrombose antiplaquetária	(25)

Ação tópica do óleo de buriti na miosite induzida em ratos	Ratos	Óleo da polpa	In vivo	Atividade anti- inflamatória antidematogênica	(26)
Fonte: autores					

Diante da diversidade de compostos fitoquímicos presentes na composição do buriti e de evidências de sua ação nutracêutica, pesquisadores sugerem a utilização desse fruto como alternativa terapêutica, assim como uma matéria prima promissora para o setor farmacêutico (6,10,25,26).

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelaram que o buriti contém uma diversidade de fitoquímicos, com predomínio de compostos da classe dos flavonoides. Tais substâncias atuam na prevenção de diversas doenças crônico-degenerativas e são promissoras para o desenvolvimento de produtos nas áreas farmacêutica e terapêutica. Os resultados deste trabalho contribuirão para a desenvolvimento de pesquisas quimiométricas e posterior aplicação industrial dos compostos presente neste valioso fruto amazônico.

REFERÊNCIAS

1. Santos, M.F.G., Mamede, R.V.S., Rufino, M.S.M., Brito, E.S., Alves, R.E. Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds. *Antioxidants*, 4, 591-602, 2015.
2. Paula-Elias, F.C., Sousa, I.B.U., Passos, J.P., Paula, C.B.C., Vieira-Almeida, E.C.V., Contiero, J., Almeida, A.F. Frutos amazônicos como fonte de aplicações biotecnológicas. Livro Frutos Amazônicos biotecnologia e sustentabilidade, cap.01, p.11-25, Palmas-TO, 2020.
3. Cedrim, P.C.A.S.; Barros, E.M.A.; Nascimento, T.G. Propriedades antioxidantes do açaí (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21: e2017092, 2018.
4. Verruck, S., Prudêncio, E.S., Silveira, S.M. Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas. *Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos*, v. 4, n. 1, 2018.
5. Carnaúba, R.A. Ação dos compostos bioativos dos alimentos no envelhecimento e longevidade. *Revista Brasileira de Nutrição Funcional*, 45(80), 2019.
6. Negri, T.C., Berni, P.R.A., Brazaca, S.G.C. Valor nutricional de frutas nativas e exótica do Brasil. *Biosaude*, Londrina, v.18, n. 2, 2016.
7. Ferrentino, G., Asaduzzaman, M.D., Scampicchio, M.M. Current technologies and

- new insights for the recovery of high valuable compounds from fruits by-products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.58, n.3, p. 386-404, 2018.
8. Carvalho, R.S., Assis, M.W.V., Santos, T.T. Propriedades químicas, nutricionais e medicinais da polpa e do óleo do buriti (*Mauritia flexuosa* L.). *Revista Desafios*, v.7, n. 3, 2020.
 9. Freire, J.A.P., Barros, K.B.N.T. Lima, L.K.F., Martins, J.M., Araujo, Y.C., Oliveira, G.L.S., Aquino, J.S., Ferreira, P.M.P. Phytochemistry profile nutritional properties and pharmacological activities of *Mauritia flexuosa*. *Journal of Food Science*, vol. 8, 2016.
 10. Pereira, G.S., Freitas, P.M., Basso, S.L., Araujo, P.M., Santos, R.R., Conde, C.F., Pereira, E.F.D., Haverroth, M., Amara, A.M.F. Quality Control of the Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L. f.) for use in 3-Phase Oil Formulation for Skin Hydration. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 5:1, 2018.
 11. Romero, A.B.R. Martins, M.C.C., Nunes, P.H.M., Ferreira, N.R.T., Brito, A.K.S., Cunha, P.F.M., Lima, A., Assis, R.C., Araujo, E.M. In vitro and in vivo antioxidant activity of buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.). *Nutrición Hospitalaria*, v.32, n.5, p.2153-2161, 2015.
 12. Santos, S.O., Castro, D.A.M., Fonseca, J.C., Dariva, C., Diniz, L.E.C., Lopez, J.A. Avaliação da capacidade antioxidante e do potencial antimicrobiano do óleo extraído do fruto de *Mauritia flexuosa* (buriti). *Anais 2016: 18º semana de pesquisa da Universidade Tiradentes*, outubro, 2016.
 13. Costa, N.A., de Sá, E.R.A., Bezerra, R.D.S., Souza, J.L., Lima, F.C.A. Constituents of buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) like inhibitors of the SARS-Coronavirus main peptidase: an investigation by docking and molecular dynamics. *Journal of biomolecular structure and dynamics*, Teresina/PI, 8p., 2020.
 14. Moraes, A.V.S., Uhlmann, L.A.C. Propriedades medicinais da *Mauritia flexuosa*. *Pubsaúde*, 7, a200, 2021.
 15. Souza, F.G., Araujo, F.F., Farias, D.P., Zanotto, A.W., Neri-numa, I.A., Pastore, G.M. Brazilian fruits of Arecaceae: Na overview of some representatives with promising food, therapeutic and industrial applications. *Food Research International*, 138, 109690, 2020.
 16. Carneiro, T.B., Carneiro, J.G.M. Frutos e polpa desidratada buriti (*Mauritia flexuosa* L.): aspectos físicos, químicos e tecnológicos. *Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)* v.6, n.2, p. 105 – 111 abril/junho de 2011.
 17. Castro, J.F., Silva, E.L.M., Alves, E.B., Santos, M.R.P., Alves, A.R., Figueiredo, F.C., Silva, B.S., Santos, A.L.S., Lima, I.M., Pessoa, P.A.P. Avaliação do potencial nutritivo da polpa do buriti comercializada no município de Caxias-MA. In: 59º Congresso Brasileiro de Química-CBQ, João Pessoa-PB, 2019.

18. Sandri, D.O., Xisto, A.L.R.P., Rodrigues, E.C., Moraes, E.C., Barros, W.M. Antioxidant activity and physicochemical characteristics of buriti pulp (*Mauritia flexuosa*) collected in the city of diamantino – mts. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 39, n.3: (e-864), Jaboticabal, São Paulo, 2016.
19. Manhães, L.R.T.; Sabaa-srur, A.U. O. Centesimal composition and bioactive compounds in fruits of buriti collected in Pará. Food Science and Technology, Campinas, v. 31, p. 856-863, 2011.
20. Koolen, H.H.F. et al. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. Food Research International, v. 51, n. 2, p. 467–473, 1 maio 2013.
21. Bataglion, G.A., Da Silva, F.M.A., Eberlin, M.N., Koolen, H.H.F. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Food Research International, v. 66, p. 396–400, 2014.
22. Aquino, J.D.S. Soares, J.K.B., Magnani, M., Stamford, T.C.M., Mascarenhas, R.J., Tavares, R.L., Stamford, T.L.M. Effects of dietary Brazilian palm oil (*Mauritia flexuosa* L.) on cholesterol profile and vitamin A and e status of rats. Molecules, v. 20, n. 5, p. 9054- 9070, 2015.
23. Batista, J.S., Olinda, R.B., Medeiros, V.B., Rodrigues, C.M.F., Oliveira, A.F., Paiva, E.S., Freitas, C.I.A., Medeiros, A.C. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.1, p.136-141, jan, 2012.
24. Aquino, J.S., Pessoa, D.C.N.P., Oliveira, C.E.V., Cavaleiro, J.M.O., Stamford, T.L.M. Processamento de biscoitos adicionados de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.): uma alternativa para o consumo de alimentos fontes de vitamina A na merenda escolar. Rev. Nutr., Campinas, 25(6):765-774, nov./dez., 2012.
25. Fuentes, E., Rodriguez-perez, W., Guzman, L., Alarcon, M., Navarrete, S., Forerodoria, O., Palomo, I. *Mauritia flexuosa* presentes in vitro and in vivo antiplatelet and antithrombotic activities. Evidence based complementary and alternative medicine-Hindawi, 11p. Novembro, 2013.
26. Barbosa, U.B., Silva, M.A., Barros, E.M.L., Barbosa, M.U., Sousa, R.C., Lopes, M.A.C., Coelho, N.P.M.F. Topical action of Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) in myositis induced in rats. Acta Cirúrgica Brasileira, 32(11):956-963, 2017.

DOI: 10.53934/9786585062046-16

Capítulo 16

AS INTERAÇÕES ENTRE A REVOLUCIONÁRIA NUTRIGENÔMICA E AS DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS: A ALIMENTAÇÃO NO ÂMBITO DA SAÚDE E DA DOENÇA

Alessandra Sales da Costa ; Renato Antunes Pereira 

*Alessandra Sales da Costa. Nutricionista. - Email: alesalesdacosta@gmail.com

**Renato Antunes Pereira. Nutricionista. Professor da Fundação Educacional de Além Paraíba (FEAP) - Email: mlemmap@hotmail.com

Resumo

A nutrigenômica é a ciência que estuda a associação entre os genes humanos e a alimentação. Os nutrientes e os compostos bioativos presentes nos alimentos influenciam a expressão gênica, podendo ou não resultar no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). O presente artigo faz um panorama sobre as interações existentes entre a revolucionária nutrigenômica e algumas doenças crônicas não transmissíveis objetivando a compreensão detalhada da genômica nutricional e suas influências na saúde e na doença, valorizando a intervenção dietética personalizada, em prol da profilaxia e do tratamento dessas patologias e, além disso, da promoção de saúde. A metodologia utilizada foi uma ampla revisão integrativa bibliográfica, a partir de artigos e livros. Concluiu-se que a nutrigenômica proporcionou uma revolução no âmbito da saúde, mas são necessários novos estudos.

Palavras-chave: doenças crônicas não transmissíveis; genômica; nutrição; nutrigenômica

INTRODUÇÃO

A transição nutricional e epidemiológica, em associação com a demográfica, proporcionou um novo cenário em termos de mortalidades e morbidades, resultando em um impacto diferente na saúde. A carga genética colabora com o desenvolvimento do quadro de morbimortalidades, contudo, há estudos que demonstram que os fatores ambientais também possuem um significativo papel deletério (1).

A partir dos avanços tecnológicos, da urbanização, da industrialização e da globalização, houve uma transição da desnutrição e das doenças infecciosas para o excesso de peso (sobrepeso e obesidade) e as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), resultantes da nova cultura alimentar (1).

As DCNT caracterizam-se por apresentarem etiologias múltiplas e diversos fatores de risco, origem não-infecciosa, longos períodos de latência, curso prolongado, associando-se com as incapacidades e as deficiências funcionais. Além disso, participam do grupo de doenças de maior magnitude no Brasil atingindo, principalmente, as populações vulneráveis, ou seja, com baixa escolaridade e com baixa renda, visto que o país apresenta desigualdades

socioeconômicas (2, 3).

A nutrigenômica é a ciência que estuda as relações existentes entre os genes humanos e um fator ambiental específico que acompanha os indivíduos ao longo da vida: a alimentação. Os nutrientes e os compostos bioativos presentes nos alimentos influenciam a expressão gênica, dando origem aos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP), podendo ou não resultar no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (4).

Com a finalidade de um estudo aprofundado, o presente artigo fez um panorama sobre as interações entre a revolucionária nutrigenômica e algumas doenças crônicas não transmissíveis, especificamente: o câncer, as doenças cardiovasculares e o diabetes mellitus tipo 2, objetivando a compreensão detalhada da genômica nutricional e suas influências na saúde e na doença, valorizando a intervenção dietética personalizada, em prol da profilaxia e do tratamento dessas patologias e, além disso, da promoção de saúde.

A metodologia utilizada foi uma ampla revisão integrativa bibliográfica formada por levantamentos de dados científicos encontrados em artigos e livros. As pesquisas dos artigos foram realizadas por meio de bases de dados como o Scielo, o PubMed e o Google Acadêmico. Foram consultados artigos de 2002 a 2022 e selecionados os que apresentaram maior relevância, contribuindo para o aprendizado sobre o tema.

1. A REVOLUCIONÁRIA NUTRIGENÔMICA

1.1 Genética e Nutrição

Em 1953, James Watson e Francis Crick determinaram que a base genética é construída a partir das sequências de bases do genoma, na forma dos ácidos nucleicos como o ácido desoxirribonucleico (DNA), uma molécula que apresenta uma estrutura de dupla-hélice, sendo formada de duas fitas de subunidades de nucleotídeos conectadas por ligações de hidrogênio, em que cada subunidade possui um fosfato, o açúcar desoxirribose e uma das quatro bases nitrogenadas: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). Esse arranjo linear, formado a partir da disposição desses nucleotídeos lado a lado, determina as informações que serão codificadas em um segmento de DNA, que resulta na síntese de uma proteína ou RNA funcional (5, 6).

A codificação da informação presente no DNA ocorre através do método de transcrição, em que a enzima polimerase do ácido ribonucleico (RNA polimerase) sintetiza o DNA em uma nova molécula intermediária denominada RNA mensageiro. Após esse processo, inicia-se a etapa de tradução, na qual a informação codificada no RNA mensageiro direciona-se à montagem dos aminoácidos para que obtenha-se a molécula de proteína (6).

Uma sequência de nucleotídeos do DNA é denominada gene. Em 1961, François Jacob e Jacques Monod demonstraram, através de estudos, que os genes apresentam elementos regulatórios que comandam a expressão gênica. Esse processo ocorre por meio de uma proteína regulatória que se une a um gene, atuando como repressora ou ativadora de suas informações (5, 6).

Segundo Conti (7) e Safraid et al. (8), diversos alimentos, além das funções nutricionais básicas, são responsáveis pela construção de novos hábitos alimentares mais saudáveis e geram efeitos benéficos para a saúde a longo prazo, sendo considerados alimentos com propriedades funcionais.

A partir do aprofundamento dos estudos genéticos, surge o Projeto Genoma Humano,

que revolucionou a área da saúde.

O Projeto Genoma Humano, concluído em 2003, surgiu do esforço de muitos países que se uniram em prol da identificação de cada um dos nucleotídeos existentes no DNA, aumentando substancialmente o conhecimento sobre como alguns fatores ambientais atuam nas variações do DNA (6).

Através do desenvolvimento do Projeto Genoma Humano e dos métodos e procedimentos da biologia molecular, novos avanços tecnológicos reforçaram o conhecimento de que a alimentação pode influenciar na expressão de determinados genes, de acordo com a variabilidade genômica de cada indivíduo (9).

De acordo com Conti et al. (10), o genoma do ser humano é 99,9% idêntico, sendo 0,1% de diferença, responsável pelas alterações no fenótipo, ou seja, nos aspectos físicos como a cor dos olhos, do cabelo, da pele, inclusive pelo maior ou menor risco de desenvolvimento de doenças crônicas e pela necessidade existente de determinados compostos bioativos e nutrientes, e essas diferenças são conhecidas como polimorfismos de nucleotídeos únicos (*single-nucleotide polymorphism*, SNP). Em alguns casos, os SNP resultam em alterações nos processos fisiológicos de digestão e metabolismo, a partir de modificações na função, na estrutura, na localização e na quantidade de proteínas codificadoras, influenciando nas respostas aos alimentos, nas necessidades nutricionais e nos riscos de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).

Na era pós-genômica, o objetivo é compreender a atuação dos fatores ambientais, desde a fase intrauterina, como o estresse, o uso de medicamentos, o tabagismo, a ingestão de bebida alcoólica, a poluição, a atividade física e, principalmente, a alimentação, que acompanha, ao longo da vida, todos os indivíduos (7).

A nutrição vem conquistando espaço e ganhando força, associando-se com a integração de análises e descobertas genéticas e, conseqüentemente, construindo novos horizontes com amplas possibilidades na área da alimentação (9). O perfil genético individual é uma informação importante para que estabeleça-se uma nutrição personalizada e obtenha-se uma diminuição no risco de DCNT (7).

1.2 Nutrigenômica

A partir da combinação entre a genômica e a alimentação, surge a nutrigenômica com o objetivo de compreender as funcionalidades dos genes e as suas interações com a alimentação, para que ocorra a prevenção do risco de DCNT e, conseqüentemente, a promoção de saúde (7).

A nutrigenômica busca compreender, através de estudos cada vez mais avançados, os efeitos dos nutrientes e dos compostos bioativos presentes nos alimentos sobre a modulação gênica. Essa ciência engloba outras duas ciências: a nutrigenética e a epigenética. A nutrigenética estuda sobre como as variações genéticas de cada indivíduo, frente a um alimento, formam respostas e afetam o funcionamento do organismo. A epigenética estuda os efeitos gerados pelos fatores ambientais sobre as alterações no desempenho do genoma, influenciando nos resultados finais, ou seja, controlando se os genes podem ser expressos, através do ligamento ou do desligamento dos mesmos, e esse processo é conhecido como regulação gênica (6, 11).

Segundo Conti (7), a nutrigenômica pode ser compreendida como uma ciência na qual a alimentação pode influenciar a atividade dos genes, assim como os genes podem influenciar a necessidade dos nutrientes, e ambos podem influenciar no estado de saúde do indivíduo, conforme exemplifica a Figura 1.

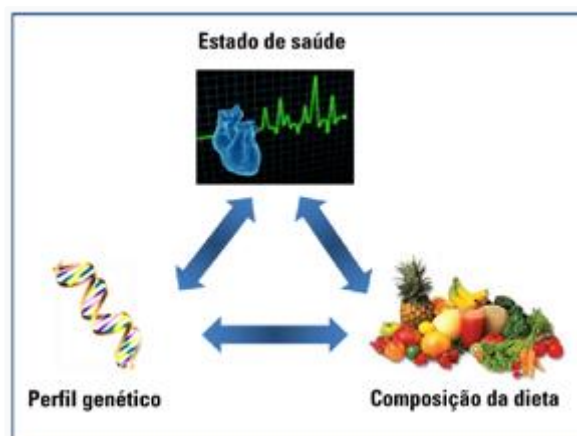


Figura 1 - Nutrigenômica
 Fonte - Conti (7)

No interior da área da nutrigenômica, formam-se subáreas, ou seja, outras ômicas: a transcriptômica que estuda os produtos da transcrição, o RNA mensageiro e as suas modificações frente a um nutriente ou a um composto bioativo; a proteômica que analisa e identifica o conjunto de proteínas codificadas em cada gene, compreendendo as funcionalidades de cada uma delas e as alterações evidenciadas a partir da presença ou da ausência de nutrientes bioativos; a metabolômica que verifica os metabólitos importantes para a monitorização da condição de saúde, analisando o controle do transporte dos nutrientes e dos produtos do metabolismo em suas rotas bioquímicas (6, 9).

Os alimentos e seus componentes bioativos são responsáveis pelas modificações na expressão gênica, de um modo dinâmico e constante, em prol da manutenção do estado de equilíbrio do organismo, considerando todas as etapas presentes no ciclo da vida (11).

2. INFLUÊNCIAS DA NUTRIGENÔMICA NA SAÚDE E NA DOENÇA

Diferentemente dos fármacos, que agem em vias específicas, os nutrientes e os compostos bioativos atuam de maneira sinérgica, por estarem presentes em diversas combinações de alimentos, e apresentam múltiplos alvos moleculares (7).

Os nutracêuticos consistem em uma diversidade de compostos bioativos encontrados em alimentos que são responsáveis pelos efeitos benéficos na saúde, agindo no tratamento e na prevenção das DCNT, visto que são comprovadamente eficazes como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios, influenciando na modulação da expressão gênica dos indivíduos. As moléculas lipofílicas, de pequeno peso molecular, adentram nas membranas celulares, ligando-se aos fatores de transcrição que controlam a expressão dos genes, como por exemplo: as catequinas presentes no chocolate amargo e no chá, e o resveratrol presente na casca da uva. As moléculas hidrofílicas, de grande peso molecular, comunicam-se através da transdução de sinal, a partir de interações com as proteínas dos receptores das membranas celulares, iniciando uma cascata de reações bioquímicas e resultando em fatores de transcrição que interagem com o DNA e alteram a expressão gênica, como por exemplo: os sulforanos e outros glucosinolatos encontrados nos vegetais que pertencem à família do repolho (12,13).

As influências genéticas e epigenéticas resultam na fisiopatologia das DCNT. O processo inflamatório prolongado é o denominador comum de todas essas patologias. O estilo

de vida e a nutrição são moduladores da inflamação (6).

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 reduzem o processo inflamatório, modulando a biossíntese dos eicosanóides anti-inflamatórios, reprimindo a expressão gênica relacionada com a síntese de citocinas inflamatórias, como os genes de interleucina-I e de fator de necrose tumoral alfa. Os pesquisadores continuam buscando, de forma ativa, os estudos de circunstâncias em que o ômega-3 possa ser empregado com o intuito de diminuir os processos inflamatórios e de aumentar a sensibilidade à insulina (6, 14).

A alimentação, em alguns casos, pode ser um agravante para a formação de patologias e, devido a isso, é importante conhecer as alterações intracelulares na presença desses alimentos e a interação existente entre eles com a transcriptômica e a metabolômica, objetivando à personalização dos efeitos da dieta e à correção do metabolismo (15).

Ainda que por um custo elevado, o que é um ponto negativo em relação ao acesso popular ao exame, é tecnicamente executável e cientificamente aceitável realizar o sequenciamento do genoma humano (7) visto que a ação de identificação dos mecanismos bioquímicos e genéticos sustentam uma base para que ocorra o desenvolvimento das estratégias de prevenção através de uma intervenção dietética individualizada (6).

3. GENÔMICA NUTRICIONAL E DOENÇAS CRÔNICAS

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são responsáveis por 74% dos óbitos no mundo. Os fatores de risco podem ser não modificáveis (idade, sexo e herança genética) e/ou modificáveis (alimentação, tabagismo, inatividade física, consumo excessivo de álcool e de outras drogas), sendo potencializados pelos fatores condicionantes culturais, socioeconômicos e ambientais, aumentando o risco de gerar perda da qualidade de vida com limitações nas atividades de lazer e de trabalho, mortes prematuras, impactos econômicos negativos para a sociedade em geral, agravando as injustiças derivadas das desigualdades socioeconômicas e aumentando o nível de pobreza (2, 6, 16).

A nutrigenômica possui um papel importante na incidência, na progressão e/ou na gravidade das DCNT. A partir disso, entende-se que a alimentação atua prevenindo ou acelerando o desenvolvimento de doenças, sendo importante intervenções amplas na promoção de saúde (7).

É necessário identificar os genes que interagem entre si e com o ambiente, e que portanto contribuem para o início e a progressão das patologias crônicas, e compreender a regulação da expressão gênica através de componentes alimentares. Alguns estudos demonstram a relação existente entre as DCNT, a expressão gênica e a alimentação, contribuindo para novas descobertas de prevenção e tratamento no âmbito da saúde (6).

3.1 Câncer

O câncer é considerado uma DCNT que corresponde a alterações genéticas, proporcionando um descontrole dos mecanismos do ciclo celular e, consequentemente, uma perda das funções celulares. As mutações somáticas em genes controlam os proto-oncogenes, que são responsáveis pela estimulação do ciclo da proliferação de células a partir do processo de divisão celular, e os genes supressores de tumor, que são responsáveis pela inibição dessas divisões celulares. Os proto-oncogenes, através de mutações, podem se tornar oncogenes,

causando uma multiplicação celular excessiva. Os genes supressores de tumor, ao serem inativados, favorecem o desenvolvimento de câncer (17, 18).

Os antioxidantes (vitamina C, vitamina E, vitamina A e os carotenóides, selênio e zinco), os compostos bioativos (licopeno, antocianinas, polifenóis, alfa, betacarotenos, criptoxantina, flavonoides, luteína, zeaxantina, sulforanos, indóis e sulfetos alílicos), conforme exemplifica detalhadamente a Tabela 1, e alguns outros nutrientes (cálcio, ácidos graxos essenciais e ácido fólico) podem influenciar as principais vias de sinalização desreguladas atuando como inibidores de carcinógenos, prevenindo diversos tipos de câncer. As vias incluem: o reparo de DNA, o metabolismo carcinogênico, a sinalização celular, a proliferação celular, o controle do ciclo celular, a apoptose, o equilíbrio hormonal, a inflamação, a diferenciação, o desequilíbrio da razão oxidante/antioxidante e a angiogênese (6, 19).

O sulforano, presente no brócolis, estimula a expressão de genes muito importantes para o processo de defesa celular de compostos químicos tóxicos ao organismo, sendo considerado um composto bioativo com função anticancerígena, atuando com um efeito protetor (7).

Tabela 1 - Fitoquímicos em Vegetais e Frutas que Podem Ter Propriedades Protetoras contra o Câncer

Cor	Fitoquímico	Vegetais e frutas
Vermelha	Licopeno	Tomate e produtos à base de tomate, toranja rosa, melancia
Vermelha e roxa	Antocianinas, polifenóis	Framboesa, amora, uvas, vinho tinto, ameixas
Laranja	Alfa e betacarotenos	Cenouras, mangas, abóbora
Laranja e amarela	Criptoxantina, flavonoides	Melão, pêssegos, laranjas, mamão papaia, nectarinas
Amarela e verde	Luteína, zeaxantina	Espinafre, abacate, melão, couve e nabo, verduras, aspargo
Verde	Sulforanos, indóis	Repolho, brócolis, couve-de-bruxelas, couve-flor
Branca e verde	Sulfetos alílicos	Alho-poró, cebola, alho, cebolinha

Fonte: Mahan; Raymond (6)

Por outro lado, os intensificadores dietéticos de carcinogênese incluem os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) formados nas superfícies das carnes que são grelhadas em altas temperaturas e nas gorduras presentes nas carnes vermelhas. As carnes processadas de cor rosada são compostas por nitratos, adicionados como conservantes, e esses

nitratos são reduzidos a nitritos, interagindo com as aminas e as amidas, formando os compostos N-nitrosos (CON): as nitrosaminas e as nitrosamidas, que são mutágenos e carcinógenos (6).

Os intensificadores dietéticos de carcinogênese promovem um microambiente nutricional desordenado nos níveis molecular e celular, resultando em um ambiente propício ao acúmulo de danos no DNA e, portanto, ao desenvolvimento e à progressão de alguns tipos de câncer (18).

Entende-se que a alimentação é determinante no prognóstico da neoplasia e os compostos bioativos presentes nos alimentos atuam como agente protetores contra o desenvolvimento de câncer. Contudo, enfatiza-se a importância da criação de programas de saúde individuais, ou seja, com intervenções específicas para cada pessoa, objetivando a obtenção de melhores respostas e a diminuição do índice de mortalidade (20).

3.2 Doenças Cardiovasculares

A doença cardiovascular constitui um grupo de doenças que possuem uma inter-relação e, em muitos casos, uma coexistência. Essas doenças são: a aterosclerose, a dislipidemia, a hipertensão arterial, a insuficiência cardíaca, a doença arterial coronariana, a doença vascular periférica e a doença cardíaca isquêmica. Alguns fatores de risco proporcionam o desenvolvimento ou o agravamento dessas doenças como a idade, o sexo, os antecedentes familiares e genéticos, a obesidade, a alimentação inadequada, o sedentarismo, o estresse, o sono insuficiente, o tabagismo, o consumo excessivo de álcool e a presença de outras DCNT (6).

A identificação das associações existentes entre os genes e a dieta para a doença cardiovascular e o estudo das influências do consumo de determinados alimentos na profilaxia e no tratamento dessa DCNT são uns dos principais focos da nutrigenômica. O objetivo do tratamento é reduzir as altas concentrações plasmáticas de colesterol-LDL e os triglicerídeos, e elevar o colesterol-HDL, a partir de uma alimentação com baixo teor de gorduras saturadas e trans, e com um alto teor de gorduras poliinsaturadas. O genótipo é um fator importante e deve ser considerado através de uma combinação com a intervenção dietética (6).

Indivíduos com o SNP no gene $PPAR\gamma$, que faz parte do controle das concentrações séricas de triacilglicerol, apresentam maiores concentrações de triacilglicerol do que aqueles com a ausência dessa alteração genética. É importante compreender as consequências metabólicas desse polimorfismo específico com o objetivo de identificar o indivíduo que deve ter cautela ao consumir gorduras, principalmente as saturadas e as trans, para evitar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (7).

Conti (7) ressalta a presença de um outro SNP encontrado no gene $APOA1$, relacionado ao colesterol-HDL. Os indivíduos que não possuem esse polimorfismo e consomem ácidos graxos poliinsaturados, como o ômega-3, aumentam a concentração sérica do colesterol-HDL, considerado o “bom colesterol”. Os outros indivíduos que apresentam alterações genéticas, obtêm uma diminuição desse biomarcador lipídico. Compreende-se, portanto, que as intervenções dietéticas são interindividuais, com a presença de diferenças nas respostas à dieta e na efetividade.

A proposta alimentar chamada Dieta das Abordagens Dietéticas para Interromper a Hipertensão (Dietary Approaches to Stop Hypertension - DASH) foi desenvolvida na década de 90 e, de acordo com pesquisas realizadas por norte-americanos, consiste em uma importante medida eficaz para o controle dos níveis pressóricos, sendo composta por frutas, verduras,

legumes, oleaginosas, grãos integrais, carnes magras e laticínios sem gordura ou com pouca gordura, resultando em uma alimentação rica em minerais como cálcio, magnésio, potássio e fibras, e pobre em lipídeos. Esses nutrientes, quando combinados, previnem o aumento da pressão arterial sistólica e diastólica. Sendo assim, essa estratégia previne a hipertensão arterial sistêmica (HAS), propicia a melhora da qualidade de vida no paciente hipertenso, evitando a evolução do seu quadro e, conseqüentemente, reduzindo a incidência de doenças cardiovasculares (6, 21).

Os flavonoides possuem propriedades antioxidantes e diversos estudos apresentam o efeito cardioprotetor dessa substância fenólica, resultando na peroxidação lipídica das lipoproteínas e na redução do colesterol-LDL. Alguns estudos analisados demonstram que há uma influência positiva dos flavonóides do cacau na profilaxia e no tratamento de doenças cardiovasculares, devido ao seu potencial vasodilatador, antioxidante e anti-inflamatório. Entretanto, são necessários novos estudos sobre os protocolos de intervenção concretos e válidos desse nutriente, sobre a sua recomendação, para que ele exerça a função (22, 23).

3.3 Diabetes Mellitus tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 é uma doença endócrina caracterizada pela alta concentração sanguínea de glicose. Essa hiperglicemia resulta de defeitos na secreção da insulina, na ação da insulina ou em ambos. A decorrente má captação de glicose é uma consequência da resistência dos tecidos à insulina, que está relacionada a fatores genéticos, à idade avançada, à obesidade intra-abdominal, aos hábitos alimentares não adequados e ao sedentarismo (6).

Muitos estudos indicam a relação da dieta mediterrânea com a redução da incidência do diabetes mellitus tipo 2. O padrão alimentar mediterrânico é caracterizado por um maior consumo de alimentos de origem vegetal como frutas frescas e secas, verduras, legumes, cereais integrais, leguminosas, oleaginosas, azeite extra-virgem e doses moderadas de vinho; um consumo frequente de peixes; um menor consumo de carnes vermelhas; um consumo moderado de laticínios desnatados. Dessa forma, resulta-se em uma alimentação rica em fibras, vitaminas, minerais e compostos bioativos (6, 24, 25).

Orteza-Azorín (26) demonstrou, através de um estudo, a existência de uma interação gene-dieta consistente com a adesão à dieta mediterrânea, ou seja, a associação dos polimorfismos FTO -rs9939609 e MC4R -rs17782313 com o diabetes mellitus tipo 2 depende da dieta mediterrânea. A alta adesão à dieta mediterrânea resulta em uma neutralização da predisposição genética a essa doença endócrina.

As antocianinas, que são flavonóides responsáveis pelas cores roxo, vermelho e azul nas frutas, nos vegetais e nas flores, estão presentes no milho roxo. Uma pesquisa explicitou que as antocianinas presentes no milho roxo são capazes de melhorar a secreção da insulina nas células pancreáticas e a captação hepática de glicose nos hepatócitos, a partir da ativação do receptor de ácidos graxos livres-1 (FFAR1) e da glucoquinase (GK), respectivamente, prevenindo o diabetes mellitus tipo 2 e reduzindo potencialmente o risco de evolução das suas comorbidades (27).

Um estudo demonstrou que baixas concentrações de gorduras saturadas no plasma estão relacionadas com uma menor resistência à insulina em indivíduos com síndrome metabólica (SM), portadores dos alelos rs10920533 em AdipoR1 e rs266729 no gene da adiponectina. Portanto, a redução do consumo de ácidos graxos saturados, nesses indivíduos, melhoraria a sensibilidade à insulina (28).

Um outro estudo foi realizado com pacientes que apresentavam alteração na glicemia de jejum ou diagnóstico recente de diabetes mellitus tipo 2 e concluiu que o grupo que recebeu leguminosas e grãos integrais manifestou um aumento na apolipoproteína AV e uma diminuição nos níveis de triglicerídeos e de glicose (29).

As desordens neuro-hormonais e energéticas resultantes da obesidade podem induzir em anormalidades no metabolismo lipídico, hiperinsulinemia e resistência à insulina. Estudos têm demonstrado a importância do consumo da proteína isolada da soja associada às isoflavonas (daidzeína e genisteína) e à linhaça rica em lignanas, possuindo efeitos benéficos no metabolismo dos lipídios, do açúcar e dos hormônios, reduzindo os níveis de insulina sérica e a resistência à insulina (30). Um estudo apontou que a ingestão de uma baixa quantidade de soja, diariamente, contendo apenas 12,95 g, foi bem tolerada pelos pacientes estudados e, além disso, proporcionou uma melhora em relação à resistência à insulina, aos níveis de adiponectina e de colesterol-HDL (31).

Conclusão

A partir da presente revisão da literatura, conclui-se, portanto, que a nutrigenômica proporcionou uma revolução no âmbito da saúde. Essa associação entre a genômica e a nutrição demonstrou a importância da alimentação, a sua relação com o genoma humano e com o estado de saúde de cada indivíduo.

De acordo com os estudos científicos, as DCNT são multifatoriais, ou seja, existem interligações complexas entre os fatores genéticos e os ambientais. A alimentação, que acompanha todos os indivíduos desde a fase intrauterina, é um fator ambiental de ampla relevância que atua efetivamente na profilaxia e no tratamento dessas doenças.

O perfil genético é individual e, conseqüentemente, as intervenções dietéticas devem estar associadas à nutrição personalizada para que os nutrientes e os compostos bioativos presentes nos alimentos possam atuar efetivamente, realizando suas funções.

O teste nutrigenético é uma ferramenta de aplicabilidade da nutrigenômica em aspectos práticos. Apesar de ainda possuir limitações, ao ser realizado apenas no setor privado, e por possuir custos elevados, que resultam em uma baixa acessibilidade igualitária, o desenvolvimento do sequenciamento do genoma é viável e plausível.

A nutrigenômica e as suas interações com as DCNT correspondem há um tema recente e necessita, cada vez mais, de novos estudos sobre os SNP, os genes específicos e os compostos bioativos, em prol de um apoio ao acesso ilimitado do teste nutrigenético, inclusive no setor público, e da promoção de saúde.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira SRG. Alimentação, nutrição e saúde: avanços e conflitos da modernidade [Internet]. Ciência e Cultura, 62 (4): 31-34, São Paulo, Outubro, 2010 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252010000400011#:~:text=62%20no.,2010&text=A%20magnitude%20das%20melhorias%20ocorridas,flu%C3%A4Dram%20pela%20mente%20do%20leitor
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Diretrizes e recomendações para o cuidado integral de doenças crônicas não-transmissíveis: promoção de saúde, vigilância, prevenção e assistência [texto da

- Internet]. Série Pactos pela Saúde 2006, (8): 9-72. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2008 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_recomendacoes_cuidado_doenças_cronicas.pdf
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não-Transmissíveis. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento de doenças crônicas e agravos não-transmissíveis no Brasil 2021 - 2030 [texto da Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2021 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/doencas-cronicas-nao-transmissiveis-dcnt/09-plano-de-dant-2022_2030.pdf/view
 4. Schmidt L, Soder TF, Benetti F. Nutrigenômica como ferramenta preventiva de doenças crônicas não transmissíveis [Internet]. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, Umuarama, 23 (2):127-138, Maio/Agosto 2019 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/6386>
 5. Griffiths AJF, Doebley J, Peichel C, Wassarman DA. Introdução à genética. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022.
 6. Mahan LK, Raymond JL. Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia. 14. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.
 7. Conti A de. Nutrigenômica: a ciência da nutrição na era pós genoma [Internet]. Food Ingredients Brasil, (15): 2-4, 2010 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://revista-fi.com/artigos/ingredientes-funcionais/nutrigenomica-a-ciencia-da-nutricao-na-era-pos-genoma>
 8. Safraid GF, Portes CZ, Dantas RM, Batista ÂB. Perfil do consumidor de alimentos funcionais: identidade e hábitos de vida [Internet]. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, 25: 1-14, 2022 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/FRYBXmfYCHkffmw6Gh4NCtG/?lang=pt>
 9. Santos LF dos, Albuquerque EPA. Nutrigenômica, nutrigenética e suas aplicações [Internet]. In: XI EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica; 2019 Out 29-30; Brasil. Anais eletrônicos. Brasil: UNICESUMAR, 2019 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://rdu.unicesumar.edu.br/handle/123456789/3285>
 10. Conti A de, Moreno FS, Ong TP. Nutrigenômica: revolução genômica na nutrição [Internet]. Ciência e Cultura, 62 (2): 4-5, São Paulo, 2010 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252010000200002
 11. Cintra DE. Nutrigenômica e alimentos funcionais na prática clínica. 1. ed. São Paulo: Editora Senac, 2018.
 12. Ronis MJJ, Pedersen KB, Watt J. Adverse effects of nutraceuticals and dietary supplements [Internet]. Annual Review Pharmacology Toxicology, (58): 583-601, New Orleans, USA, 2018 January 06 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052844?urlver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rft_dat=cr_pub++0pubmed
 13. Mahan LK, Escott-Stump S, Raymond JL. Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia. 13 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
 14. Rocha JA, Lopes MSG, Avelino LLS, Martins GS, Pereira CP, Bezerra AN. Efeitos do uso do ômega-3 na resistência à insulina [Internet]. In: Conexão Unifametro; 2020

- Nov 3; Fortaleza (CE). Anais eletrônicos. Fortaleza (CE), 2020 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.doity.com.br/anais/conexaounifametro2020/trabalho/167481>
15. Espíndola FS, Calábria LK, Rezende AAA de, Pereira BB, Santana FA, Amaral IMR, Lobato J, França JL, Mario JL, Figueiredo LB, Santos LP dos, Gouveia NM de, Nascimento R, Teixeira RR, Reis TA dos, Araújo TG de. Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica, transcriptômica proteômica, interatômica e metabolômica [Internet]. Bioscience Journal, 26 (3): 463-477, Uberlândia, 2010 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7146>
 16. World Health Organization. Noncommunicable Diseases: Progress Monitor 2022. Genebra: World Health Organization; 2022 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: http://apps.who.int/iris/handle/10665/353048?search-result=true&query=NONCOMMUNICABLE+DISEASES+PROGRESS+MONITOR+2022&scope=&rpp=10&sort_by=score&order=desc
 17. Souza SR de, Rocha AM. Oncogenes: genes mutantes e o papel que desempenham no surgimento do câncer [Internet]. Psicodebate, 4(1): 86-86, Dezembro 2018 [acesso em 15 de agosto de 2022]. Disponível em: <http://psicodebate.dpgpsifpm.com.br/index.php/periodico/article/view/432>
 18. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Dieta, nutrição, atividade física e câncer: uma perspectiva global: um resumo do terceiro relatório de especialistas com uma perspectiva brasileira [Internet]. Rio de Janeiro: INCA, 2020 [acesso em 15 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/relatorios/dieta-nutricao-atividade-fisica-e-cancer-uma-perspectiva-global-um-resumo-do>
 19. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals [Internet]. Nature Reviews Cancer, 3 (10): 768-780, October 2003 [acesso em 15 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc1189>
 20. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer [Internet]. Biochemical Pharmacology, 71 (10): 1397-1421, May 2006 [acesso em 15 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295206000955?via%3Dihub>
 21. Rodrigues LL, Celestino ITP, Rocha AM, Rocha BM, Brasileiro IW, Debenetti MM, Peraro NC, Vieira SA. O uso da dieta DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) para manejo da hipertensão arterial na atenção primária [Internet]. Revista Eletrônica Acervo Saúde, 12 (10): 1-7, 2020 [acesso em 15 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/4359>
 22. Oliveira VP de, Espeschit ACR, Peluzio MCG. Flavonóides e doenças cardiovasculares: ação antioxidante [Internet]. Revista Médica de Minas Gerais, 16 (4): 234-238, Minas Gerais, 2006 [acesso em 15 de agosto de 2022]. Disponível em: <http://rmmg.org/artigo/detalhes/580#:~:text=Os%20flavon%C3%B3ides%2C%20com%20sua%20ca%20pacidade,antial%C3%A9rgico21%20e%20vasodilatador22>
 23. Pazzinato K, Cardoso CKS. Efeitos dos flavonoides do cacau na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares: uma revisão de literatura [Internet]. Revista de Ciências Médicas, 28 (2): 85-98, 2019 [acesso em 14 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://seer.sis.puc-campinas.edu.br/cienciasmedicas/article/view/4457>
 24. Tosti V, Bertozzi B, Fontana L. Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic

- and Molecular Mechanisms [Internet]. The Journals of Gerontology: Series A, 73 (3): 318-326, March 2018 [acesso em 14 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://academic.oup.com/biomedgerontology/article/73/3/318/4736301>
25. Gonçalves JFL. Influência da dieta mediterrânica na microbiota intestinal humana [dissertação]. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2020 [acesso em 09 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/9660>
 26. Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Asensio EM, Coltell O, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Covas MI, Arós F, Lapetra J, Serra-Majem L, Gómez-Gracia E, Fiol M, Sáez-Tormo G, Pintó X, Muñoz MA, Ros E, Ordovás JM, Estruch R, Corella D. Associations of the FTO rs9939609 and the MC4R rs17782313 polymorphisms with type 2 diabetes are modulated by diet, being higher when adherence to the Mediterranean diet pattern is low [Internet]. Cardiovascular Diabetology, 11 (137): 2-12, 2012 [acesso em 14 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2840-11-137>
 27. Luna-Vital DA, Mejia EG de. Anthocyanins from purple corn activate free fatty acid-receptor 1 and glucokinase enhancing in vitro insulin secretion and hepatic glucose uptake [Internet]. Plos One, 13 (7): 1-20, July 11, 2018 [acesso em 14 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0200449>
 28. Ferguson JF, Phillips CM, Tierney AC, Pérez-Martínez P, Defoort C, Helal O, Lairon D, Planells R, Shaw DI, Lovegrove JA, Gjelstad IMF, Drevon CA, Blaak EE, Saris WHM, Leszczyńska-Gołabek I, Kiec-Wilk B, Risérus U, Karlström B, Lopez-Miranda J, Roche HM. Gene-nutrient interactions in the metabolic syndrome: single nucleotide polymorphisms in ADIPOQ and ADIPOR1 interact with plasma saturated fatty acids to modulate insulin resistance [Internet]. The American Journal of Clinical Nutrition, 91 (3): 794-801, march 2010 [acesso em 14 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/91/3/794/4597285>
 29. Kang RW, Kim M, Chae JS, Lee SH, Lee JH. Consumption of whole grains and legumes modulates the genetic effect of the APOA5 -1131C variant on changes in triglyceride and apolipoprotein A-V concentrations in patients with impaired fasting glucose or newly diagnosed type 2 diabetes [Internet]. Trials, 15 (100): 1-9, april 2014 [acesso em 14 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://trialsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6215-15-100>
 30. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes [Internet]. The American Journal of Clinical Nutrition, 76 (6): 1191-1201. USA, December, 2002 [acesso em 14 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/76/6/1191/4689547?login=true>
 31. Bahls LD, Venturini D, Sripes NA, Lozovoy MAB, Simão TNC, Simão ANC, Dichi I, Morimoto HK. Avaliação do consumo de uma baixa quantidade diária de soja no estresse oxidativo, no perfil lipídico e inflamatório e na resistência à insulina em pacientes com síndrome metabólica [Internet]. Arq Bras Endocrinol Metab, 55 (6): 309-405. Londrina, Ago 2011 [acesso em 14 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/cvZpL6RhsWFhmNppcY7Rf9p/?lang=pt>

Capítulo 17

USO DA BIOINFORMÁTICA NO ESTUDO EVOLUTIVO DOS CULICÍDEOS

Maria Júlia de França Souza Silva* ; **Alexandre Freitas da Silva** ; **Gabriel da Luz Wallau** 

**Maria Júlia de França Souza Silva - mariajuliadefranca@gmail.com:*

Com o passar dos anos, as técnicas de bioinformática vem deixando de ter um papel de complementaridade em diversos estudos, para ter um de fundamentalidade no mesmo. As infinitas possibilidades que essa área da biologia molecular traz para a comunidade científica é imensurável e vem sendo muito bem aproveitada. Os Culicídeos, mais popularmente conhecidos como “mosquitos” ou “pernilongos”, são de grande importância médica pela sua capacidade de transmitir patógenos para humanos e animais, tendo uma distribuição em escala global. Por conta disto, eles caracterizam um grupo de organismos de grande interesse mundial e se faz necessário a realização de investigações sobre sua biologia e sobre sua história evolutiva, para que assim, sejam criadas estratégias de controle mais adequadas na tentativa de diminuir as sequelas deixadas por eles. Portanto, esta revisão visa mostrar a importância da família Culicidae, associando com a progressão da bioinformática e suas principais estratégias aplicadas aos Culicídeos, e por último alguns dos resultados que foram obtidos através dessas técnicas ao longo dos anos.

Palavras-chave: bioinformática; biologia molecular; filogenia; genomas; mitogenomas

INTRODUÇÃO

A família Culicidae faz parte da ordem Diptera e compreende mais de 3 mil espécies de mosquitos encontrados em todas as regiões do mundo, mas ocorrendo principalmente em áreas tropicais e temperadas. Os Culicídeos são divididos em duas subfamílias: Culicinae e Anophelinae, que possuem 110 e 3 gêneros, respectivamente, apesar de existirem inconsistências entre os autores em relação às classificações dos táxons. Na subfamília Culicinae encontramos 11 tribos e alguns dos seus gêneros são: *Aedes*, *Sabethes*, *Culex*, *Mansonia* e *Coquillettidia*. Já a Anophelinae, caracteriza uma quantidade menor de táxons onde estão alocados somente 3 gêneros: *Anopheles*, *Bironella* e *Chagasia*.

Várias espécies são de interesse médico e veterinário por serem vetoras de diversos patógenos, como vermes filariais, protozoários do gênero *Plasmodium* e diversos vírus, como por exemplo o vírus Zika. Em um estudo realizado em 2018 estimou-se que em torno de 725 mil pessoas perderam suas vidas devido a ação de mosquitos vetores ao redor do mundo, como o *Aedes aegypti* e *Anophele gambiae* (1). Por conta disso, os Culicídeos são fortemente estudados no mundo todo através de diversas abordagens, dentre elas está o estudo da evolução e da filogenia desta grande família. A melhor compreensão das relações filogenéticas dentro desse grupo é fundamental para compreender possíveis novas ameaças e possíveis novos vetores a partir da análise de semelhanças evolutivas entre as espécies. A sistemática tem uma

origem muito antiga, desde Aristóteles já temos registros de tentativas de organização e separação daquilo que era visto. Contudo é a partir de Linné e seu sistema binominal que uma melhor organização desses estudos se tornou possível. Inicialmente, as análises comparativas eram totalmente baseadas em métodos observativos e morfológicos a fim de separar e agrupar as espécies. Com o advento da tecnologia e todas as descobertas da biologia celular e molecular foi possível começar a utilizar dados biológicos para inferir esses relacionamentos de forma mais precisa e confiável.

A bioinformática é uma área recente na biologia, mas que já promoveu diversas descobertas relevantes para o campo e dentre estas, mudanças filogenéticas de diversos grupos de organismos trazendo novas perspectivas. Hoje, temos acesso a uma vasta rede de programas e *softwares* que nos dão a chance de processar, organizar, analisar e estudar esses dados biológicos, desde o DNA até às proteínas.

O objetivo desta revisão é trazer a versatilidade da bioinformática e os principais achados que ela proporcionou para o estudo da evolução e biologia do grupo dos Culicídeos, que são de grande importância através de uma revisão pelas técnicas utilizadas e pelas diferentes abordagens que podem ser adotadas. Com isso, também trazer a importância de dados básicos sobre vetores e suas relações interespecíficas para o melhor entendimento de possíveis dinâmicas ecológicas e vetoriais, e assim, colaborar para o desenvolvimento de estratégias de controle.

TÓPICOS

Primeiros estudos:

No ano de 1951, se deu o início de estudos evolutivos da família Culicidae a partir da construção da primeira filogenia evolutiva realizada por Ross (2). As primeiras sistematizações eram bem básicas se comparados aos métodos disponíveis atualmente, sendo possível apenas separar as três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae, propostas nesta época. Existem importantes autores na cladística dos Culicídeos, dentre eles Forattini, Lane e Judd que contribuíram com a construção de suas chaves de identificação utilizadas até hoje para diversos gêneros dentro da família. Esses estudos examinavam as diferentes fases do ciclo de vida dos mosquitos, larva (que possui quatro estágios), pupa e mosquito adulto. Os estudos evoluíram de utilizar somente a observação e desenhos ilustrativos para a organização sistemática para uso de cladogramas de parcimônia a partir da década de 70 (3).

Os estudos morfológicos e separação de táxons a partir da observação dessas características se baseia em características subjetivas que estão sujeitas a diferentes interpretações levando a uma série de inconsistências no momento da classificação. Um problema bem pontual dentro desse grupo de organismos relacionado a sua classificação morfológica é a existência de alguns complexos de espécies, como por exemplo o complexo *Culex pipiens* que inclui várias subespécies, como *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. molestus* e *Cx. pallens*. Esse complexo é de extrema importância médica e veterinária devido a capacidade dessas espécies agirem como vetores de diversos patógenos, como: vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da febre do Vale Rift (RVFV) e vírus Sínbis (SINV) (4). Logo, é extremamente importante que as espécies sejam devidamente identificadas e separadas para que o estudo e desenvolvimento de tecnologias de controle vetorial sejam construídas com a melhor acurácia possível.

Para isso, com o passar do tempo os estudos morfológicos foram sendo combinados com novas metodologias baseadas em caracteres genéticos com o objetivo de obter resultados mais precisos (5). Contudo, além de ser possível utilizar o DNA do núcleo celular para investigação evolutiva, também é possível utilizar o DNA mitocondrial, que é um conjunto genético diferente do nuclear e que pode trazer outras informações. Isto se dá pelas características encontradas no DNA mitocondrial, como seu alto número de cópias e um número bem maior

de mutações. Essa maior taxa mutacional do DNA mitocondrial o torna um marcador mais informativo para discernir diferentes espécies (6). O gene Citocromo Oxidase 1 (*COX 1*), por um exemplo, é um dos marcadores mitocondriais mais amplamente usado para identificação e sistemática molecular em diversos grupos como Nematoda e Arthropoda (7)(8).

Bioinformática e sua multifuncionalidade:

Muitos estudos consideram que o acontecimento que marcou o início da história da bioinformática ocorreu em 1953 a partir do modelo de dupla hélice do DNA proposto pelos pesquisadores James Watson e Francis Crick. Isso porque foi a partir deste entendimento mais completo da estrutura molecular da molécula responsável por carregar nossas informações genéticas foi possível ampliar diferentes abordagens de estudos e aplicar esse conhecimento para outras biomoléculas. Com o avanço das tecnologias, a área da biologia não ficou de fora quando se trata de inovações facilitadoras de estudo e que abrem um leque de possibilidades. A partir da década de 70, temos o surgimento de uma ferramenta que revolucionaria a área da biologia molecular, a criação dos métodos de sequenciamento de DNA. As primeiras formas foram elaboradas por Allan Maxam e Walter Gilbert (sequenciamento químico) e por de Alan Coulson e Frederick Sanger (sequenciamento de Sanger). Dessa forma, junto com essa oportunidade de organizar o material genético e estudá-lo melhor veio também a enorme quantidade de informação sendo produzida das mais variadas espécies gerando uma necessidade de organização e mineração deste volume de dados.

Com isso, a bioinformática surge sendo um campo multidisciplinar, empregando matemática e computação para extrair informações de dados biológicos em larga escala. Uma ferramenta bastante vantajosa foi a criação dos bancos de dados online, onde é possível ter acesso a inúmeras informações biológicas disponíveis para qualquer tipo de organismos. Podemos encontrar bancos de dados exclusivos para alguma informação, como por exemplo, o UniProt que caracteriza um banco específico para sequências proteicas, como também bancos de dados mais amplos contendo sequências proteicas e nucleotídicas como o GenBank. O desenvolvimento de algoritmos e de programas com a capacidade de trabalhar com dados biológicos também é uma parte fundamental dentro dessa área.

Inúmeros programas foram criados nesses últimos 10 anos auxiliando na construção de análises filogenéticas e assim permitindo um melhor entendimento das relações intra e interespecíficas. Desses, os mais utilizados como o Geneious Prime, MITObim e BEAST permitem uma fácil análise e interpretação dos dados, além de permitir uma variedade de abordagens para um único set de informações. O Geneious Prime funciona como um programa multifuncional onde é possível visualizar e estudar sequências anotadas de DNA e RNA, realizar alinhamentos, simulação de clonagem molecular e análises filogenéticas. O programa BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) é uma ferramenta extensamente utilizada para a reconstrução filogenética e a criação de hipóteses evolutivas (9). Seu algoritmo se destaca por construir as árvores baseadas na Cadeia de Markov Monte Carlo, que é baseada em uma distribuição probabilística, e por ter diversos modelos de relógio moleculares, que podem se adequar ao tipo específico de conjunto de dados levando em consideração suas nuances e assim obter o melhor resultado possível (10). Além de também possuir a possibilidade de incluir informações temporais baseadas em registros fósseis, trazendo uma maior complexidade para as análises. Após o sequenciamento genômico, é necessário realizar a etapa de montagem desse genoma. Dentro da gama de programas desenvolvidos para essa função está o MITObim que é específico para reconstrução de genomas mitocondriais (11). Este programa objetiva reconstruir mitogenomas sem a necessidade de um genoma de referência da espécie estudada, usando no lugar disto informação genômica de uma espécie distante como ponto de partida. Quando se obtém um novo mitogenoma o próximo passo é a

anotação gênica, geralmente realizada no *webserver* MITOS. No geral, é esperado que os organismos possuam todos os 37 genes conservados em eucariotos: 13 genes codificadores de proteínas, 22 RNAs transportadores e 2 RNAs ribossomais em uma ordem e estrutura padronizada. Contudo, através de um estudo realizado com espécies da tribo Sabethini foi registrado a primeira translocação gênica onde os pesquisadores notaram que dois tRNAs, Y e C, não estavam localizados entre o gene Citocromo Oxidase e o tRNA-W, mas sim entre tRNA-I e a região de AT de controle (30). Essa translocação foi colocada como sendo um autapomorfia das espécies de Sabetines encontrados na região Neotropical, ou seja, uma característica que foi derivada e vai ser encontrada exclusivamente dentro de um táxon terminal dentro da filogenia, podendo ser usado com critério de distinção entre os táxons dessa tribo.

A partir da utilização desses programas é possível colocar em prática diferentes abordagens para a análise genômica evolutiva. Inicialmente, existem dois tipos de dados que podem ser utilizados: ácidos nucleicos (DNA e RNA) e os aminoácidos (proteínas). Cada grupo vai nos fornecer informações e visões diferentes do processo evolutivo que ocorreu ao longo do tempo dentro de um determinado grupo. As análises nucleotídicas a partir de genomas mitocondriais são mais estudadas e realizadas, e se mostraram bastante eficientes em reconstruções intraespecíficas dentro de alguns grupos, como os Diptera (12). Por outro, as análises baseadas em códons desse genoma podem trazer questões relevantes e singulares. Como os genes codificadores de proteínas possuem uma alta taxa de mudança em seus códons, principalmente na terceira posição, e essa substituição na grande maioria das vezes não caracteriza um aminoácido diferente, isso pode ser usado como medidor de taxa evolutiva (13). Além do mais, a utilização de sequências de proteínas são ideais em estudos que possuem o objetivo de caracterizar ramos mais antigos dentro do grupo de organismos estudados, sendo um conjunto de dados mais confiável que os nucleotídeos neste contexto. Também é possível realizar análises particionadas, onde cada dado será analisado separadamente, e que pode ser usada para as proteínas e os nucleotídeos de formas diferentes para melhor explorar o dado filogenético levando em consideração a diferença na taxa evolutiva de cada região do genoma.

Por último, é importante também ressaltar que a bioinformática nos permite ir mais fundo do que somente as análises filogenéticas, podendo combinar estas com estudos de viroma e microbioma, visando a caracterização global de vírus e outros microorganismos respectivamente. Assim como qualquer organismo, os mosquitos dispõem de uma série de microorganismos em seus sistemas e que vão ter um papel chave no seu ciclo de vida e nas suas respostas a estímulos e interações externas com o ambiente. Tanto bactérias quanto fungos podem ser encontrados, porém, as bactérias formam o grupo de maior quantidade e participação nesses processos. Esses estudos são extremamente relevantes, visto que as interações desses microorganismos e dos mosquitos ao longo do tempo podem também ter tido influência em seus comportamentos fisiológicos referentes à transmissão de arbovírus (14-18). O microbioma pode ser encontrado não somente no trato digestivo, mas também vai estar presente nas glândulas salivares, local chave para a competência vetorial do mosquito e sua possível transmissibilidade. A composição desse bioma impacta no sistema imunológico dos mosquitos (positivamente ou negativamente), na sua alimentação e pode modular a infecção e propagação de patógenos. Uma forma bastante utilizada para realizar a identificação das espécies é através de *barcoding*, utilizando o gene 16S rRNA para bactérias e o gene 18S rRNA para fungos em técnicas de PCR e sequenciamento (19). A partir do conhecimento dessa microbiota é possível elaborar possíveis estratégias de controle biológico mais eficientes utilizando os próprios microorganismos já associados aos mosquitos.

Principais achados a partir do uso da Bioinformática na família Culicidae:

Como mencionado anteriormente, vários estudos de grupos de organismos se beneficiaram das técnicas de bioinformática e puderam obter resultados interessantes e esclarecedores sobre suas relações de parentesco e evolução. Dentre esses, a família Culicidae é bastante explorada e estudada visto sua importância médica e veterinária já citada acima. Um gênero bastante relevante dentro desta família é o gênero *Anopheles*, que possui várias espécies vetoras como *An. funestus*, *An. stephensi*, *An. messeae* e *An. dacie*, transmissoras da Malária em vários continentes como a Europa, África e América do Sul (20-22). Esse gênero é formado por complexos de espécies, onde somente através de uma análise genômica é possível diferenciar os táxons. Contudo, algumas espécies podem estar proximamente relacionadas a esses complexos, como achado para a espécie *An. christyi* que nas filogenias gerada por um estudo em 2021 demonstrou uma relação com o complexo de *Anopheles gambiae(s.l)*, sendo este último o complexo com as principais espécies transmissoras de Malária (23). Esse tipo de achado é extremamente relevante para planos de controle de patógenos e de vigilância para possíveis novos vetores em áreas endêmicas. Outro resultado muito interessante retirado a partir desse tipo de análise é a possível data de surgimento desta família e seus grupos dentro do contexto geológico e evolutivo. A partir de análises filogenéticas datadas realizadas por um estudo foi visto que a aparente origem da família Culicidae ocorreu em torno de 182 milhões de anos atrás a partir da observação do último ancestral comum desse grupo. Esse surgimento coincide com o período Jurássico que é marcado pelo início do afastamento da Pangeia, o que colaborou com o aumento de diversificação e especiação de animais e plantas (24).

A tribo Aedini compreende gêneros importantes por conta da sua capacidade vetorial como *Aedes*, vetor de Dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV), e *Haemagogus*, vetor da Febre Amarela (25). O estudo de filogenias datadas ajudam a compreender como esses táxons se diversificaram ao longo do tempo e possivelmente entender a origem do seu padrão vetorial e assim determinar outras possíveis origens. Além disso, muitos estudos vêm se dedicando a caracterizar o microbioma encontrado em *Aedes* em todos seus estágios de vida (ovo, larva, pupa e adulto) e assim verificar o possível impacto dele nas transmissões de patógenos e nos comportamentos biológicos desse táxon (26, 27). Através dos estudos metagenômicos proporcionados pela bioinformática foi possível caracterizar diversos gêneros de bactérias encontrados com um certo padrão dentro de *Aedes*, dentre esses estão: *Asaia*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (27). O gênero de bactéria *Asaia* pode ser encontrado em diversas partes do corpo do mosquito e já foi identificado espécies de *Anopheles* vetoras de *Plasmodium*, como *An. gambiae* e *An. maculipennis* mostrando que pode ser uma opção para o combate desse parasitoide. Além de que já foi observado microrganismos que agem estimulando o sistema imune do mosquito e assim bloquear ou aumentar a reação contra algum patógeno, como por exemplo, o fungo *Beauveria bassiana* aumenta a resistência Dengue (DENV) através de um aumento na atividade de vias imunológica muito importante desse grupo, a via Toll e a via JAK-STAT (28). Ademais, apesar da família Culicidae ser extensamente estudada há muitos anos, ainda existem diversas espécies pouco conhecidas e que nem sequer tiveram seu genoma caracterizado, logo, através do sequenciamento e montagem de genomas é possível realizar a descrição, e assim, incluir essas novas espécies em estudos e análises, e investigar melhor seus traços evolutivos e ecológicos. Um estudo realizou a primeira descrição do genoma mitocondrial das espécies *Aedes vexans* e *Ochlerotatus caspius* e através de reconstruções filogenéticas buscaram estabelecer possíveis marcadores para facilitar futuros estudos epidemiológicos que que incluam esses táxons (29).

Os avanços tecnológicos dos últimos 30 anos na área de sequenciamento e bioinformática expandiram substancialmente as funcionalidades e amplitude de possibilidades dentro das áreas da saúde e da biologia. Com o surgimento das técnicas de biologia molecular veio juntamente a possibilidade de explorar mais profundamente as moléculas responsáveis pelo desenvolvimento e pelos traços biológicos dos organismos, como o DNA e as proteínas. Apesar de ser um grupo que passa muitas vezes despercebido, os Culicídeos constituem uma família de insetos com um alto nível de interação com a população humana e que é responsável pela transmissão de patógenos causadores de diversos tipos de doenças por todo o globo.

O uso da taxonomia clássica é altamente utilizado até os dias de hoje, estudos morfológicos são feitos para a caracterização e diferenciação de diversas espécies e compõem uma parte fundamental e significativa da cladística. Contudo, é inegável que como qualquer tipo de estudo ela possui suas limitações e imprecisões que podem afetar diretamente a acurácia de certos estudos com grupos importantes de organismos, tais quais os Culicídeos. Por isso foi tão fundamental a criação e o agregamento de tecnologias ao longo dos últimos anos para unir a taxonomia clássica com a taxonomia baseada em dados moleculares e assim aumentar sua precisão e sua quantidade de informação dali retiradas, e consequentemente aplicadas a favor da ciência. A adição de dados moleculares em estudos filogenéticos permitiram que uma maior clareza fosse trazida para a classificação da família Culicidae, juntamente com dados geológicos, hipóteses e possíveis novos vetores.

Ademais, a aplicação de ferramentas bioinformáticas para a caracterização e estudo da composição do microbioma das espécies de Culicídeos é uma linha de experimentação tão importante quanto da filogenética. A partir dos estudos de microbiota foi possível caracterizar a existência de um microbiome “core” que caracteriza um padrão de grupos de bactérias e fungos encontrados em gêneros de Culicídeos de localidades diferentes. Isso somado com a crescente busca por organismos que podem ser utilizados como forma de controle – biológico visando uma diminuição de uso de químicos nocivos para a natureza, faz com que relevância e a potencialidade dessa microbiota seja colocada em destaque para utilizá-la ao nosso favor na luta contra as arboviroses. Essa aplicabilidade ainda pode ser muito explorada principalmente por praticamente termos transmissão anual em quase todos os estados brasileiros de Dengue, Zika e Chikungunya. Assim, seria interessante investigar se isso tem alguma ligação com o seu microbioma, ou, se o mesmo pode ser utilizado para combater número tão altos de contaminação por esses patógenos.

Assim, é notável como a bioinformática nos permite ter uma liberdade e versatilidade em estudos e experimentos (Fig. 1) dentro desse grupo de mosquitos e vem trazendo resultados promissores e determinantes no melhor entendimento da sua evolução, distribuição e relação intraespecífica deles.

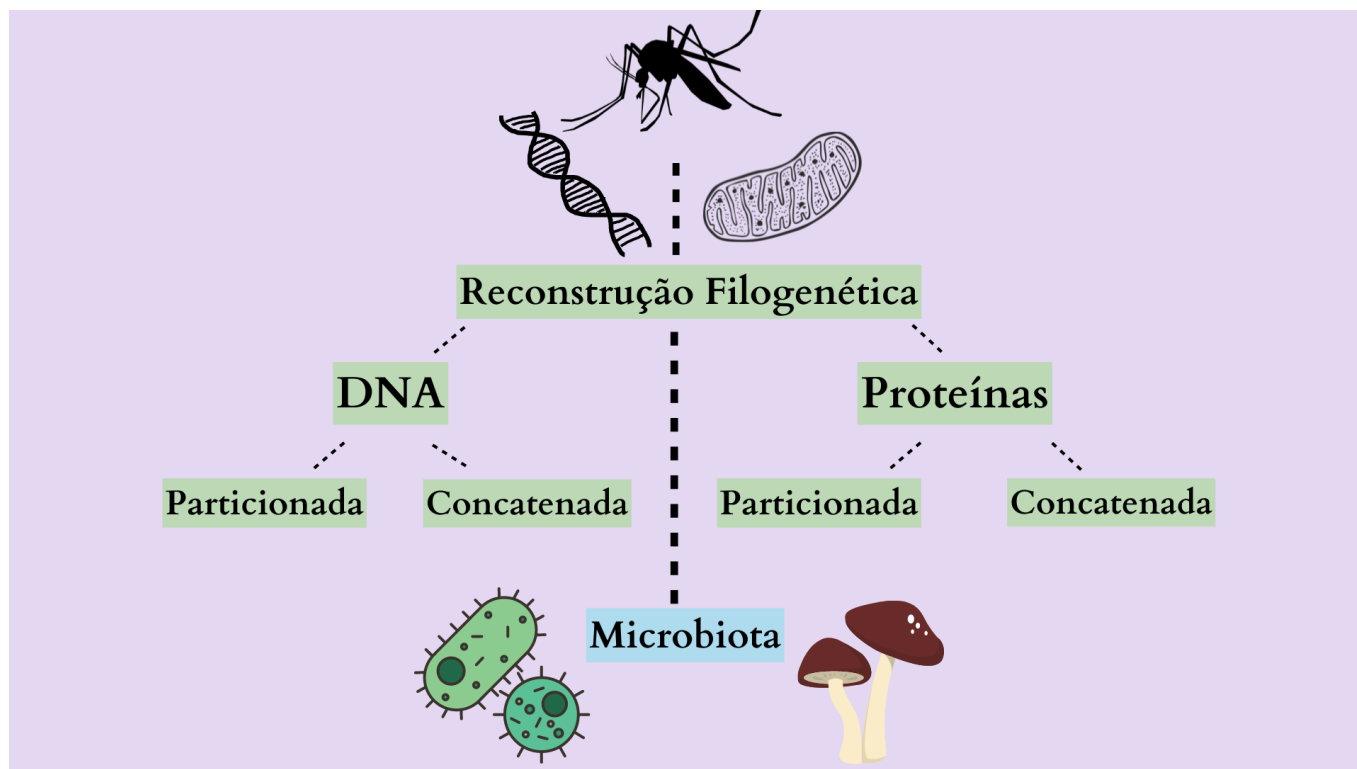


Figura 1- Esquemática de formas de estudo dos Culicídeos utilizando a bioinformática.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio através do Programa de Iniciação Científica. Ao Dr. Prof. Gabriel Wallau e ao Msc. Alexandre Freitas pelas correções e suporte durante a escrita desta revisão.

REFERÊNCIAS

1. GZH Saúde. Mosquitos mataram mais de 725 mil pessoas ao redor do mundo em 2018, aponta estudo. 2022 [acesso em 2022 Julho 20]. Disponível em: <https://gauchazh.clicrbs.com.br/saude/noticia/2022/07/mosquitos-mataram-mais-de-725-mil-pessoas-ao-redor-do-mundo-em-2018-aponta-estudo-cl5ld767c007p014sisdw7e81.html>
2. Ross H.H. Conflict with Culex. Mosquito News. 1951. Volume 11: 128–132
3. Harbach R. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa. 2007. Volume 1668: 591–638.
4. Turell M J. Members of the Culex pipiens Complex as Vectors of Viruses. Journal of the American Mos. Control Association. 2012. Volume 28: 123-126.

5. Motta M. A, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum M. A. M. Phylogeny of genus *Wyeomyia* (Diptera: Culicidae) inferred from morphological and allozyme data. *T. Canadian E.* 2007. Volume 139: 591-627.
6. Sharma N, Pasala M. S, Prakash A. Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. *Enviro and mol mutagenesis.* 2019. Volume 60: 668-682.
7. Dittrich-Schröder G. U. D. R. U. N, Wingfield M. J, Klein H, Slippers B. DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps. *Mol Eco Resources.* 2012. Volume 12: 109-115.
8. Ngui R, Mahdy M. A, Chua K. H, Traub R, Lim Y. A. Genetic characterization of the partial mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I (cox 1) gene of the zoonotic parasitic nematode, *Ancylostoma ceylanicum* from humans, dogs and cats. *Acta Tro.* 2013. Volume 128: 154–157.
9. Suchard M A, Lemey P, Baele G, Ayres D L, Drummond A J, Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus evo.* 2018. Volume 4: 1-16.
10. Reyes A, Alves J. M. P, Durham A, Gruber A. Use of profile hidden Markov models in viral discovery: Current insights. *Adva in Genom and Genet.* 2017. Volume 7: 29-45.
11. Hahn C, Bachmann L, Chevreux B. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads—a baiting and iterative mapping approach. *Nu acids research.* 2013. Volume 41: e129-e129.
12. Talavera G, Vila R. What is the phylogenetic signal limit from mitogenomes? The reconciliation between mitochondrial and nuclear data in the Insecta class phylogeny. *BMC Evol Biol.* 2011. Volume 11: 315-330.
13. Inagaki Y, G B Simpson A, Dacks J B, Roger A J. Phylogenetic Artifacts Can be Caused by Leucine, Serine, and Arginine Codon Usage Heterogeneity: Dinoflagellate Plastid Origins as a Case Study. *Syst Bio.* 2004. Volume 53: 582–593.
14. Hegde S, Rasgon J L, Hughes G L. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Curr opin in viro.* 2015. Volume 15: 97-102.
15. Johnson K. N. The impact of *Wolbachia* on virus infection in mosquitoes. *Viruses.* 2015. Volume 7: 5705-5717.
16. Shi C, Zhao L, Atoni E, Zeng W, Hu X, Matthijnssens, J, *et al.* Stability of the Virome in Lab- and Field-Collected *Aedes albopictus* Mosquitoes across Different Developmental Stages and Possible Core Viruses in the Publicly Available Virome Data of Aedes Mosquitoes. *mSystems.* 2020. Volume 5: e00640-20.
17. Ricci I, Damiani C, Capone A, DeFreece C, Rossi , Favia, G. Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives. *Curr opin in micro.* 2012. Volume 15: 278-284.
18. Minard G, Mavingui P, Moro C V. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Para & vect.* 2013. Volume: 6: 1-12.
19. Jackson E E, Hawes I, Jungblut A D. 16S rRNA gene and 18S rRNA gene diversity in microbial mat communities in meltwater ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Polar Biol.* 2021. Volume: 44: 823–836.
20. Naumenko A N, Karagodin D A, Yurchenko A A, *et al.* Chromosome and Genome Divergence between the Cryptic Eurasian Malaria Vector-Species *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae*. *Genes (Basel).* 2020. Volume 11 165-187.
21. Rodriguez A M, Hambly M G, Jandu S, Simão-Gurge R, Lowder C, Lewis E E, *et al.* Histamine ingestion by *Anopheles stephensi* alters important vector transmission

- behaviors and infection success with diverse plasmodium species. *Biomol.* 2021. Volume: 11: 719-742.
22. Yokoly F N, Zahouli J, Small G, Ouattara A F, Opoku M, de Souza D K, *et al.* Assessing *Anopheles* vector species diversity and transmission of malaria in four health districts along the borders of Côte d'Ivoire. *Mala jour.* 2021. Volume 20: 409-420.
 23. Ghassemi-Khademi T, Oshaghi M A, Vatandoost H, Madjdzadeh S M, Gorouhi, M A. (2021). Utility of Complete Mitochondrial Genomes in Phylogenetic Classification of the Species of *Anopheles* (Culicidae: Anophelinae). *Jour of arthro-borne disea.* 2021. Volume: 15: 1–20.
 24. da Silva A F, Machado L C, de Paula M B, da Silva Pessoa Vieira C J, de Moraes Bronzoni R V, de Melo Santos M A V, *et al.* Culicidae evolutionary history focusing on the Culicinae subfamily based on mitochondrial phylogenomics. *Scient repor.* 2020. Volume 10: 1-14.
 25. Cano M E, Marti G, Balsalobre A, Muttis E, Bruno E, Rossi G C, *et al.* Database of Sabethes and Haemagogus (Diptera: Culicidae) in Argentina: Sylvatic Vectors of the Yellow Fever Virus. 2021. *Jour of Med Entomo.* Volume 58: 1762 - 1770.
 26. Scolari F, Sandionigi A, Carlassara M, Bruno A, Casiraghi M, Bonizzoni M. Exploring changes in the microbiota of *Aedes albopictus*: comparison among breeding site water, larvae, and adults. 2021. *Front in Micr.* Volume 12: 62417.
 27. Scolari F, Casiraghi M, Bonizzoni M. *Aedes* spp. and their microbiota: a review. *Front in Micro.* 2019. Volume 10: 2036.
 28. Caragata E P, Tikhe C V, Dimopoulos G. Curious entanglements: interactions between mosquitoes, their microbiota, and arboviruses. *Curr opin in virol.* 2019. Volume 37: 26-36.
 29. Ma X X, Wang F F, Wu T T, Li Y, Sun X J, Wang C R, *et al.* First description of the mitogenome and phylogeny: *Aedes vexans* and *Ochlerotatus caspius* of the Tribe Aedini (Diptera: Culicidae). *Infecion, genet and evol: journal of molecular.* 2022. Volume 102: 105311.
 30. Lorenz C, Alves J M P, Foster P G. *et al.* First record of translocation in Culicidae (Diptera) mitogenomes: evidence from the tribe Sabethini. *BMC Genom.* 2019 Volume 20: 1-8.

DOI: 10.53934/9786585062046-18

Capítulo 18

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ANÁLISE DA EXPRESSÃO *in silico* DE SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASE (SHMT) EM *Jatropha curcas* SOB SALINIDADE

Elvia Jéssica da Silva Oliveira¹ *; Vanessa Emanuelle Santos¹ ; Francielly Negreiros de Araújo¹ ; Wilson José da Silva Júnior² ; Éderson Akio Kido¹ 

¹ Laboratório de Genética Molecular de Plantas – LGM, UFPE, Recife, PE, Brasil.

² Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

*Autor correspondente (Elvia Jéssica da S. Oliveira) – Email: elvia.oliveira@ufpe.br

Resumo: A fotorrespiração é uma via alternativa que impede a fotoinibição e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. A dupla afinidade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RubisCO) para fixação de gás carbônico (CO₂) e oxigênio (O₂), quando assume a função de oxigenase, resulta na fixação de oxigênio em um processo denominado fotorrespiração. Dentre as enzimas responsáveis por esse processo está a SHMT que converte a glicina em serina em uma de suas fases que ocorre na mitocôndria. As plantas mediante estresse abiótico tendem a oferecer um aparato menos danoso para realizar suas atividades fisiológicas. Neste trabalho foram caracterizados os genes de SHMT e suas respectivas proteínas em *Jatropha curcas*, em três espécies pertencentes a família Euphorbiaceae e em *Arabidopsis*. A estrutura gênica e os motivos conservados seguem um padrão para cada grupo de SHMT caracterizado. As proteínas SHMT tem apenas um domínio (SHMT). A árvore fenética obtida ficou agrupada em dois clados, que correspondem a Classe I, subgrupos SHMT7 e SHMT4, e a Classe II, subgrupos SHMT3 e SHMT1. Na análise das regiões promotoras foram identificados sítios de ligação aos fatores de transcrição Dof, HSF, C2H2, bZIP, Myb-related, bHLH e B3, os quais são intimamente relacionados a estresses abióticos. A análise de expressão gênica de raízes do genótipo Jc171 de *J. curcas* submetido à 150 mM de NaCl identificou apenas a SHMT4 que é comumente encontrada no tecido radicular, assim, estudos adicionais utilizando o tecido foliar possibilitará um respaldo significativo sobre as outras SHMT envolvidas na via da fotorrespiração de *J. curcas*.

Palavras-chave: Pinhão-mansão; Fotorrespiração; Estresse Salino.

INTRODUÇÃO

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas*), pertence à família Euphorbiaceae e é uma oleaginosa, encontrada em regiões áridas, com potencial para a produção de biocombustíveis, além de apresentar um sistema radicular eficaz para controle da erosão dos solos, que pode ser utilizado para proteger áreas degradadas (1). Esta espécie é considerada tolerante a seca, devido, principalmente, ao seu caule suculento que contribui

para reserva de água, equilíbrio na perda de folhas, e uma taxa de transpiração conservada (2). Em virtude da correlação existente entre os estresses de seca e salinidade, os diferentes genótipos de pinhão-mansão apresentam respostas variáveis quando comparados entre si, podem ser tolerantes a salinidade dos solos ou apresentar uma resposta mais próxima a um genótipo sensível (3).

As condições ambientais adversas como salinidade, seca e resfriamento podem estimular o acúmulo de serina hidroximetiltransferase (SHMT) em células vegetais. A SHMT está amplamente distribuída nas plantas, e desempenha um papel positivo na regulação e resistência das plantas a estresse abiótico (4). Esta enzima minimiza os danos causados pelo estresse abiótico através da modulação do nível de espécies reativas de oxigênio (ERO), reduzindo danos oxidativos; recupera o metabolismo celular afetado e; está correlacionada com a atividade fotorrespiratória (5).

Diferentes trabalhos têm constatado a influência positiva de SHMT para a tolerância ao sal. Em arroz, por exemplo, foi observada uma alta expressão de SHMT associada a resposta ao estresse salino, quando comparado com a variedade sensível ao sal (6). Em *Arabidopsis*, a mutação S31D em SHMT1 reduziu o fechamento estomático induzido por sal, destacando a importância de manter a atividade fotorrespiratória de SHMT1 sob condições salinas e de estresse hídrico (7).

Sob condições de alta salinidade, as plantas têm a fotossíntese inibida pelo fechamento estomático e diminuição de gás carbônico (CO₂), a irregularidade da assimilação fotossintética de CO₂ são capazes de elevar as taxas da fotorrespiração (8). Os indicativos de taxas mais altas de fotorrespiração, mostram aumentar o CO₂, a estimulação da fotossíntese, diminuindo a concentração de oxigênio (O₂), a atividade da glicolato oxidase e a formação de metabólitos fotorrespiratórios (glicina e serina), além de manter as taxas de transporte de elétrons em CO₂ (8).

A fotorrespiração é uma importante via alternativa sob condições limitantes de CO₂, pois a Rubisco assume a função de oxigenase e incorpora os O₂ e equivalentes redutores em excesso das reações fotoquímicas, evitando a fotoinibição (9). A rota metabólica da fotorrespiração ocorre em três compartimentos subcelulares, iniciando no cloroplasto, seguido do peroxissomo e por fim na mitocôndria, onde ocorre a conversão de serina em glicina através da enzima SHMT (EC 2.1.2.1), uma enzima piridoxal-5'-fosfato, desempenhando um papel vital no metabolismo de um carbono (5).

Neste trabalho foram analisados, a estrutura éxon-ítron dos genes SHMT; a distribuição dos fatores de transcrição associados aos promotores; os motivos conservados, ponto isoelétrico, massa molecular e localização subcelular das proteínas SHMT; e o padrão de expressão tecido-específico de genes SHMT em plantas de *Jatropha curcas*.

MATERIAL E MÉTODOS

Dados disponíveis de RNA-Seq

A origem dos dados que correspondem ao RNA-Seq de *J. curcas* estão disponíveis em Souza et al (10) e de Lima Cabral et al (11). Os acessos utilizados foram selecionados com base em ensaios prévios (3). O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado com dois acessos (Jc171 e Jc183), dois tratamentos (com e sem

exposição salina de 150 mM NaCl /3 h), e três plantas meio-irmãs de cada acesso. Após 3 h de exposição ao NaCl, amostras de raízes foram coletadas e RNAs de boa qualidade (RNA Integrity Number, RIN>8; Agilent Bioanalyzer RNA 6000) foram usados na geração de bibliotecas RNA-Seq (Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Prep LS Protocol), que foram posteriormente sequenciadas (HiSeq Flow Cell v4; leituras pareadas de 100 bp) pelo Centro de Genômica da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil).

Montagem por referência: Tratamento e análise dos reads RNA-seq

O genoma representativo de *J. curcas*, recuperado do portal NCBI (RefSeq) correspondeu à montagem RJC1_Hi-C (GCF_014843425.1), de 05/10/2020, que juntamente com o transcriptoma de referência foram indexados ao Bowtie2 v.2.3.5.1. Os reads brutos foram avaliados pelo FastQC v.0.11.9, sendo os adaptadores, removidos pelo Cutadapt v.3.7. Os reads “clipados” foram filtrados pelo Sickel v.1.33, pelos critérios de qualidade e comprimento (20 para ambos). Os dados filtrados foram alinhados contra o transcriptoma de referência pelo Tophat2 v.2.1.1 e o Cufflinks v.2.2.1 foi usado para gerar as planilhas e cálculos de estatísticas. A montagem gerada foi anotada a partir dos dados de referência (RJC1_Hi-C) de *J. curcas* disponíveis no NCBI.

Visualização da expressão gênica de SHMT em *Jatropha curcas*

A expressão dos transcritos considerou os valores de Log2 FoldChange (Log2FC) ≥ 1 para transcritos induzidos (UR, *up-regulated*) e Log2FC ≤ -1 para transcritos reprimidos (DR, *down-regulated*), sendo visualizados através da ferramenta TBtools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>).

Caracterização de SHMT em *Jatropha curcas*

As sequências polipeptídicas de serina hidroximetiltransferase (SHMT) foram obtidas do proteoma de *Jatropha curcas* (GCF_014843425.1) disponível no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly>). Estas sequências foram submetidas na ferramenta online Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para encontrar sequências similares nas espécies *Manihot esculenta*, *Ricinus communis* e *Hevea brasiliensis*, pertencentes a família Euphorbiaceae, e *Arabidopsis thaliana* como grupo externo. Os domínios das sequências foram confirmados pelo Pfam [[https://pfam.xfam.org/\(12\)](https://pfam.xfam.org/(12))] e visualizados no Tbttools (13). A análise de motivos conservados das proteínas SHMT foi realizada no software MEME [[https://meme-suite.org/meme/tools/meme\(14\)](https://meme-suite.org/meme/tools/meme(14))] e visualizados no Tbttools. A anotação dos motivos foi realizada através da ferramenta online InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>).

A massa molecular (kDa) e os valores de ponto isoelétrico foram previstos pela ferramenta ExPASy [[https://web.expasy.org/compute_pi/\(15\)](https://web.expasy.org/compute_pi/(15))] das as proteínas SHMT enquanto a localização subcelular foi prevista pela ferramenta DeepLoc 2.0 [[https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-2.0\(16\)](https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-2.0(16))].

Alinhamento de múltiplas sequências e análise fenética

As sequências polipeptídicas foram alinhadas no *JalView* (17), visando analisar os padrões de conservação por identidade, seguindo metodologia de alinhamento do ClustalW e a árvore fenética foi construída no MEGA11 (18), pelo método de *Neighbor Joining-NJ*, utilizando *bootstrap* de 10000. A estrutura éxon-íntron dos genes foi visualizada no programa Tbttools, utilizando o identificador dos transcritos de cada espécie e arquivo GTF (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>) correspondente, como arquivo de entrada.

Predição de fatores de transcrição associados às sequências promotoras de genes SHMT

As regiões promotoras (1,0 kb) dos potenciais genes de *J. curcas* que codificariam enzimas componentes das via de fotorrespiração foram extraídas pelo pacote GFF-Ex [Genome Feature Extraction Package; <http://bioinfo.icgeb.res.in/gff/> (19)] a partir da linha de comando: "caminho da pasta"/gffex -in (gff) -db (sequence).

A prospecção dos motivos candidatos a elementos *cis* regulatórios (CECRs) em cada região promotora foi feita através do software MEME v5.0. [<http://meme-suite.org/tools/meme>(14)], adotando-se $e10^{-2}$ para caracterização como CECRs e máximo de 10 motivos. Motivos foram restritos entre 6 e 50 nucleotídeos de comprimento.

Após a análise supracitada utilizou-se o software Tomtom v4.11.2 (<http://meme-suite.org/tools/tomtom>)(20), comparando os identificadores detectados com um banco de dados de motivos curados (JASPAR), nas opções “JASPAR (NON-REDUNDANT) DNA” e “JASPARCORE (2022) plants”, considerando os alinhamentos mais significativos gerados pelo programa ($p\text{-value} < 0,05$). O identificador JASPAR, correspondente a cada alinhamento, foi pesquisado no banco [<https://jaspar.genereg.net/>(21)], onde é possível obter os fatores de transcrição que estão relacionados a região promotora de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação de SHMT

A enzima hidroximetiltransferase (SHMT) foi identificada em *Jatropha curcas*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis*, *Hevea brasilienses* e *Arabidopsis thaliana* (Tabela 1). As proteínas correspondentes a enzima SHMT que apresentaram domínio incompleto foram descartadas das análises posteriores.

Tabela 1 - Quantitativo de serina hidroximetiltransferase (SHMT) nas espécies.

Espécie	Loci	Transcritos	Proteínas
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5	5	3
<i>Jatropha curcas</i>	6	9	5
<i>Manihot esculenta</i>	10	14	9
<i>Ricinus communis</i>	6	7	6
<i>Hevea brasilienses</i>	10	23	10
Total	37	58	33

Fonte: Bancos de dados NCBI

Caracterização de SHMT em *Jatropha curcas*

A árvore filogenética de serina hidroximetiltransferase (SHMT) (Fig. 1A) ficou agrupada em dois clados, que correspondem a Classe I, subgrupos SHMT7 e SHMT4, e a Classe II, subgrupos SHMT3 e SHMT1, nela estão representantes das espécies *Manihot esculenta*, *Ricinus communis* e *Hevea brasilienses*, pertencentes a família Euphorbiaceae, e *Arabidopsis thaliana* como grupo externo. A anotação dos motivos conservados destas proteínas encontra-se na Tabela 2, os quais variaram entre 15 e 50 aminoácidos. Além disso, esses motivos conservados (Fig. 1B) seguem o mesmo padrão de evolução da estrutura éxon-íntron (Fig. 1C) de seus respectivos genes.

O subgrupo SHMT7 possui todos os motivos, o que confere a este subgrupo um alto nível de conservação, exceto *SHMT7_Hb*(XP_021656673.1) que não possui os motivos 6 e 9, e *SHMT7_Me*(XP_043808985.1) que não possui os motivos 5, 6 e 9. Em SHMT4, os motivos seguem um padrão bem conservado exceto em *SHMT4_Hb*(XP_021689870.1) e *SHMT4_Me*(XP_021595799.1) que não possuem o motivo 3. O subgrupo SHM3, Classe II possui todos os motivos exceto o motivo 9, e o subgrupo SHMT1 possui todos os motivos, exceto o motivo 5 e *SHMT1_Hb*(XP_021667955.1) não possui os motivos 5 e 8. As SHMT de *Jatropha curcas* possuem todos os motivos que agrupam cada clado.

A análise da estrutura dos genes SHMT indicaram que membros intimamente relacionados tem uma estrutura éxon-íntron semelhante como observado na Figura (1C). A divergência da estrutura éxon-íntron é importante para observar a evolução de genes duplicados e as diferentes composições de motivos e sua diversidade funcional (22). Em SHMT7 e SHMT4 o número de éxons e íntrons correspondem a 4 e 3, respectivamente. Em SHMT3 tem um padrão de 11 éxons e 11 íntrons, e SHMT 15 éxons e 15 íntrons (Fig. 1C). As respectivas proteínas de SHMT tiveram o domínio SHMT previsto.

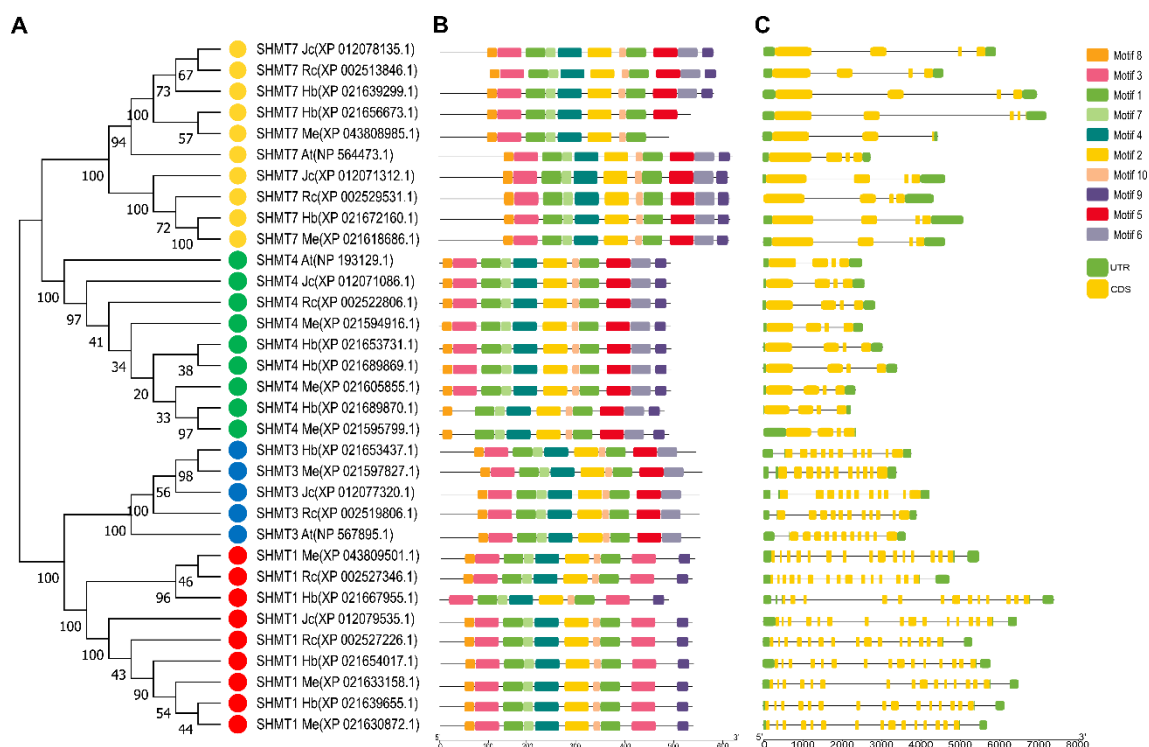


Figura 1 – Relação filogenética, motivos conservados e estrutura gênica de serina hidroximetiltransferase (SHMT) em *Jatropha curcas*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis*, *Hevea brasiliensis* e *Arabidopsis thaliana*. **A.** Árvore filogenética foi construída usando o método *Neighbor-joining* com 10000 replicatas de *bootstrap* no MEGA 11. Classe I: círculos amarelos e verdes, subgrupos SHMT7 e SHMT4, respectivamente. Classe II: círculos verdes e vermelhos, subgrupos SHMT3 e SHMT1, respectivamente. **B.** Motivos conservados das proteínas SHMT. Os 10 motivos conservados estão indicados na legenda. **C.** A estrutura éxon-íntron de SHMT. Retângulos amarelos indicam éxons; linhas pretas indicam íntrons.

Tabela 2 – Detalhes dos 10 motivos conservados de SHMT em espécies da família Euphorbiaceae e *Arabidopsis thaliana*.

Motivo	aa	Sequência	Anotação
1	41	ALQAFPHBHTIWGLAVQLKSGSTANFKAYTAQLKPNDRIMG	-
2	50	LLCDMAHISGLVAAKEAANPFYCDIVTTTTHKSLRGPRGGMIFYRKGP	Serine hydroxymethyltransferase
3	50	NRQKNGJELIASFNFTSRVMEALGSHLTNKYSEGLPGARYYGGNEYIDE	Serine hydroxymethyltransferase
4	50	SIFFESLPYKVNEQTGYIDYDKLEEKATDFRPKLJICGGSAYPRDWDYAR	Serine hydroxymethyltransferase
5	50	TDNHLVLWDLRPLGLTGKNVEKLCDLCNITVNKNAVFGDNSAJAPGGVR	Serine hydroxymethyltransferase
6	41	GTPAMTSRGLVEKDFETIADFLHRAVQITLSIQKEHGKLLK	Serine hydroxymethyltransferase
7	21	LDLPSSGHLSSHGYTTPGGKKS	-
8	21	WGNQPLETVDPETIHDJIEKEK	-
9	24	NKDIAELRHDVEKFASQFPMPPGFE	-
10	15	AVYDFEDKINFAVFP	-

As proteínas SHMT são formadas por 458 a 538 aminoácidos, apresentam massa molecular variando de 50,15 a 66,29 kDa, ponto isoelétrico entre 5,65 a 9,13 e a localização subcelular desta proteína é no citoplasma, nas organelas mitocôndria e plastídio ou no núcleo, conforme Tabela 3. Esta localização também foi observada na

cultura de tomate em Liu et al (23). O SHMT presente no cloroplasto apresenta um papel vital para fotorrecepção e biossíntese de metabolismo de um carbono (24).

Tabela 3 - Localização subcelular, massa molecular (Mw) e ponto isoelétrico (pI) das proteínas serina hidroximetiltransferase (SHMT) em *Jatropha curcas*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis*, *Hevea brasiliensis* e *Arabidopsis thaliana*.

Proteína / Espécie	Identificador NCBI	Aa	pI	Mw (kDa)	Localização subcelular
SHMT1_Hb	XP_021639655.1	515	8,56	57,10	Mitocôndria
SHMT1_Hb	XP_021654017.1	515	8,37	57,26	Mitocôndria
SHMT1_Hb	XP_021667955.1	466	9,13	51,65	Citoplasma Mitocôndria
SHMT1_Jc	XP_012079535.1	515	8,88	56,88	Mitocôndria
SHMT1_Me	XP_021630872.1	515	8,69	57,03	Mitocôndria
SHMT1_Me	XP_021633158.1	515	8,88	56,96	Mitocôndria
SHMT1_Me	XP_043809501.1	516	8,65	57,10	Mitocôndria
SHMT1_Rc	XP_002527226.1	515	8,84	56,88	Mitocôndria
SHMT1_Rc	XP_002527346.1	513	8,11	56,57	Mitocôndria
SHMT3_At	NP_567895.1	529	9,03	57,98	Plastídio
SHMT3_Hb	XP_021653437.1	520	8,08	56,91	Plastídio
SHMT3_Jc	XP_012077320.1	527	8,48	57,19	Plastídio
SHMT3_Me	XP_021597827.1	533	7,62	57,98	Plastídio
SHMT3_Rc	XP_002519806.1	527	7,21	57,54	Plastídio
SHMT4_At	NP_193129.1	471	6,80	51,72	Citoplasma
SHMT4_Hb	XP_021653731.1	471	8,24	52,01	Citoplasma
SHMT4_Hb	XP_021689869.1	471	7,19	51,81	Citoplasma
SHMT4_Hb	XP_021689870.1	458	7,61	50,15	Citoplasma
SHMT4_Jc	XP_012071086.1	471	7,17	51,73	Citoplasma
SHMT4_Me	XP_021594916.1	471	7,59	51,65	Citoplasma
SHMT4_Me	XP_021595799.1	468	5,65	51,59	Citoplasma
SHMT4_Me	XP_021605855.1	471	8,18	51,79	Citoplasma
SHMT4_Rc	XP_002522806.1	471	7,59	51,87	Citoplasma
SHMT7_At	NP_564473.1	598	8,03	66,29	Núcleo
SHMT7_Hb	XP_021639299.1	557	6,97	61,41	Núcleo
SHMT7_Hb	XP_021656673.1	510	7,56	56,45	Núcleo
SHMT7_Hb	XP_021672160.1	590	5,80	65,95	Núcleo
SHMT7_Jc	XP_012071312.1	588	6,62	65,36	Núcleo
SHMT7_Jc	XP_012078135.1	558	7,24	61,74	Núcleo
SHMT7_Me	XP_021618686.1	591	5,94	66,08	Núcleo
SHMT7_Me	XP_043808985.1	466	7,87	51,41	Núcleo
SHMT7_Rc	XP_002513846.1	567	7,55	62,66	Núcleo
SHMT7_Rc	XP_002529531.1	590	5,98	66,11	Núcleo

Montagem por Referência

A montagem de referência para o acesso Jc171 resultou em 13389 transcritos, destes, os transcritos considerados significantes para o corte ($p\text{-value} \leq 0,05$; $q\text{-value} \leq 0,05$; $\log_2 FC \geq 1$ ou ≤ -1) estabelecido foram distribuídos da seguinte forma 3001 UR (*up-regulated*), 2965 DR (*down-regulated*) e 1865 n.s. (*no significant*), os demais foram excluídos da análise pois não atingiram o ponto de corte estabelecido. Enquanto para o acesso Jc183 foram 438 UR, 217 DR e 116 n.s, os demais foram excluídos da análise pois não atingiram o ponto de corte estabelecido.

Expressão diferencial *in silico* de transcritos SHMT em *Jatropha curcas*

Em *Jatropha curcas* foram identificados nove transcritos SHMT, porém o genótipo Jc171 apresentou seis transcritos de SHMT. Enquanto o genótipo Jc183 não apresentou SHMT diferencialmente expressas, isso se explica pela concentração de NaCl utilizada ser inferior ao que este genótipo suporta, e por ser considerado um genótipo tolerante quando comparado ao Jc171(3). Em Jc171 havia um transcrito que estava regulado positivamente, o SHMT4(XM_012215696.3), e dois negativamente, como observado na Figura 2. Em *Arabidopsis* a acumulação AtSHMT4 foi restrita a raiz em plântulas jovens (24), o presente estudo é com base em dados provenientes de raiz de Jc171.

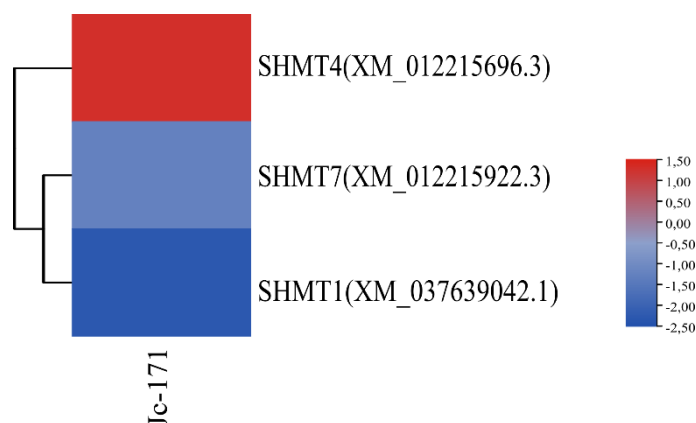


Figura 2 - Expressão diferencial dos transcritos SHMT em Jc171 sob estresse salino (150 mM NaCl)

A serina hidroximetiltransferase é a enzima responsável pela conversão de glicina em serina (Figura 3). A SHMT também possui um papel indispensável na via fotorrespiratória de organismos fotossintéticos aeróbicos (25). Já foi observado a superexpressão de SHM1 em *Arabidopsis* resgatando parcialmente seu fenótipo sensível ao sal (26). A SHMT tem um papel crucial na interação com glutamato sintase na formação do complexo fotorrespiratório (27). Em *Arabidopsis*, foi superexpresso o gene OsSHMT3 (*Oryza sativa*) o qual exibiu tolerância ao estresse salino (150 mM NaCl) (28).

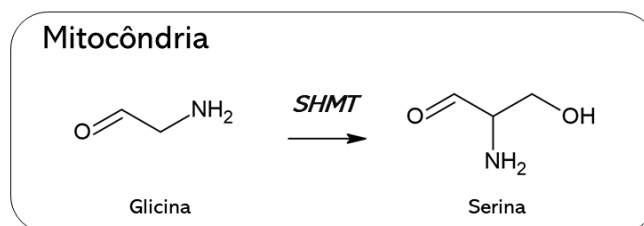


Figura 3 - Síntese de glicina em serina através de serina hidroximetiltransferase (SHMT)

Fatores de transcrição associados aos genes SHMT de *Jatropha curcas*

Os fatores de transcrição (FTs) funcionam como reguladores capazes de controlar processos que especificam tipos celulares, padrões de desenvolvimento e modulam vias específicas nas plantas, tendo um papel essencial quando elas estão sob algum tipo de estresse abiótico (29). Neste estudo foram analisados os FTs (Figura 4) associados as

SHMT do genótipo Jc171 de *J. curcas* sob salinidade. Os FTs B3 e bHLH foram exclusivos de SHMT4 e SHMT7, respectivamente. O FT Myb-related aparece em SHMT1 e SHMT7. O FT Dof e HSF apareceram em SHMT1, SHMT3 e SHMT4. O FT C2H2 em SHMT1, SHMT4, SHMT7. O FT bZIP em SHM4. O FT GATA20 aparece em todos os SHMTs, exceto a *SHMT(LOC105630748)*.

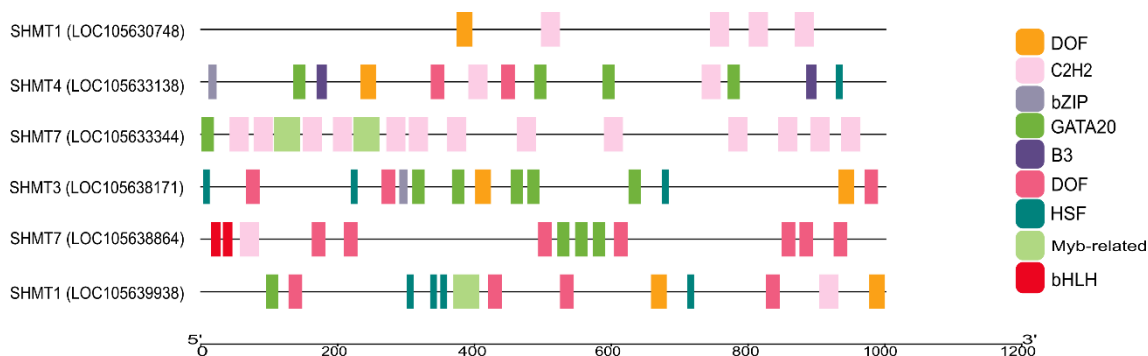


Figura 4– Distribuição de Fatores de Transcrição em genes SHMT de Jc171

Em pinhão manso (*Jatropha curcas*), bZIP conferiu resistência a seca e a salinidade, este FT é envolvido com processos biológicos que incluem, desenvolvimento e crescimento das plantas (11,30). Em arroz (*Oryza sativa*), houve acúmulo de Myb-related, conferindo tolerância ao estresse salino e a seca, este FT que tem suas atividades essenciais no desenvolvimento e crescimento da planta (31). Em pimenta (*Capsicum annuum* L.), o bHLH estava regulando positivamente sob estresse salino, aquecimento, frio e seca, este FT está relacionado com estresses ambientais e envolvido na transdução de sinal e vias anabólicas (32). Os fatores de transcrição citados promovem a transcrição de genes importantes para a adaptação e respostas das plantas aos fatores abióticos.

CONCLUSÕES

A caracterização estrutural de serina hidroximetiltransferase é de extrema relevância para indicar sua participação em diferentes compartimentos subcelulares. O seu acúmulo e sua expressão influenciam na via metabólica de fotorrespiração, atuando na conversão de glicina em serina. No genótipo Jc171 de *J. curcas* foram poucas identificadas, pois o tecido o qual estava sendo analisado foi o radicular e apresentou apenas a SHMT4 que é mais comum nesta região. Uma análise utilizando tecido foliar poderá fornecer mais informações sobre esse gene, uma vez que ele atua diretamente na via fotorrespiratória a qual é ativada pelo excesso de O₂ provocado por fatores externos, como os estresses ambientais.

AGRADECIMENTOS

À Capes pelo financiamento do projeto e concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

1. Reubens B, Achten WMJ, Maes WH, Danjon F, Aerts R, Poesen J, et al. More than biofuel? *Jatropha curcas* root system symmetry and potential for soil erosion

- control. *J Arid Environ* [Internet]. 2011;75(2):201–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2010.09.011>
2. Maes WH, Achten WMJ, Reubens B, Raes D, Samson R, Muys B. Plant-water relationships and growth strategies of *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. *J Arid Environ*. 2009;73(10):877–84.
 3. Lozano-Isla F, Campos MLO, Endres L, Bezerra-Neto E, Pompelli MF. Effects of seed storage time and salt stress on the germination of *Jatropha curcas* L. *Ind Crops Prod*. 2018;118(July 2017):214–24.
 4. Kopriva S, Bauwe H. Serine hydroxymethyltransferase from *Solanum tuberosum*. *Plant Physiol*. 1995;107(1):271–2.
 5. Fang C, Zhang P, Li L, Yang L, Mu D, Yan X, et al. Serine hydroxymethyltransferase localised in the endoplasmic reticulum plays a role in scavenging H₂O₂ to enhance rice chilling tolerance. *BMC Plant Biol*. 2020;20(1):1–13.
 6. Patel MK, Joshi M, Mishra A, Jha B. Ectopic expression of SbNHX1 gene in transgenic castor (*Ricinus communis* L.) enhances salt stress by modulating physiological process. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2015;122(2):477–90.
 7. Liu Y, Guérard F, Glab N. Photorespiratory serine hydroxymethyltransferase 1 activity impacts abiotic stress tolerance and stomatal closure. 2019;(May):2567–83.
 8. Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. Photorespiration: Metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2000;355(1402):1517–29.
 9. Lima Neto MC, De Oliveira Martins M, Ferreira-Silva SL, Silveira JAG. *Jatropha curcas* and *ricinus communis* display contrasting photosynthetic mechanisms in response to environmental conditions. *Sci Agric*. 2015;72(3):260–9.
 10. Souza MCP, Silva MD, Binneck E, de Lima Cabral GA, Benko Iseppon AM, Pompelli MF, et al. RNA-Seq transcriptome analysis of *Jatropha curcas* L. accessions after salt stimulus and unigene-derived microsatellite mining. *Ind Crop Prod* [Internet]. 2020;147(April 2019):112168. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112168>
 11. de Lima Cabral GA, Binneck E, de Souza MCP, da Silva MD, Costa Ferreira Neto JR, Pompelli MF, et al. First Expressed TFome of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) After Salt Stimulus. *Plant Mol Biol Report*. 2020;38(2):189–208.
 12. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1):222–30.

13. Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He Y, et al. TBtools : An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. *Mol Plant* [Internet]. 2020;13(8):1194–202. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>
14. Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. 1994;2:28–36.
15. Duvaud S, Gabella C, Lisacek F, Stockinger H, Ioannidis V, Durinx C. Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W216–27.
16. Thummuluri V, Armenteros, Juan Almagro, Johansen AR, Nielsen H, Winther O. Prediction Using Protein Language Models. 2022;50(April):1–7.
17. Clamp M, Cuff J, Searle SM, Barton GJ. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*. 2004;20(3):426–7.
18. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*. 2021;38(7):3022–7.
19. Rastogi A, Gupta D. GFF-Ex: A genome feature extraction package. *BMC Res Notes*. 2014;7(1):7–9.
20. Gupta S, Stamatoyannopoulos JA, Bailey TL, Noble WS. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol*. 2007;8(2).
21. Sandelin A, Alkema W, Engström P, Wasserman WW, Lenhard B. JASPAR: An open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(DATABASE ISS.).
22. Yu J, Xie Q, Li C, Dong Y, Zhu S, Chen J. Comprehensive characterization and gene expression patterns of LBD gene family in *Gossypium*. *Planta* [Internet]. 2020;251(4):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03364-8>
23. Liu Z, Pan X, Wang C, Yun F, Huang D, Yao Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of serine hydroxymethyltransferase (SHMT) gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PeerJ*. 2022;10.
24. Zhang Y, Sun K, Sandoval FJ, Santiago K, Roje S. One-carbon metabolism in plants : characterization of a plastid serine hydroxymethyltransferase. 2010;105:97–105.
25. Waditee R, Bhuiyan NH, Hirata E, Hibino T, Tanaka Y, Shikata M, et al. Metabolic Engineering for Betaine Accumulation in Microbes. *J Biol Chem* [Internet]. 2007;282(47):34185–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M704939200>

26. Zhou H, Zhao J, Yang Y, Chen C, Liu Y, Jin X, et al. UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE16 modulates salt tolerance in arabidopsis by regulating Na⁺/H⁺ antiport activity and serine hydroxymethyltransferase stability. *Plant Cell*. 2013;24(12):5106–22.
27. Jamai A, Salomé PA, Schilling SH, Weber APM, McClung CR. Arabidopsis photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Plant Cell*. 2009;21(2):595–606.
28. Mishra P, Jain A, Takabe T, Tanaka Y, Negi M, Wood A. Heterologous Expression of Serine Hydroxymethyltransferase-3 From Rice Confers Tolerance to Salinity Stress in *E. coli* and Arabidopsis. 2019;10(March):1–17.
29. Villano C, Esposito S, D'Amelia V, Garramone R, Alioto D, Zoina A, et al. WRKY genes family study reveals tissue-specific and stress-responsive TFs in wild potato species. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–12.
30. Wang Z, Zhu J, Yuan W, Wang Y, Hu P, Jiao C, et al. Genome-wide characterization of bZIP transcription factors and their expression patterns in response to drought and salinity stress in *Jatropha curcas*. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2021;181:1207–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.027>
31. Xiong H, Li J, Liu P, Duan J, Zhao Y, Guo X, et al. Overexpression of OsMYB48-1, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice. *PLoS One*. 2014;9(3):1–13.
32. Zhang Z, Chen J, Liang C, Liu F, Hou X, Zou X. Genome-Wide Identification and Characterization of the bHLH Transcription Factor Family in Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Front Genet*. 2020;11(September):1–14.

DOI: 10.53934/9786585062046-19

Capítulo 19

TÉCNICA DO DNA RECOMBINANTE PARA OBTENÇÃO DO COMPLEXO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Davi Bento Antonucci^{ID*}; Kássia Ayumi Segawa do Amaral^{ID}; Adriele Rodrigues dos Santos^{ID}; Isadora Oliveira Gondim^{ID}; Priscilla Zwierchewski de Oliveira^{ID}; Juliana Morini Küpper Cardoso Perseguini^{ID}

**Autor correspondente (Corresponding author) – Email: dba_br@hotmail.com*

Resumo: A celulose é o recurso natural mais abundante e um componente chave da biomassa vegetal, podendo ser uma fonte de energia econômica e ambientalmente viável e renovável. Atualmente, as celulasas são produzidas comercialmente a partir de fungos, sendo seu alto custo atribuído principalmente aos substratos utilizados na produção e à lenta taxa de crescimento dos fungos. A produção das enzimas celulolíticas em hospedeiros bacterianos, utilizando a técnica do DNA recombinante, é uma estratégia para reduzir os custos da produção de enzimas. O sistema de expressão procariótico está sendo preferido em relação ao sistema de expressão eucariótico devido ao seu baixo custo e taxa de crescimento rápido. A *Escherichia coli* é considerada uma boa escolha porque sua expressão gênica e fisiologia são bem conhecidas, cresce em altas densidades celulares e em meios de cultura acessíveis. Dessa forma, neste artigo abordaremos informações sobre a técnica do DNA recombinante para produção mais eficaz e viável das enzimas celulolíticas.

Palavras-chave: celulase; clonagem; DNA recombinante; engenharia genética; enzimas celulolíticas

INTRODUÇÃO

As enzimas ocorrem em todos os organismos vivos e catalisam reações bioquímicas necessárias para sustentar a vida, fazem parte de uma classe altamente seletiva de proteínas que desempenham um papel vital em funções fisiológicas que variam desde a digestão de alimentos até a síntese de DNA (1). Um grupo de enzimas presente em abundância em micróbios, plantas e animais são as celulasas. O sistema enzimático celulolítico é composto por três enzimas: β -1,4-endoglucanases, β -1,4-exoglucanases e β -glucosidases, que funcionam de forma coordenada para a degradação da celulose em unidades de glicose (2).

A celulose é o recurso natural mais abundante e um componente chave da biomassa vegetal, podendo ser uma fonte de energia econômica e ambientalmente viável e renovável. Porém, a utilização econômica desse recurso natural depende principalmente do ritmo de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos para a produção dos metabólitos e biocombustíveis desejados (3) e, nesse sentido, o uso das enzimas celulolíticas se torna

uma opção.

Entretanto, o custo das enzimas para converter materiais de biomassa vegetal em açúcares fermentáveis é um grande impedimento para o desenvolvimento da indústria de biocombustíveis (4,5). Atualmente, as celulasas são produzidas comercialmente a partir de fungos e, embora as cepas fúngicas já tenham sofrido uma extensa melhoria, é difícil alcançar um rendimento de proteína superior a 100 mg/l usando os métodos existentes (3,6).

A produção das enzimas celulolíticas em hospedeiros bacterianos, utilizando a técnica do DNA recombinante, é uma estratégia para reduzir os custos da produção de enzimas (7,8), uma vez que o sistema bacteriano alcança a alta densidade populacional em pouco tempo e, a produção extracelular das celulasas é comparativamente maior do que a do sistema fúngico (3,6,8). Isso permitiria a eliminação de enzimas não essenciais e focaria na melhoria racional de enzimas-chave necessárias para a quebra eficiente de celulosos (3,6).

Dessa forma, neste artigo abordaremos informações sobre a técnica do DNA recombinante para produção mais eficaz e viável das enzimas celulolíticas.

TÉCNICAS TRADICIONAIS DE OBTENÇÃO DA ENZIMA CELULASE

As celulasas são a chave principal das biotransformações bioquímicas, porém, possuem um custo elevado para a sua produção, que se transforma em uma barreira para a comercialização dos bioprodutos. Um sistema enzimático eficiente, balanceado e de baixo custo se torna possível com a utilização dos microrganismos (9). Na literatura encontram-se relatos da utilização de vários microrganismos para a produção de celulasas, dentre os quais, os mais citados são os fungos: *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus* sp, *Schizophyllum* sp, *Chaetomium* sp e *Hemicola* sp (10).

De toda a diversidade microbiana, os fungos filamentosos são os mais utilizados devido às suas características morfológicas. A extensão das hifas permite ao fungo a penetração no substrato de crescimento, formando uma estrutura de apoio sólida. Para isso, prefere-se a fermentação em estado sólido, que permite o acesso de nutrientes e a excreção das enzimas pelas hifas, que não são diluídas ao meio, além de simular o habitat natural dos fungos filamentosos (11,12).

A manipulação de microrganismos visando a obtenção de produtos é conhecida desde antigamente, mas é a partir da década de 1990 que ela se intensifica devido ao avanço da engenharia genética com o potencial de ampliação de escala da produção. Dois métodos são largamente utilizados, a fermentação em estado sólido e a fermentação submersa (13).

A fermentação em estado sólido possui vantagens econômicas e simplicidade de produção sobre todos os outros métodos de fermentação existentes por cultivar o microrganismo em substratos sólidos com ausência de água livre, propiciando o aproveitamento de resíduos agroindustriais (14). Também proporciona um maior rendimento da excreção enzimática, maior estabilidade das enzimas em variações de temperatura e pH com menos susceptibilidade à inibição (14).

Para a fermentação submersa, o crescimento do microrganismo ocorre em um

meio propício com concentração de oxigênio controlada e permite o escalonamento da produção com facilidade por utilizar meios líquidos de cultivo (15,16). Os processos mais utilizados são a fermentação contínua, batelada alimentada e batelada simples, seguidos dos parâmetros de controle de pH, temperatura, difusão de oxigênio, formação de dióxido de carbono e taxa de alimentação do biorreator (13). Uma das desvantagens atrelada a essa técnica é o alto gasto energético associado aos sistemas de esterilização, purificação e agitação (16). Para a remoção das enzimas secretadas em um meio líquido, é necessária uma etapa de filtração ou centrifugação com consequente remoção das células suspensas, por serem enzimas extracelulares, elas ainda permanecem no meio após a remoção da biomassa, necessitando de uma etapa de concentração enzimática geralmente por filtração de membranas, sendo essa a maior dificuldade de uma fermentação submersa (13).

A maioria dos fungos apresenta um sistema celulolítico e que precisa ser induzido pela presença do substrato contendo celulose (17). Diversos resíduos apresentam celulose complexa em sua composição, além de alguns açúcares simples, o mais utilizado é o bagaço da cana-de-açúcar pela alta disponibilidade e pelo baixo custo. A Tabela 1 lista os principais resíduos disponíveis pela indústria e suas composições.

Tabela 1. Composição de alguns materiais lignocelulósicos.

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana	40	26	25
Bagaço de laranja	16	14	1
Casca de amendoim	38	36	16
Casca de arroz	36	20	19
Casca de aveia	31	29	23
Palha de cana	36	21	16
Palha de milho	36	28	29
Palha de trigo	39	36	10
Palha de cevada	44	27	7
Palha de arroz	43	22	17
Palha de algodão	42	12	16
Farelo de cevada	23	33	21
Sabugo de milho	36	28	NR*

*NR: Valores não reportados. Fonte: Adaptado de Santos (18).

Embora os fungos tenham a capacidade de melhor produção de celulase, um único fungo com todos os componentes do sistema de celulase para a hidrólise eficaz da biomassa é muito raro (19–21). Além disso, a produção comercial de celulase é realizada usando diferentes linhagens de fungos para desenvolver todas as três principais enzimas eficientes do sistema celulase (exo, endo e β -g) (19).

A celulase é uma enzima de importância industrial e subsidia cerca de 20% do mercado global de enzimas em todo o mundo. Portanto, a produção e eficiência da enzima celulase tornaram-se um dos principais pontos de atenção a serem focados em escala industrial (16).

USO DO DNA RECOMBINANTE PARA OBTENÇÃO DE CELULASES

A celulase tem sido amplamente utilizada em aplicações industriais e diversas commodities, incluindo biocombustíveis de segunda geração, alimentos e recursos bioquímicos (22,23). Estas enzimas são produzidas em larga escala usando fungos, sendo seu alto custo atribuído principalmente aos substratos utilizados na produção e à lenta taxa de crescimento dos fungos (24). Contudo, para aumentar a produção de celulase e minimizar o custo total das aplicações industriais de celulose, a produção de celulase microbiana recombinante via engenharia genética foi proposta e rapidamente desenvolvida (22).

Dentre as bactérias, *Bacillus spp.* representa um dos gêneros mais importantes para produção de enzimas celulolíticas e, numerosos genes de celulases foram clonados de várias espécies de *Bacillus*, incluindo: *B. licheniformis* (22,25), *B. subtilis* (24,26–29), *B. polymyxa* (30,31), *B. circulans* (30) e *B. macerans* (32). As celulases de *Bacillus* foram relatadas como pertencentes às famílias da glicosil hidrolase 5 (GH5) e tentativas foram feitas para clonar e expressar os genes que codificam essas enzimas em um hospedeiro heterólogo, *Escherichia coli* (5,29). A clonagem e superexpressão de genes de celulases em hospedeiros heterólogos podem ser benéficas para sua aplicação industrial direta (5).

Assim, os pesquisadores se concentraram no desenvolvimento de celulase recombinante usando o sistema de expressão de *E. coli* (24). Esta bactéria como host, não requer meio de cultura específico e cresce de forma robusta (5). Portanto, a principal vantagem da celulase recombinante é o aumento de escala no nível de produção sem o uso de substrato caro (28).

TÉCNICA DO DNA RECOMBINANTE

A tecnologia de DNA recombinante (rDNA) compreende a alteração do material genético fora de um organismo para obter características aprimoradas e desejadas em organismos vivos ou como seus produtos (33). Essa tecnologia envolve a inserção de fragmentos de DNA de diversas fontes, possuindo uma sequência gênica desejável via vetor apropriado (33,34). Esta técnica permite amplificar determinado *locus*, desde que apresente quantidades mínimas de DNA genômico. Esta amplificação é feita com uma polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, em cerca de 20 a 30 ciclos, podendo obter-se milhões de cópias do fragmento de DNA, levando apenas algumas horas (35).

Esta técnica começou a ser desenvolvida no ano de 1970, utilizando as enzimas de restrição, que são utilizadas e permitem cortar o DNA em pontos específicos, e vetores de clonagem, como plasmídeos e genomas virais (36). As primeiras moléculas de rDNA foram geradas em 1973 por Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang e Stanley Cohen da Universidade de Stanford e da Universidade da Califórnia em São Francisco (33). Em 1975, durante a “The Asilomar Conference” foi discutida a regulamentação e o uso seguro da tecnologia rDNA (33,37). E, desde meados da década de 1980, o número de produtos como hormônios, vacinas, agentes terapêuticos e ferramentas de diagnóstico tem sido desenvolvido continuamente para melhorar a saúde (33).

ETAPAS DA TÉCNICA DE DNA RECOMBINANTE

Uma vez que o microrganismo de origem (*B. subtilis*), o gene alvo (celulase) e o

vetor de expressão (*E. coli*) foram identificados dá-se início à seleção dos reagentes. Inúmeros materiais podem ser adquiridos comercialmente tais como: kit de extração de DNA bacteriano, kit de purificação, kit de preparação plasmidial, kits de amplificação para a reação em cadeia de polimerase, cepas hospedeiras com marcadores de resistência, vetores de clonagem, enzimas de restrição, entre outros (22,24).

EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

A extração do DNA cromossômico total é a primeira etapa a ser concluída e para tal pode-se fazer uso de kits comerciais (22,24).

AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE INTERESSE

Os *primers* devem permear todo o segmento de interesse incluindo os códons de iniciação e terminação. A sequência do gene alvo pode ser localizada em plataformas de banco de dados genômicos como o GenBank (gi: 39776). Caso o gene de interesse não possua sítios de restrição idênticos aos do plasmídeo é necessário, para facilitar as etapas posteriores de produção do microrganismo recombinante, adicionar ao *primer* a sequência correspondente a esses sítios (2,24). Este procedimento irá fundir extremidades no *amplicon* que serão complementares aos sítios de restrição do DNA plasmidial do vetor de clonagem (2,24). Sendo que, após rodar a PCR (Polymerase Chain Reaction) a etapa de isolamento e purificação do *amplicon* deve ser conduzida.

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO AMPLICON

Para o isolamento dos fragmentos amplificados faz-se a digestão destes pelas enzimas de restrição para os quais o *amplicon* e o plasmídeo possuam sítios de restrição (Tabela 2). Estas enzimas bacterianas reconhecem sequências de pares de bases específicas nas moléculas de DNA e as cortam nesses pontos. Após a digestão, faz-se uma corrida em gel de agarose a 1% para confirmação (24). Etapas de sequenciamento para análise comparativa e construção de vetor para caracterizar a produção da proteína é algo desejável (2,22).

Tabela 2. Principais enzimas de restrição, organismo de origem e sítios de clivagem.

Nome de enzima	Fonte	Local de reconhecimento e de clivagem	Natureza das pontas cortadas
<i>Eco R1</i>	<i>E. coli</i> RY13	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'	Coesiva
<i>Hind III</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	5'-A AGCTT-3' 3'-TTCGA A-5'	Coesiva
<i>Bam HI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5'-G GATCC-3' 3'-CCTAG G-5'	Coesiva
<i>Alu I</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'-AG CT-3' 3'-TC GA-5'	Cega
<i>Not I</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	5'-GC GGCCGC-3' 3'-CGCCGG CG-5'	Coesiva
<i>Sau3AI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	5'- GATC-3' 3'-CTAG -5'	Coesiva
<i>Sma I</i>	<i>Serratia marcescens</i>	5'-CCC GGG-3' 3'-GGG CCC-5'	Cega

Fonte: (38)

Como as enzimas de restrição clivam em regiões palindrômicas e deixam segmentos coesivos expostos, para evitar a circularização e formação de estruturas secundárias, a etapa de desfosforilação e fosforilação com o uso de fosfatase alcalina pode ser necessária para diminuir a perda de produto e fundo sujo (39,40). Enzimas como TSAP e T4 PNK são opções para esse processo.

CONSTRUÇÃO DO VETOR DE CLONAGEM

Os vetores de clonagem (Figura 1) podem ser produzidos em laboratório ou adquiridos de empresas especializadas como Novagen, Invitrogen e Promega (22,24). A construção do vetor se inicia com a adição da endonuclease utilizada para a digestão do *amplicon* (24) em um tubo juntamente com o inserto e o vetor. A enzima DNA ligase é adicionada para refazer as ligações fosfodiéster entre os segmentos de DNA plasmidial e amplificado, e obter o vetor recombinante (vetor de clonagem) (2).

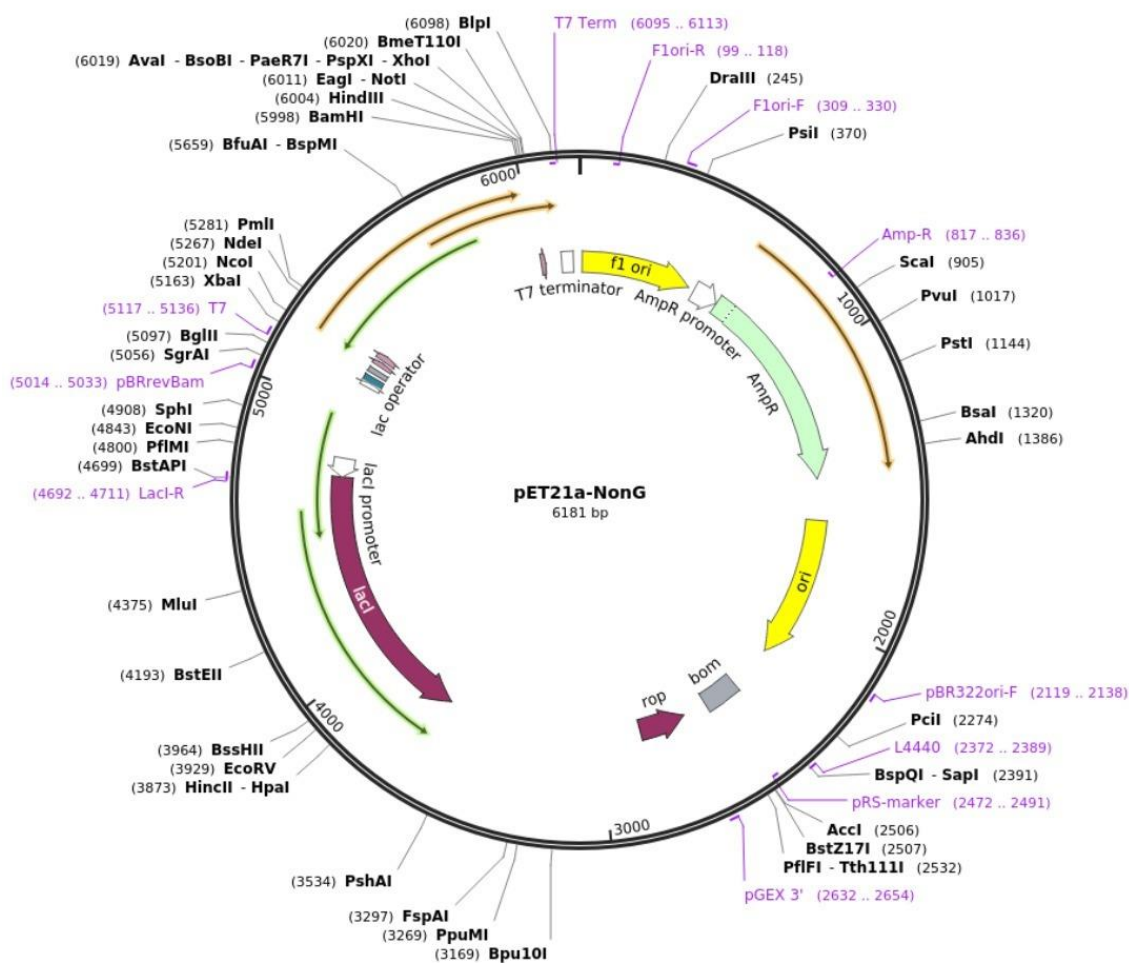


Figura 1 – Mapa do vetor pET21a com os principais *loci* de genes e sítios para ação de endonucleases.
Fonte: (41)

O sítio de inserção do gene exógeno deve ser analisado para se evitar a quebra da codificação de proteínas essenciais. O posicionamento do inserto após um promotor correto também é etapa que exige estudo (42).

TRANSFORMAÇÃO DO HOSPEDEIRO

A célula hospedeira ou vetor de expressão, neste caso a *E. coli*, pode ser adquirida ou desenvolvida em laboratório. Esta célula deve conter em seu genoma um sítio de resistência a antibióticos como a canamicina, ampicilina ou cloranfenicol para a seleção dos hospedeiros recombinantes (43).

Os vetores de clonagem são acondicionados juntamente às células hospedeiras e uma das opções de transformação bacteriana é desencadeada. Os principais métodos de transformação adotados em laboratórios são: eletroporação (2) e choque térmico.

SELEÇÃO DAS CÉLULAS TRANSFORMADAS

Após a etapa de transformação do hospedeiro é necessário proceder à seleção destes. As células transformadas são colocadas em meio com o agente antimicrobiano para o qual as células recombinantes bem-sucedidas possuem resistência e a seleção das colônias é realizada. Os clones bacterianos positivos, ou seja, com a inserção do DNA recombinante e do gene de resistência crescerão neste meio (2).

Para a confirmação do sucesso no processo de transformação pode-se realizar, a partir de uma alíquota das colônias selecionadas, uma rodada de amplificação com *primers* específicos e comparar, através de corrida em gel de agarose, com o controle (DNA genômico do *B. subtilis*) (24). Adicionalmente pode-se sequenciar o amplificado (2) e com uso de ferramentas de bioinformática alinhar e comparar com o controle.

Para a extração do DNA plasmidial pode-se optar pela lise alcalina e centrifugação. Uma vez que o DNA plasmidial possui menor peso molecular que o cromossomal, o primeiro estará no sobrenadante (44).

EXCISÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA

A remoção dos marcadores selecionáveis, não mais necessários, pode ser benéfica, uma vez que estes limitam o empilhamento de genes adicionais em transformações subsequentes e podem representar uma carga metabólica excessiva na maquinaria celular (45) e evitar questões regulatórias (46).

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DE INTERESSE

Uma das etapas finais do processo de produção de um microrganismo recombinante é a verificação da expressão gênica, secreção da proteína alvo para o meio e o estabelecimento da produção em larga escala (2,22).

PRINCIPAIS CEPAS HOSPEDEIRAS E SUAS CARACTERÍSTICAS

As principais características para uma célula hospedeira é ter fisiologia celular bem documentada, sequências completas do genoma, informações do mecanismo de regulação, expressão gênica e propriedades de recombinação disponíveis.

Existem diversas cepas de *E. Coli* que são utilizadas como hospedeiros para

produção de proteínas heterólogas, as mais conhecidas são a K-12 e atualmente a BL21- (DE3). A *E. coli* K-12 é uma das bactérias mais extensivamente estudadas, o seu genoma foi sequenciado em 1997 e consiste em um único cromossomo circular de 4.6 Mbp. Tem um histórico de uso seguro na produção de especialidades químicas e medicamentos humanos por não possuir as estruturas de superfície necessárias para a colonização eficiente do intestino humano e também carecer dos genes que codificam toxinas (47). A cepa BL21(DE3), também conhecida como células quimicamente competentes e igualmente adequada para clonar segmentos de DNA instáveis, emergiu como destaque devido seu crescimento ser mais rápido que outras linhagens (por não terem flagelos e serem imóveis) e tornou-se o hospedeiro preferido para a produção de proteínas recombinantes. O sequenciamento do genoma de cepas da linha B tem ajudado a entender a base molecular de fenótipos úteis para a síntese de proteínas heterólogas (48).

A *E. coli* é considerada uma boa escolha porque sua expressão gênica e fisiologia são bem conhecidas, tem rápido crescimento, cresce em altas densidades celulares e em meios de cultura acessíveis, não formam aglomerados celulares, há a possibilidade de uso de cepas com baixa atividade proteolítica, além de serem de fácil manipulação e custo-benefício. É o hospedeiro mais bem caracterizado com muitas alternativas de ferramentas de expressão e regulação disponíveis. Entretanto são incapazes de degradar polímeros de celulose devido à falta de celulasas endógenas e são pobres secretores de proteínas sob condições normais de cultura devido seu envelope celular com duas membranas; as proteínas recombinantes produzidas em *E. coli*, inclusive na BL21(DE3), geralmente são encontradas intracelularmente na forma de corpos de inclusão insolúveis e, por serem procariotos, não podem introduzir modificações pós-tradução como pontes dissulfeto ou glicosilação (48). Vários estudos estão sendo conduzidos para inserir modificações (ancorar proteínas na membrana externa) para que a proteína heteróloga seja produzida no meio externo (22).

Os hospedeiros do gênero *Bacillus* são úteis para a produção de enzimas heterólogas e outras proteínas procarióticas e eucarióticas em larga escala secretando proteínas diretamente no meio de fermentação, porém tem como desvantagem possuírem vários genes de resistência a antibióticos (8,49,50). *Pseudomonas fluorescens* é considerada segura, porém acumula proteínas heterólogas intracelularmente como corpos de inclusão (8).

As leveduras são muito utilizadas para a produção de biocombustíveis a partir de resíduos industriais. A *Saccharomyces cerevisiae* já está bem documentada e Chang *et al.* (43) desenvolveu uma técnica de engenharia de hospedeiro para ajustar os níveis de expressão de genes heterólogos na levedura do kefir, *Kluyveromyces marxianus*, para obter alta eficiência celulolítica, as leveduras possuem alta eficiência secretória e podem fazer modificações pós-traducionais (49).

Os fungos são produtores e secretores eficazes de celulasas devidos sua fisiologia e nicho ecológico que ocupam. A vantagem dos fungos sobre outros microrganismos industriais é sua capacidade de secretar grandes quantidades de proteínas (até 120-150 g/litro) (51). No entanto podem ter limitações como proteólise das proteínas heterólogas, produção de micotoxinas (metabólitos secundários) (8,51) e a ausência de promotores de RNA polimerase III, que pode ser contornada usando o promotor RNA polimerase II e ribozimas ou o promotor 5S rRNA (51,52).

As células vegetais estão sendo utilizadas para produzir alimentos com melhores características nutricionais (conteúdo lipídico ou de vitaminas), na otimização de absorção de nutrientes do solo, resistência a pragas e menor uso de pesticidas, resistência a estresses abióticos, entre outros. Mas são poucos os cultivares que tem informações mais detalhadas acerca do seu genoma (53,54).

As células de mamíferos também são capazes de inserir modificações pós-traducionais, entretanto necessitam de fatores mais complexos (nutrientes essenciais, fatores de crescimento, hormônios, balanço de gases etc.). O produto apresenta um custo mais elevado e os fatores limitantes descritos são baixa eficiência e controle preciso da expressão gênica. Sua aplicação é direcionada para área pesquisa médica, farmacêutica e testes de segurança, pecuária, xenotransplante de órgãos, entre outros. Exemplos de hospedeiros: células de rim de hamster, culturas celulares diversas e animais transgênicos biorreatores (55).

O sistema de expressão procariótico está sendo preferido em relação ao sistema de expressão eucariótico devido ao seu baixo custo, taxa de crescimento rápido, flexibilidade e facilidade de escala para produção de proteínas de nível mais alto que não requerem modificações pós-traducionais. As propriedades de recombinação são especialmente relevantes para a escolha de hospedeiros para propagação de bibliotecas a fim de evitar a deturpação devido ao crescimento desigual de clones (48,56). Sendo essencial localizar um “porto seguro” genômico para a inserção de genes, de modo que ele funcione corretamente e não cause risco ao hospedeiro, pois nem sempre estas células sobrevivem ao próprio gene ou à proteína expressada (48,56).

CONCLUSÃO

O sucesso da clonagem e expressão de genes que codificam celulasas promove o desenvolvimento de uma estratégia de baixo custo para produzir este grupo enzimático em grande quantidade. O objetivo final de produzir uma proteína desejada em um hospedeiro heterólogo econômico é influenciado por uma variedade de fatores. No entanto, maximizar a produção de proteínas heterólogas para aplicação comercial ainda é uma arte. Uma expressão enzimática econômica e uma caracterização detalhada da enzima recombinante purificada pode ser um candidato valioso para uso em vários processos industriais, especialmente na indústria de biocombustíveis para conversão de biomassa vegetal em açúcar fermentável.

REFERENCIAS

1. Ladics GS, Sewalt V. Industrial microbial enzyme safety: What does the weight-of-evidence indicate? Regul Toxicol Pharmacol [Internet]. 2018;98(July):151–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.07.016>
2. Liu ZL, Li HN, Song HT, Xiao WJ, Xia WC, Liu XP, et al. Construction of a trifunctional cellulase and expression in *Saccharomyces cerevisiae* using a fusion protein. BMC Biotechnol. 2018;18(1):1–7.
3. Wang BT, Hu S, Yu XY, Jin L, Zhu YJ, Jin FJ. Studies of cellulose and starch utilization and the regulatory mechanisms of related enzymes in *Fungi*. Polymers (Basel). 2020;12(3):1–17.
4. Fatma S, Hameed A, Noman M, Ahmed T, Sohail I, Shahid M, et al.

- Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for Future. *Protein Pept Lett.* 2018;25:148–63.
5. Santos CA, Ferreira-Filho JA, O'Donovan A, Gupta VK, Tuohy MG, Souza AP. Production of a recombinant swollenin from *Trichoderma harzianum* in *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):1–11.
 6. Liu M, Yu H. Cocktail production of an endo- β -xylanase and a β -glucosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414 in *Escherichia coli*. *Biochem Eng J* [Internet]. 2012;68:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.07.003>
 7. Dadwal A, Sharma S, Satyanarayana T. Thermostable cellulose saccharifying microbial enzymes: Characteristics, recent advances and biotechnological applications. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2021;188(July):226–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.024>
 8. Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006;45(2):144–58.
 9. Florencio C. Microrganismos Produtores de Celulases : Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp. [Internet]. São Carlos: UFSCar. Universidade Federal de São Carlos; 2011. Available from: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/6979/3718.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 10. da Silva R, Yim DK, Park YK. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp. for pulp improvement. *J Ferment Bioeng.* 1994;77(1):109–11.
 11. Hölker U, Höfer M, Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64(2):175–86.
 12. Raimbault M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron J Biotechnol.* 1998;1(3):114–40.
 13. Hargreaves PI. Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana [Internet]. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008. Available from: <http://www.tpqb.eq.ufrj.br/download/bioprospeccao-de-novas-celulases-de-fungos-filamentosos.pdf>
 14. Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2010;46(7):541–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
 15. Tavares APM. Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira [Internet]. Universidade de Aveiro; 2006. Available from: <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/3177/1/2007001374.pdf>
 16. Passos D de F, Pereira N, Castro AM de. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. *Curr Opin Green Sustain Chem* [Internet]. 2018;14:60–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.06.003>

17. Zúñiga UFR. Desenvolvimento De Um Bioprocesso Para Produção De Celulases Específicas Na Cadeia Produtiva Do Etanol De Segunda Geração [Internet]. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo; 2010. Available from: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-15032011-133333/publico/TeseUrsulaFabiolaRodriguezZuniga.pdf>
18. Santos ADS. Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por Linhagem Fúngica Mutante [Internet]. Instituto De Tecnologia. Universidade federal rural do Rio de Janeiro; 2014. Available from: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48104/1/Dissertacao-Alex-Monica.pdf>
19. Srivastava N, Rawat R, Singh Oberoi H, Ramteke PW. A review on fuel ethanol production from lignocellulosic biomass. *Int J Green Energy*. 2015;12(9):949–60.
20. Srivastava N, Srivastava M, Mishra PK, Gupta VK, Molina G, Rodriguez-Couto S, et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. 2018;82(August 2017):2379–86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.074>
21. Kumar S, Sarma AK. Recent Advances in Bioenergy Edited by. Vol. I. 2013.
22. Kim D, Ku S. Bacillus cellulase molecular cloning, expression, and surface display on the outer membrane of Escherichia coli. *Molecules*. 2018;23(2).
23. Juturu V, Wu JC. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew Sustain Energy Rev*. 2014;33:188–203.
24. Vadala BS, Deshpande S, Apte-Deshpande A. Soluble expression of recombinant active cellulase in E.coli using B.subtilis (natto strain) cellulase gene. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021;19(1).
25. Lloberas J, Perez-Pons JA, Querol E. Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the endo- β -1,3-1,4-d-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* Predictive structural analyses of the encoded polypeptide. *Eur J Biochem*. 1991;197(2):337–43.
26. Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. *Bioresour Technol*. 2000;74(1):69–80.
27. Wei KSC, Teoh TC, Koshy P, Salmah I, Zainudin A. Cloning, expression and characterization of the endoglucanase gene from bacillus subtilis UMC7 isolated from the gut of the indigenous termite macrotermes malaccensis in escherichia coli. *Electron J Biotechnol*. 2015;18(2):103–9.
28. Zafar M, Ahmed S, Imran M, Khan M, Jamil A. Recombinant expression and characterization of a novel endoglucanase from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*. *Mol Biol Rep*. 2014;41(5):3295–302.
29. Li W, Zhang WW, Yang MM, Chen YL. Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol*. 2008;40(2):195–201.
30. Baird SD, Johnson DA, Seligy VL. Molecular cloning, expression, and characterization of endo- β -1,4-glucanase genes from *Bacillus polymyxa* and *Bacillus circulans*. *J Bacteriol*. 1990;172(3):1576–86.
31. Gosalbes MJ, Perez-Gonzalez JA, Gonzalez R, Navarro A. Two β -glycanase genes

- are clustered in *Bacillus polymyxa*: Molecular cloning, expression, and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo- β -(1,3)-(1,4)-glucanase. *J Bacteriol.* 1991;173(23):7705–10.
32. Heng NCK, Jenkinson HF, Tannock GW. Cloning and expression of an endo-1,3-1,4- β -glucanase Gene from *Bacillus macerans* in *Lactobacillus reuteri*. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(8):3336–40.
 33. Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, et al. Role of recombinant DNA technology to improve life. *Int J Genomics.* 2016;2016.
 34. Fauser BCJM, Mannaerts MJL, Devroey P, Leader A, Boime I, Baird DT. Advances in recombinant DNA technology: Corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Hum Reprod Update.* 2009;15(3):309–21.
 35. Alberto J, Candeias N. Novos aspectos da saúde pública/recent aspects of public health A Engenharia Genética. *Rev Saúde Pública* [Internet]. 1991;25(1):3–10. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v25n1/02.pdf>
 36. Lira P de. Aplicação da tecnologia do DNA recombinante na saúde: riscos e benefícios [Internet]. Faculdade de ciências da educação e saúde; 2016. Available from: <https://repositorio.uniceub.br/jspui/handle/235/9023>
 37. Griffin JA. Recombinant DNA — Potential for Gene Therapy. *Am J Med Sci* [Internet]. 1985;289(3):98–106. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002962915371597>
 38. Roberts MAJ. Recombinant DNA technology and DNA sequencing. *Essays Biochem.* 2019;63(4):457–68.
 39. Chen F, Li Y ya, Yu Y li, Dai J, Huang J ling, Lin J. Simplified plasmid cloning with a universal MCS design and bacterial in vivo assembly. *BMC Biotechnol.* 2021;21(1):1–13.
 40. Green MR, Sambrook J. Dephosphorylation of DNA Fragments with Alkaline Phosphatase. *Cold Spring Harb Protoc.* 2020;2020(8):365–9.
 41. SnapGene software [Internet]. San Diego; [cited 2022 Aug 29]. Available from: www.snapgene.com
 42. Hoseini SS, Sauer MG. Molecular cloning using polymerase chain reaction, an educational guide for cellular engineering. *J Biol Eng.* 2015;9(1).
 43. Chang JJ, Lin YJ, Lay CH, Thia C, Wu YC, Hou YH, et al. Constructing a cellulosic yeast host with an efficient cellulase cocktail. *Biotechnol Bioeng.* 2018;115(3):751–61.
 44. Delaney S, Murphy R, Walsh F. A comparison of methods for the extraction of plasmids capable of conferring antibiotic resistance in a human pathogen from complex broiler cecal samples. *Front Microbiol.* 2018;9(AUG).
 45. Sheva M, Hanania U, Ariel T, Turbovski A, Rathod VKR, Oz D, et al. Sequential Genome Editing and Induced Excision of the Transgene in *N. tabacum* BY2 Cells. *Front Plant Sci.* 2020;11(November):1–8.
 46. Tan J, Wang Y, Chen S, Lin Z, Zhao Y, Xue Y, et al. An Efficient Marker Gene Excision Strategy Based on CRISPR/Cas9-Mediated Homology-Directed Repair in Rice. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3).
 47. Cronan JE. *Escherichia coli* as an Experimental Organism [Internet]. John Wiley &

- Sons, Ltd; 2005. Available from: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsair&AN=edsair.doi.dedup.....c4aa070d153c6cdee9b9aa5199766b4b&lang=pt-br&site=eds-live&scope=site>
48. Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci.* 2019;28(8):1412–22.
 49. Giovannoni M, Gramegna G, Benedetti M, Mattei B. Industrial Use of Cell Wall Degrading Enzymes: The Fine Line Between Production Strategy and Economic Feasibility. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(April):1–20.
 50. Krüger A, Welsch N, Dürwald A, Brundiek H, Wardenga R. A host - vector toolbox for improved secretory protein overproduction in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2022;9:5137–51. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12062-2>
 51. Rozhkova AM, Kislitsin VY. CRISPR/Cas Genome Editing in Filamentous Fungi. *Biochem.* 2021; 86:S120–39.
 52. Balabanova LA, Shkryl YN, Slepchenko L V., Yugay YA, Gorpenchenko TY, Kirichuk NN, et al. Development of host strains and vector system for an efficient genetic transformation of filamentous fungi. *Plasmid* [Internet]. 2019;101(August 2018):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.11.002>
 53. Ceasar SA, Maharajan T, Hillary VE, Ajeesh Krishna TP. Insights to improve the plant nutrient transport by CRISPR/Cas system. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2022;59(April):107963. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107963>
 54. Li J, Scarano A, Gonzalez NM, D’Orso F, Yue Y, Nemeth K, et al. Biofortified tomatoes provide a new route to vitamin D sufficiency. *Nat Plants.* 2022;8(June).
 55. Bihon Asfaw A, Assefa A. Animal transgenesis technology: A review. *Cogent Food Agric* [Internet]. 2019;5(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1686802>
 56. Sanal MG, Vats N, Venugopal SK, Taneja P, Sarin SK. Cloning of human ABCB11 gene in *E. coli* required the removal of an intragenic Pribnow-Schaller Box before it’s Insertion into genomic safe harbor AAVS1 site using CRISPR-Cas9. *F1000Research.* 2020;9:1–17.

DOI: 10.53934/9786585062046-20

Capítulo 20

ANÁLISE DO VIROMA DE RNA EM AMOSTRAS DE MORCEGOS *DESMODUS ROTUNDUS* DE UMA REGIÃO AMAZÔNICA

Nádia Koide Albuquerque^{ID*}; Carine Fortes Aragão^{ID}; Sandro Patroca da Silva^{ID};
Ana Cecília Ribeiro Cruz^{ID}

*Autor correspondente (Corresponding author) – Email: koidenadia@gmail.com

Resumo: Os morcegos têm sido associados a uma série de doenças virais zoonóticas, como as causadas pelas famílias *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Coronaviridae*, que exemplificam a fatalidade das doenças transmitidas. Com os avanços da biologia molecular, a metagenômica permite sequenciar o material genético de todos os microrganismos presentes em uma amostra, que podem compreender vírus, bactérias ou organismos eucariotos, sem necessidade de cultivo celular, isso amplia a caracterização de muitas espécies de microrganismos, inclusive aquelas abrigadas por morcegos. O objetivo deste trabalho foi investigar o viroma em amostras de morcegos da espécie *Desmodus rotundus* obtidos em um município no Pará. A detecção do viroma em importantes reservatórios auxilia na vigilância epidemiológica e são importantes para compreender as possíveis contribuições à resistência peculiar da espécie, seu desempenho como hospedeiro e questões evolutivas. Foram sequenciados fragmentos de pulmão no *NextSeq 500* (Illumina) e os dados obtidos passaram por análises bioinformáticas. Os resultados mostram a presença de *Desmodus rotundus endogenous retrovirus*, que são de grande importância para estudos filogenéticos que abordam sobre a evolução das espécies e pode inferir, em estudos posteriores, como a presença desses elementos endógenos se relaciona com questões imunológicas peculiares dos morcegos.

Palavras-chave: metagenômica; morcegos; *Desmodus rotundus*; *Desmodus rotundus endogenous retrovirus*; bioinformática.

INTRODUÇÃO

Os morcegos são mamíferos silvestres da ordem *Chiroptera* e estão divididos em duas subordens: *Megachiroptera* que podem ser encontradas em regiões da África, Índia, Ásia e Oceania e *Microchiroptera*, encontrada em várias localidades ao longo do globo, excluindo zonas polares e algumas ilhas oceânicas. Ao todo possuem 21 famílias, 227 gêneros e 1.386 espécies. É a segunda ordem entre os mamíferos com maior diversidade de espécies, ficando atrás somente da ordem *Rodentia* (1,2).

O Norte e Nordeste do Brasil possuem grande diversidade de morcegos. O Pará é o estado do Norte com maior número de espécies registradas, sendo *Desmodus rotundus* e *Carollia perspicillata* os mais capturados em estudos de campo que retratam a quiropterofauna da região. A Amazônia brasileira possui em torno de 146 espécies distribuídas em 64 gêneros (3,4,5). São os únicos mamíferos com capacidade de voo, organizam-se em grupos diversificados e dispõe de características comportamentais

particulares, entre elas o hábito noturno, além de contribuírem diretamente no equilíbrio do ecossistema, realizando predação de insetos, polinização e dispersão de sementes (1).

Entretanto, os morcegos têm sido associados a uma série de doenças virais zoonóticas. Essa relação ocorre por inúmeros fatores, entre eles a grande diversidade de espécies, o tamanho da colônia, longevidade, capacidade migratória e imunologia única que contribuem para a transmissão intraespecífica e interespecífica de patógenos (6,7). Estão entre as principais fontes de novas cepas virais, provavelmente, devido sua coevolução com tais vírus que forneceu oportunidade de manutenção (8,9).

Os morcegos abrigam a maior proporção de vírus zoonóticos, o que explica a maioria dos eventos de *spillover* para humanos. O *spillover* é o transbordamento de um vírus de uma espécie para outra que requer oportunidade ecológica para contato, compatibilidade celular entre vírus e o hospedeiro, além de resposta imune permissiva. Há eventos de *spillover* direto de morcegos para humanos e eventos indiretos, que envolvem hospedeiros intermediários (10,11).

As epidemias causadas por vírus das famílias *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Coronaviridae* exemplificam a fatalidade das doenças transmitidas, mas apesar de abrigarem grande diversidade viral, na maioria das vezes os morcegos não apresentam sintomatologia. Diante disso, algumas hipóteses imunológicas são propostas. A ausência de componentes do sistema imunológico que reconhecem o material genético de agentes estranhos, como a família de genes PYHIN, evitam a ativação do inflamassoma e os danos provocados pela infecção (12).

O estresse oxidativo é alto durante atividades metabólicas, entretanto, nos morcegos a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) é limitada devido adaptações mitocondriais que minimizam o estresse durante o voo, o que pode diminuir a patogênese. Os morcegos ainda podem recrutar antioxidantes enzimáticos para eliminar o ROS eficientemente evitando assim danos oxidativos ao DNA mitocondrial e seus impactos negativos na longevidade (12,13). Em algumas espécies de morcegos a mutação no gene STING, estimulador de interferon (IFN), diminui a expressão do INF e pode permitir a replicação viral. Entretanto, apesar da replicação, a demora para recrutar linfócitos T e B após a infecção é uma estratégia evolutiva para impedir a resposta imunopatológica (13,14).

Além disso, a existência de elementos virais endógenos (EVE) é mais uma das hipóteses para a imunidade dos morcegos frente às infecções virais. Um EVE é integrado a uma célula germinativa após infecção, tornando-se parte do material genético do hospedeiro, portanto reconhece-o como próprio. Algumas regiões no genoma dos morcegos que contém esses elementos podem ter propriedades que inibem a produção de citocinas, fazendo com que sejam assintomáticos (13,14).

Atualmente, com os avanços da biologia molecular, algumas abordagens conseguem sequenciar o material genético de todos os microrganismos presentes em uma amostra, que podem compreender vírus, bactérias ou organismos eucariotos, sem necessidade de cultivo celular, permitindo ampliar a caracterização de muitas espécies de microrganismos, visto que a maioria não é cultivável. Tal vantagem proporcionou mais estudos acerca do microbioma de importantes hospedeiros (15,16).

Os vírus são capazes de infectar espécies de todos os domínios de vida existentes e através da metagenômica é possível detectar o viroma de diferentes táxons. A metagenômica possibilita uma visão mais ampla, tirando o foco dos principais causadores de doenças. Os ERVs estão presentes no material genético da maioria dos vertebrados devido infecções

retrovirais acumuladas ao longo da sua história evolutiva, cerca de 10% do genoma é formado por ERVs (17).

O objetivo deste trabalho foi investigar o viroma em amostras de morcegos da espécie *Desmodus rotundus* obtidos em um município no Pará. A detecção do viroma em importantes reservatórios auxilia na vigilância epidemiológica e são importantes para compreender as possíveis contribuições à resistência peculiar da espécie, seu desempenho como hospedeiro e questões evolutivas. A região amazônica possui grande parte da diversidade de espécies de morcegos do Brasil, mas ainda necessita de mais relatos sobre o microbioma que eles carregam nessa área. A pandemia atual aumentou o alerta sobre a relevância de identificar novos vírus carregados por morcegos e relacioná-los com outros fatores (18).

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras deste estudo foram obtidas de 15 morcegos, *Desmodus rotundus*, provenientes do município de Melgaço, localizado no arquipélago do Marajó, Pará (Figura 1), que chegaram ao Instituto Evandro Chagas em 2019 em status de óbito e foram submetidos ao teste de imunofluorescência direta para Raiva, porém todos foram negativos. Na necropsia foram coletados fragmentos de pulmão e separados em 3 pools, contendo 5 fragmentos em cada (Tabela 1) e armazenados em freezer -70 °C.

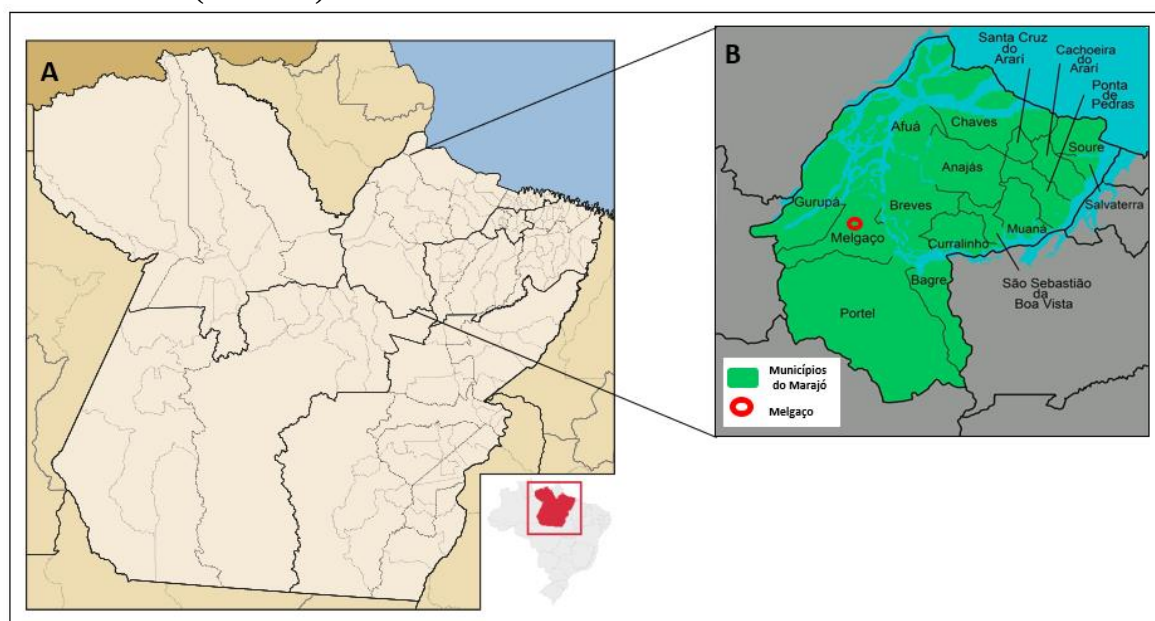


Figura 1. A- Mapa do Pará e B- mapa do arquipélago do Marajó
 Fonte: A- Adaptado familysearch.org; B- Do autor.

Pool	Nº de registro
1	47773
	47774
	47775

	48103
	48104
2	48105
	48106
	48107
	48108
	48109
3	48110
	48111
	48112
	48250
	48251

Tabela 1. Identificação dos morcegos por pool.

Os fragmentos das vísceras foram colocados em microtubos com capacidade de 2 mL, estéreis e livres de DNase e RNase e identificados por origem, víscera e número de registro dos animais. Foi adicionado 1 mL de Trizol e uma esfera de tungstênio de 5 mm de diâmetro para maceração no *TissueLyser II* (Qiagen) a 25 Hz por 1 minuto.

A extração e purificação do RNA total foi realizada pelo método Trizol combinado com o kit *PureLink RNA Mini Kit* (Thermo Fisher) e quantificado com *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) utilizando o kit *Qubit® RNA HS Assay*. Posteriormente, foi verificada a qualidade dos fragmentos de RNA pelo *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) com o kit *Agilent RNA 6000 Pico*, seguindo os protocolos dos fabricantes.

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foram utilizados 2 kits, para a 1ª fita o *SuperScript VILO MasterMix* (Invitrogen) e para a 2ª fita o *NEBNext mRNA Second Strand Synthesis Module* (New England Biolabs).

O cDNA foi purificado com o auxílio de esferas magnéticas *AMPure bead* e utilizado na preparação da biblioteca genômica pelo kit *Nextera XT DNA Library Preparation* (Illumina). A quantificação de moléculas de cDNA foi estimada com auxílio do equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer* e kit *Qubit® dsDNA HS Assay*. O tamanho dos fragmentos produzidos na biblioteca foi observado no *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) através do kit *High Sensitivity DNA Analysis* (Agilent Technologies). A partir disso, foi realizado o sequenciamento pelo equipamento *NextSeq 500* com o kit *NextSeq 500/550 High Output v2.5* (300 ciclos) (Illumina) seguindo as instruções do fabricante.

Os dados obtidos do sequenciador foram transformados para extensão *.fastq* pelo programa *bcl2fastq2* e resultou nos arquivos R1 e R2 para cada amostra. A qualidade dos dados brutos foi visualizada no *Fastp* e posteriormente filtrada para remover leituras curtas de baixa qualidade e bases indeterminadas, o *Bowtie2* foi utilizado para mapear as leituras contra o genoma do hospedeiro, *Desmodus rotundus* (genoma referência: ASM294091V2 Feb. 2018). O *SortMeRNA v.2.1* realizou a remoção de RNA ribossomal. As sequências foram novamente visualizadas no *Fastp* para atestar a qualidade.

As leituras passaram por alinhamento no programa *DIAMOND* para comparação com o banco de sequências não redundantes (NR) do NCBI e o percentual correspondente a cada agente viral foi visualizado no *Krona*. O programa *Kraken* fez as classificações taxonômicas e *Pavian* permitiu visualizá-las em tabelas, ambos os programas oferecem resultados rápidos e de alta sensibilidade.

O SPAdes realizou a montagem *De Novo* das leituras através da seleção automática de k-mers 21,33,55,77 baseado no comprimento de 150pb das sequências. Foi utilizado também o *MegaHit*, que faz montagem com k-mers 21,41,61,81,99. Após isso, os arquivos de *contigs* foram inspecionados no *Megan v.6.23.2* para avaliar as famílias mais abundantes e os *contigs* selecionados passaram por edição, mapeamento por referência no *Geneious v.9.1.8* e para alinhamento utilizamos *ClustalW*, ferramenta incluída no *Geneious v.9.1.8*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A área de estudo foi selecionada em razão da diversidade de espécies quiropteros em sua extensão, como relatados por Marques-Aguiare et al. (25). Além do histórico de surtos de doenças reservadas em morcegos na região que podem ter transmissão facilitada devido à fatores socioeconômicos locais (26,27). Apesar de haver grande quantidade de morcegos dessa região analisados pelo IEC para vigilância epidemiológica da Raiva, a maioria apresenta diagnóstico negativo na imunofluorescência direta e prova biológica, o que pode indicar morte por outras causas, inclusive fatores virais. Isso mostra a necessidade de mais estudos em localidades específicas da Amazônia, além de investigação através de outras técnicas laboratoriais.

Foram obtidas 84.404.720 leituras brutas, sendo a menor quantidade para vírus, de acordo com os programas de classificação taxonômica (Tabela 1) e após passar por filtragem, o número de sequências reduziu significativamente. As sequências que apresentaram homologia com sequências do banco NR foram inspecionadas no *MEGAN6* e o total de leituras e *contigs* obtidos foram 22.891 e 9.424 respectivamente. A redução das leituras já é algo esperado nas análises de bioinformática, a diminuição com do *Bowtie2* elimina as sequências referentes ao hospedeiro, facilitando a montagem de *contigs* para vírus (19).

Amostras	Nº de leituras brutas	Leituras classificadas (%)	Leituras microbianas (%)	Leituras para vírus (%)
Pool 1	33.955.233	69.50%	61.50%	0.16%
Pool 2	22.816.122	63.10%	53.70%	0.17%
Pool 3	27.633.365	60.80%	51.50%	0.18%

Tabela 2. Leituras brutas e percentuais obtidos antes da filtragem pelos *softwares Kraken e Pavian*.

As famílias mais abundantes em leituras e *contigs* nos pools foram *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Retroviridae* e *Mimiviridae* (Gráfico 1), com destaque para *Retroviridae* que possui vírus que infectam vertebrados. A detecção do viroma em animais conhecidos como importantes reservatórios auxilia no monitoramento de vírus com potencial patogênico para humanos. De acordo com Van Brussel e Holmes (20), durante os últimos anos, foram

detectados vários vírus em morcegos por meio do Sequenciamento de Nova Geração (NGS), cerca de 30% de todas as sequências virais relacionadas a morcegos existentes no *GenBank* foram obtidas através da metagenômica, sendo a maioria para vírus de RNA, que possuem maior facilidade de mutação, o que pode aumentar o grau de patogenicidade e produzir efeitos mais graves e fatais.

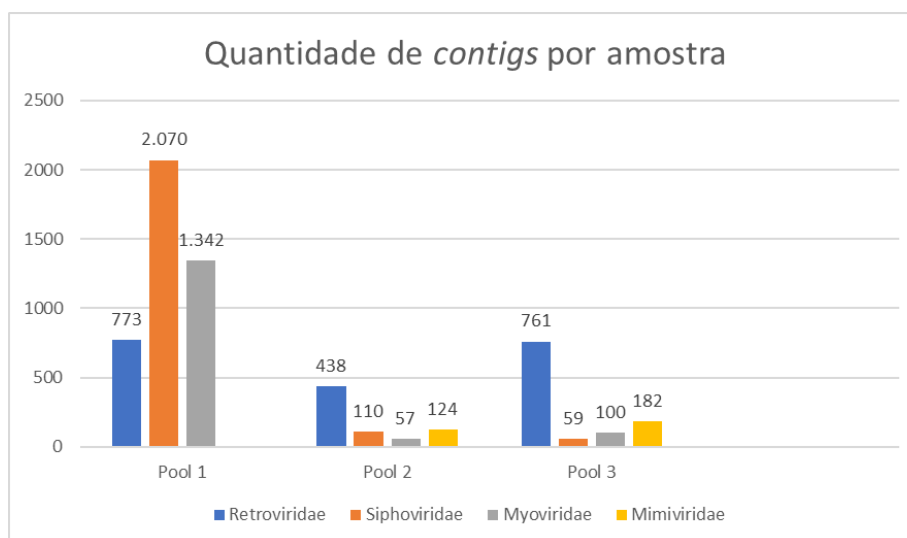


Gráfico 1. Famílias mais abundantes nas amostras

Os *contigs* montados para a família *Retroviridae* são referentes ao retrovírus endógeno (ERV) *Desmodus rotundus endogenous retrovirus* (DrERV). Os ERVs estão normalmente presentes no genoma dos vertebrados, provavelmente, devido a integração do provírus de um retrovírus exógeno no ancestral comum que se fixou no material genético antes da divergência das espécies. Portanto, são linhagens virais antigas em táxons de mamíferos e por meio delas é possível compreender sobre questões evolutivas da espécie (21).

Os retrovírus são transmitidos principalmente por contato com sangue, sendo assim, os retrovírus endógenos de morcegos hematófagos teriam facilmente saltado de uma espécie para outra. O DrERV é um provírus de baixo número de cópias que possui características estruturais betaretrovirais do tipo D. Os genes *pol* e *env* são elementos centrais que possuem vários códons de parada e espera-se que produzam produtos gênicos truncados (22).

Sequências relacionadas ao DrERV presentes na espécie *Carollia perspicillata* descrito por Baillie et al. (23) e a ausência em *Diphylla ecaudata*, outra espécie de morcego hematófago da família *Phyllostomidae*, sugere que o DrERV foi adquirido por infecções independentes após a divergência de espécies. Bergner et al. (24) também relata fatores ecológicos que podem influenciar a composição da comunidade viral em morcegos hematófagos, como diversidade de outras espécies animais para oferecer oportunidades de transmissão interespecífica e idade, visto que, os adultos acumulam mais infecções ao longo da vida e os juvenis desempenham papel importante na dinâmica viral devido à maior suscetibilidade.

Nos pools foram selecionados *contigs* do gênero *Betaretrovirus* já que apresentaram maior quantidade de nucleotídeos (nt) e maior identidade com uma região que codifica o gene *pol* de *Desmodus rotundus endogenous retrovirus* (DrERV) (GenBank ID

AJR27940.1). Porém, no mapeamento e edição não foi possível estender de forma satisfatória as sequências. Para dar continuidade às análises, foi utilizada outra sequência completa como referência (MH648003) obtida em estudo anterior de Franco-Filho et al. (24) com morcegos da mesma espécie na Amazônia. O mapeamento contra os *contigs* de ambos os montadores resultou em sequências completas de DrERV, apesar de possuir algumas regiões com variabilidade genética (mutação de transição), são referentes a todos os genes deste retrovírus ou parte deles. O tamanho das sequências obtidas pode ser visualizado na Tabela 2.

Amostras	Tamanho (nucleotídeos)
Pool 1	8.309 nt
Pool 2	10.713 nt
Pool 3	8.364 nt

Tabela 2. Tamanho das sequências obtidas através do mapeamento dos *contigs* contra sequência de referência (nº de acesso MH648003) no NCBI.

As sequências de estudo alcançaram tamanho aproximado com a referência de Franco-Filho (24), o que pode inferir que DrEVR está disseminado nos *D. rotundus* de várias regiões amazônicas. O pulmão foi utilizado como amostra devido a possibilidade de infecções por via aerógena e visto que é um órgão altamente vascularizado, permitindo facilmente a replicação viral de cepas já conhecidas. Geralmente, amostras de urina, saliva e fezes são utilizadas com maior frequência nos estudos, pois minimizam o impacto nas colônias, além de representarem a possível via de transmissão de microrganismos, no entanto, trabalhar somente com essas amostras pode falhar na detecção de vírus associados à órgãos específicos ou sofrer interferência do ambiente nos resultados (11, 20).

CONCLUSÕES

A espécie *D. rotundus* está amplamente distribuída em áreas da zona rural com presença de animais domésticos de produção, devido à disponibilidade de alimento, uma vez que são hematófagos, este fator é um alerta para que a espécie seja mais investigada acerca dos microrganismos que pode armazenar. Porém, outros vírus não patogênicos, como os ERVs, são de grande importância para estudos filogenéticos que abordam sobre a evolução das espécies e pode inferir, em estudos posteriores, como a presença desses elementos endógenos se relaciona com questões imunológicas peculiares dos morcegos.

Os dados obtidos ainda podem ser profundamente analisados para avaliação de outros microrganismos presentes nos tecidos, como bactérias e fungos, complementando o presente estudo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho faz parte de um projeto maior envolvendo alunos e doutores do Instituto Evandro Chagas (IEC). Agradeço em especial a Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) que disponibilizou estrutura laboratorial, kits e equipamentos de excelência para construção destes resultados.

REFERÊNCIAS

1. Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Morcegos do Brasil. Universidade Estadual de Londrina. 2007.
2. Burgin CJ, Colella JP, Kahn PL, Upham NS. How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy*. 2018; 99 (1): 1-14.
3. Bernard E, Tavares VC, Sampaio E. Compilação atualizada das espécies de morcegos (*Chiroptera*) para a Amazônia Brasileira. *Biota Neotropica*. 2011; 11(1): 35-46.
4. Cajaiba RL. Morcegos (*Mammalia, Chiroptera*) em cavernas no município de Uruará, Pará, norte do Brasil. *Biota Amazônia*. 2014; 4 (1): 81-86.
5. Delgado-Jaramillo M, Aguiar LM, Machado Rb, Bernard E. Assessing the distribution of a species-rich group in a continental-sized megadiverse country: Bats in Brazil. *Diversity and Distributions*. 2020; 26 (5): 632-643.
6. Klimpel S, Mehlhorn H. Bats (*Chiroptera*) as vectors of diseases and parasites. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2016.
7. Mandl JN, Schneider C, Schneider DS, Baker ML. Going to Bat(s) for Studies of Disease Tolerance. *Frontiers in Immunology*. 2018; 20(9):2112.
8. Luis AD, Hayman DT, O'shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT; Pulliam JR, Mills JN, Timonin ME, Willis CK, Cunningham AA, Fooks AR, Rupprecht CE, Wood JL, Webb CT. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proceedings of Royal Biology Society*. 2013; 280 (1756): 20122753-20122753.
9. Recht J, Schuenemann VJ, Sánchez-Villagra MR. Host Diversity and Origin of Zoonoses: The Ancient and the New. *Animals*. 2020; 10 (9):1672.
10. Olival K, Hosseini P, Zambrana-Torrel C. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*. 2017; 546 (7660): 646-650.
11. Letko M, Seifert SN, Olival KJ, Plowright RK, Munster VJ. Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Natural Reviews of Microbiology*. 2020; 18(8): 461- 471.
12. Menachery VD, Graham RL, Baric RS. Jumping species - a mechanism for coronavirus persistence and survival. *Current Opinion in Virology*. 2017; 23: 1-7.
13. Brook CE, Dobson AP. Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends in Microbiology*. 2015; 23 (3):172-180.
14. Skirmuntt EC, Escalera-Zamudio M, Teeling EC, Smith A, Katzourakis A. The Potential Role of Endogenous Viral Elements in the Evolution of Bats as Reservoirs for Zoonotic Viruses. *Annual Reviews of Virology*. 2020; 7 (1):103-119.

15. Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *Journal of General Virology*. 2012; 93(9): 1853-1868.
16. Sudarikov K, Tyakht A, Alexeev D. Methods for the metagenomic data visualization and analysis. *Current issues in molecular biology*. 2017; 24(1): 37-58.
17. Harvey E, Holmes EC. Diversity And Evolution Of The Animal Virome. *Nature Reviews Microbiology*. 2022; 20(6):321-334.
18. Hayward JA, Tachedjian M, Cui J, Field H, Holmes EC, Wang LF, Tachedjian G. Identification of diverse full-length endogenous betaretroviruses in megabats and microbats. *Retrovirology*. 2013; 10 (35).
19. Hardmeier I, Aeberhard N, Qi W, Schoenbaechler K, Kraetli H, Hatt J-M, et al. Metagenomic analysis of fecal and tissue samples from 18 endemic bat species in Switzerland revealed a diverse virus composition including potentially zoonotic viruses. *PLoS ONE*. 2021; 16(6): e0252534.
20. Van Brussel K, Holmes EC. Zoonotic disease and virome diversity in bats. *Current Opinion in Virology*. 2021; 52:192-202.
21. Hayward JA, Tachedjian M, Cui J, Field H, Holmes EC, Wang LF, Tachedjian G. Identification of diverse full-length endogenous betaretroviruses in megabats and microbats. 2013: *Retrovirology* 10: 35.
22. Escalera-Zamudio M, Mendoza ML, Heeger F, Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E, Méndez-Ojeda ML, Taboada B, Mazzoni CJ, Arias CF, Greenwood AD. A novel endogenous betaretrovirus in the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) suggests multiple independent infection and cross-species transmission events. *J Virology*. 2015;89(9):5180-4.
23. Baillie GJ, van de Lagemaat LN, Baust C, Mager DL. Multiple groups of endogenous betaretroviruses in mice, rats, and other mammals. *Journal of Virology*. 2004;78:5784–5798.
24. Franco Filho LC, Barata RR, Cardoso JF, Massafra JMV, Lemos PDS, Casseb LMN, Cruz ACR, Nunes MRT. Metagenomic Analysis of Samples from Three Bat Species Collected in the Amazon Rain Forest. *Microbiology Resource Announcements*. 2019; 8 (2): e01422- 18.
25. Marques-Aguiare AS, Melo CCS, Aguiar GFS, Queiróz JAL. Levantamento preliminar da mastofauna da região de Anajás-Muaná, Ilha de Marajó, Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 2002; 13 (3): 841-854.
26. Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde. Surto De Raiva Humana Transmitida Por Morcegos No Município De Portel-Pará. *Boletim Eletrônico*. 2004; 4 (6):1-5.
27. Instituto Evandro Chagas (IEC). IEC Confirma 3 Mortes Por Raiva Humana Em Melgaço Em 2018. [acesso em 16 de Jul 2022]. Disponível em:

https://www.iec.gov.br/wpcontent/uploads/2018/05/23maio2018_diario_do_para.pdf.

DOI: 10.53934/9786585062046-21

Capítulo 21

AVALIAÇÃO DO GENE *TEK* EM RELAÇÃO AO RISCO DE DESENVOLVIMENTO DO GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO JUVENIL: REVISÃO DE LITERATURA

Gabrielle Maria Giovanna da Silva Gonçalves¹ *; **Ana Carolina Lima Camargo² **; **Ana Rafaela Carvalho Monte **; **Ana Vitória Volpato Jensen **; **Thiago Adalton Rosa Rodrigues **; **Júlia Nicolliello Pereira de Castro **; **Mônica Barbosa de Melo¹ **

**Autor correspondente – Email: melomb@unicamp.br*

Resumo: O glaucoma é a principal causa de cegueira irreversível mundial, sua forma mais comum é o glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA). O glaucoma primário congênito (GCP) é uma das manifestações mais graves juntamente com o glaucoma primário de ângulo aberto juvenil (GPAA-J), devido a ambos serem glaucomas de início precoce. O gene *TEK*, possui uma associação com a manifestação da neuropatologia para diagnósticos de GCP, visto que a via Angiopoetina-*TEK* (ANGPT-*TEK*) é necessária para o desenvolvimento normal do Canal de Schlemm (CS), responsável pela drenagem do fluxo de humor aquoso que quando prejudicada, ocasiona o aumento da pressão intraocular, principal fator de risco relacionado a todos os tipos de glaucomas primários. Para a realização deste trabalho, foram utilizados os seguintes sites de busca: PubMed, Investigate Ophtalmology and Visual Science (IOVS) na ARVO Journal, Google Acadêmico, Naticional Library of Medicine, Nature Communications, Scielo, Science Direct, Elsevier, Wiley Online Library, Springer Nature e *Connectedpapers*. A composição desta revisão é do tipo usufruiu de “review articles” e “research articles”, pelas palavras chaves para as buscas foram: JOAG (do inglês *Juvenile -Onset Open Angle Glaucoma*), *TEK*, glaucoma associations, ANGPT1/2 e TIE2. Após as análises de literatura que implicam em associações e co-ocorrência envolvendo o *TEK* e o glaucoma, observou-se que já existem estudos contendo a presença de portadores de GPAA-J com variantes do gene *TEK*. Esta revisão tem como objetivo identificar o papel do gene na progressão do GPAA-J e melhorar a compreensão dos mecanismos gênicos ligados à afecção.

Palavras-chave: ANGPT-*TEK*; genética; glaucoma; juvenil; *TEK*

INTRODUÇÃO

Glaucoma é a principal causa de cegueira irreversível mundial e refere-se a um grupo de doenças heterogêneas, caracterizadas como uma neuropatia crônica degenerativa de natureza multifatorial. Uma característica comum do glaucoma, é a morte

celular, causada pela degeneração e escavação progressiva do nervo óptico, que por consequência promove danos às células ganglionares da retina (CGR) e nos axônios (1,2), ocasionando assim um quadro de cegueira irreversível como demonstrado na Figura 01.

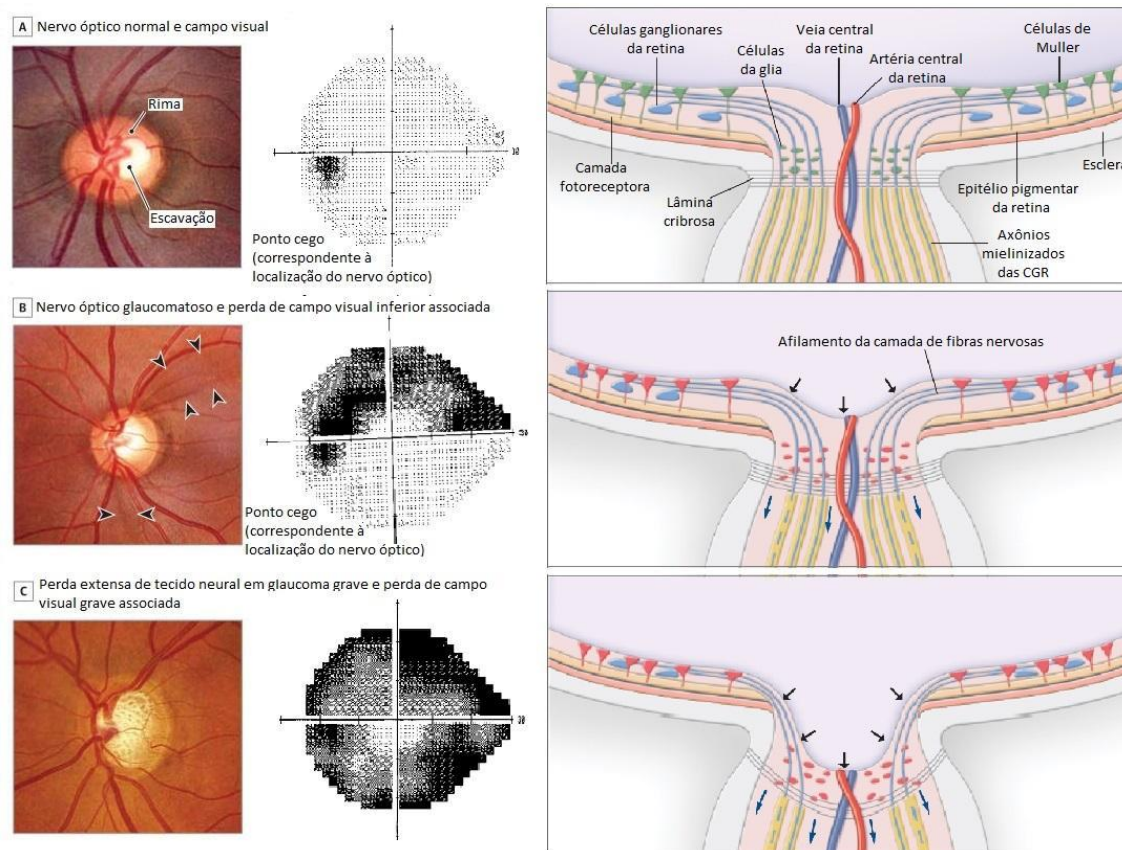


Figura 01: Fisiopatologia do glaucomatoso e exame de OCT comparados a um olho saudável. A morfologia do olho glaucomatoso consiste em mecanismos que fazem com que o escoamento e o fluxo de humor aquoso sejam prejudicados, devido a alteração de estruturas oculares específicas, que oportunamente ocasionam o aumento de pressão intraocular (PIO). Conforme a PIO se eleva, o disco óptico sofre uma atrofia equivalente a morte celular dos axônios e fibras nervosas, que é denominada escavação, essa por sua vez resulta na perda do campo visual inicialmente na região periférica, até a região central dos olhos. A) Nervo óptico sem degeneração, com o exame de OCT demonstrando que não há alterações glaucomatosas; B) olho com glaucoma inicial, apresentando defeitos no campo visual registrados pela OCT, iniciando pela lateral do campo, ocasionado pela degeneração/ escavação anormal do nervo óptico; C) olho glaucomatoso avançado, com uma degeneração/ escavação do nervo óptico mais aprofundada, levando a maiores defeitos no campo visual, desde a região lateral ocular até o campo central de visão. Adaptado de Kwon et al. (2009) (3).

Dos subtipos abrangentes, o mais abundante na população mundial é o glaucoma primário. A terminologia primário se refere a glaucomas de etiologias desconhecidas (sem uma causalidade), já a terminologia secundário abrange glaucomas cuja condição ocular/ sistêmica do paciente acarretou o desenvolvimento do glaucoma (4).

O glaucoma primário é classificado em quatro grupos: o glaucoma primário de ângulo fechado (GPAF), glaucoma primário de ângulo aberto adulto (GPAA), juvenil (GPAA-J) e glaucoma congênito primário (GCP) (5).

O GPAA é uma doença silenciosa, em função desta característica os defeitos nas CGR são observados após uma perda de cerca de 40% das células (6). A genética do glaucoma concede entendimento sobre a sua etiologia, que por sua vez é distinta dentre os variados tipos e padrões de respostas fisiológicas (7).

Diversos parâmetros podem influenciar na manifestação do glaucoma, corroborando para o seu fenótipo, como fatores ambientais, sistêmicos e genéticos. No entanto, a caracterização da base genética glaucomatosa ainda não foi totalmente descrita, visto que somente 10% dos genes e variantes relacionados ao aumento de risco para glaucoma foram relatados nos bancos de dados genéticos. Sabe-se que os padrões de herança que compõem o glaucoma pertencem a herança poligênica e herança mendeliana autossômica dominante e/ ou recessiva (8).

Dentre os mecanismos envolvidos no glaucoma já bem elucidados, estão descritos a má funcionalidade do corpo ciliar e malha trabecular (MT), implicados na produção, regulação e escoamento do fluxo de humor aquoso (AHO). Quando há alterações estruturais nessas regiões são registradas deformações, estresse mecânico e oxidativo, que ocasionam a resistência da drenagem do humor aquoso e consequentemente aumento da pressão intraocular (PIO), atualmente considerado hoje o principal fator de risco relacionado ao desenvolvimento do glaucoma (1,9,10). Outros fatores de risco ligados a neuropatia incluem: PIO elevada para os subtipos primários que podem apresentar interferências de fatores ambientais, além de ser o único fator tratável para retardar a progressão da doença (11,12). A ancestralidade, de acordo com a população avaliada, pode corresponder a uma porcentagem de afetados variada, para a ancestralidade africana é registrado um risco três a cinco vezes maior para o glaucoma, tornando-o potencialmente mais severo (13). O histórico familiar positivo (registro de casos de glaucoma na família) e idade, também são elementos de risco, visto que o glaucoma é uma doença genética que pode apresentar padrão monogênico ou poligênico e tende a apresentar maior risco conforme o envelhecimento (14–16).

O GCP é uma forma grave que dispõe da particularidade de apresentar globos oculares maiores (bftalmo), estrias de *Haab*, se manifestar durante a infância durante os primeiros dias de vida até os 3 anos de idade, apresentando uma PIO elevada, que ocorre por meio de defeitos na via de saída do AHO, líquido produzido no corpo ciliar e drenado pelo canal de Schlemm (CS), malha trabecular e vias uveosclerais (2).

Semelhante a algumas características do GCP, o GPAA-J também exibe uma PIO extremamente elevada e idade de diagnóstico clínico ocorrendo entre os 3 e 40 anos de idade. O GPAA-J é o tipo menos responsivo aos tratamentos tópicos e o que mais demanda intervenções cirúrgicas, além de demonstrar alta penetrância e registros de histórico familiar positivo para a doença, tendo como padrão genético a herança autossômica dominante (17,18).

Para a determinação de padrões genéticos associados ao GPAA e outros tipos de glaucoma, os ensaios envolvendo técnicas de biologia molecular e avaliações de risco genético, são as principais ferramentas utilizadas para a investigação clínica e composição do *Polygenic Risk Score* (PSR). Os resultados das análises para investigação de genes potencialmente envolvidos em mecanismos glaucomatosos (19), tendem a exibir

resultados benéficos aos pacientes portadores da neuropatologia, principalmente para casos de início precoce e juvenil, já que a base genética glaucomatosa do juvenil se encontra associada a mais de 15 genes (20).

A dificuldade de diagnóstico para glaucomas de início precoce (GCP e GPAA-J) tem sido um desafio mundial, devido à dificuldade de estabelecer uma precisão entre os diagnósticos. Por essa razão, as revisões de literatura de casos já descritos, são essenciais para o seguimento de novas abordagens e ensaios genéticos, sejam eles o sequenciamento completo do exoma ou genoma. A determinação e estudo de novas variantes para compreensão dos mecanismos envolvidos, se torna mais precisa possibilitando uma nova forma de diagnóstico para o futuro (11).

Portanto, o objetivo desta revisão é analisar a possível relação entre gene *TEK*, já bem descrito na patologia do GCP, com os casos de GPAA-J descritos na literatura.

• **Genética do glaucoma**

De acordo com Iglesias e colaboradores, os endofenótipos ou fenótipos intermediários são atributos clínicos estruturais e/ou funcionais que possibilitam o fenótipo final, estando associadas a uma ou mais doenças, devido a sua relação com os componentes genéticos herdados (21). Essas heranças que compõem características glaucomatosas podem estar ligadas aos seguintes endofenótipos do GPAA: proporção vertical escavação/ cabeça do nervo óptico, pressão intraocular, redução da espessura central da córnea (21).

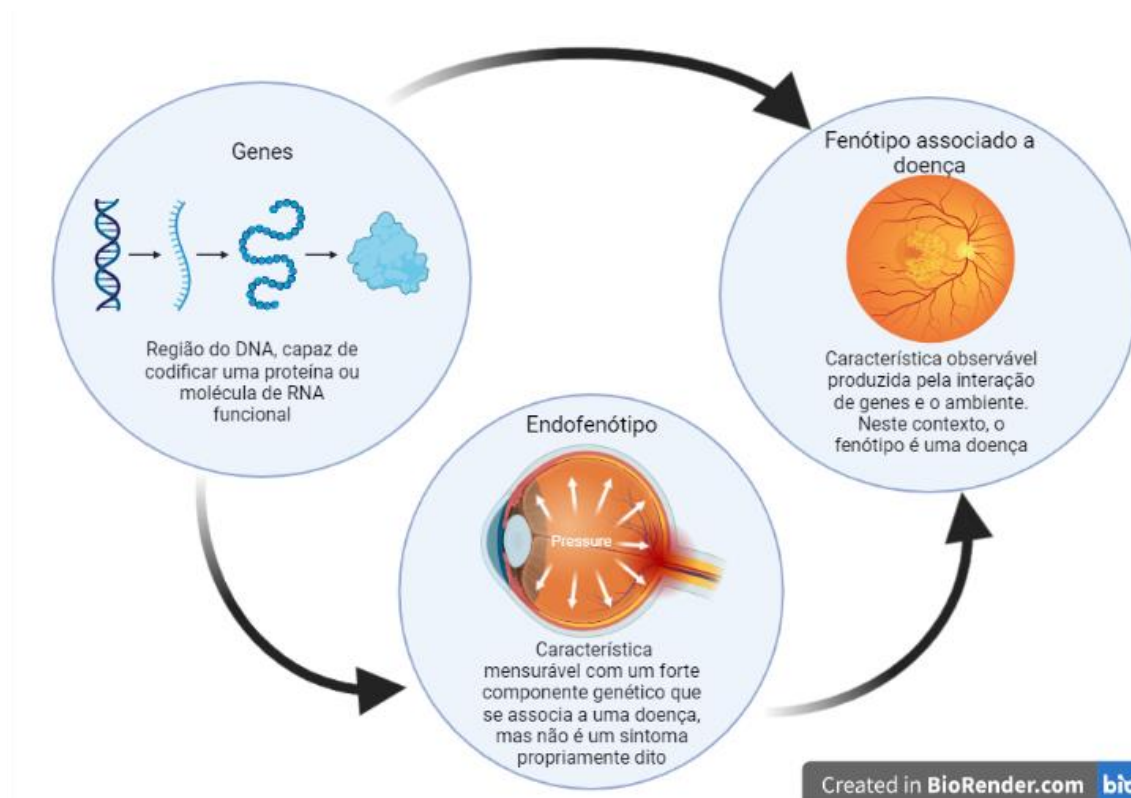


Figura 02: Relação de genes, fenótipos e endofenótipos. Na imagem acima temos de forma demonstrativa a possibilidade da interação de genética (mutagênese gerar uma característica fenotípica, que pode ou não estar relacionada a uma doença. Por outro lado, a epigenética (relação de genes, fatores ambientais, estilo de vida e fatores sociais) também pode resultar no fenótipo, que por sua vez é um sinal característico de uma doença. Adaptado de Iglesias A. e colaboradores (23).

De acordo com *Human Genome Organization/ Genome Database*, quando há loci candidatos associados ao glaucoma eles devem ser reconhecidos pela sigla “GLC”, após a sigla vem os números “1, 2 e 3” que informam respectivamente se o glaucoma é de ângulo aberto, ângulo fechado, ou congênito, em seguida é inserido uma letra referente ao primeiro, segundo ou terceiro mapeamento genético de cada subgrupo (22).

Algumas abordagens realizadas para a investigação de heranças genéticas incluem os estudos de amplitude genômica (GWAS, do inglês *Genome Wide Association Studies*), estudos de ligação e sequenciamento de exoma. Esses métodos atuam em colaboração para a composição do quadro de risco em diferentes populações e distintos tipos de glaucoma (23,24).

Atualmente alguns genes já foram descritos com impacto no GPAA-J, incluindo estudos envolvendo variantes raras com efeitos escalonados para o endofenótipo. A principal fonte para o achado de novas variantes de risco são os estudos de ligação em pedigree e sequenciamento completo do exoma, sendo esses métodos mais precisos sobre a segregação de variantes e mapeamento gênico (11,22).

Nos últimos anos houve um aumento de publicações de artigos científicos envolvendo variantes do gene *TEK*. A evidência genética relacionado ao *TEK* é a sua relação com a uma via de drenagem de AHO, permitindo que o endofenótipo desse gene possa ser encontrado em dois tipos de glaucoma de início precoce (GCP e GPAA-J) e, até o momento o *TEK* indique ter uma ação de ser um fator determinante para o desenvolvimento de ambos (11,25).

- **TEK**

O gene *TEK Receptor Tyrosine Kinase (TEK)*, também conhecido por VMCM1, *TIE2*, Angiopoietin-1 Receptor, Tunica Interna Endothelial Cell Kinase, se localiza no braço curto do cromossomo 9, região 21.2 (9p21.2). Seus receptores são altamente expressos nas células endoteliais do canal de Schlemm e suas funções são: fator de regulação e desenvolvimento do CS e MT, promover a angiogênese, receptor para Angiopoetina 1, 2 e 4 (ANGPT1/2/4), estimular a proliferação celular, migração, adesão, manutenção da quiescência vascular e reorganização do citoesqueleto (26).

O gene *TEK* exibe um padrão de herança autossômica dominante, entretanto, sua expressão é variável entre os indivíduos, de modo que são registradas alterações também de acordo com a população avaliada. Como efeito, genes associados aos glaucomas de início precoce demonstram penetrância incompleta e expressão variável, diferentemente dos genes ligados ao glaucoma de início adulto (11).

Algumas de suas variantes já descritas na literatura são responsáveis pela perda da função de sua proteína (haploinsuficiência), um atributo observado em 5% dos casos de GPC (4,7). A proteína por sua vez, se encontra na membrana plasmática e sua atividade

tirosina quinase é medida pela autofosforilação dos resíduos localizados no C- terminal (27).

A porção proteica encontrada na região extracelular, possui dois domínios semelhantes à imunoglobulina, três domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico e três repetições de fibronectina tipo III. Sabe-se que o ligante Angiopoetina 1 (ANGPT1) se encaixa no receptor TEK e inicia uma sinalização para o desenvolvimento do epitélio vascular embrionário, porém, vale ressaltar que toda a natureza de suas variantes e produtos da transcrição ainda não foi elucidada. Um exemplo seria as variantes de splicing alternativo descritas (28), por isso é extremamente difícil estabelecer todos os impactos dessas variantes (29).

Recentemente por meio de abordagens moleculares e ensaios *in vivo*, a via deste gene foi associada a via de sinalização da malha trabecular e via de desenvolvimento do CS (30). A interrupção da expressão do gene *TEK* interfere no desenvolvimento do CS, isso sugere que o receptor ANGPT-TEK seria um dos fatores influentes de forma indireta na regulação da PIO, e ainda de forma indireta cause o desenvolvimento do glaucoma, visto que a PIO é o principal fator de risco e não a causa da manifestação do glaucoma (31).

Em 50% dos casos onde há variações na redução de expressividade do *TEK*, são encontradas malformações teciduais no CS e redução do escoamento do humor aquoso, confirmando que a sua expressão está relacionada à um fator genético que envolva mais de um gene, incluindo outras vias (32).

- **Canal de Schlemm**

O CS, assim como a via da malha trabecular, são vias de escoamento fundamentais para o retorno do AHO a corrente sanguínea, porém o CS é a via não convencional revestida por um endotélio que se situa na região anterior do olho responsável por drenar 20% do AHO (25,33).

Um ensaio *in vivo* demonstrou que a deleção do *TEK*, ou de seus ligantes *ANGPT1* e *ANGPT2* leva a formação do CS hipomórfico, com a PIO elevada, evitando a letalidade, mas não impedindo de ocorrer a perda rápida dos gânglios retinianos e o desenvolvimento do glaucoma (25,29). Outro ensaio realizado com camundongos registrou que suas células compreendem propriedades sanguíneas e linfáticas, sendo produzidas nas primeiras semanas de vida, após o nascimento. Resultados semelhantes foram encontrados em um modelo animal utilizando Macacos *Cynomolgus*, onde pela deleção dos ligantes do TIE2, ou seja, *ANGPT1* e 2, durante o período gestacional, obteve-se um comprometimento da drenagem, ocasionando o glaucoma. Portanto, a via ANGPT-TEK é a essencial para a homeostase e drenagem normal de AHO em mamíferos, sendo responsável por emitir sinais para o gene *TEK* aumentar o fluxo de AHO e desenvolver o CS sem más conformações (33).

- **Associação genéticas e físicas do *TEK***

Como já esclarecido acima, a via ANGPT- TEK, detém de uma forte relação com o *TEK*, por haver 2 receptores específicos. O *ANGPT1* é caracterizado pelos artigos como

antagonista primário do *TEK*, por meio da ativação com o receptor *TEK* o estimulando a sua função pró-angiogênica, do *TEK* estabilizando a formação de novos vasos (29).

Estudos de caso investigando a relação do *TEK* com o GCP notaram uma correlação com outros genes, levando a potencialização das más conformações, aumento da penetrância e agravamento do glaucoma (27).

Modulações do gene *SVEP1* resultaram no aumento da penetrância de variantes *TEK* em indivíduos *pedigree*, mas limitou a sua sinalização dentro da via de desenvolvimento. O diferencial desta pesquisa entre as outras foi o uso da cultura de células endoteliais umbilicais humanas (HUVECs) para avaliar a expressão do *TEK* por meio da estimulação do *SVEP1*. Outros achados importantes foram variantes raras *missense* e *nonsense* do *TEK* em indivíduos assintomáticos de 8 famílias, sendo algumas dessas variantes ainda não registradas no gnomAD database, demonstrando um padrão de herança autossômica dominante (7), semelhante ao encontrado no GPAA-J (34).

Interessantemente, Gharahkhani e colaboradores (35) observaram através da análise de GWAS para GPAA que o gene *SVEP1* está associado a doença, sendo seu produto uma proteína da matriz extracelular ligada especificamente com a linfangiogênese em camundongos *knockout* que se relacionam com o desenvolvimento do CS e modulam os genes *TEK*, *FOXC2* e *ANGPT* (35).

Curiosamente, *ANGPT1* e 2, também tiveram *loci* ligados ao risco aumentado para GPAA dentro do mesmo GWAS onde o *SVEP1* foi citado em 2021 (34). Essas regiões são primordiais para o desenvolvimento correto do CS, portanto, influenciam e guiam a forma como o *TEK* é expresso (29,33,35).

Apesar do AHO ser drenado em sua maioria pela via convencional da MT, os fármacos disponíveis atuam na via não convencional, por esta razão as abordagens direcionadas ao CS, são fundamentais para redução da PIO e manutenção da homeostase (36).

A via CS forma um sistema análogo à relação das células endoteliais vasculares e células de suporte, portanto, defeitos no CS, levam a defeitos vasculares conhecidos na retinopatia diabética, doenças renais e câncer. A inibição da via *ANGPT-TEK* seria em alguns casos fatal, esse fenômeno pode ser visto quando há a baixa expressão de *TEK* em alguns embriões, devido a sua atividade angiogênica e estabilizadora de vasos pela ação dos receptores de VEGF, ocasionando a apoptose de células endoteliais em regiões hemorrágicas (36,37).

Por fim, a inter-relação *TEK-CYP1B1* nos ensaios *in vitro* decorre por meios físicos de contatos entre as proteínas dos respectivos genes. O gene *CYP1B1* age tentando garantir a homeostase da PIO, porém devido a falha de não conseguir imunoprecipitar o *TEK*, seu efeito é reduzido. Outro ponto relevante é que os controles positivos não apresentaram variantes heterozigotas de ambos os genes co-ocorrendo (26).

Contudo apesar do foco dos estudos envolvendo *TEK* ser apenas em um dos glaucomas de início precoce, algumas famílias de GCP avaliadas também apresentaram portadores de GPAA-J, inclusive houveram registros de variantes do *TEK* em GPAA-J (25), infelizmente nos outros estudos de famílias onde haviam parentes com o diagnóstico de GPAA-J, não foram investigados em relação às variantes encontradas e por não haver até o momento indícios de que o *TEK* possa ter envolvimento com a fisiopatologia do GPAA-J (27).

MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, foram utilizados os seguintes sites de busca: PubMed, Investigate ophtalmology e visual science (IOVS) na ARVO Journal, Google Acadêmico, Naticional Library of Medicine, Nature Communications, Scielo, Science Direct, Elsevier, Wiley Online Library, Springer Nature e *Connectedpapers*. A partir disso os artigos foram selecionados artigos do tipo “review articles” e “research articles”. Utilizando as seguintes palavras-chaves: JOAG (do inglês *Juvenile -Onset Open Angle Glaucoma*), *TEK*, glaucoma associations, *ANGPT1/2* e *TIE2*.

O site *Connectedpapers*, forneceu uma rede de artigos relacionados a pesquisa de Terri L. Young e colaboradores (27), utilizando o filtro ano, foram selecionados artigos de 2005 a 2022, como demonstrado na Figura 03. As palavras chave para a pesquisa foram: JOAG (do inglês *Juvenile -Onset Open Angle Glaucoma*), *TEK*, glaucoma associations, *ANGPT1/2* e *TIE2*.

A seleção dos artigos escolhidos para essa revisão se baseou em artigos publicados nos últimos 5 anos e de impacto sobre o tema, que demonstrassem associações diretas ou indiretas com o GPAA-J, ou seja, artigos que mesmo não tento o foco nos aspectos genéticos do *TEK* e GPAA-J, tinham resultados amostrais publicados. O impacto da revista não foi um fator determinante para esta revisão.

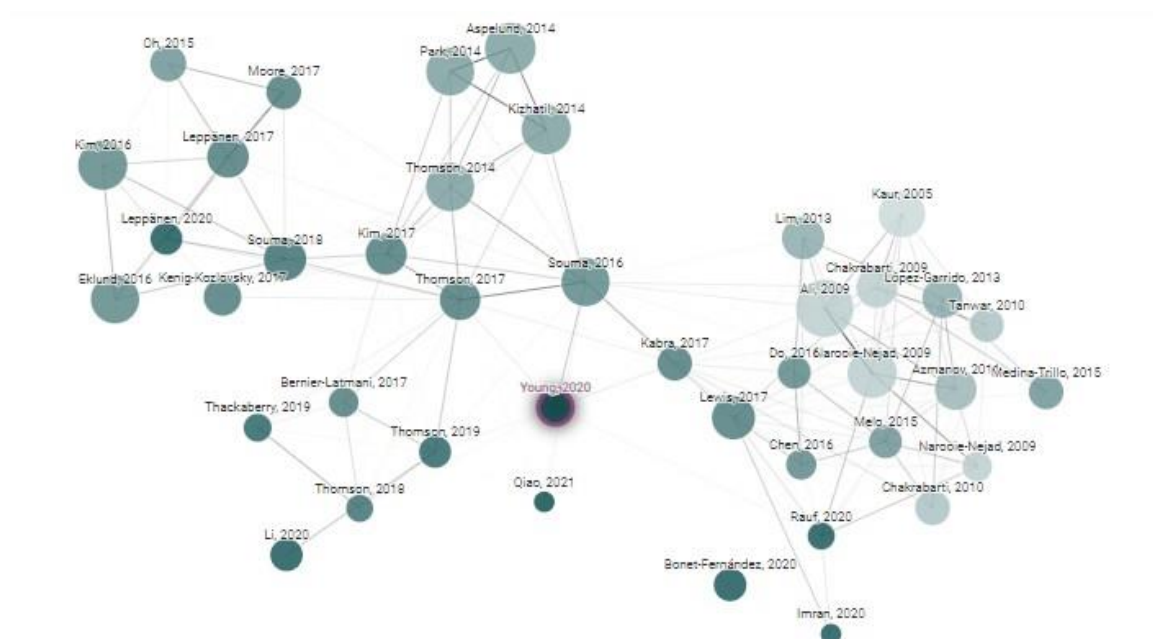


Figura 03: Mapa de artigos relacionados ao gene *TEK* e ao glaucoma de início precoce. Para a elaboração deste mapa o artigo central é o “*SVEP1 as a Genetic Modifier of TEK-Related Primary Congenital Glaucoma*”. Esse artigo contém resultados que mostram variantes do gene *TEK* em portadores de GCP, GPAA-J e GPAA adulto.

De acordo com o site <https://icite.od.nih.gov/analysis> os índices de citações envolvendo a via *ANGPT-TEK* com ensaios *in vivo* e *in vitro* tem aumentado nos últimos anos, demonstrando o interesse direto nesta via para futuras possibilidades de tratamentos

gênicos, compreensão da sua fisiopatologia e progressão do glaucoma, como pode ser observado na figura 04.

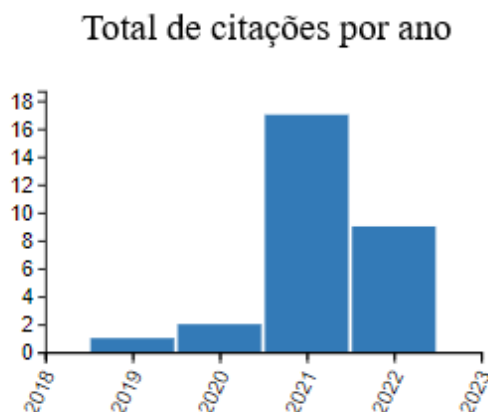


Figura 04: Índice de citações envolvendo o gene TEK e glaucoma. Podemos notar que os números relacionados a publicações envolvendo a via ANGPT-TEK ou somente o gene TEK vem aumentando gradativamente nos últimos anos, devido a esse gene estar associado a um papel fundamental no desenvolvimento do CS e angiogênese de vasos. O interesse por elucidar e determinar os efeitos de suas variantes e modulações podem ser a chave para novas terapias gênicas, capaz de tratar o glaucoma e não somente retardar a doença controlando a PIO, Adaptado de ICite (38).

CONCLUSÕES

O GCP tem sido relacionado a via ANGPT-TEK devido a mesma modular o desenvolvimento do CS (via não convencional) encarregada por drenar 20% do AHO e regular a elevação da PIO em pacientes com glaucoma. As deformidades no CS em portadores de GPC, são resultantes das alterações genéticas ocasionadas por variantes de deleção do gene *TEK*, ou por outras variantes que também modulam a expressão gênica do *TEK*, tornando sua expressão desregulada, que pode acarretar em defeitos na proteína.

Dentre os efeitos citados na literatura, há o aumento da PIO em portadores de glaucoma. Ensaios realizados em embriões foi observado a letalidade ocasionada pela presença de variantes com efeito de deleção registradas nos *loci* dos genes *ANGPT* e *TIE2* (25,29,33).

Estudos recentes têm demonstrado que as modulações do *TIE2* são guiadas pelo ligante *ANGPT1*, enquanto que o seu antagonista *ANGPT2* é guiado pelo *SVEP1* (27,29,33). Além disso, as variantes descritas acima foram encontradas tanto em portadores de GCP, como em indivíduos com GPAA-J. Recentemente modelos animais incluindo, camundongos, primatas e zebrafish são as grandes ferramentas para o conhecimento dessa via (39,40), relatando alterações que podem ser encontradas tanto em endofenótipos de GCP quanto para o GPAA-J (25,27,29,33,37).

Apesar de haver evidências que apontam o *TEK* como um novo candidato para estudos de ligação e GWAS o associando com o GPAA-J, e ao glaucoma de início na vida adulta, são necessários mais estudos funcionais para a compreender a caracterização e composição do PRS (39–41).

Recentemente, um novo estudo foi realizado nas coortes de NEIGHBOR e ANZRAG, onde não há associações significativas entre GPAA e as regiões genômicas do *TIE2*, porém essa avaliação pode ser variável em populações miscigenadas como a população brasileira. Assim, uma das próximas etapas para esclarecimento dos mecanismos da via ANGPT-TEK com o GPAA-J, é a validação de dados na população brasileira por meio de métodos como sequenciamento de exoma em famílias e GWAS, para que haja a inclusão desses dados em estudos de PRS brasileiro. Vale ressaltar, que devido a maioria das variantes terem sido caracterizadas nas populações caucasianas e asiáticas, é importante que seja elaborado pesquisas na população brasileira devido ao seu forte poder amostral e pioneirismo em estudos com populações miscigenadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, por me proporcionar a oportunidade de inserção no meio acadêmico por meio do *projeto 18/20628-8,21/03278-6*.

Agradeço também a instituição sede Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - CBMEG.

REFERÊNCIAS

1. Quigley HA. Open-angle glaucoma. *N Engl J Med*. 1993 Apr 15;328(15):1097-106. doi: 10.1056/NEJM199304153281507. PMID: 8455668.
2. Lewis CJ, Hedberg-Buenz A, DeLuca AP, Stone EM, Alward WLM, Fingert JH. Primary congenital and developmental glaucomas. *Hum Mol Genet*. 2017 Aug 1;26(R1):R28-R36. doi: 10.1093/hmg/ddx205. PMID: 28549150; PMCID: PMC5886473.
3. Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, Alward WL. Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med*. 2009 Mar 12;360(11):1113-24. doi: 10.1056/NEJMra0804630. PMID: 19279343; PMCID: PMC3700399.
4. Júnior HMM. Portaria SAS/MS n o 1.279, 19 de novembro de 2013, retificada em 23 de janeiro de 2014. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. 2013;1:81–109.
5. Micheal S, Saksens NTM, Hogewind BF, Khan MI, Hoyng CB, den Hollander AI. Identification of TP53BP2 as a Novel Candidate Gene for Primary Open Angle Glaucoma by Whole Exome Sequencing in a Large Multiplex Family. *Mol Neurobiol*. 2018 Feb;55(2):1387-1395. doi: 10.1007/s12035-017-0403-z. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28150229; PMCID: PMC5820370.
6. Lebrun-Julien F, Duplan L, Pernet V, Osswald I, Sapieha P, Bourgeois P, Dickson K, Bowie D, Barker PA, Di Polo A. Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell-autonomous mechanism. *J Neurosci*. 2009 Apr 29;29(17):5536-45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0831-09.2009. PMID: 19403821; PMCID: PMC6665839.
7. Johnson AT, Richards JE, Boehnke M, Stringham HM, Herman SB, Wong DJ, Lichter PR. Clinical phenotype of juvenile-onset primary open-angle glaucoma

- linked to chromosome 1q. *Ophthalmology*. 1996 May;103(5):808-14. doi: 10.1016/s0161-6420(96)30611-8. PMID: 8637692.
8. Wiggs JL, Pasquale LR. Genetics of glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2017 Aug 1;26(R1):R21-R27. doi: 10.1093/hmg/ddx184. PMID: 28505344; PMCID: PMC6074793.
 9. Menaa F, Braghini CA, Vasconcellos JP, Menaa B, Costa VP, Figueiredo ES, Melo MB. Keeping an eye on myocilin: a complex molecule associated with primary open-angle glaucoma susceptibility. *Molecules*. 2011 Jun 27;16(7):5402-21. doi: 10.3390/molecules16075402. PMID: 21709622; PMCID: PMC6264709.
 10. Occhiutto ML. Avaliação dos polimorfismos E2, E3 e E4 no gene APOE em relação à etiologia do Glaucoma Primário de Ângulo Aberto em uma amostra da população brasileira. Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP; 2021.
 11. Aboobakar IF, Wiggs JL. The genetics of glaucoma: Disease associations, personalised risk assessment and therapeutic opportunities-A review. *Clin Exp Ophthalmol*. 2022 Mar;50(2):143-162. doi: 10.1111/ceo.14035. Epub 2022 Jan 17. PMID: 35037362; PMCID: PMC9185665.
 12. Hollitt GL, Siggs OM, Ridge B, Keane MC, Mackey DA, MacGregor S, Hewitt AW, Craig JE, Souzeau E. Attitudes Towards Polygenic Risk Testing in Individuals with Glaucoma. *Ophthalmol Glaucoma*. 2022 Jul-Aug;5(4):436-446. doi: 10.1016/j.ogla.2021.11.002. Epub 2021 Nov 11. PMID: 34774858.
 13. Bonnemaier PWM, Iglesias AI, Nadkarni GN, Sanywa AJ, Hassan HG, Cook C; GIGA Study Group, Simcoe M, Taylor KD, Schurmann C, Belbin GM, Kenny EE, Bottinger EP, van de Laar S, Williams SEI, Akafo SK, Ashaye AO, Zangwill LM, Girkin CA, Ng MCY, Rotter JJ, Weinreb RN, Li Z, Allingham RR; Eyes of Africa Genetics Consortium, Nag A, Hysi PG, Meester-Smoor MA, Wiggs JL; NEIGHBORHOOD Consortium, Hauser MA, Hammond CJ, Lemij HG, Loos RJJ, van Duijn CM, Thiadens AAHJ, Klaver CCW. Genome-wide association study of primary open-angle glaucoma in continental and admixed African populations. *Hum Genet*. 2018 Oct;137(10):847-862. doi: 10.1007/s00439-018-1943-7. Epub 2018 Oct 13. PMID: 30317457; PMCID: PMC6754628.
 14. Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res*. 2006 Mar;612(2):105-14. doi: 10.1016/j.mrrev.2005.11.001. Epub 2006 Jan 18. PMID: 16413223.
 15. Wu J, Hewitt AW, Green CM, Ring MA, McCartney PJ, Craig JE, Mackey DA. Disease severity of familial glaucoma compared with sporadic glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2006 Jul;124(7):950-4. doi: 10.1001/archophth.124.7.950. PMID: 16832017.
 16. Wolfs RC, Klaver CC, Ramrattan RS, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT. Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol*. 1998 Dec;116(12):1640-5. doi: 10.1001/archophth.116.12.1640. PMID: 9869795.
 17. Collantes ERA, Delfin MS, Fan B, Torregosa JMR, Siguan-Bell C, Florcruz NVG, Martinez JMD, Masna-Hidalgo BJ, Guzman VPT, Anotado-Flores JF, Levina FD, Hernandez SRC, Collantes AA, Sibulo MC, Rong S, Wiggs JL. EFEMP1 rare variants cause familial juvenile-onset open-angle glaucoma. *Hum*

- Mutat. 2022 Feb;43(2):240-252. doi: 10.1002/humu.24320. Epub 2021 Dec 28. Erratum in: Hum Mutat. 2022 May 1;; PMID: 34923728; PMCID: PMC8972201.
18. Selvan H, Gupta S, Wiggs JL, Gupta V. Juvenile-onset Open-angle Glaucoma – A Clinical and Genetic Update. Surv Ophthalmol [Internet]. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2021.09.001>
 19. Stone EM, Aldave AJ, Drack AV, Maccumber MW, Sheffield VC, Traboulsi E, Weleber RG. Recommendations for genetic testing of inherited eye diseases: report of the American Academy of Ophthalmology task force on genetic testing. Ophthalmology. 2012 Nov;119(11):2408-10. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.05.047. Epub 2012 Sep 1. PMID: 22944025.
 20. Weinreb RN, Leung CK, Crowston JG, Medeiros FA, Friedman DS, Wiggs JL, Martin KR. Primary open-angle glaucoma. Nat Rev Dis Primers. 2016 Sep 22;2:16067. doi: 10.1038/nrdp.2016.67. PMID: 27654570.4. Júnior HMM. Portaria SAS/MS nº 1.279, 19 de novembro de 2013, retificada em 23 de janeiro de 2014.. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. 2013;1:81–109.
 21. Iglesias AI, Springelkamp H, Ramdas WD, Klaver CC, Willemsen R, van Duijn CM. Genes, pathways, and animal models in primary open-angle glaucoma. Eye (Lond). 2015 Oct;29(10):1285-98. doi: 10.1038/eye.2015.160. Epub 2015 Aug 28. PMID: 26315706; PMCID: PMC4815694.
 22. Svidnicki PV. Análise de aspectos genéticos do Glaucoma Primário de Ângulo Aberto Juvenil. Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP; 2018.verificar
 23. Choquet H, Wiggs JL, Khawaja AP. Clinical implications of recent advances in primary open-angle glaucoma genetics. Eye (Lond). 2020 Jan;34(1):29-39. doi: 10.1038/s41433-019-0632-7. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31645673; PMCID: PMC7002426.
 24. Choi SW, Mak TS, O'Reilly PF. Tutorial: a guide to performing polygenic risk score analyses. Nat Protoc. 2020 Sep;15(9):2759-2772. doi: 10.1038/s41596-020-0353-1. Epub 2020 Jul 24. PMID: 32709988; PMCID: PMC7612115.
 25. Souma T, Thompson SW, Thomson BR, Siggs OM, Kizhatil K, Yamaguchi S, Feng L, Limvipuvadh V, Whisenhunt KN, Maurer-Stroh S, Yanovitch TL, Kalaydjieva L, Azmanov DN, Finzi S, Mauri L, Javadiyan S, Souzeau E, Zhou T, Hewitt AW, Kloss B, Burdon KP, Mackey DA, Allen KF, Ruddell JB, Lim SH, Rozen S, Tran-Viet KN, Liu X, John S, Wiggs JL, Pasutto F, Craig JE, Jin J, Quaggin SE, Young TL. Angiopoietin receptor TEK mutations underlie primary congenital glaucoma with variable expressivity. J Clin Invest. 2016 Jul 1;126(7):2575-87. doi: 10.1172/JCI85830. Epub 2016 Jun 6. PMID: 27270174; PMCID: PMC4922711.
 26. Kabra M, Zhang W, Rathi S, Mandal AK, Senthil S, Pyatla G, Ramappa M, Banerjee S, Shekhar K, Marmamula S, Mettla AL, Kaur I, Khanna RC, Khanna H, Chakrabarti S. Angiopoietin receptor TEK interacts with CYP1B1 in primary congenital glaucoma. Hum Genet. 2017 Aug;136(8):941-949. doi: 10.1007/s00439-017-1823-6. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28620713; PMCID: PMC5953556.
 27. Young TL, Whisenhunt KN, Jin J, LaMartina SM, Martin SM, Souma T, Limvipuvadh V, Suri F, Souzeau E, Zhang X, Dan Y, Anagnos E, Carmona S, Jody NM, Stangel N, Higuchi EC, Huang SJ, Siggs OM, Simões MJ, Lawson BM,

- Martin JS, Elahi E, Narooie-Nejad M, Motlagh BF, Quaggin SE, Potter HD, Silva ED, Craig JE, Egas C, Maroofian R, Maurer-Stroh S, Bradfield YS, Thompson SW. SVEP1 as a Genetic Modifier of TEK-Related Primary Congenital Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020 Oct 1;61(12):6. doi: 10.1167/iovs.61.12.6. PMID: 33027505; PMCID: PMC7545080.
28. Database TG human gene. TEK Gene - TEK Receptor Tyrosine Kinase [Internet]. 2022. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TEK>
 29. Thomson BR, Quaggin SE. Morphological Analysis of Schlemm's Canal in Mice. *Methods Mol Biol*. 2018;1846:153-160. doi: 10.1007/978-1-4939-8712-2_10. PMID: 30242758; PMCID: PMC6499067.
 30. Leysen L, Cassiman C, Vermeer S, Casteels I, Balikova I. Genetics in primary congenital glaucoma: Implications in disease management and counseling. *Eur J Med Genet*. 2022 Jan;65(1):104378. doi: 10.1016/j.ejmg.2021.104378. Epub 2021 Nov 5. PMID: 34748994.
 31. Khawaja AP, Cooke Bailey JN, Wareham NJ, Scott RA, Simcoe M, Igo RP Jr, Song YE, Wojciechowski R, Cheng CY, Khaw PT, Pasquale LR, Haines JL, Foster PJ, Wiggs JL, Hammond CJ, Hysi PG; UK Biobank Eye and Vision Consortium; NEIGHBORHOOD Consortium. Genome-wide analyses identify 68 new loci associated with intraocular pressure and improve risk prediction for primary open-angle glaucoma. *Nat Genet*. 2018 Jun;50(6):778-782. doi: 10.1038/s41588-018-0126-8. Epub 2018 May 21. PMID: 29785010; PMCID: PMC5985943.
 32. Wang HW, Sun P, Chen Y, Jiang LP, Wu HP, Zhang W, Gao F. Research progress on human genes involved in the pathogenesis of glaucoma (Review). *Mol Med Rep*. 2018 Jul;18(1):656-674. doi: 10.3892/mmr.2018.9071. Epub 2018 May 23. PMID: 29845210; PMCID: PMC6059695.
 33. Thackaberry EA, Zhou Y, Zuch de Zafra CL, Fuh G, Lee CV, Sanowar S, Ridgway JB, Kusi AM, Farman C, Booler H, Sheinson D, Rasmussen CA, Miller PE, Wakshull E, Yan M, Bantseev V. Rapid Development of Glaucoma Via ITV Nonselective ANGPT 1/2 Antibody: A Potential Role for ANGPT/TIE2 Signaling in Primate Aqueous Humor Outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019 Oct 1;60(13):4097-4108. doi: 10.1167/iovs.18-26349. PMID: 31574535.
 34. Wiggs JL, Haines JL, Paglinauan C, Fine A, Sporn C, Lou D. Genetic linkage of autosomal dominant juvenile glaucoma to 1q21-q31 in three affected pedigrees. *Genomics*. 1994 May 15;21(2):299-303. doi: 10.1006/geno.1994.1269. PMID: 8088822.
 35. Gharahkhani P, Jorgenson E, Hysi P, Khawaja AP, Pendergrass S, Han X, Ong JS, Hewitt AW, Segrè AV, Rouhana JM, Hamel AR, Igo RP Jr, Choquet H, Qassim A, Josyula NS, Cooke Bailey JN, Bonnemaier PWM, Iglesias A, Siggs OM, Young TL, Vitart V, Thiadens AAHJ, Karjalainen J, Uebe S, Melles RB, Nair KS, Luben R, Simcoe M, Amersinghe N, Cree AJ, Hohn R, Poplawski A, Chen LJ, Rong SS, Aung T, Vithana EN; NEIGHBORHOOD consortium; ANZRAG consortium; Biobank Japan project; FinnGen study; UK Biobank Eye and Vision Consortium; GIGA study group; 23 and Me Research Team, Tamiya G, Shiga Y, Yamamoto M, Nakazawa T, Currant H, Birney E, Wang X, Auton A, Lupton MK, Martin NG, Ashaye A, Olawoye O, Williams SE, Akafo S, Ramsay

- M, Hashimoto K, Kamatani Y, Akiyama M, Momozawa Y, Foster PJ, Khaw PT, Morgan JE, Strouthidis NG, Kraft P, Kang JH, Pang CP, Pasutto F, Mitchell P, Lotery AJ, Palotie A, van Duijn C, Haines JL, Hammond C, Pasquale LR, Klaver CCW, Hauser M, Khor CC, Mackey DA, Kubo M, Cheng CY, Craig JE, MacGregor S, Wiggs JL. Genome-wide meta-analysis identifies 127 open-angle glaucoma loci with consistent effect across ancestries. *Nat Commun*. 2021 Feb 24;12(1):1258. doi: 10.1038/s41467-020-20851-4. PMID: 33627673; PMCID: PMC7904932.
36. Thomson, B.R., Liu, P., Onay, T. *et al*. Cellular crosstalk regulates the aqueous humor outflow pathway and provides new targets for glaucoma therapies. *Nat Commun* **12**, 6072 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26346-010>.
 37. Jones N, Voskas D, Master Z, Sarao R, Jones J, Dumont DJ. Rescue of the early vascular defects in Tek/Tie2 null mice reveals an essential survival function. *EMBO Rep*. 2001 May;2(5):438-45. doi: 10.1093/embo-reports/kve093. PMID: 11375937; PMCID: PMC1083887.
 38. ICite NI of HO of PA (NIH)-. Results for TEK, poag [Internet]. Available from: <https://icite.od.nih.gov/analysis>
 39. Shi Song Rong, Anna Larson JLW. A zebrafish model system for studying the ANGPT/TIE2 pathway and glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2022;
 40. Alejandra Bosco, Cesar O Romero, Joon Schwakopf, Oleg Yarishkin, J Cameron Millar, Michael Steele, David Krizaj MLV. Schlemm canal-targeted Tie2 knockdown (SC-Tie2 KD) as mouse model of adult-onset human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2022;
 41. Jessica Cooke Bailey, Puya Gharakhani, Stuart W Tompson, Tomokazu Souma, Owen Siggs, Terri L Young, Angelo P Tanna, Louis R Pasquale, Susan E Quaggin, Stuart MacGregor, Jamie E Craig, Jonathan L Haines JLW. Association of ANGPT1 with Primary Open Angle Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2022;

DOI: 10.53934/9786585062046-22

Capítulo 22

APLICABILIDADES DA TECNOLOGIA CRISPR NO DIAGNÓSTICO E TERAPIA DO CÂNCER: REVISÃO DE LITERATURA

Gabriele da Silva F. Cavalcante^{}*; Cecília Rodrigues M. de Oliveira^{}; Daísa
Adriana da Silva^{}; Júlia Martins S. de Souza^{}; Leonino José da C.
Albuquerque^{}; Robson de Azevedo A. Filho^{}; Fabiana América S. D. de Souza^{}

**Autor correspondente (Corresponding author) - Email:*
faabiana.americasouza@gmail.com

Resumo: O câncer é conhecido não apenas por múltiplas alterações genéticas, mas também epigenéticas que conduzem a propagação de células malignas e químioreistentes. Dentre as ferramentas de edição gênica, uma das mais estudadas e cobiçadas é a CRISPR. Sua flexibilidade e a facilidade de uso permitiram a pronta realização de praticamente qualquer alteração gênica com maior eficiência e menor custo do que as modalidades anteriores no estudo do câncer. Por essa razão, esta revisão de literatura visou destacar a utilização da tecnologia CRISPR no diagnóstico e terapia do câncer. Vários estudos utilizaram a técnica CRISPR para editar DNA genômico de células cancerígenas *ex vivo* e *in vivo*, e mostraram potencial para ampliação dos protocolos anticâncer. Além disso, o CRISPR pode ser usado para corrigir mutações oncogênicas, descobrir drogas anticancerígenas e projetar células imunes e vírus oncolíticos para tratamento imunoterápico do câncer. A otimização do desempenho do sistema CRISPR deve impulsionar sua aplicação na medicina de precisão. E, os conhecimentos já existentes tem imenso potencial de uso para terapia personalizada do câncer.

Palavras-chave: Câncer; CRISPR; diagnóstico; terapia gênica

INTRODUÇÃO

Os diversos sistemas CRISPR/Cas9 (Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas Regularmente Interespaçadas/Sistema de Nucleases de Associação), são adaptações genéticas, utilizadas por Bactérias e Arqueas, que capturam material genético dos bacteriófagos e adicionam ao seu próprio genoma para a familiarização com esses vírus, em caso de haver um segundo contato (1, 2). No geral, essa imunidade bacteriana adquirida, utiliza alguns tipos de RNA, como o CRISPR RNA (crRNA), o trans-ativador

de RNA (tracrRNA) e RNA guia (gRNA) para ativar e guiar o sistema de proteínas Cas9, ligando-as com o DNA do invasor, possibilitando a clivagem das sequências do DNA viral (3).

Nessa perspectiva, a associação dessas formas de RNA é essencial para a formação de um guia duplo, eficaz no reconhecimento do alvo (3). E, com a evolução das pesquisas de edição genômica, a utilização do sistema CRISPR/Cas9 vem sendo extremamente significativa dentro dos ramos da biotecnologia, das produções de ferramentas para a edição do genoma e, principalmente, para os testes laboratoriais da terapia de câncer. A utilização desse sistema inclui diversas vantagens, como a rápida operação, design simples e baixo custo, sendo aplicável a quase todos os genomas (4).

A descoberta do sistema CRISPR e sua utilização para edição genética na terapia do câncer, fornece triagem personalizada para os diferentes aspectos genéticos das neoplasias, e possibilita o direcionamento na criação de terapias gênicas (2). A espécie comumente utilizada nos estudos direcionados ao diagnóstico e combate ao câncer, é a bactéria *Streptococcus pyogenes*, pois o seu CRISPR demonstra alta eficácia no processo de identificação e quebra do DNA a partir da proteína associada Cas, utilizando o RNA para reconhecer e atingir a região alvo, no caso, alcançar os genes causadores ou que estão relacionados a diferentes tipos de processos cancerígenos (4, 5).

A capacidade de quebrar fitas altamente específicas nas regiões alvo do DNA da endonuclease presente no CRISPR/Cas9, facilita a produção de reagentes *knockout*, tornando as edições genéticas baseadas na tecnologia CRISPR mais viável que as demais (6). Com essa técnica, várias alterações no tecido cancerígeno podem ser eliminadas de forma eficiente, além de genes supressores de tumores que estão inativados em decorrência do câncer podem ser tratados com este sistema (7).

Porém, ainda há muitas dificuldades encontradas acerca dessa ferramenta, como as diversas redes regulatórias que controlam as atividades celulares de neoplasias, tornam a identificação de um alvo genético singular um desafio para a eficácia da terapia com CRISPR/Cas9 (8). A problemática dos mecanismos transportadores dos genes em percorrer até o gene alvo e a indefinição deste através da longa sequência de nucleotídeos faz-se necessária a ampliação de estudos e pesquisas desenvolvidas para superar esses desafios, o que motiva o objetivo deste trabalho, que buscou revisar na literatura trabalhos direcionados ao estudo de edição genética através do sistema CRISPR/Cas9 para diagnóstico e terapia do câncer (9).

DIAGNÓSTICO DE CÂNCER ORIENTADO POR CRISPR

O diagnóstico do câncer pode ser desenvolvido a partir do aproveitamento do CRISPR que, após a digestão enzimática, pode identificar as alterações sequenciais características das células cancerígenas, a identificação pode ser feita por meio de

microssatélites comuns. Também se destaca a capacidade de diferentes desenhos de aminoácidos para reconhecimento de possíveis mutações genéticas e o uso de sistemas como o SHERLOCK e DETECTR utilizando o CRISPR/Cas9 para diagnóstico prévio de alterações genéticas derivadas do câncer, fazendo uso de diferentes tipos de proteínas associadas, como, por exemplo, Cas13a (9).

Um dos estudos recentes com CRISPR, tem como intenção detectar mutações de p53 em tumores ovarianos, além de detectar ácidos nucleicos com o auxílio do Cas12. Essa junção com um repórter enzimático e um repórter trans, têm sido usados para identificar anomalias em amostras de vários pacientes. E, ainda, é possível que a mesma ideia seja utilizada para detectar infecções por SARS-CoV-2. É seguro afirmar que em alguns anos o CRISPR possa se tornar um sistema personalizado para o monitoramento e detecção do câncer (10).

CRISPR/ CAS9 E MEDICINA PERSONALIZADA NA TERAPIA DIRECIONADA AO CÂNCER

A medicina personalizada tem uma abordagem individualizada no que diz respeito a dados clínicos, genéticos e ambientais. Cada caso tem sua particularidade, por isso requer protocolos terapêuticos distintos (11). Em geral, pacientes com câncer do mesmo tipo respondem de maneiras diferentes ao processo terapêutico, separam-se por apresentarem quadros genéticas e epigenéticas diferentes, gerando exposições de transcriptoma - o conjunto completo de RNAs, proteoma - aglomerado de proteínas - e metaboloma, que é conjunto dos metabólitos em uma célula (2).

Alguns outros estudos apontam que os tumores primários e metastáticos devem ser tratados diferentemente, pois, se não houver alteração do panorama de mutação ou na variação do número de cópias dos oncogenes condutores, os clones celulares continuarão evoluindo cada vez mais resistentes, assim, mitigando a eficácia da terapia (12). O êxito no desenvolvimento dos gRNA (RNA guia) fez das descobertas com uso do CRISPR/Cas as respostas aos questionamentos acerca da funcionalidade de determinado gene no câncer, e estes testes são melhores quando realizados *in vivo* ou *ex vivo* em camundongos de laboratório (10). Na tabela 1 observa-se aplicações do CRISPR/Cas9 para o tratamento de alguns cânceres.

CRISPR PARA MODELAGEM DE PESQUISA DE TUMORES

Para que seja possível um combate eficaz em tumores, é necessário entender os processos que os impulsionam. Porém, uma das principais dificuldades está nas múltiplas mutações genéticas que originam tais tumores, visto que, são de uma complexidade elevada, sendo um obstáculo na criação dos modelos completos de câncer (4). Contudo, ao utilizar o CRISPR/Cas9, é possível modelar rapidamente esses tumores animais para

a identificação precoce das alterações gênicas, assim, conseguindo silenciar ou ativar algum gene sintetizador de proteínas ligadas ao tumor (3).

Tabela 1. Algumas aplicações utilizando CRISPR/Cas9 no tratamento do câncer

Câncer	Gene alvo	Linhagem celular/animal	Método de Entrega	Resultado	Referência
Carcinoma hepatocelular	<i>LIN28B-AS1</i>	Linhagem celular HepG2 de ratos	Lipofectamina 2000	Atenuação do crescimento do tumor	(13)
Câncer colorretal	<i>MUC5AC</i>	Linhagens celulares HCT-8 e LS174T Camundongos	Lipofectamina 2000	Redução da tumorigênese e quimiorresistência ao direcionar a sinalização de CD44/ β -catenina/p53/p21	(14)
Câncer colorretal	<i>LSD1</i>	Linhas celulares T29, SW480, HCT116, LoVo e RKO	Lentivírus	Inibição de transição epitelial-mesenquimal e migração mediada por Akt	(15)
Câncer de mama	Osteopontina	Linhagem celular MDA-MB-231	Lentivírus	Provocando radiosensibilidade significativa	(16)
Vários cânceres	<i>FOs</i>	Linhagens celulares A673, RD-ES e U2OS de ratos	Lentivírus	Reduzindo a carga/mortalidade do tumor	(17)
Câncer de próstata	<i>BRCA2</i>	Linhagens celulares LNCaP, DU145, 22RV1 e TRAMP-C2 de Camundongos	Lentivírus	Efeitos antiproliferativos	(18)
Câncer de próstata	<i>Akt1/2</i>	Linhagem celular CWR22Rv1 De Ratos	Plasmídeo (px300)	Metástase suprimida	(19)

Outros fatores importantes para modelagem e o uso do CRISPR estão na identificação de genes envolvidos na resistência terapêutica, podendo ser uma forte estratégia na composição de medicamentos mais eficazes. Essa estratégia permite uma maior rapidez nas pesquisas direcionadas ao tumor e a criação de modelos *in vitro* em linhagens de mamíferos, geralmente, camundongos, com deleção de um ou vários genes. Além disso, o CRISPR é aplicado para ativar ou desativar alelos funcionais para desenvolver resistência às drogas *in vitro*, isto permite avaliar rapidamente genes candidatos ou mutações específicas associadas à resistência medicamentosa (21).

OTIMIZAÇÃO DA EDIÇÃO DE GENES PARA TERAPIA DO CÂNCER

A terapia por edição genética busca sempre garantir maior eficiência e rapidez nos resultados, mas a carga de mutações do câncer é de difícil compreensão. Sendo assim, uma nova estratégia vem sendo descrita por pesquisadores, utilizando camundongos para simular o desenvolvimento de vários tipos de cânceres e incorporando mutações específicas de pacientes. Essa técnica permite um estudo específico e personalizado, mesmo em cânceres raros, possibilitando o surgimento de hipóteses acerca de novos alvos terapêuticos que direcionam a utilização do CRISPR/Cas9. A maioria desses trabalhos relacionados a edição genética ocorrem *in vitro*, contudo há também o desenvolvimento de outros ensaios clínicos (6).

Nesse contexto, apesar de ser uma tecnologia que está em constante evolução, a fim de melhorar a eficiência e precisão da sua aplicabilidade, fatores como a ineficácia na entrega da terapia CRISPR/Cas9 pode acometer dificuldades no processo da edição de genes. A utilização de camundongos imunocompetentes nas pesquisas é animadora, visto que é possível observar a interação entre o tumor e o sistema imune. E, essas novas descobertas podem ter implicações vantajosas, já que, com o CRISPR pode-se realizar marcações no DNA, mapeamento genético, regulação da expressão de genes, entre outros (22).

CRISPR E IMUNOTERAPIA TUMORAL

Uma estratégia adotada pela célula cancerosa e um dos principais mecanismos para sobreviver e se adaptar no microambiente tumoral, enquanto o sistema imunológico não a reconhece, é denominada de escape imune tumoral. Essa estratégia, possibilita que o câncer controle as células do sistema imune através de múltiplas vias, isso faz com que favoreçam o desenvolvimento da neoplasia e a metástase, ocorrendo assim a progressão

de células tumorais. Nesse sentido, a imunoterapia é vista como uma grande estratégia para direcionar as células cancerígenas no tratamento contra o câncer (23).

Para Kick et. al. (24) as células T no sistema imunológico humano desempenham um importante papel na proteção e defesa do organismo, combatendo infecções patogênicas e eliminação de células com mutações, através de um modelo de reconhecimento específico realizado pelo meio dos receptores de células T (TCRs). A imunoterapia se baseia na estratégia de reconhecimento dos TCRs para aumentar a eficácia antitumoral das células e assim originar células T geneticamente modificadas e equipadas com receptores de antígenos (3).

No entanto, o principal entrave nessa estratégia é a eficácia limitada das células T que foram alteradas geneticamente no tratamento de tumores sólidos. Diante disso, uma nova maneira de aumentar a eficácia de células T para o tratamento clínico de diferentes tipos de câncer se dá através do sistema CRISPR. Atualmente, o CRISPR tem sido utilizado em vários ensaios clínicos de imunoterapia em andamento, no entanto ainda há diversos desafios quanto à segurança e eficácia no uso para aplicações clínicas (24). Alguns ensaios são demonstrados na tabela 2.

CRISPR NO GENOMA OU SUBGENOMA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS DE DROGAS PERSONALIZADAS

O CRISPR apresenta uma triagem em todo o genoma ou subgenoma com alto rendimento para validar a contribuição de milhares de elementos genéticos, sendo eles o próprio gene, miRNA, gene codificador de proteínas e outras substâncias. O DNA contém um sistema de reparo que é ativado automaticamente a fim de corrigir a clivagem das partículas, mas vale ressaltar que nesse ajuste pode decorrer a retirada ou inativação de um gene do genoma de forma precisa. É essa capacidade que permite elementos genéticos direcionados em um genoma, o que se denomina por tela ampla do genoma (28, 2).

Diante disso, as telas CRISPR são aplicadas para o rastreamento de reguladores com dependências genéticas ou comunicações gênicas letais sintéticas, possibilitando que os pesquisadores descubram novas técnicas genéticas para fenótipos celulares. Então, ao aplicar as técnicas de maneira personalizada em várias linhagens celulares, em modelos *in vitro* ou transplantes *in vivo*, pode-se identificar genes essenciais nas células tumorais evidenciando potenciais alvos para terapias anticâncer com alvos de drogas específicas (29, 30).

Tabela 2. Alguns ensaios clínicos em andamento usando tecnologias CRISPR para projetar imunoterapias para o tratamento de cânceres humanos com alvos nas células imunológicas.

Identificador de ensaio clínico	Estágio	Tipo de célula	Alvo e método	Referência
NCT04037566	I	Células T RAQ direcionadas a CD19 autólogas	PHQ1 endógeno editado	(25)
NCT04417764	I	linfócitos infiltrantes de tumor Autólogo	Nocaut da PD1	(26)
NCT03545815	I	Células T RAQ direcionadas à mesotelina alogênica	PD1 e Nocaut do RCT	(26)
NCT04426669	I/II	Células T RAQ direcionadas a CD19 autólogas	CISH Nocaut	(26)
NCT04767308	Fase inicial I	Células T RAQ direcionadas a CD5 alogênicas	Nocaut CD5 Endógeno	(27)
NCT04502446	I	Células T RAQ direcionadas a CD70 alogênicas	RAQ Inserido, RCT endógenos e Nocaut do CPHC-I	(27)

RAQ = Receptor de Antígeno Quimérico; PD1 = Proteína de Morte Celular Programada 1; RCT = Receptor de Células T; SHIC = Proteína Contendo SH2 Induzível por Citocina; CPHC-I = Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I; PHQ1 = Progenitora Hematopoiética Quinase 1

MODIFICAÇÃO CRISPR/CAS9 DE CÉLULAS NÃO CANCEROSAS DIRECIONADAS PARA TRATAR O CÂNCER

Apesar de existir uma infinidade de opções para atingir células cancerosas pela técnica de CRISPR/Cas9, ainda existem obstáculos, como a heterogeneidade do tecido canceroso, que dificultam a edição genética seletiva para o câncer. Por conseguinte, o gene escolhido como alvo da terapia pode não estar presente em todas as células da neoplasia e a edição ocorre apenas nas que possuem esse gene, enquanto as demais resistem e se multiplicam livres e vantajosamente, ocupando a lacuna deixada pelas que sucumbiram ao tratamento (12, 5).

Uma alternativa para superar esse impasse é a modificação de células estromais que rodeiam as neoplasias, já que, essas células são mais estáveis geneticamente e sua função é auxiliar na proteção e nutrição de células próximas. Esse mecanismo, apesar de ser essencial em pacientes saudáveis, acaba dando suporte ao desenvolvimento cancerígeno em pacientes afetados. A inibição, no tecido saudável, da via metabólica que possibilita essa troca nutricional pode causar morte na célula cancerosa (31).

TERAPIAS BASEADAS EM CRISPR *EX VIVO*

Em testes *ex vivo*, a transdução do genoma é inoculada em camundongos receptores, através de enxertos e, assim, identificados os controles de metástase. Este processo é realizado de duas formas, a primeira é o direcionamento da quebra da fita dupla de DNA, seguido do aumento e direcionamento de genes para iniciar a reparação homóloga precisa - HDR. O outro método utiliza as enzimas dos *Cas* para modificar diretamente o DNA. Alguns pesquisadores desenvolveram um estudo que provam o quão bem pode ser utilizado para atingir vários reguladores, outros estudiosos, por sua vez, usavam a estratégia baseada em telas para marcar os alvos na superfície celular de dezenas de anticorpos, esse tipo de abordagem faz uma simplificação na hora de validar essas novas terapias (10).

Com os recentes experimentos biotecnológicos, são realizadas as interrupções de proteínas influenciadoras de morte celular (PD1) através da técnica de CRISPR/Cas9 ao guiar o metabolismo das células T (linfócitos) a impedir o avanço tumoral (32). Em 2020, Stadtmauer et al., realizaram os primeiros passos de uso de CRISPR em humanos, introduzindo em 3 pacientes com cânceres em estágios avançados, com células T modificadas *ex vivo*, esse CRISPR foi ligado a Cas9 e levaram a carga necessária para a resistência e combate ao tumor. Desse modo, garantiu-se a permanência e eficácia prolongada das células T programadas para melhorar o processo imunoterápicos dos pacientes (33).

POTENCIAL PRÉ-CLÍNICO DE TERAPIAS CRISPR *IN VIVO*

O processo pré-clínico é um meio rápido e econômico para o desenvolvimento da triagem de evolução das vulnerabilidades de células cancerígenas. Durante o processo, são desenvolvidos tecidos contextuais para que as células consigam interagir entre si, para introduzir diretamente o CRISPR é preciso superar vários empecilhos. As técnicas CRISPR na prática clínica estão entregando sucessos em tratamentos e como uma alternativa para casos em que intervenções cirúrgicas e farmacêuticas não são eficientes. Devido às dificuldades das aplicações do sistema CRISPR/Cas, iniciou-se o desenvolvimento de um novo sistema denominado Casmini que foi projetado a partir do sistema VF tipo 2 (CRISPR-Cas12f) e evoluiu através do RNA guia e das engenharias de proteínas (34).

Nessa perspectiva, esse novo sistema tem atividade equivalente a Cas12a, embora não tenha a mesma capacidade de realizar algumas práticas, como as modificações genéticas em células de mamíferos. No entanto, as proteínas efetoras Cas, caracterizam-se menores que o limite de subordinação de VAA (vírus Adeno-Associado) e essa limitação acaba refletindo na entrega do *in vivo* (35). Além disso, existem alguns exemplos específicos dessa terapia, envolvendo tratamento sobre a fusão de genes oncogênicos, e reforçando a seletividade das células tumorais devido à fusão, ou seja, após a fusão a célula recupera a capacidade de desenvolver sua função, assim, parando de se multiplicar promovendo a ruptura da lesão genética que impele o tumor (10).

As conhecidas telas CRISPR *in vivo* são executadas com as bibliotecas de RNAs guia junto ao código de barras para identificar escopo terapêutico personalizado que apresente maior poder estatístico. Também há um sistema específico para a entrega de técnicas *in vitro* que é a MiniCAFE, porém este sofre influência da VAA com base nos modelos *in vivo*. Desta forma, essa terapia gênica assim como qualquer outra descoberta requer estudos pré-clínicos objetivos (36).

LIMITAÇÕES NA TERAPIA MEDIADA POR CRISPR/CAS9

O CRISPR tem um grande potencial no direcionamento de genes, porém há algumas dificuldades, a exemplo da limitação no efeito fora do alvo (OTEs) que atrapalha o uso amplo em terapias gênicas. Muitas possibilidades ainda estão sendo exploradas, porém, a segurança clínica e a eficácia de tais sistemas ainda precisam ser minuciosamente estudadas e identificadas (37). Assim, o refinamento com efeitos mínimos de alvo e em um tamanho que permita sua embalagem para os veículos de entrega amplamente utilizados são algumas das principais áreas de impulso a serem abordadas num futuro próximo. Essas otimizações aproximam o CRISPR das clínicas de oncopatologias (38).

Apesar dos estudos promissores, ainda há algumas limitações ao se trabalhar com o CRISPR/Cas9, entre elas é possível citar a condução da Cromotripsia, mutação genética

danificadora estrutural do núcleo de cromossomos que causam doenças congênitas humanas e câncer, a perda e a seleção de genes supressores tumorais como o p53, o comprometimento da função celular normal, ou ainda, um dano ao DNA que pode levar a apoptose, ou mesmo além da cura o desencadeamento do câncer. Porém, mesmo levantando algumas suspeitas sobre a terapia com CRISPR, nenhum estudo confirmou que ele pode ter alguma relação diretamente com o impulsionamento do câncer (39).

DIREÇÕES FUTURAS PARA CRISPR/CAS9 NA TERAPIA DO CÂNCER

Em uma análise da concretização da promessa CRISPR/Cas9 realizada no câncer de transição, espera-se que a maioria das linhagens de células cancerosas sejam cobertas por triagens CRISPR agrupadas. Diante disso, será possível a observação de interações letais sintéticas e a identificação de novos escopos terapêuticos, no entanto, especialistas apontam ser necessário o aprofundamento quanto à eficácia e segurança do paciente quando a técnica CRISPR é utilizada *in vivo*. E, à medida que os anos passam, os estudos e ensaios clínicos avançam tornando possível acreditar que esses editores genéticos têm potencial para tratar diversas doenças humanas, principalmente, o câncer (40, 6).

Apesar da grandeza de possibilidades a qual esse sistema CRISPR possui, componentes que são imunogênicos em humanos, ainda não estão suficientemente elucidados para essa utilização em potencial. A medicina personalizada oportuniza que os pesquisadores reproduzam a sequência genética responsável pela oncogênese em diferentes tumores a partir dos meios de cultura de organóides avançados e engenharia versátil apta para o sistema CRISPR/Cas9. Porém, como já mencionado, é importante aguardar confirmação dos estudos clínicos usando essa técnica terapêutica como escudo para combater o sistema imunológico do câncer (31).

CONCLUSÕES

De acordo com a literatura, foi possível concluir que o CRISPR é uma ferramenta personalizável, de fácil aplicação e baixo custo. E, teoricamente, é possível utilizá-la para tratar doenças infecciosas e cânceres. Porém ainda há muitas ressalvas para utilização desta técnica em processo de terapia gênica, principalmente envolvendo uma patologia tão complexa como o câncer. Uma grande problemática é a questão ética social ao modificar genes humanos e provocar mutações genéticas de escalas não programadas. Pois, mesmo com diversos testes positivos, é uma linha que muitos cientistas têm receio de cruzar. Por isso, faz-se necessário mais investimentos e comprometimento nos estudos que visem resultados não causadores de efeitos estocásticos. Para isso, será essencial otimizar a eficácia, segurança e especificidade do CRISPR antes de sua utilidade clínica. Sendo assim, investigadores de todo o mundo estão descobrindo diversas rotas para ajustar a entrega de CRISPR às células específicas no corpo humano. E, mesmo com essas

atuais ressalvas, o CRISPR tem sido e continuará sendo, uma ferramenta chave em nossa busca para compreender e tratar cânceres humanos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Pernambuco - *Campus* Mata Norte, que tem sido essencial para nossa formação; ao Laboratório de Biotecnologia da UPE - *Campus* Mata Norte (LABIOTEC UPE CMN), e por último, mas não menos importante, ao Grupo de Pesquisa, Extensão e Informação: ProBioTec, liderado pela Prof.^a Dr.^a Fabiana América S. D. Souza, primordial para aquisição de novos conhecimentos científicos, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: upgrading prokaryotes for adaptive immunity. *Mol Célula*. 2014;54(2):234–44.
2. Sumit D. Shehnaz Bano. Prachi Kapse and Gopal C. Kundu. CRISPR based therapeutics: a new paradigm in cancer precision medicine. *Molecular Cancer*, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2022.
3. Yang Y, Xu J, Ge S, Lai L. CRISPR/Cas: Advances, Limitations, and Applications for Precision Cancer Research. *Frente. Med.*8:649896, 2021.
4. Baghini S. CRISPR/Cas9 application in cancer therapy: a pioneering genome editing tool. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2022.
5. Balon K, Sheriff A, Jackow J, Laczmanski L. Targeting cancer with CRISPR/Cas9-based therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 573.
6. Tufail M. Genome editing: An essential technology for cancer treatment. China: *Institute of Biomedical Sciences*. Shanxi University. n. 100015. 2022.
7. Singh D, Parveen A, Yadav K. *Role of PARP in TNBC*: mechanism of inhibition, clinical applications and resistance. *Biomedicin*. 2021; 9(11):1512.
8. Lopes R. Systematic dissection of transcriptional regulatory networks by genomic and single-cell scale CRISPR screens. *Science*. Av. 7, eabf 5733 (2021)

9. Assis O, Souza B, Souza S. Effectiveness of the application of the crispr/cas9 system in the treatment of duchenne muscular dystrophy. revista multidisciplinar em saúde. v. 1. n. 2. 2020.
10. Katti A, Diaz B, Cargine C, Sanjana N, Dow L. Crispr in cancer biology and therapy. Críticas da natureza. V. 22. Maio. 2022.
11. Krzyszczyk P, Acevedo A, Davidoff EJ, Timmins LM, Marrero Berrios I, Patel M, et al. The growing role of precision and personalized medicine in cancer treatment. Tecnologia. 2018 set;06(03n04):79–100.n.
12. Dagogo-Jack I, Shaw T. Tumor heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nat Rev Clin Oncol. 2018;15(2):81–94.
13. Zhang L, Yang Y, Chai L, Bu H, Yang Y, Huang H, Ran J, Zhu Y, Li L, Chen F. FRK plays an oncogenic role in non-small cell lung cancer by increasing the stemness phenotype by inducing metabolic reprogramming. Int J Câncer. 2020;146(1):208–22.
14. Pothuraju R, Rachagani S, Krishn R, Chaudhary S, Nimmakayala K, Siddiqui JA, Ganguly K, Lakshmanan L, Cox L, Mallya K. Molecular implications of the MUC5AC-CD44 axis in colorectal cancer progression and chemoresistance. Mol Câncer. 2020;19(1):37.
15. Miller A, Policastro A, Savant S, Sriramkumar S, Ding N, Lu X, Mohammad P, Cao S, Kalin H, Cole A. Lysine-specific demethylase 1 mediates AKT activity and promotes epithelial-mesenchymal transition in PIK3CA mutant colorectal cancer. Mol Câncer Res. 2020;18(2): 264-77.
16. Behbahani R, Danyaei A, Teimoori A, Neisi N, Tahmasbi M. Radioresistance in breast cancer can be overcome by knocking out the osteopontin gene with the CRISPR/Cas9 technique. Câncer/Radioterapia. 2021;25(3):222–8.
17. Riedel M, Berthelsen F, Cai H, Haldrup J, Borre M, Paludan SR, Hager H, Vendelbo MH, Wagner EF, Bakiri L. Inactivation of Fos by CRISPR in vivo promotes progression of prostate cancer by altering the associated AP-1 subunit Jun. Oncogene. 2021;40(13):2437–47.

18. Chakraborty G, Patail NK, Hirani R, Nandakumar S, Mazzu YZ, Yoshikawa Y, Atiq M, Jehane LE, Stopsack KH, Lee. G-SM. Attenuation of SRC kinase activity increases PARP. 2021; 27(6):1792-1806.
19. Su B, Zhang L, Zhuang W, Zhang W, Chen X. Knockout de Akt1/2 suprime a metástase para células de câncer de próstata humano CWR22rv1 *in vitro e in vivo*. J Cell Mol Med. 2021;25(3):1546–53.
20. Raffi S. Tashkandi E. Bukhari N. Al-Shamsi H. Current status of CRISPR/Cas9 application in clinical cancer research: opportunities and challenges. Cancers, v. 14, n. 4, p. 947, 2022.
21. Smurnyy Y. Cai M. Wu H. McWhinnie E. Tallarico JA. Yang Y. DNA sequencing and CRISPR-cas9 gene editing for target validation in mammalian cells. Nat Chem Biol. 2014; 10:623-5. doi: 10.1038/nchembio.1550.
22. Santos V S, Wietholter P. Contribuições da engenharia genética no tratamento de doenças. Curitiba: Brazilian Journal of Development. v. 7. n. 3. p. 31157-31176. 2021.
23. Yoon S. Mapping the *in vivo* fitness scenario of lung adenocarcinoma tumor suppression in mice. Nat Genet. 2018; 50:483-6. doi:10.1038/s41588-018-0083-2.
24. Kick L, Kirchner M, Schneider S. CRISPR-Cas9: from a bacterial immune system to genome-edited human cells in clinical trials. Bioengenharia. 2017; 8:280-6. doi: 10.1080/21655979.2017.1299834.
25. US National Library of Medicine. Células CAR-T específicas de CD19 editadas por CRISPR (HPK1) (células CAR-T XYF19) para leucemia ou linfoma CD19+ [Internet]. 2019 [acesso em 5 Agosto 2022]. Disponível em: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04037566>.
26. US National Library of Medicine. TACE Combinado Com Célula T PD-1 Knockout Engineered em Carcinoma Hepatocelular Avançado [Internet]. 2020 [acesso em 5 Agosto 2022]. Disponível em: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04417764>.

27. US National Library of Medicine. Segurança e Eficácia de Células CT125A para Tratamento de Doenças Hematopoiéticas CD5+ Recidivantes/Refratárias [Internet]. 2021 [acesso em 5 Agosto 2022]. Disponível em: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04767308>.
28. Liu Y, Cao Z, Wang Y, Guo Y, Xu P, Yuan P, et al. Genome-wide screening for long non-coding RNAs functional in human cells by targeting Cas9 to splicing sites. *Nat Biotechnol.* 2018; 36(12):1203–10.
29. Szlachta K, Kuscu C, Tufan T, Adair SJ, Shang S, Michaels AD, et al. CRISPR knockout screening identifies combinatorial drug targets in pancreatic cancer and models the cellular response to drugs. *Nat Comun.* 2018; 9(1):4275.
30. Parrish PCR, Thomas JD, Gabel AM, Kamlapurkar S, Bradley RK, Berger AH. Discovery of lethal synthetic pairs and tumor suppressors in the human genome. *Rep. Célula* 2021; 36(9).109597.
31. Chen M, Mao A, Xu M, Weng Q, Mao J, Ji J. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Câncer Let.* 2019.
32. Guo X. Disruption of PD-1 enhanced the anti-tumor activity of chimeric antigen receptor T cells against hepatocellular carcinoma [Internet]. *Front. Pharmacol.* 9, 1118. 2018. [acesso em 1 Agosto 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30327605/>
33. Stadtmauer EA. Células T projetadas por CRISPR em pacientes com câncer refratário. *Science.* v. 367. n. 6481. 2020.
34. Xu X, Chemparathy A, Zeng L, Kempton HR, Shang S, Nakamura M. Miniature CRISPR-Cas system designed for mammalian genome regulation and editing. *Mol Célula.* 2021;81(20):4333-4345.e4.
35. Liu X, Liu X, Zhou C, Lv J, He X, Liu Y. Engineered FnCas12a with enhanced activity through directional evolution in human cells. *J Biol Chem.* 2021 Jan;296: 100394.

36. Liu JJ, Orlova N, Oakes BL, Ma E, Spinner HB, Baney KLM. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Natureza*. 2019;566(7743):218–23.
37. Uddin, F; Rudin, C; Sen, T. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Frontiers in Oncology*. 7 de agosto de 2020. [acesso em 4 Agosto 2022]. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01387/full>
38. Bhattacharjee R. Das, L; Choudhury, A. Understanding on CRISPR/Cas9 mediated cutting-edge approaches for cancer therapeutics. *Discover Oncology*, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2022.
39. Leibowitz M. L. Chromotripsis as a consequence of the CRISPR-Cas9 genome editing target. *Nature Genetics*, v. 53. p. 895-905. 2021.
40. Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(6):523–33.

DOI: 10.53934/9786585062046-23

Capítulo 23

SÍNDROME DE EDWARDS PARCIAL ASSOCIADA À DUPLICAÇÃO TERMINAL DO BRAÇO LONGO DO CROMOSSOMO 5: RELATO DE CASO

Marta Marques de Carvalho Lopes *; Thaís Dornas Xavier ; Rejane Alves
de Carvalho Monteiro ; Isabela Aurora Rodrigues ; Isabelly Rocha
Borges ; Amanda De Lourdes Nunes ; Uyara da Silva Cadar 

**Autor Correspondente*

E-mail: marta.mdecarvalho@gmail.com

Resumo: Alterações cromossômicas numéricas e estruturais são, em sua maioria, incompatíveis com a vida, principalmente quando estão presentes em todas as células do organismo. São responsáveis por cerca de 50% de todos os abortos espontâneos ocorridos no primeiro trimestre de gravidez. As translocações balanceadas e não balanceadas, são exemplos de alterações cromossômicas estruturais, sendo as não- balanceadas responsáveis pela formação de cromossomos derivativos. Assim, relatamos um caso de uma criança apresentando um rearranjo cromossômico raro e complexo, envolvendo os cromossomos 5 e 18. Os exames realizados que possibilitaram a detecção de tais rearranjos, foram o Cariótipo de Banda G, o CGH-array e o FISH para a Síndrome de CRI-DU-CHAT/SOTOS. O resultado do exame de Cariótipo de Banda G revelou o resultado 47,XY,t(5;18)(q35;q21.1),+der(18)t(5;18)(q35;q21.1), corroborando com os achados encontrados na análise por CGH-array, que demonstrou um ganho nas regiões 5q35.3 e 18p11.32q21.1, gerando uma trissomia parcial de ambos os cromossomos. Já o exame de FISH apresentou resultado normal. A correlação fenótipo e genótipo constituem-se como uma ferramenta importante no diagnóstico e prognóstico de indivíduos com alterações cromossômicas raras, pois auxiliam no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que podem proporcionar uma melhor qualidade de vida ao portador.

Palavras-chave: alteração cromossômica rara; Síndrome De Edwards Parcial; cromossomo derivativo; duplicação 5q35

INTRODUÇÃO

A estabilidade numérica e estrutural dos cromossomos em qualquer organismo é considerada um dos principais fatores para o seu desenvolvimento, resultando em um indivíduo físico e psicologicamente normal (1). Qualquer erro nesta dinâmica resultará em alterações cromossômicas que, em sua maioria, são incompatíveis com a vida, principalmente quando acometem todas as células do organismo. Tais alterações, são responsáveis por aproximadamente 50% de todos os abortos espontâneos ocorridos no primeiro trimestre de gestação, acometendo também e 1 a cada 160 nativos (2).

A translocação balanceada ou recíproca é o tipo de alteração cromossômica estrutural mais comum, onde segmentos cromossômicos de dois ou mais cromossomos são trocados entre si. Portadores dessa alteração constitucional são fenotipicamente normais, entretanto, podem gerar gametas não-balanceados, levando à infertilidade, abortamento espontâneo ou ao nascimento de conceitos anormais (3).

A translocação não-balanceada pode acarretar na formação de cromossomos denominados derivativos, que são aqueles que apresentam o centrômero intacto, ou seja, identificável, mas que sofreram rearranjos intercromossomal e/ou intracromossomal. Assim, pode-se dizer que é um cromossomo estruturalmente alterado que derivou de um cromossomo conhecido. Normalmente, indivíduos que apresentam cromossomos derivativos, herdaram de seus progenitores um dos cromossomos rearranjados devido à presença de translocação recíproca, carreando monossomias/trissomias parciais raras (3).

Neste contexto, apresentamos o relato de uma criança com um rearranjo cromossômico raro, envolvendo os cromossomos 5 e 18, uma translocação recíproca seguida de uma duplicação de um dos cromossomos derivativo, gerando uma trissomia parcial dos mesmos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente, foi realizada a análise de variações de número de cópias do genoma do paciente, através do exame CGH-array usando CytoScan®750K Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA), seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante. A análise de dados foi realizada usando o Software Affymetrix® Chromosome Analysis Suite (ChAS). Em seguida, a técnica de FISH - Hibridização *in situ* Fluorescente foi feita, utilizando a sonda para Síndrome de deleção do cromossomo 5p ou CRI-DU-CHAT/SOTOS PROBE COMBINATION, conforme protocolo padrão (Cytocell Aquarius, Inglaterra, OGT). E, para complementar o diagnóstico do paciente, a análise citogenética de linfócitos do sangue periférico foi realizada usando técnicas padrões de bandamento G (400 bandas).

Todos os exames foram realizados no Departamento de Citogenética e Genética Molecular do Instituto Hermes Pardini S/A. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) autorizando a utilização dos resultados, assim como todas as informações relevantes para a utilização em pesquisa e/ou divulgação científica foi assinado pela responsável do paciente.

Adicionalmente, foi realizada uma revisão bibliográfica nos bancos de dados públicos disponíveis (PubMed, MedLine, DECIPHER, ClinVar) das alterações apresentadas pelo conceito em questão, considerando os fenótipos relacionados e a patogenicidade determinada ou descrita nas alterações semelhantes às do paciente.

RELATO CLÍNICO

O probando é do sexo masculino, atualmente com 5 anos e 3 meses de vida, segundo filho de casal hígido e não consanguíneo. Nasceu a termo, parto cesáreo por pré-eclampsia e com boa vitalidade, porém com características de retardo de crescimento intra-uterino e síndrômico. A mãe, G3P2A1, apresentava ao nascimento 30 anos de idade, nega qualquer exposição a agentes teratógenos durante o período pré-natal. O casal apresenta uma filha

hígida com idade atual de 18 anos e não apresenta histórico de má- formações ou deficiência intelectual em ambas as famílias.

O paciente foi submetido à avaliação com o neuropediatra, onde foi observado um atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e hipotonia global correspondente para a idade, principalmente o comprometimento do intelecto/cognição e linguagem expressiva aliada à alteração motora. Não possui cardiopatia congênita, apresenta dismorfias faciais, criptorquidia à esquerda, dificuldade de deglutição, sialorreia excessiva e sem controle esfinteriano. No exame de Tomografia computadorizada foi evidenciado um aumento da fossa posterior.

O resultado do exame de CGH-*array* revelou um ganho de aproximadamente 47 Mb no cromossomo 18 na região p11.32q21.1, envolvendo cerca de 258 genes e de 3,4 Mb no cromossomo 5 na região q35.3, compreendendo cerca de 64 genes, resultando em uma trissomia parcial dos cromossomos 5 e 18. Ambas as variações foram classificadas como patogênicas de acordo com os bancos de dados (DECIPHER e ClinVar). Essas alterações compreendem alguns genes com funções conhecidas que poderiam estar modulando para o fenótipo do paciente. Além de duas CNVs (variações no número de cópias), encontradas na população em geral, sem associações até o momento, a fenótipos anormais.

No exame de Cariótipo de Banda G, também foi identificada a trissomia parcial dos cromossomos 5 e 18 (Figura 1). A pesquisa para Síndrome de *Cri-Du-Chat* através da técnica de FISH (Figura 2) foi negativa.

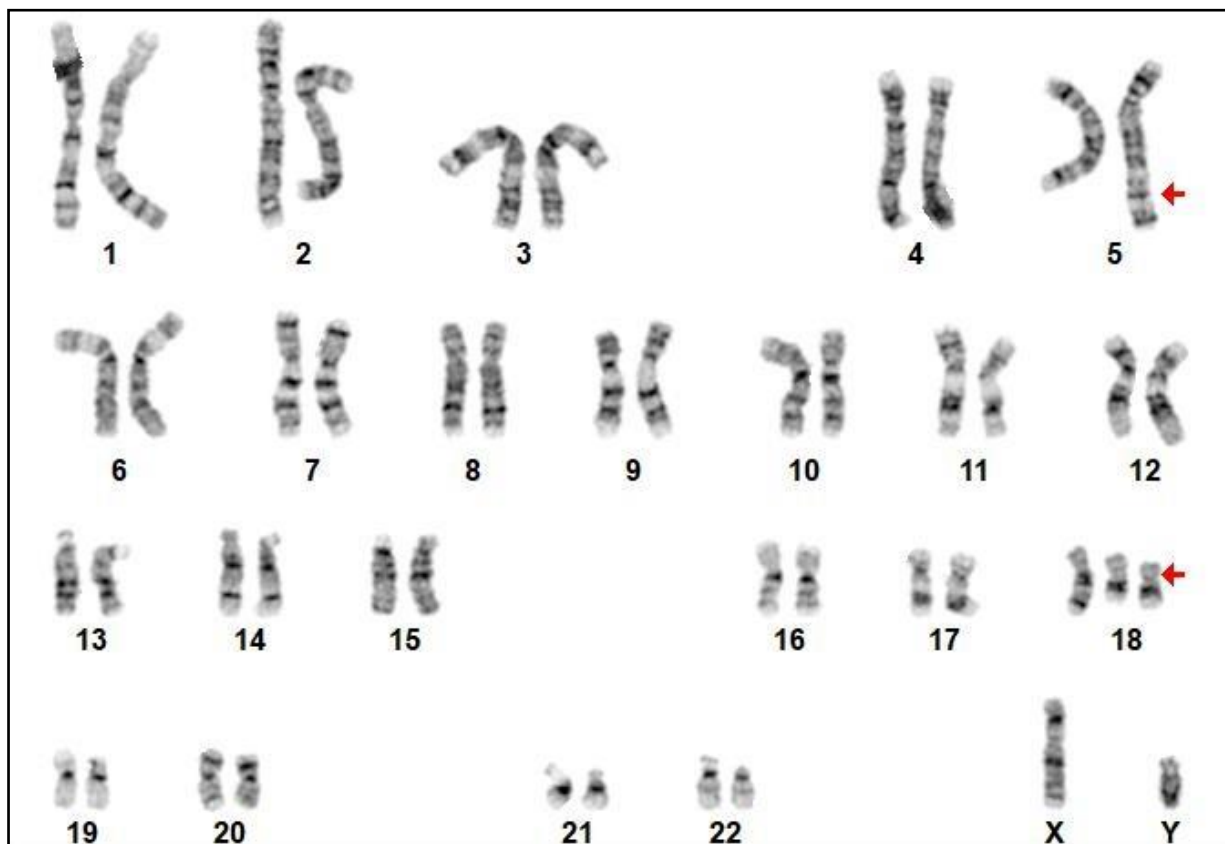


Figura 1- Cariótipo por bandeamento G. Arquivo dados da pesquisa.

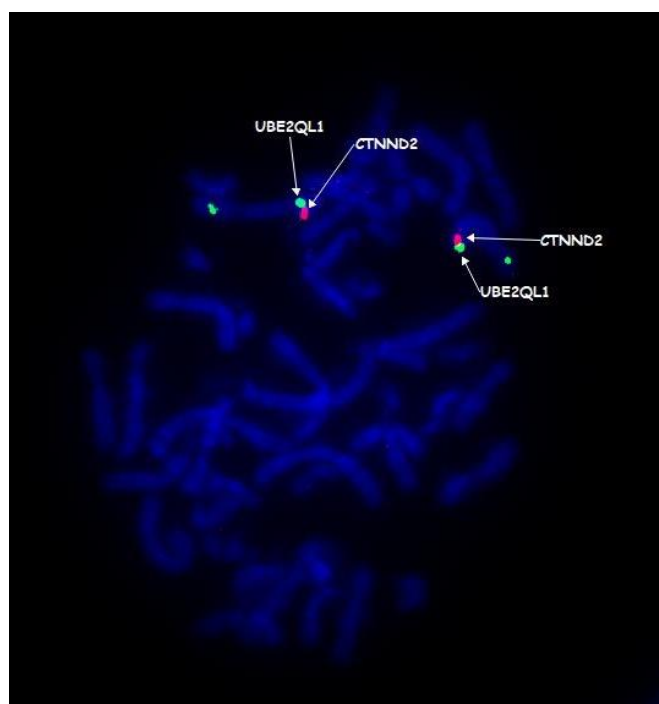


Figura 2- FISH para Síndrome de Cri-Du-Chat. Fonte: Arquivo dados da pesquisa.

Na tabela 1, encontram-se os resultados de todos os exames realizados para diagnóstico do paciente.

Tabela 1- Resultados dos exames realizados no Instituto Hermes Pardini S/A.

Exame	Resultado
CGH-array	-arr [hg19] 18p11.32q21.1 (136, 227-47, 327,624)x3 -arr [hg19] 5q35.3 (177,259, 401-180, 715, 096)x3 -2 CNVs presentes em indivíduos da população em geral
Cariótipo Banda G	47,XY,t(5;18)(q35;q21.1),+der(18)t(5;18)(q35;q21.1)
FISH Cri-Du-Chat	ish (CTNND2,UBE2QL1)x2

Legenda: CGH-array: hibridização genômica comparativa por microarranjos; CNVs: Variações do número de cópia; FISH: Hibridização *in situ* por fluorescência. Fonte: Arquivo dados da pesquisa.

No momento, não há ainda tratamento específico, somente as terapias de reabilitação. Devido à pandemia causada pelo Coronavírus-Covid-19 a criança tem apresentado uma regressão. As terapias de reabilitação incluem terapia ocupacional e fonoaudiologia com certificação em BOBATH OU PADOVAN, fisioterapia motora com certificação em PEDIASUIT e aquática com especialização em ABA, divididas durante a semana.

DISCUSSÃO

Com os avanços das técnicas citogenômicas, novos *loci* estão sendo relacionados e determinados para clínicas específicas. Consequentemente, novos genes, localizados nesses novos *loci* cromossômicos, vêm sendo apontados como candidatos responsáveis pelas alterações clínicas apresentadas pelo paciente ou por determinada síndrome (3,4).

O resultado exame CGH-array permitiu identificar cópias extras de vários genes localizados em 5q35.3 e 18p11.32q21.1, variantes consideradas patogênicas (5). Além de duas CNVs descritas em indivíduos da população em geral. Relacionar alterações no padrão de expressão gênica com as variações no número de cópias no genoma constitui-se uma tarefa difícil, visto que as mesmas estão presentes tanto em indivíduos fenotipicamente normais, como em indivíduos fenotipicamente afetados. Estima-se que cerca de 12% de todo o genoma humano é alvo de variações no número de cópias, conferindo uma importante contribuição para a variabilidade genética presente na espécie humana (5,6).

Através dos achados encontrados no Cariótipo de Banda G, foi possível confirmar e definir qual tipo de alteração cromossômica estrutural o paciente apresentava, visto que a técnica de *CGH-array* possibilita detectar perdas ou ganhos, não detectando assim translocações balanceadas. O resultado demonstrou uma translocação balanceada entre os cromossomos 5 e 18, seguida de uma duplicação do cromossomo 18 derivativo, confirmando o ganho das cópias extras de ambos os cromossomos (7). A criança apresenta uma irmã filha dos mesmos pais sem nenhuma anormalidade fenotípica. Não foi possível realizar o cariótipo dos pais e da irmã em tempo hábil para descrever no estudo, que seria de grande valia na elucidação diagnóstica e aconselhamento genético, pois as mesmas poderiam ser herdadas.

A duplicação em 5q35.3 afeta a região terminal do braço longo do cromossomo 5, estando relacionada a uma ampla gama de fenótipos clínicos, porém, até o momento, sem associação a uma síndrome genética específica. Nesta região, estão mapeados 64 genes, onde a dosagem extra cursa com baixa estatura, dismorfias craniofaciais, microcefalia, deficiência intelectual, retardo na linguagem, atraso motor, alterações no sistema nervoso central, entre outras (8). Tais alterações fenotípicas já descritas em indivíduos com duplicação de 5q35.3 estão de acordo com o fenótipo do paciente alvo do estudo como já descrito, considerando que o ele apresenta atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento intelectual e de cognição, dismorfias faciais e alterações motoras.

O ganho de 18p11.32q21.1 de aproximadamente 47 Mb relaciona-se com a Síndrome da Trissomia do Cromossomo 18, também conhecida como Síndrome de Edwards. As características apresentadas pelos portadores desta síndrome são muito variáveis e estão diretamente relacionadas com o tamanho do material genético extra (9). A trissomia completa ou total do cromossomo 18 é a forma mais comum na população, representando cerca de 94% dos casos. Trissomias parciais ou em mosaico exibem fenótipos mais brandos. As características típicas incluem deficiência intelectual grave, baixo peso ao nascimento, anormalidades craniofaciais, malformações de órgãos interno, sobreposição dos dedos das mãos e pés, entre outras (9). Todas as dismorfias e alterações neuropsicomotores observadas no paciente também corroboram com as descritas na literatura. Muitas características fenotípicas presente na Síndrome de Edwards sobrepõem as descritas na duplicação de 5q35.3, não sendo possível distinguir até o momento, qual região extra estaria mais relacionada a clínica da criança.

Deste modo, estudos citogenéticos clássicos e moleculares são de suma importância no diagnóstico de portadores de malformações e atraso no desenvolvimento, pois possibilitam a detecção de alterações cromossômicas numéricas e estruturais que possivelmente estariam contribuindo para o fenótipo apresentado.

CONCLUSÕES

Relatos de pacientes portadores de alterações genéticas raras juntamente com as características clínicas apresentadas são de suma importância, pois se constitui como uma ferramenta útil para a correlação genótipo e fenótipo, contribuindo assim para uma melhor compreensão da complexidade da doença, possibilitando também melhores estratégias

terapêuticas e medicamentosas, a fim de proporcionar uma melhor qualidade de vida aos indivíduos afetados.

AGRADECIMENTO

Ao Instituto Hermes Pardini S/A pelo apoio e financiamento.

REFERÊNCIAS

1. Nussbaum RL, Mcinnes RR, Willard HF. Genética Médica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
2. Blue NR, Page JM, Silver RM. Genetic abnormalities and pregnancy loss. Semin Perinatol. 2019; 43: 66–73.
3. Maluf, SW, Riegel M, et al. Citogenética Humana. Porto Alegre: Artmed; 2011.
4. Levy B, Wapner R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. Fertil Steril. 2018; 109:201–12.
5. de Leeuw N, et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. Hum Mutat. 2012; 33: 930-40.
6. Girirajan S, Eichler EE. Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. Hum Mol Genet. 2010; 19: R176-R187.
7. Hanemaaijer NM, et al. Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by highresolution array in routine diagnostics. Eur J Hum Genet. 2012; 202: 161-165.
8. Yue, Fagui et al. “Prenatal diagnosis of a 5q35.3 microduplication involving part of the ADAMTS2 locus: a likely benign variant without apparent phenotypic abnormality: Case series.” Medicine. 2019. 98:49.
9. Cereda A, Carey JC. The trisomy 18 syndrome. Orphanet J Rare Dis. 2012 Oct 23; 7:81.

ISBN 978-659996580-7



9

786599

965807