

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *CRISPR*/Cas9 NO CONTEXTO DA COVID-19: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Vinícius Bezerra De Freitas Pereira¹;

<http://lattes.cnpq.br/1452926939953353>

Ana Victoria Mota Lima²;

<https://orcid.org/0000-0001-9323-6319>

Andrielle Maria Lôbo Rodrigues³;

<https://orcid.org/0009-0007-3409-2168>

Any Kaylanne Duarte De Aquino⁴;

<http://lattes.cnpq.br/0383975598933002>

Camila Bezerra Nobre⁵;

<http://lattes.cnpq.br/2372103952520072>

Daniely Sampaio Arruda Tavares⁶;

<https://orcid.org/0000-0003-4101-2473>

Denyd Renan Feitosa De Lima Saraiva⁷;

<https://orcid.org/0009-0006-8948-6888>

Emanuel de Sousa Lima Sampaio⁸;

<http://lattes.cnpq.br/1691194593732004>

Givaldo De Alencar Lima Júnior⁹;

<http://lattes.cnpq.br/8793417176361856>

Guilherme Fernandes Teixeira¹⁰;

<https://orcid.org/0009-0001-7501-9764>

Iarny Silvestre De Alencar¹¹;

<http://lattes.cnpq.br/1735294470246983>

Júlio César Silva^{*12};

<https://orcid.org/0000-0003-3602-3776>

Laura Bianca Ferreira Lopes¹³;

<http://lattes.cnpq.br/2588890549924045>

Maria Aparecida Santiago da Silva¹⁴;

<https://orcid.org/0000-0002-4720-4479>

Maria Hellena Garcia Novais¹⁵;

<https://orcid.org/0000-0001-9150-0139>

Marina Micaelle Rodrigues Siqueira¹⁶;

<http://lattes.cnpq.br/9805101077799047>

Paulo Henrique Lavor Bezerra¹⁷;

<https://orcid.org/0009-0002-1659-4002>

Raul Felipe Oliveira Vêras¹⁸;

<https://orcid.org/0009-0009-6218-1453>

Romário Matheus Conceição de Oliveira¹⁹;

<http://lattes.cnpq.br/1286433857333185>

Vitória Beatriz Roberto Silva²⁰;

<http://lattes.cnpq.br/9049339857440984>

Volker Alencar Brito De Medeiros²¹;

<https://orcid.org/0009-0001-4217-0118>

Wenderson Pinheiro de Lima²².

<http://lattes.cnpq.br/0875385883440539>

RESUMO: Este estudo teve como objetivo avaliar a utilização da técnica de *CRISPR/Cas9* no contexto de pandemia da COVID-19. Tratou-se de uma revisão sistemática da literatura realizada no segundo semestre de 2021 na qual a coleta de informações foi realizada através das bases de dados Pubmed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), Periódicos Capes, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Google acadêmico (*Scholar Google*). Foram incluídos artigos publicados entre os anos de 2019 e 2021 que continham as palavras “*CRISPR-Associated Protein 9*” “*CRISPR Associated Protein 9*” E “*SARS-CoV-2 infection*” “*SARS CoV 2 infection*” “*COVID19*” “*COVID 19*” no título, resumo ou assunto, nos idiomas inglês, português e espanhol e dois artigos foram incluídos na síntese. O sistema *CRISPR/Cas9* tem uma grande margem de crescimento e potencial, graças à sua capacidade de editar qualquer célula, seja ela humana, animal ou vegetal podendo também ser aplicada a métodos diagnósticos virais como o SARS-CoV-2. São descritas novas metodologias com destaque para a coleta de amostras de escarro e aspirados nasofaríngeos submetidos a procedimento colorimétrico, que são expressos em intensidade de cor proporcional a concentração de RNA na amostra. Desta forma os resultados obtiveram sucesso porém

com uma baixa amostragem o que pode dificultar a confiabilidade.

PALAVRAS-CHAVE: Edição de Genes. SARS-CoV-2. Betacoronavirus.

USE OF THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE IN THE CONTEXT OF COVID-19: A SYSTEMATIC REVIEW

ABSTRACT: This study had as objective evaluate the use of the *CRISPR/Cas9* technique in the context of the COVID-19 pandemic. This is a systematic literature review carried out in the first half of 2021 in which information was collected in Pubmed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Scientific Electronic Library Online (SciELO), CAPES periodics, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) and Scholar Google. Articles published between 2019 and 2021 that contained the words “CRISPR-Associated Protein 9” “CRISPR Associated Protein 9” AND “SARS-CoV-2 infection” “SARS CoV 2 infection” “COVID19” “COVID 19” were included in the title, abstract or subject in English, Portuguese and Spanish and two articles were included in the synthesis. The CRISPR/Cas9 system has a large margin of growth and potential, thanks to its ability to edit any cell, whether human, animal or plant, and can also be applied to viral diagnostic methods such as SARS-CoV-2. In this context, new methodologies are described, with emphasis on the collection of sputum samples and nasopharyngeal aspirates submitted to a colorimetric procedure, which are expressed in color intensity proportional to the concentration of RNA in the sample. Thus, the results were successful but with a low sampling, which can make reliability difficult.

KEY-WORDS: Gene Editing. SARS-CoV-2. Betacoronavirus.

INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 (sigla do inglês que significa Coronavírus tipo 2 causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave) é um novo tipo de coronavírus que desenvolve a doença infecciosa chamada COVID-19. A maioria das pessoas infectadas com SARS-CoV-2 tem doença respiratória leve a moderada e podem se recuperar sem tratamento especial. Os idosos e as pessoas com doenças subjacentes, como doenças cardiovasculares, diabetes, doenças respiratórias crônicas e câncer, têm maior probabilidade de desenvolver a doença de forma grave e evoluir para, até mesmo, o óbito (WORD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Após sua identificação, seguida de análise da sequência genética e desenvolvimento de um método de detecção, o rápido aumento no número de casos e o aumento da evidência de transmissão entre humanos indicam que o vírus é mais infeccioso do que o SARS-CoV (descoberto em 2003 na Ásia) e o MERS-CoV (descoberto em 2012 no oriente médio) (MUNSTER *et al.*, 2020; PAULES; MARSTON; FAUCI, 2020; WANG *et al.*, 2020). Até o momento do presente estudo, bases de dados estimam que cerca de 257.996.568 de

peessoas no mundo contraíram o SARS-Cov-2 e cerca de 5.155.786 vieram a óbito (CSSE - JOHN HOPKINS, 2021)

Diante disso, é de fundamental importância que as mais modernas ferramentas laboratoriais sejam aplicadas ao diagnóstico/tratamento da doença (MORENS et al., 2020). Com ênfase para a técnica de *CRISPR/Cas9* (*Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crispr associated 9 protein - Aglomerados de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente inter espaçadas - proteína 9 associada a Crispr*) que têm mostrado ao longo dos anos diversas evidências científicas importantes como a utilização da técnica para incluir genes de resistência contra patógenos em plantas por exemplo. (BORRELI et al., 2018; SANTOS et al., 2021).

Os sistemas *CRISPR* foram reconhecidos pela primeira vez por Ishino e colaboradores (1987) presentes na bactéria *Escherichia coli* como nucleotídeos repetidos intercalados com sequências curtas de DNA. Vários anos depois, demonstrou-se que as sequências *CRISPR* e as proteínas *Cas* servem como um mecanismo de defesa antiviral de *arqueas* e bactérias, que posteriormente vieram a se tornar uma técnica de edição de genoma (FRACZEK; NASEEB; DELNERI, 2018).

Essa técnica opera recrutando a nuclease *Cas9* para um locus genômico com um *Protospacer adjacent motif* (PAM) - do português “Motivo adjacente ao Protoespaçador” usando um *Single Guide RNA* (*sgRNA*) - do português “RNA guia de fita de simples” sintético curto com uma sequência de 18-20 nucleotídeos correspondendo ao alvo desejado (ALLEN et al., 2019).

Desta forma a edição do genoma mediada por *CRISPR* revolucionou, sem dúvida, a engenharia genética de animais. Com a capacidade de modificação virtualmente ilimitada de quase qualquer genoma, descobertas incríveis pavimentaram o caminho para esta tecnologia inovadora. Por meio desses dois mecanismos, os genes endógenos podem ser eliminados ou reparados/modificados com precisão. Logo, ferramentas de edição de genoma, especialmente *CRISPR*, revolucionaram a geração de modelos de doenças humanas (LIANG et al., 2017; TRÖDER; ZEVNIK, 2021).

Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a utilização da técnica de *CRISPR/Cas9* no contexto da COVID-19, assim como suas limitações e da sua capacidade de controle de disseminação viral.

DESENVOLVIMENTO

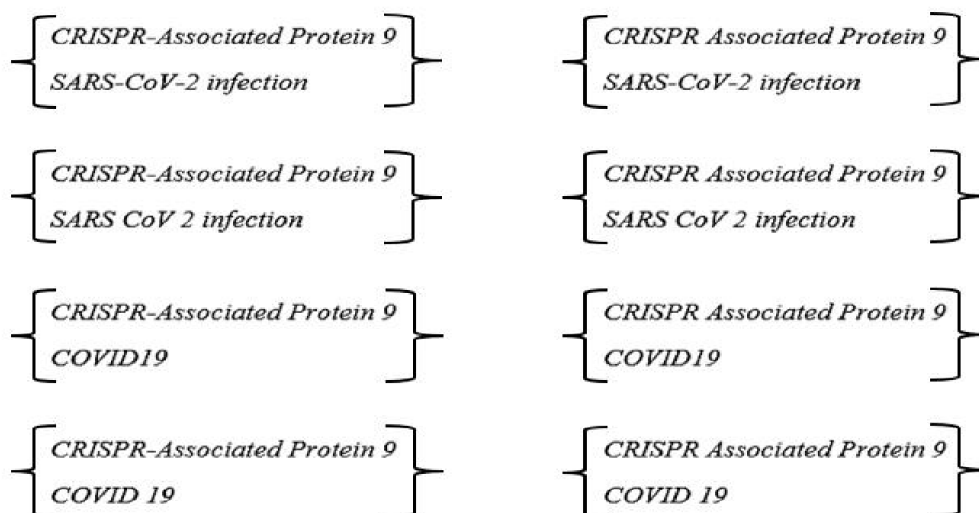
Tratou-se de uma revisão de literatura sistemática, realizada no segundo semestre de 2021. A coleta de informações foi realizada através das bases de dados Pubmed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), Periódicos Capes, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Google acadêmico (*Scholar Google*) e se deu pelo uso conjunto das palavras-chave organizados

em pares: “*CRISPR-Associated Protein 9*” “*CRISPR Associated Protein 9*” E “*SARS-CoV-2 infection*” “*SARS CoV 2 infection*” “*COVID19*” “*COVID 19*” totalizando 8 possibilidades de pesquisa.

Foram incluídos no estudo, artigos publicados entre os anos de 2019 e 2021, nos idiomas inglês, português e espanhol. Os artigos continham as palavras “*CRISPR-Associated Protein 9*” “*CRISPR Associated Protein 9*” E “*SARS-CoV-2 infection*” “*SARS CoV 2 infection*” “*COVID19*” “*COVID 19*” no título, resumo ou assunto. Foram excluídos artigos duplicados, bem como aqueles que se caracterizaram por outras Revisões de Literatura. Além disso, foram excluídos os artigos que, mediante leitura do título e do resumo, não abordaram o tema em questão.

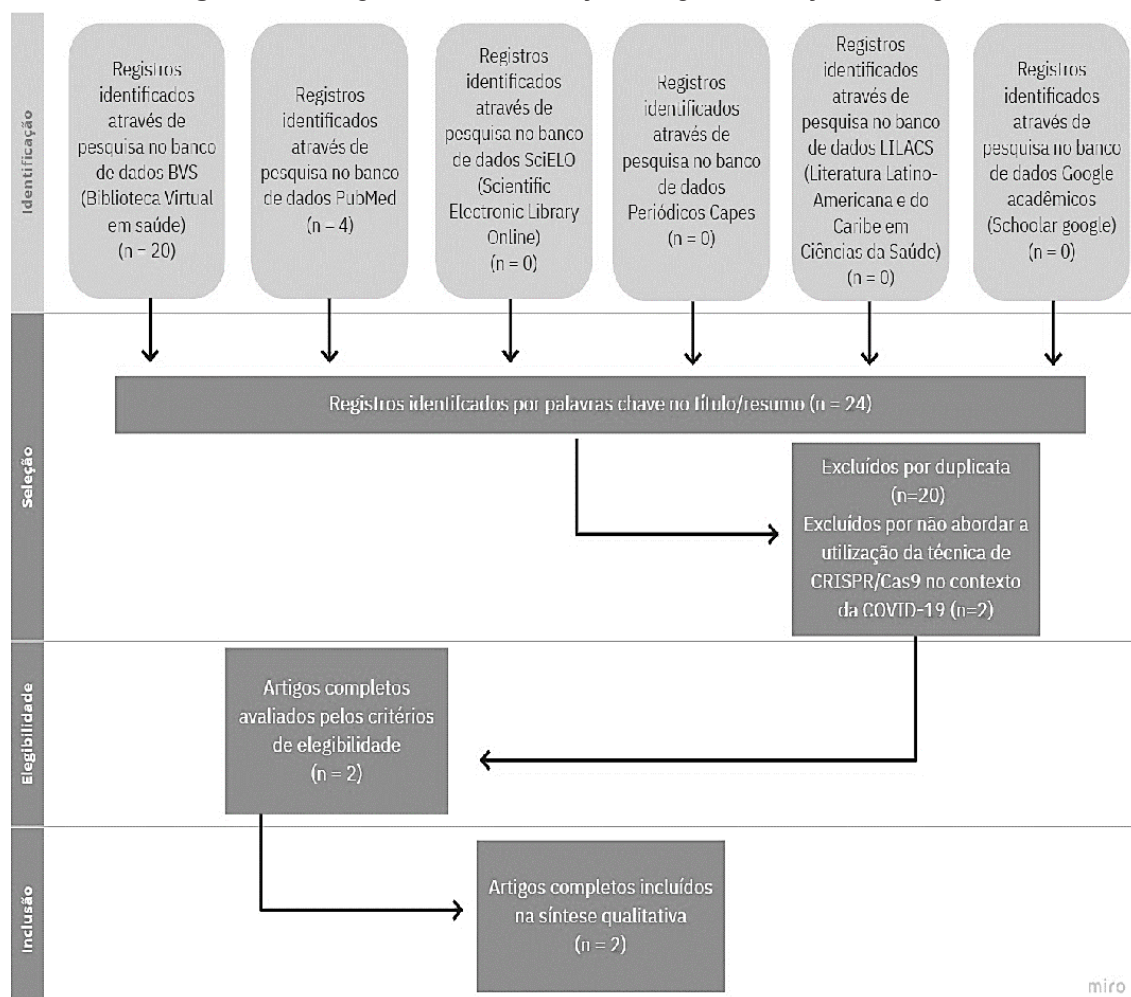
A figura 1, a seguir, apresenta as 8 possibilidades de pesquisa utilizando das palavras-chave incluídas na metodologia. A figura 2, por outro lado, apresenta o fluxograma de seleção dos artigos que compuseram o presente estudo, segundo a metodologia de PRISMA (GALVÃO; PANSANI; HARRAD, 2015).

Figura 1: Possibilidades de pesquisa utilizando os conjuntos das palavras-chave previamente estabelecidas.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 2: Fluxograma de identificação, triagem e seleção de artigos.



Fonte: Dados da pesquisa.

miro

O quadro 1 a seguir agrupa informações dos dois artigos incluídos na revisão sistemática de literatura.

Quadro 1: Informações sobre artigos incluídos no presente estudo.

Título	Autor e Ano	Tipo de estudo	Periódico	Conclusão
<i>Colorimetric Detection of SARS-CoV-2 and Drug-Resistant pH1N1 Using CRISPR/dCas9</i>	MOON et al., 2020	Estudo <i>in vitro</i>	ACS sensors	Prevê-se que um método simples de detecção de vírus baseado em <i>CRISPR/dCas9</i> pode ser útil para o diagnóstico de pacientes atuais com COVID-19, bem como de vírus reemergentes resistentes a medicamentos no futuro
<i>CRISPR-based techniques: Cas9, Cas13 and their applications in the era of COVID-19</i>	ZAAMI et al., 2021	Artigo de opinião	European Review for Medical and Pharmacological Sciences	A edição do genoma da linha germinativa, sem dúvida, mantém grande promessa para o futuro da ciência médica: a evolução natural das terapias genéticas atuais. Para enfrentar com eficácia algumas das questões aqui analisadas, deve-se adotar o princípio da cautela e da responsabilidade para com as gerações futuras.

Desde o primeiro relato de que o sistema *CRISPR/Cas* pode ser utilizado para a detecção de ácidos nucleicos, diversos métodos de detecção de doenças foram desenvolvidos, como o diagnóstico baseado em *SHERLOCK* e *DETECTR*, *DNA FISH* (métodos que envolvem outras endonucleases como a *Cas13a* e *Cas12a*), mediado por *CRISPR*, *CRISPR-dCas9* imobilizado em um transistor de efeito de campo de grafeno e método de amplificação de deslocamento de fita acionado por *CRISPR/Cas9* (MOON et al., 2020).

O sistema *CRISPR/Cas9* tem uma grande margem de crescimento e potencial, graças à sua capacidade de editar qualquer célula, seja ela humana, animal ou vegetal, de forma a corrigir até as mais ligeiras mutações ao nível genético. Além de suas aplicações em pesquisa básica, o *CRISPR/Cas9* pode ser usado em praticamente todos os ambientes biotecnológicos (ZAAMI et al., 2021)

Desde então, várias abordagens baseadas em *CRISPR* foram desenvolvidas para detecção de vírus com a promessa de ser pelo menos tão sensível quanto aquelas baseadas em PCR, pesando a favor da PCR a história científica de 20 anos ou mais de estudos comparados aos 2 anos de introdução das técnicas baseadas em *CRISPR* (MOON et al., 2020).

Comparado aos métodos convencionais baseados em PCR, as abordagens diagnósticas baseadas em *CRISPR* possuem algumas vantagens, incluindo alta especificidade devido ao reconhecimento enzimático do ácido nucleico alvo, tempo de resposta rápido, reação isotérmica conveniente e ampla aplicabilidade devido ao sistema

programável simples (MOON et al., 2020).

Zaami e colaboradores (2021) tratou-se de um artigo de opinião que aborda a utilização das técnicas baseadas em *CRISPR* como a *Cas9* e a *Cas13* e suas aplicações na era da COVID-19. A bactéria utilizada na técnica detecta a presença de DNA viral encapsulado em seu genoma, ela cria uma curta sequência de RNA correspondendo ao DNA do vírus invasor, que então dá origem a uma resposta complexa envolvendo a proteína *Cas9* capaz de excisar DNA em um local preciso.

Por outro, lado Moon e colaboradores (2020) trata-se de um estudo experimental *in vitro* que relata um método de detecção viral colorimétrica de SARS-CoV-2 e H1N1 baseado no sistema *CRISPR/dead Cas9* – endonuclease morta (*dCas9*). As técnicas de detecção por biossensor colorimétrico de moléculas alvo a olho nu ou detectores ópticos portáteis simples têm se destacado devido sua simplicidade, praticidade e custo-benefício.

No estudo os RNAs guias (gRNAs) foram projetados para reconhecer cada vírus, e os complexos *dCas9/gRNA* foram imobilizados em uma microplaca. Lisados virais e biotina-*protospacer adjacente motif* (PAM) foram adicionados a placas de poços *dCas9/gRNA*, seguido de uma enzima peroxidase de rábano (HRP) e consequente reação colorimétrica envolvendo 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) (MOON et al., 2020).

Para detecção foram coletados aspirados nasofaríngeos e amostras de escarro de 5 pacientes com COVID-19 que foram armazenados até o início dos testes. Essas amostras foram obtidas a partir de Yonsei University Health Service Center, um Hospital da Coreia do sul e foram previamente diagnosticadas positivas para COVID-19 usando qRT-PCR (MOON et al., 2020).

Como resultado, a detecção de SARS-CoV-2 foi eficaz embora uma ligeira reação cruzada tenha sido observada entre H1N1 e SARS-CoV-2, a cor amarela foi observada na presença do RNA viral correspondente ao *gRNA* e a intensidade da cor é diretamente proporcional a sua concentração. O ensaio total pode ser realizado em 90 min (MOON et al., 2020).

A sensibilidade e a quantificação desse método são limitadas em comparação com o método baseado em PCR. Porém espera-se que em breve possa ser desenvolvido um método de diagnóstico molecular e imunológico simultâneo para o SARS-CoV-2 combinando a abordagem atual com um novo anticorpo. (MOON et al., 2020).

CONCLUSÃO

No estudo experimental avaliado pôde-se perceber que mesmo que a metodologia tenha apresentado resultados positivos na inserção de um novo método para diagnóstico de doenças virais que, pode ser feito a olho nu, o fato de possuir uma baixa amostragem de apenas 5 pessoas na comparação de seus resultados pode dificultar a confirmação de resultados verdadeiramente significativos

Atécnica de CRISPR/Cas9 é realmente inovadora no ramo da biotecnologia possuindo diversas aplicabilidades. Com a evolução da tecnologia e de um maior conhecimento a cerca dessa técnica, ela tem se mostrado a cada dia mais eficaz, podendo assim baratear e facilitar o diagnóstico em massa de uma doença emergencial como a COVID-19. A pesquisa em torno do método ainda é muito recente e mesmo que essa possua algumas vantagens em relação a métodos convencionais de diagnóstico como a PCR, a inexperiência e a falta de publicações acerca do tema no contexto da COVID-19 ainda dificultam sua aplicação.

REFERÊNCIAS

ALLEN, F. *et al.* Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 1, 2019.

BORRELLI, V. M. G *et al.* The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology. **Frontiers in plant science**, v. 9, n. 1, 2018.

COVID-19 DASHBOARD, Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU), Baltimore, 22/11/2021. Disponível em:

<<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Acesso em: 22/11/2021

FRACZEK, M. G.; NASEEB, S.; DELNERI, D. History of genome editing in yeast. **Yeast**, v. 35, n. 5, 2018.

GALVÃO, T. F.; PANSANI, T. S. A.; HARRAD, D. Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises: A recomendação PRISMA. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 1, 2015.

LIANG, P. *et al.* Developmental history and application of CRISPR in human disease. **The journal of gene medicine**, v. 19, n. 6-7, 2017.

MOON, J. *et al.* Colorimetric detection of sars-cov-2 and drug-resistant ph1n1 using crispr/dcas9. **ACS sensors**, v. 5, n. 12, 2020.

MORENS, D. M. *et al.* Pandemic COVID-19 joins history's pandemic legion. **MBio**, v. 11, n. 3, 2020.

MUNSTER, V. J. *et al.* A novel coronavirus emerging in China - key questions for impact assessment. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, 2020.

PAULES, C. I.; MARSTON, H. D.; FAUCI, A. S. Coronavirus infections—more than just the common cold. **Jama**, v. 323, n. 8, 2020.

SANTOS, T. A *et al.* A tecnologia crispr/cas9 na resistência de plantas contra patógenos fúngicos. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 3, 2021.

TRÖDER, S. E.; ZEVIK, B. History of genome editing: From meganucleases to CRISPR.

Laboratory Animals, v. 1, p. 1, 2021.

WANG, C. *et al.* A novel coronavirus outbreak of global health concern. **The lancet**, v. 395, n. 10223, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Coronavirus. 2020. Acesso em 26/10/2021: > https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1

ZAAMI, S. *et al.* Commentary-CRISPR-based techniques: Cas9, Cas13 and their applications in the era of COVID-19. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 3, 2021.