



CRISPR-CAS9

EM PLANTAS

DESAFIOS ÉTICOS, CIENTÍFICOS E OPORTUNIDADES

**ALTINO BRANCO CHOUPINA
KELLY FERNANDA VIEIRA
PATRICK PASCOAL FERREIRA**

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

DESAFIOS ÉTICOS, CIENTÍFICOS E OPORTUNIDADES

ALTINO BRANCO CHOUPINA
KELLY FERNANDA VIEIRA
PATRICK PASCOAL FERREIRA

Copyright © 2024
by Altino Branco Choupina, Kelly Fernanda Vieira,
Patrick Pascoal Ferreira

Capa
Jorge Figueiredo
Praise Art Designs
<https://praiseartdesigns.com>

Todos os direitos reservados.

ISBN: 9798300888411

DEDICATÓRIA

Dedico este livro a todos os amigos do conhecimento e aos meus filhos Clara e David.

Altino Choupina

Dedico este livro à minha família, que sempre me apoiou, especialmente ao meu esposo, Thiago Ventura, e à minha filha, Violeta Ventura. Agradeço também à minha mãe, Ana Maria, por sempre me encorajar a escrever um livro, e às estimadas amigas que me inspiraram e fortaleceram ao longo desta jornada.

Kelly Vieira

Dedico este livro a toda a minha família, com uma menção especial à minha esposa Rubia Ferreira e aos meus filhos, Eva Ferreira e Ben Ferreira.

Patrick Ferreira

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA.....	3	
ÍNDICE GERAL.....	5	
INDICE DE FIGURAS.....	7	
AGRADECIMENTOS.....	2	
INTRODUÇÃO.....	11	
CAPÍTULO I		
Fundamentos de CRISPR-Cas9.....	13	
1.1 História e Evolução de CRISPR-Cas9.....	14	
1.2 Princípios e Mecanismos de CRISPR-Cas9.....	17	
1.4 Aplicações Farmacêuticas de CRISPR-Cas9.....	25	
1.5 Aplicações Agrícolas de CRISPR-Cas9.....	25	
CAPÍTULO II		
Uso de CRISPR-Cas9 na Proteção Vegetal.....	28	
2.1 Estratégias Moleculares para Resistência Vegetal.....	28	
2.2 Enfrentando Stresse Biótico.....	30	
2.3 Enfrentando Stresse Abiótico.....	32	
CAPÍTULO III.....		34
Edição Genômica de Parasitas com CRISPR-Cas9.....	34	
3.1 Edição no Genoma de Insetos.....	35	
3.2 Edição no Genoma de Fungos.....	38	
3.3 Edição no Genoma de Oomicetes.....	39	
3.4 Controlo Sustentável de Pragas Agrícolas.....	41	
CAPÍTULO IV.....		43
Interferência de RNA: Regulação Genética e Melhoramento Vegetal.....	43	
4.1 Avanços no Melhoramento Vegetal.....	43	
4.2 Funcionamento de Interferência de RNA.....	45	
4.3 RNAi no Melhoramento Genético Vegetal.....	50	
4.4 Comparação entre RNAi e CRISPR-Cas9.....	63	

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

CAPÍTULO V

Aspetos Éticos e Políticos.....	68
5.1 Implicações Éticas e Segurança Alimentar.....	68
5.2 Impactos Ambientais e Socioeconómicos.....	71
5.3 Aceitação Pública.....	74
5.4 Políticas Regulatórias de CRISPR-Cas9.....	75
CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	86
GLOSSÁRIO.....	103
SOBRE OS AUTORES.....	110

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. História do CRISPR	16
Figura 2. <i>Loci</i> CRISPR	19
Figura 3. Mecanismo de Defesa CRISPR-Cas9	23
Figura 4. Aplicações do CRISPR-Cas9	28
Figura 5. Stresses Bióticos	33
Figura 6. Stresses Abióticos	36
Figura 7. CRISPR-Cas9 para Plantas em Perigo de Extinção	38
Figura 8. Técnicas Controlo de Pragas com CRISPR-Cas9	41
Figura 9: Mecanismo do RNAi	55
Figura 10. Expressão de dsRNA em Cloroplastos	61
Figura 11. Análise Morfológica Raízes de <i>Castanea sativa</i>	68
Figura 12. SDS-PAGE Expressão <i>Phytophthora cinnamomi</i>	69
Figura 13. Infecção de raízes da <i>Castanea sativa</i>	71
Figura 14. 72 horas de infecção de <i>Castanea sativa</i>	72
Figura 15: Protocolo Laboratorial para RNAi	74
Figura 16: Protocolo Laboratorial para CRISPR-Cas9	75
Figura 17: Comparação RNAi versus CRISPR-Cas9	77
Figura 18. Mapa Mundial de Políticas Regulatórias	95

AGRADECIMENTOS

Agradecemos, em primeiro lugar, às nossas famílias, que nos apoiaram incondicionalmente ao longo deste percurso, oferecendo paciência, compreensão e incentivo a cada etapa.

Estendemos a nossa gratidão aos alunos, que diariamente nos motivam a procurar novos conhecimentos e a continuar a aprender. Aos colegas e amigos do meio acadêmico, pela partilha de ideias e pela colaboração valiosa, o nosso mais profundo agradecimento.

Manifestamos também a nossa gratidão às instituições de ensino e investigação às quais estamos vinculados, que nos fornecem o suporte e os recursos necessários para o desenvolvimento do nosso trabalho.

Por fim, dirigimos um sincero agradecimento aos leitores por escolherem esta obra. Esperamos que ela inspire novas ideias e contribua para avanços na ciência e na educação. Que juntos possamos continuar a construir um futuro mais inovador e sustentável.

INTRODUÇÃO

A edição genómica por meio do sistema CRISPR-Ca9 representa um avanço significativo na biotecnologia, especialmente no melhoramento genético vegetal, ao permitir a modificação precisa dos genes específicos para enfrentar os desafios contemporâneos da agricultura.

Este estudo tem como objetivo principal realizar uma revisão sistemática da literatura sobre o funcionamento da tecnologia CRISPR-Cas9, destacando as suas vantagens relativamente às técnicas anteriores e discutindo as suas aplicações na proteção vegetal, com ênfase no controlo de pragas, na resistência a stresse bióticos e abióticos, e no fortalecimento da imunidade vegetal. Além disso, o estudo visa refletir sobre os aspetos éticos, políticos e regulamentares envolvidos no uso dessa tecnologia.

O trabalho está organizado da seguinte forma: Na Introdução apresenta-se a metodologia, objetivos e estrutura do presente estudo. No Capítulo I, apresentam-se os fundamentos do sistema CRISPR-Cas9, abordando a sua história, mecanismos de ação, além das suas aplicações médicas, farmacêuticas e agrícolas. Em seguida, no Capítulo II, explora-se o uso dessa tecnologia na proteção de plantas, analisando como as ferramentas moleculares

de CRISPR-Cas9 são empregues para aumentar a resistência vegetal contra o stresse abióticos e bióticos. No Capítulo III, aprofunda-se a edição genómica de parasitas como insetos, fungos e oomicetes, discutindo o seu papel no controlo sustentável de pragas agrícolas. No Capítulo IV, introduz-se a técnica de RNA de interferência (RNAi), uma abordagem alternativa ao CRISPR-Cas9, destacando os seus avanços para conferir imunidade vegetal e resistência a stresse bióticos, além de comparar ambas as técnicas em termos de eficácia e aplicabilidade no melhoramento genético vegetal. Por fim, o Capítulo V examina as implicações éticas envolvidos na utilização de CRISPR-Cas9 na edição genómica, considerando questões relacionadas com a agricultura, segurança alimentar, impactos ambientais e socioeconómicos, bem como a aceitação pública e as políticas regulatórias em diferentes países. A Conclusão, reafirma a importância da tecnologia CRISPR-Cas9 no avanço do melhoramento vegetal, ao mesmo tempo que destaca a necessidade de mais estudos e debates para garantir o seu uso responsável e ético, considerando os desafios e as oportunidades para a agricultura global.

CAPÍTULO I

Fundamentos de CRISPR-Cas9

As tecnologias para modificar o material genético permitiram avanços desde a descoberta da dupla hélice do DNA. Antes do surgimento do sistema de CRISPR-Cas9, as técnicas mais utilizadas para adicionar, remover ou alterar o material genético em locais específicos eram a ferramenta de RNA de interferência (RNAi) que utiliza moléculas de RNA para silenciar genes específicos, reduzindo assim a sua expressão gênica; a técnica ZFNs (Zinc Finger Nucleases) que utiliza proteínas de dedos de zinco para cortar o DNA em locais específicos, permitindo a inserção, deleção ou substituição de genes; e a técnica TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) que é semelhante às ZFNs, mas utiliza proteínas de dedos de transcrição ativada para cortar o DNA em locais específicos. No entanto, as dificuldades de projeto, síntese e validação de proteínas permaneceram uma barreira para a adoção generalizada dessas nucleases projetadas para uso rotineiro. A tecnologia de

CRISPR-Ca9 surge como uma abordagem inovadora, oferecendo uma alternativa mais simples, acessível e eficaz para a edição genômica, com aplicações que vão desde o desenvolvimento de modelos celulares até questões agrícolas e epigenética (Doudna & Charpentier, 2014).

1.1 História e Evolução de CRISPR-Cas9

Em 1987, o pesquisador Yoshizumi Ishino e a sua equipa, da Universidade de Osaka, Japão, investigavam o gene *iap* em bactérias *Escherichia coli* e identificaram um *locus*, uma região peculiar no genoma bacteriano composta por sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas de função desconhecida. Na época, devido à falta de dados de sequência de DNA suficientes, era difícil prever a função biológica dessas sequências repetidas (Bortesi & Fischer, 2015; Ishino et al., 2018).

No ano de 1993, Mojica e investigadores da Universidade de Alicante, Espanha, replicaram o DNA de Archaea e descobriram repetições regularmente espaçadas em áreas específicas. Eles relataram a presença

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

de longos trechos de repetições em “tandem” no genoma do halofílico Archaeas *Haloferax mediterranei* e *Haloferax volcanii* (Gostimskaya, 2022; Mojica et al., 1995).

No início dos anos 2000, Mojica e a sua equipa revelaram que as sequências espaçadoras de CRISPR eram semelhantes às sequências de bacteriófagos, vírus, arqueas e plasmídeos constituindo um sistema imunológico para proteger organismos procariotas de infeções virais. Em 2002, a sigla CRISPR, acrónimo do inglês *C*lustered *R*egularly *I*nterspaced *P*alindromic *R*epeats (Repetições Palindrómicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas), foi oficialmente criada para nomear essas sequências (Bolotin et al., 2005; Ishino et al., 2018; Guo et al., 2022).

No ano de 2005, Bolotin e a sua equipa descobriram que as sequências espaçadoras tinham origem extracromossômica, sugerindo que a incorporação de fragmentos de genes em estruturas CRISPR poderia ocorrer após a invasão de células procarióticas por DNA estranho. Isso implicou que bactérias com o sistema CRISPR no seu *locus* eram resistentes à infeção por organismos exógenos que

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

compartilhassem sequências espaçadoras homólogas (Bolotin et al., 2005; Bortesi & Fischer, 2015).

Mojica e a sua equipa identificaram um conjunto de genes próximo ao *locus* CRISPR, chamados genes Cas (*CRISPR associated genes*), que codificam proteínas envolvidas no sistema imunológico CRISPR-Cas e fornecem imunidade adaptativa contra elementos genéticos exógenos, como vírus e plasmídeos. Esses genes estão geralmente localizados próximos ao arranjo CRISPR e estão envolvidos nas três etapas da imunidade CRISPR-Cas: adaptação, expressão e interferência. Esses estudos esclareceram que o sistema CRISPR-Cas é um sistema imunológico adaptativo dos procariotas que o utilizam como “memória de invasões anteriores” (Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2015).

Em 2012, Jennifer Doudna da Universidade da Califórnia, Estados Unidos, e Emmanuelle Charpentier da Universidade da Umeå, Suécia, desenvolveram o sistema CRISPR-Cas9 como uma ferramenta de edição de genoma programável, conhecidas como tesouras genómicas. Devido à excelente capacidade de atingir e clivar sequências específicas de DNA, o CRISPR foi

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

projetado como uma ferramenta de edição genética em 2012. Em comparação com as ferramentas anteriores, incluindo ZFNs e TALENs, a técnica de edição de genes baseada em CRISPR tem um desempenho extremamente melhor. Atualmente, o CRISPR-Cas9 tem sido um método rotineiro e versátil para editar genes em todo o mundo (Charpentier et al., 2012; Guo et al., 2022).

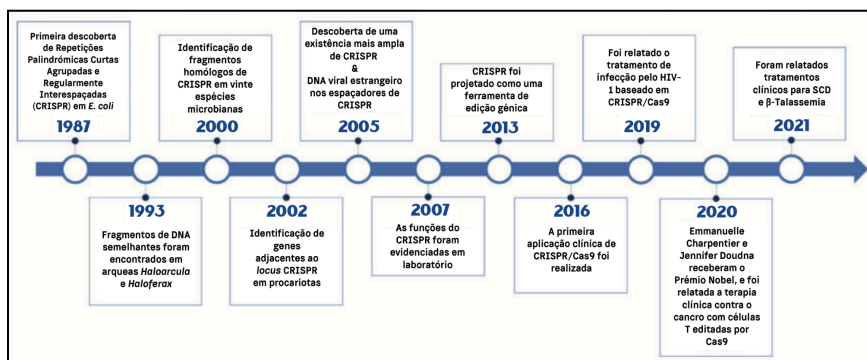


Figura 1. História do CRISPR

Descoberta em *E. coli* em 1987, a CRISPR evoluiu para uma ferramenta eficaz de edição genética, sendo atualmente aplicada em diversos tratamentos clínicos. Adaptada de Guo et al. (2022).

1.2 Princípios e Mecanismos de CRISPR-Cas9

O sistema CRISPR-Cas9 é composto por sequências CRISPR e a proteína Cas9. No processo de edição do genoma com CRISPR-Cas9, o RNA guia (gRNA ou sgRNA) é formado pela combinação do RNA

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

CRISPR (crRNA) e do RNA de transativação (tracrRNA) do crRNA, que desempenha um papel fundamental no corte direcionado (Min et al., 2022).

O sistema de imunidade adaptativa atua como uma defesa contra invasores, como bacteriófagos, transposons e plasmídeos. Bactérias e Archaeas incorporam partes do material genético desses invasores no seu próprio genoma, na região CRISPR, para se protegerem contra futuras invasões (Ferreira & Choupina, 2022; Jinek et al., 2012).

O RNA guia único (gRNA ou sgRNA) é uma molécula quimérica resultante da fusão de crRNA e tracrRNA e é responsável por direcionar-se a sequências específicas do material genético do invasor. A proteína Cas9 associada ao CRISPR é uma endonuclease que age como uma “tesoura molecular” que corta ambas as fitas do DNA num local específico (Doudna & Charpentier, 2014; Ferreira & Choupina, 2022; Gostimskaya, 2022).

O ‘duplex’ de RNA tracrRNA: crRNA maduros, em conjunto com a proteína Cas9, forma um complexo de interferência que identifica e se liga ao local específico

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

do DNA (Charpentier et al., 2015; Doudna & Charpentier, 2014).

O RNA CRISPR (crRNA) é responsável por identificar o local de clivagem no genoma invasor e direcionar a enzima Cas9 para o alvo específico que se deseja editar no DNA. O RNA de transativação (tracrRNA) é a parte essencial do sistema que permite que o crRNA direcione efetivamente a Cas9 para a sequência de DNA correta (Charpentier et al., 2015; Ferreira & Choupina, 2022; Jinek et al. 2012).

O CRISPR-Cas9 é um sistema de defesa adaptativo que permite aos procariontes se protegerem contra uma possível (re)invasão de elementos genéticos móveis indesejados, como bacteriófagos, transposons e plasmídeos. A imunidade é mediada por nucleases Cas e pequenos RNAs guias (gRNA ou sgRNA), os crRNAs (RNA derivado de CRISPR), que identificam locais específicos no genoma invasor para a clivagem. Esse sistema é composto por dois componentes principais: as proteínas Cas, que agem como catalisadores, e o *locus* CRISPR, que funciona como uma memória genética

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

(Barrangou & Marraffini, 2014; Ferreira & Choupina, 2022).

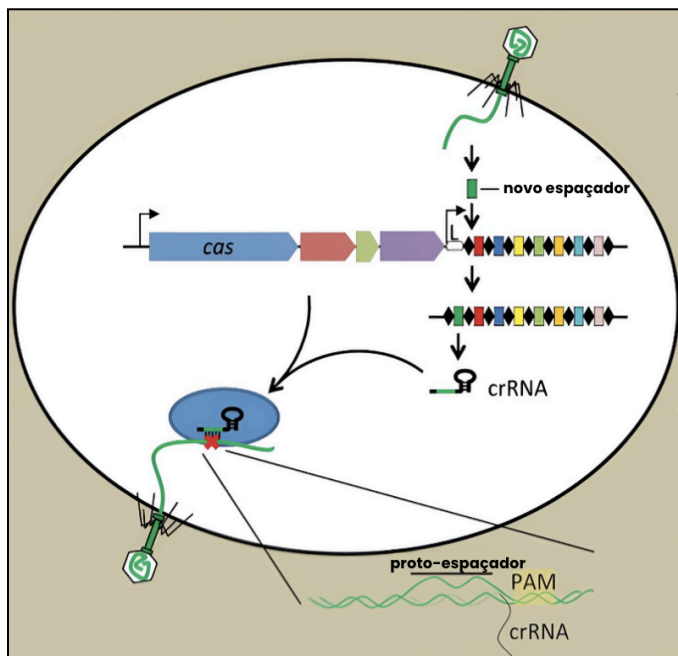


Figura 2. Loci CRISPR

Os loci CRISPR contêm repetições (losangos negros) e espaçadores (retângulos coloridos), flanqueados por uma sequência líder (L) e genes associados a CRISPR (Cas). Imagem adaptada de Barrangou e Marraffini (2014).

O mecanismo de defesa consiste em três etapas: (I) adaptação, (II) biogênese do crRNA e (III) ação contra o invasor (segmentação). Na primeira etapa de adaptação (I), quando a bactéria é infectada pela primeira

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

vez, enzimas Cas (Cas1 e Cas2) clivam o DNA do patógeno em pequenos segmentos, chamados espaçadores os quais são integrados no *locus* CRISPR, situados entre as sequências repetidas. Esses espaçadores formam a memória da infecção (Ferreira & Choupina, 2022; Marraffini, 2013).

A segunda etapa de biogênese do crRNA (II), envolve a transcrição contínua do *locus* CRISPR, mediada pela sequência líder (L), região com alto teor de adenina-timina, que funciona como um promotor. A transcrição deste *locus* resulta na formação de um precursor de “RNA CRISPR” (ou pré-crRNA), que contém múltiplas sequências repetidas e múltiplos espaçadores. Esse pré-crRNA é posteriormente processado para criar RNAs menores, os crRNAs, cada um correspondendo a um espaçador diferente (Ferreira & Choupina, 2022; Marraffini, 2013).

Na terceira etapa (III) de segmentação (ação contra o invasor), os crRNAs maduros com a proteína Cas, formam um complexo que reconhece a sequência genética exógena (plasmídeo, transposon ou vírus) e a destroem introduzindo quebras de fita dupla (DSB) no

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

DNA do invasor (Ferreira & Choupina, 2022; Marraffini, 2013).

Existem três tipos principais de sistema CRISPR-Cas: I, II, e III. Os tipos I e III dependem de conjuntos de proteínas Cas para o direcionamento guiado por crRNA. No Tipo I, um complexo multiprotéico CRISPR RNA (crRNA) chamado *Cascade* reconhece o DNA alvo, clivado por Cas3 (Ferreira & Choupina, 2022; Jiang & Marraffini, 2015).

No Tipo III, o mais complexo de todos, a Cas 10 faz parte de um complexo semelhante a uma cascata que reconhece e cliva o alvo (Ferreira & Choupina, 2022; Jiang & Marraffini, 2015).

O Tipo II é caracterizado pela presença da endonuclease Cas9 guiada pelo crRNA e são os mais simples de todos os sistemas CRISPR-Cas. Neste Sistema, o gene Cas9 é o único necessário para combater o DNA invasor. Durante uma infecção, o complexo Cas9 destrói o genoma viral, contando com o domínio PAM (motivo adjacente ao proto-espaçador) para a identificação do alvo (Ferreira & Choupina, 2022; Zhu, 2022).

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

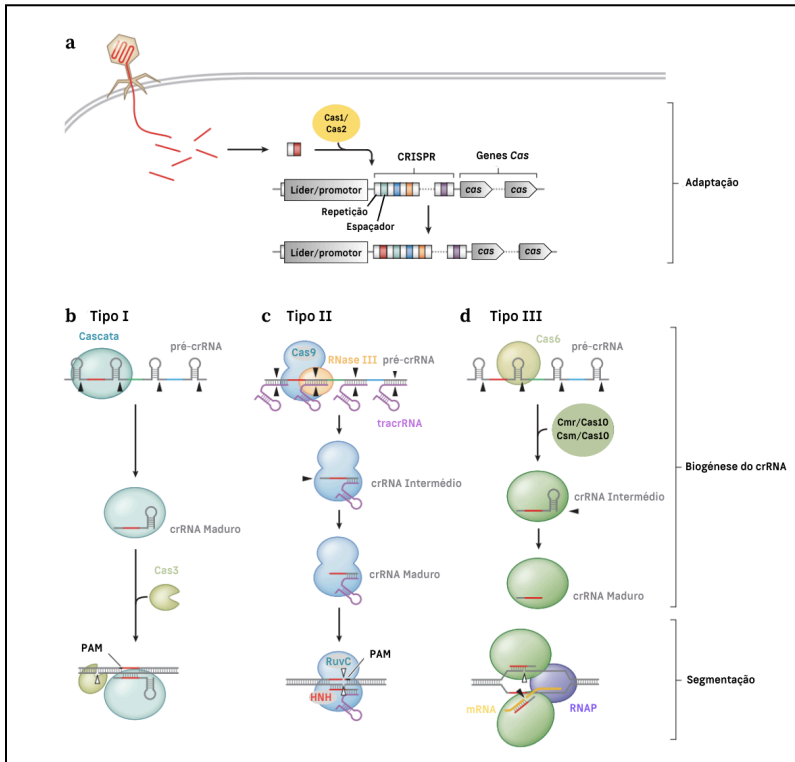


Figura 3. Mecanismo de Defesa CRISPR-Cas9

(a) Etapas do mecanismo de defesa: (I) Adaptação, (II) Biogênese do crRNA e (III) Segmentação. (b) Tipos de sistemas CRISPR-Cas: Tipo I, II e III. Adaptado de Ferreira e Choupina (2022).

1.3 Aplicações Médicas de CRISPR-Cas9

A CRISPR-Cas9 é empregue na terapia génica para corrigir mutações responsáveis por doenças genéticas hereditárias. Isso permite editar genes defeituosos e substituí-los por genes saudáveis. Estudos

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

mostraram que a edição *in vivo* do genoma do fígado com CRISPR-Cas9 tratou com sucesso um rato (modelo de laboratório) com tirosinemia hereditária, além de proporcionar proteção contra doenças cardiovasculares. Além disso, há potencial para tratar condições como anemia falciforme e distrofia muscular, interrompendo genes prejudiciais ou restaurando a função de genes essenciais (Cox et al., 2015; Doudna, 2020).

A tecnologia é usada para estudar genes ligados ao câncer, possibilitando a identificação de mutações específicas e o desenvolvimento de terapias direcionadas. A Cas9 pode modificar genes em células cancerígenas, reduzindo a proliferação e crescimento tumoral em modelos animais. Além disso, a CRISPR-Cas9 é explorada para tratar infecções virais como HIV e herpes (Wang et al., 2016).

A técnica também é investigada na criação de órgãos de suínos geneticamente modificados para transplantes em humanos, o que pode mitigar a escassez de órgãos. A CRISPR-Cas9 é usada para aprimorar terapias com células CAR-T, tornando-as mais eficazes no tratamento do câncer (Niu et al., 2017; Ren et al., 2017).

1.4 Aplicações Farmacêuticas de CRISPR-Cas9

Estudos com a CRISPR-Cas9 são realizados para identificar alvos terapêuticos e genes que conferem resistência a medicamentos. A tecnologia é usada para eliminar genes em células bacterianas ou cancerígenas, identificando genes essenciais e responsáveis pela resistência a medicamentos. Além disso, a CRISPR-Cas9 é aplicada na criação de modelos animais de resistência a medicamentos para estudar esses mecanismos e testar terapias potenciais (Zhang, 2019).

A edição dos genomas mediada por CRISPR-Cas9 também possibilita a geração de modelos transgênicos ampliando a pesquisa biológica para além dos organismos tradicionais, contribuindo para o desenvolvimento de terapias e tratamentos inovadores (Hsu et al., 2014).

1.5 Aplicações Agrícolas de CRISPR-Cas9

A tecnologia de CRISPR-Cas9 é amplamente utilizada na agricultura para o desenvolvimento de culturas com características desejáveis e resistência a diversas ameaças. Conforme o Innovative Genomics

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

Institute (IGI) da Universidade da Califórnia, fundado por Jennifer Doudna, essa tecnologia tem várias aplicações na agricultura (Innovative Genomics Institute [IGI], 2023).

Em pesquisas de melhoramento de plantas, as sequências de DNA são quebradas para descobrir funções genéticas específicas, auxiliando no desenvolvimento de cultivos com características desejáveis. Além disso, a CRISPR-Cas9 é aplicada para criar cultivos resistentes a condições de stress como seca, alta salinidade, calor extremo e frio intenso. Ela também é usada para conferir resistência a pragas, tornando as plantas pouco atraentes ou tóxicas para insetos, vírus, bactérias e fungos patogênicos (IGI, 2023; Karavolias et al., 2021).

Além de melhorar as propriedades comerciais e nutricionais, como sabor, aparência e vida útil dos alimentos, a tecnologia é empregue na produção sustentável de biomassa. Isso envolve criar plantas mais eficientes na conversão da luz solar em biomassa, visando alimentar a crescente população mundial de forma sustentável. Ademais, a CRISPR-Cas9 é utilizada para transformar plantas em fábricas biológicas,

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

produzindo produtos terapêuticos, vacinas e aumentando a eficácia da captura de carbono para auxiliar na adaptação às mudanças climáticas e na conservação de espécies ameaçadas. Na agricultura animal, a técnica é empregada no desenvolvimento de raças específicas com características melhoradas e resistência a doenças (IGI, 2023).

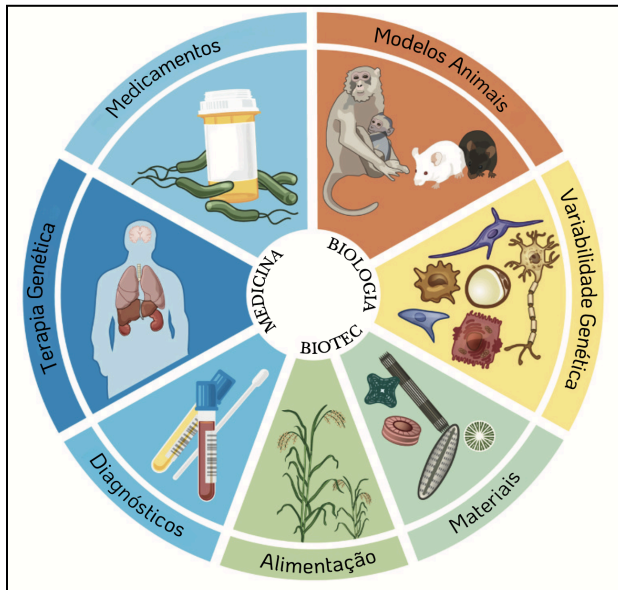


Figura 4. Aplicações do CRISPR-Cas9
CRISPR tem amplas aplicações em medicina, biotecnologia e agricultura. A tecnologia permite editar genomas e transcriptomas em células eucarióticas para criar modelos biológicos, desenvolver novos produtos e materiais, e melhorar a saúde humana por meio de diagnósticos, terapias e estudo de doenças. Adaptado de Zhang (2019).

CAPÍTULO II

Uso de CRISPR-Cas9 na Proteção Vegetal

As plantas, assim como os humanos, enfrentam constantes ameaças de infecções e ataques de pragas, resultando em perdas significativas para os agricultores e colocando em risco variedades inteiras de plantas. A tecnologia de CRISPR-Cas9 é uma ferramenta usada pelos investigadores da área da agronomia para combater esses problemas tornando os cultivos mais resistentes (IGI, 2023).

2.1 Estratégias Moleculares para Resistência Vegetal

Pesquisadores utilizam CRISPR-Cas9 para fortalecer os Genes de Resistência (Genes R) das plantas, introduzindo mutações em genes R para aprimorar a sua função e aumentar a resistência das plantas a patógenos. Num estudo, plantas de trigo foram modificadas para editar genes R associados à resistência a patógenos necrotróficos, resultando em variedades mais resistentes (Kieu et al., 2021; Poddar et al., 2023).

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

Os Genes de Suscetibilidade (Genes S) podem ser modificados para reduzir a patogenicidade. No caso das batatas, a técnica de edição genômica CRISPR-Cas9 foi empregada para introduzir mutações em Genes S, conferindo maior resistência à requeima tardia, uma doença causada pelo oomicete *Phytophthora infestans*. As variedades de batata resultante são mais resistentes, reduzindo a necessidade do uso de fungicidas (Dong & Ronald, 2019; Kieu et al., 2021).

Plantas geneticamente modificadas com CRISPR-Cas9 são criadas para conferir resistência a herbicidas, permitindo que esses produtos químicos eliminem as ervas daninhas sem prejudicar as culturas de plantas cultivadas. Um estudo realizado por Butt et al. (2017) envolveu plantas de arroz modificadas para serem tolerantes a herbicidas inibidores de acetolactato sintase (ALS), através da introdução de mutações direcionadas no gene ALS. O método de edição de cgRNA/Cas9 foi usado para gerar resistência a herbicidas em plantas de arroz, visando o gene ALS para mutagênese e reparo, resultando em plantas resistentes ao herbicida (BS) bispiribac sódico (Butt et al., 2017; Dong et al., 2021).

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

Os agricultores adotam cultivos transgênicos resistentes a herbicidas, onde a tecnologia CRISPR-Cas9 é utilizada para adicionar DNA bacteriano nas plantas. Isso permite que essas plantas produzam proteínas bacterianas que as tornam mais resistentes a produtos químicos herbicidas, possibilitando o controle de ervas daninhas sem prejudicar o cultivo (IGI, 2023).

2.2 Enfrentando Stresse Biótico

Os stresses bióticos apresentam uma ameaça significativa para o rendimento e a qualidade das colheitas. Utilizando a técnica de CRISPR-Cas9, pesquisadores conseguiram desenvolver plantas com resistência aumentada a diversos stresses bióticos, incluindo resistência a doenças fúngicas, bacterianas e virais, bem como a insetos. Por exemplo, ao incorporar genes de bactérias fotossintéticas (genes Bt) nas culturas, esses genes produzem uma toxina da bactéria *Bacillus thuringiensis* que atua como um inseticida natural, protegendo os cultivos contra as pragas. Assim, a planta torna-se tóxica para os insetos, mas não é prejudicial para os seres humanos (Chen et al., 2019; IGI, 2023).

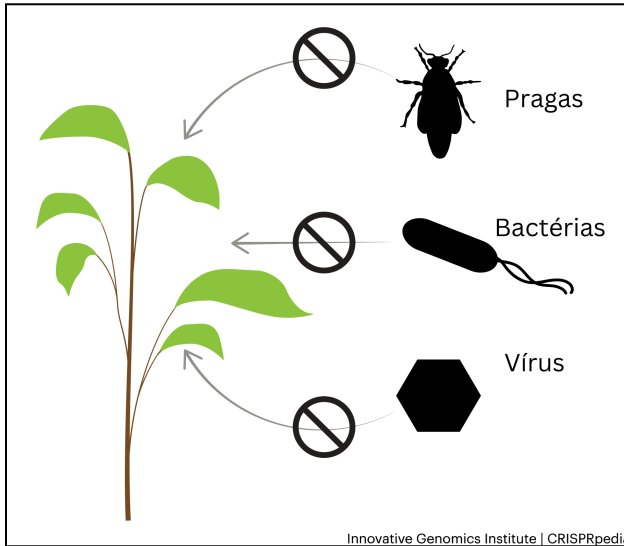


Figura 5. Stresses Bióticos

A edição genética pode tornar as plantas menos atraentes para pragas ou resistentes a vírus, bactérias e fungos patogênicos. Adaptado de IGI (2023).

Em estudos recentes, plantas de trigo foram modificadas para aumentar a resistência de doenças causadas por oídio em trigo, desativando os seis alelos TaMLO (*Mildew-Resistance Locus O*), genes do *locus O* de resistência ao oídio, enquanto em tomates, a desativação do gene MLO (*Mildew-Resistance Locus O*), genes do *locus O* de resistência ao oídio, conferiu resistência à mesma doença fúngica. No arroz, a técnica foi empregada para tornar as plantas resistentes à doença fúngica brusone, desativando o gene OsERF922 (fator de transcrição

presente no arroz). Além disso, no caso da bacteriose em arroz causada pela *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, a deleção do promotor OsSWEET13 (gene presente no arroz que regula o transporte de açúcar) proporcionou resistência. Quanto às doenças virais, CRISPR-Cas9 foi utilizado para desenvolver arroz resistente à doença de tungro, pepino resistentes ao potyvírus e algodão resistente ao vírus do enrolamento das folhas (Chen et al., 2019).

2.3 Enfrentando Stresse Abiótico

As mudanças climáticas também ameaçam as safras, com eventos como seca, alta salinidade, calor extremo e frio intenso. A edição genômica por meio de CRISPR-Cas9 têm o potencial de tornar as safras mais resistentes a essas condições extremas (IGI, 2023).

Além dos stresses bióticos, os abióticos, como a contaminação do solo por metais pesados tóxicos, também representa um desafio. A contaminação das terras aráveis criou a necessidade de prevenir a acumulação de metais pesados tóxicos nas culturas. Ao eliminar os genes OsARM1, OsNramp5 e OsHAK1, os agricultores desenvolveram variedades de arroz com

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

baixos níveis de cádmio, céσιο radioativo e arsênio. No caso do tomate, a redução da expressão do gene HyPRP1 por meio de RNAi melhorou várias tolerâncias ao stresse abiótico, incluindo o stresse osmótico, utilizando a técnica de CRISPR-Cas9 para eliminar SIHyPRP1 e aumentar a resistência à salinidade nos cultivos de tomate (Chen et al., 2019; Tran et al., 2020).

Além disso, no milho, genótipos foram desenvolvidos com tolerância à seca. A tecnologia de CRISPR-Cas9 foi utilizada para inserir ou substituir a região promotora do gene *Auxin regulated gene involved in organ size* — ARGOS8 um gene que regula o crescimento das plantas. A expressão constitutiva desse gene demonstrou aumentar o rendimento dos grãos de milho em condições de stresse hídrico (Shi et al., 2017).

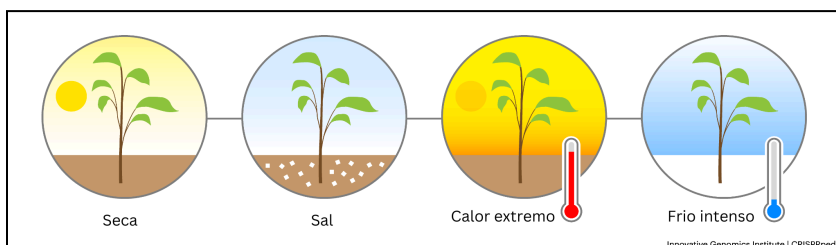


Figura 6. Stresses Abióticos

As plantas enfrentam ameaças externas, como seca, salinidade, calor e frio extremos. Adaptado de IGI (2023).

CAPÍTULO III

Edição Genómica de Parasitas com CRISPR-Cas9

A segurança alimentar global, as doenças transmitidas por vetores, a sustentabilidade ambiental com as mudanças climáticas representam grandes desafios do século XXI. No oeste dos Estados Unidos, as alterações climáticas aumentam as populações dos escaravelhos-da-casca nas árvores de coníferas, o que, por sua vez, agrava os problemas dos incêndios florestais por deixar vastas áreas de florestas com árvores mortas e secas. Já na costa leste dos Estados Unidos, um fungo que provoca o cancro de castanheiros matou mais de 4 mil milhões de castanheiros americanos no século XX, devastando ecossistemas selvagens e afetando as comunidades que dependiam deles. Diante dessas abordagens, as ferramentas de CRISPR poderiam ser potencialmente usadas para tornar estas espécies resistentes a pragas ou infeções, ajudando a restaurar a biodiversidade e a apoiar a conservação das plantas (IGI, 2023; Yan et al., 2023).



Figura 7. CRISPR-Cas9 para Plantas em Perigo de Extinção
A edição genômica com CRISPR-Cas9 pode tornar espécies de plantas ameaçadas mais resistentes, ajudando na sua conservação. Adaptado de IGI (2023).

3.1 Edição no Genoma de Insetos

Nas últimas duas décadas, pragas de insetos como a *Drosophila suzukii*, uma praga global que infesta frutas durante a fase de maturação, *Ceratitis capitata* (mosca medfly), praga global nativa do Mediterrâneo que infesta diversas espécies frutíferas, *Pectinophora gossypiella* (lagarta pink bollworm), praga invasora na maioria das regiões produtoras de algodão do mundo e *Diaphorina citri* (psílido cítrico asiático), vetor do vírus huanglongbing dos citros presentes na Ásia e no sul dos Estados Unidos, desempenham um papel significativo nas perdas agrícolas. Essas pragas e as doenças infecciosas transmitidas por insetos vetores têm-se espalhado

globalmente, intensificando os desafios agrícolas e de saúde pública (Yan et al., 2023).

Conforme apontado por Yan et al. (2023), existem várias técnicas de controlo genético para pragas de insetos. A técnica SIT (Técnica do inseto estéril) envolve a esterilização de insetos machos por radiação e a sua libertação na natureza para acasalar com fêmeas selvagens, reduzindo a população de pragas. No entanto, as fêmeas esterilizadas que são colibertadas acasalarão com os machos esterilizados e reduzirão a eficácia do controlo. Assim, o SIT guiado com precisão (pgSIT) tem como alvo simultaneamente, genes que conferem letalidade específica para fêmeas e esterilidade específica para machos. O Gene Drive baseado em CRISPR (GD), por outro lado, é uma inovação que possibilita a transmissão de um gene modificado para a maioria dos descendentes, aumentando assim a frequência de um gene específico na população de insetos. A Distorção da Proporção Sexual CRISPR-Cas9 (CRISPRSD) tem como alvo seletivo sequências, que estão localizadas exclusivamente no cromossoma X, causando assim “desgaste de X” ou “envenenamento de X”. Esse

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

método resulta principalmente em espermatozoides portadores do cromossoma Y e produz uma população com tendência masculina. Já os insetos de Sexagem Genética projetadas por CRISPR (CRISPR-GSS) geram descendentes de um único sexo, uma estratégia útil em conjunto com outras estratégias de controlo genético para reduzir a população de pragas de insetos (Green, 2019; Singh et al., 2022; Yan et al., 2023).

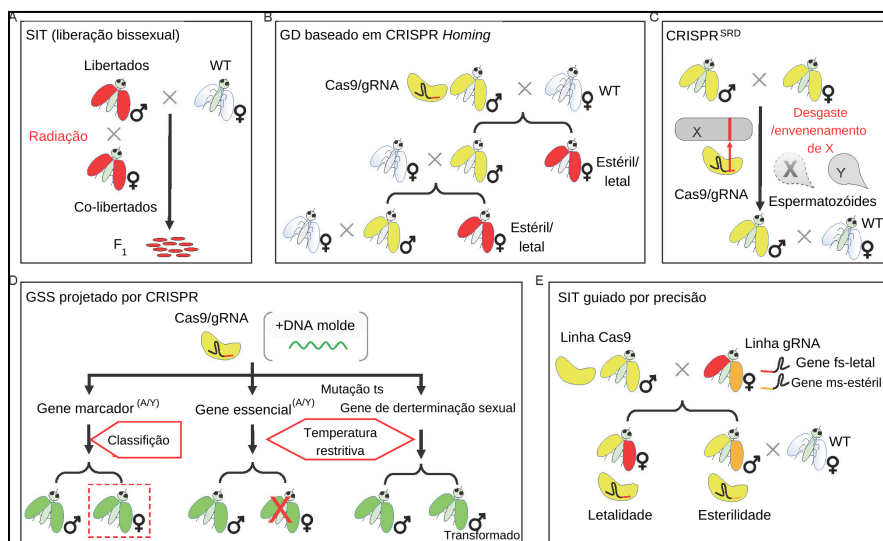


Figura 8. Técnicas Controlo de Pragas com CRISPR-Cas9
(A) Técnica de insetos estéreis (SIT); **(B)** *Gene drive* (GD); **(C)** Distorção da proporção sexual (CRISPR-SRD); **(D)** Sexagem genética (CRISPR-GSS); **(E)** SIT guiado por precisão (pgSIT). Adaptado de Yan et al. (2023).

3.2 Edição no Genoma de Fungos

Outra área importante para a agricultura é o controle dos ataques fúngicos nas colheitas. O fungo *Pyricularia oryzae* é o principal patógeno causador da brusone do arroz, que consegue infectar todas as partes das plantas, incluindo folhas, hastes, raízes e grãos. A edição genômica fúngica com CRISPR-Cas9 apresenta um potencial promissor (Yamato et al., 2019).

Essa tecnologia possibilita a criação de genótipos de fungos capazes de competir com patógenos de plantas, desencadeando respostas de defesa mais eficazes. A edição genética viabiliza a indução de mutações em genótipos virulentos, resultando em estirpes virulentas que competem diretamente com as virulentas ou induzem respostas de defesa nas plantas. Segundo Muñoz et al. (2019), uma abordagem semelhante foi descrita por outros pesquisadores em plantas de morango, onde o isolado virulento F7 (estirpe número 7 deste fungo) do *Colletotrichum fragariae* conferiu proteção completa contra a infecção causada por outro fungo *Colletotrichum acutatum* e também aumentou a resistência da planta contra o fungo *Botrytis cinerea* através da

indução das respostas de defesa da planta. Da mesma forma, o uso de um fungo isolado atenuado (estirpe modificada e enfraquecida) de *Verticillium nigrescens* reduziu a murcha do algodão causada por um isolado virulento de *Verticillium dahliae* (Muñoz, et al., 2019; Yamato et al., 2019).

3.3 Edição no Genoma de Oomicetes

O *Phytophthora sojae*, um oomicete, representa uma ameaça significativa às plantações de soja, causando a podridão radicular. Nesse contexto, a edição genética com CRISPR-Cas9 foi empregada para editar o gene Avr1b deste oomicete. O objetivo foi tornar a cepa do patógeno virulenta em plantas de soja que possuem o gene Rps1b, conferindo resistência à estirpe, visando, portanto, desenvolver estratégias para controlar a infecção por esse patógeno nas plantas de soja (Wang et al., 2020).

Outro desafio fito patogénico enfrentado pelos agricultores é o oomicete *Phytophthora capsici*, um patógeno altamente destrutivo para as culturas de *Solanaceae*, como pimenta e tomate, culturas de leguminosas, como feijão-lima e feijão-espada verde, e a

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

maioria das plantas de *Cucurbitaceae*. A tecnologia de edição genética CRISPR-Cas9 foi aplicada neste contexto, utilizando a estratégia de substituição gênica mediada por CRISPR no genoma de *Phytophthora capsici*. O objetivo foi determinar o papel da fosfodiesterase de alta afinidade (PcPdeH) na regulação do crescimento polarizado e da patogenicidade desse patógeno. Esse estudo não apenas reduziu a virulência em plantas de pimenta e tabaco, mas também avançou no entendimento sobre estratégias de patogenicidade em oomicetes (Li et al., 2020).

Além disso, a aplicação inovadora da edição genética em oomicetes, usando CRISPR-Cas9 como ferramenta baseada em marcadores permitiu a introdução de mutações pontuais em genes relacionados à resistência a fungicidas. A tecnologia foi empregada num isolado selvagem de *Phytophthora capsici*, visando avaliar a função do gene em questão e aprofundar a compreensão sobre a resistência do fungo ao fungicida (Schuster & Kahmann, 2019).

3.4 Controlo Sustentável de Pragas Agrícolas

A agricultura é uma atividade essencial para a produção global de alimentos e a subsistência de milhões de pessoas em todo o mundo, mas têm enfrentado diversos desafios no século XXI, incluindo o aumento da demanda, a escassez de recursos, as mudanças climáticas e as pragas agrícolas. Estes organismos, como insetos, fungos, oomicetes, nematoides, bactérias, vírus, ervas daninhas, roedores, entre outros, danificam as plantas cultivadas, reduzindo a qualidade e a quantidade da produção. Mais de mil pesticidas existem atualmente no mercado e o seu consumo em todo o mundo é estimado em mais de quatro milhões de toneladas anuais. No entanto, o uso intensivo desses pesticidas químicos no controlo de pragas agrícolas causam problemas ambientais e de saúde pública, contaminam o solo, a água e os alimentos, além de desenvolver a resistência a pragas, prejudicando o ecossistema e a saúde humana (Singh et al., 2022; Yan et al., 2023).

Neste cenário, estratégias e alternativas de manejo sustentável de pragas são uma necessidade atual. A CRISPR-Cas9 se mostrou como uma ferramenta

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

promissora para o controlo biológico de pragas. Esta tecnologia permite a modificação precisa do genoma de organismos que prejudicam as plantas cultivadas, reduzindo a dependência dos agricultores ao uso de pesticidas químicos. Técnicas mediadas através CRISPR-Cas9 como a resistência contra insetos, a eliminação de genes suscetíveis ao hospedeiro, a aplicação de transformação genética para silenciar genes supostamente envolvidos na patogenicidade e técnicas como a de indução de mutações genéticas nos genótipos virulentos são estratégias para o biocontrolo de pragas (Chen et al., 2019; Green, 2019; Moon et al., 2022; Singh et al., 2022).

A edição genética CRISPR-Cas9, aliada aos avanços nas tecnologias de sequenciamento e bioinformática, surgiu como uma ferramenta eficaz para o controlo sustentável de pragas agrícolas, possibilitando reduzir a dependência dos agricultores aos pesticidas químicos, aumentando a qualidade das culturas e minimizando os impactos ambientais e sociais da agricultura (Moon et al., 2022; Yan et al., 2023).

CAPÍTULO IV

Interferência de RNA: Regulação Genética e Melhoramento Vegetal

O desejo do homem de melhorar as plantas, não é algo novo; há cerca de 10 mil anos, quando começou a domesticação das plantas, o homem já tentava favorecer o aparecimento de certas características em detrimento de outras através de métodos convencionais, com o objetivo, por exemplo, de desenvolver novas variedades de culturas. Grande parte do desenvolvimento da sociedade moderna ocorreu principalmente graças a esse melhoramento convencional de plantas, que aumentou significativamente a quantidade e a qualidade dos alimentos disponíveis para a humanidade (Mohanta et al., 2017a).

4.1 Avanços no Melhoramento Vegetal

Programas de melhoramento pré-genómico, isto é, aqueles essencialmente guiados pela mutagénese por meio de compostos químicos ou irradiação, cruzamentos intergenéricos e reprodução por translocação para

permitir a seleção das mutações desejadas, apresentam algumas desvantagens, incluindo a falta de especificidade (Chen et al., 2019). O que acontece frequentemente é que grandes porções do genoma são transferidas em vez de um único gene; outro caso muito comum é a mutação de milhares de nucleótidos em vez de um. Foi para superar esses problemas que surgiram vários programas de melhoramento transgênico no final do século XX (Mohanta et al., 2017a). Recentemente, surgiu a era pós-genômica, que permitiu o acesso rápido a dados muito valiosos do ponto de vista biológico, nomeadamente, o acesso às sequências genômicas de diversas culturas vegetais, revolucionando assim os programas de melhoramento genético. A sequenciação completa do genoma, a sequenciação do transcriptoma, a identificação de pequenos polimorfismos de nucleótidos (SNP) e outros marcadores moleculares permitiram a criação de mapas genéticos de inúmeras espécies de plantas de importância agronômica (Mohanta et al., 2017b).

Nos últimos anos, o número de ferramentas e técnicas que permitem adicionar, remover ou alterar

material genético em locais específicos do genoma aumentou significativamente (MacDonald & Deans, 2016; Rajput et al., 2021). As moléculas de RNA realizam diversas tarefas importantes nas células, como o transporte de informações genéticas (rRNA — leitura do código genético, e tRNA, síntese proteica). Ao contrário do que se pensava, recentemente vários estudos (Rajput et al., 2021; Pathak & Gogoi (2016) demonstraram a importância que o RNA não codificante tem no desempenho de inúmeras funções de proteção do genoma contra vírus e elementos transponíveis, mas também na regulação da expressão genética.

4.2 Funcionamento de Interferência de RNA

O fenômeno do silenciamento de genes foi inicialmente descoberto acidentalmente em flores de *Petúnia*, quando *Carolyn Napoli* e colaboradores tentavam intensificar a cor das flores aumentando a expressão de um gene envolvido na produção de pigmentos. Surpreendentemente, isso resultou em flores variegadas em vez das esperadas flores roxas devido à supressão da expressão tanto do gene endógeno quanto do transgene. Mais tarde, *Fire* e pesquisadores observaram o mesmo

episódio em nemátodes *Caenorhabditis elegans*, quando a introdução de dsRNA levou ao silenciamento eficaz de genes endógenos (Rajput et al., 2021).

As células eucarióticas têm um sistema de regulação genética natural evolutivamente conservado, denominado interferência de RNA. Alguns autores mencionam que este sistema foi desenvolvido para fornecer proteção às células contra invasores de DNA estranhos, enquanto ajuda a manter a estabilidade genômica, a modificação epigenética e a regulação de transposons e o controle dos processos de transcrição celular (Gill et al., 2021; Mamta & Rajam, 2018).

Em 2006, *Fire e Mello* receberam o Prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina. Este prémio foi atribuído a estes investigadores por descobrirem que foi o RNA de cadeia dupla que permitiu o silenciamento bem-sucedido do gene alvo. O estudo teve como objetivo analisar a regulação da produção de proteína muscular em *C. elegans*. Os pesquisadores descobriram que não foi nem o mRNA, nem o RNA antisense que afetaram a produção de proteínas, mas sim o RNA de fita dupla (dsRNA). Os pesquisadores chamaram esse fenómeno de

“interferência de RNA”-(RNAi (Fire et al., 1998; Danaholt, 2006). Embora os investigadores tenham analisado a capacidade do RNAi usando dsRNA exógenos, o mecanismo de interferência do RNA também pode ser desencadeado pelo grampo endógeno de fita única. No caso da expressão génica em plantas, por exemplo, esta pode ser regulada por meio de pequenos RNA endógenos (sRNA), que podem ser divididos em small interfering RNA (sRNAi) e microRNA (mRNAi) (Lunardon et al., 2020). Segundo os autores, *Lunardon et al., 2021* mRNAi podem ser utilizados quando o objetivo é silenciar simultaneamente múltiplos alvos através da produção de precursores de mRNAi policistrónicos (Lunardon et al., 2021).

Em alguns casos, o RNAi pode conferir resistência a vírus ou outras infeções por patógenos. Vários elementos e vírus transponíveis produzem RNA de cadeia dupla em algum momento dos seus ciclos celulares, pelo que o RNAi ajuda a manter estes potenciais invasores sob controlo.

Em geral, o mecanismo do RNAi funciona da seguinte forma: o RNA de fita dupla (dsRNA) pode

estar presente na célula como RNA exógenos (vindos de origem externa, por exemplo, vírus ou criados em laboratório) ou RNA endógenos (de origem interna, transcrita) de genes nucleares. Esses dsRNA são reconhecidos e clivados em pequenos RNAs interferentes (21 a 28 nucleótidos de comprimento) pelo complexo proteico contendo DICER, resultando em sRNAi ou mRNAi, respetivamente.

O sRNA ou mRNA resultante associa-se a complexos silenciadores induzidos por RNA (RISC), que contém uma proteína catalítica, ARGONAUTE (AGO) (Hutvagner & Simard, 2008) e outras proteínas efetoras e levam à degradação do RNA mensageiro alvo (Wilson & Doudna, 2013).

O RNAi pode ser caracterizado como a capacidade do dsRNA endógeno ou exógeno de inibir a expressão de um gene cuja sequência é complementar a ele (Dash, et al., 2015); ver figura 9. Se o sRNAi emparelhar 100% com a sequência de mRNA alvo, o AGO cliva o mRNA alvo e promove a sua degradação. Por outro lado, se o emparelhamento não for perfeito (<100%) esta clivagem não ocorre, e os complexos mRNA/RISC associam-se

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

aos corpos P, com consequente inibição da tradução pelos ribossomas. No entanto, ambas as vias resultam em expressão gênica reduzida (q).

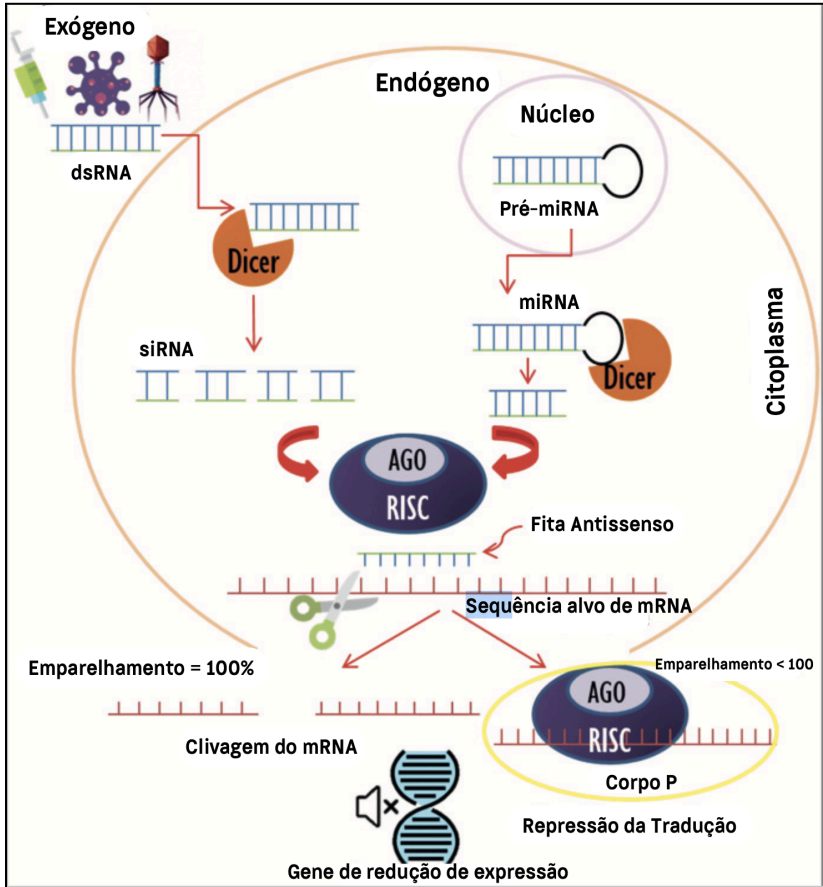


Figura 9: Mecanismo do RNAi

Ilustração do mecanismo do RNAi. Imagem adaptada de Moreira et al. (2020).

4.3 RNAi no Melhoramento Genético Vegetal

No âmbito agrícola, o RNAi tem se mostrado eficaz no fortalecimento da imunidade das plantas e na criação de resistência contra o stresse biótico. A especificidade alvo do RNA de fita dupla (dsRNA), devido ao seu modo de ação sequência-específico, coloca o dsRNA numa posição importante na tecnologia de inseticidas biosseguros. Os principais alvos de RNAi já identificados incluem genes envolvidos em (1) alimentação e digestão, (2) produção de dsRNases, (3) resistência a inseticidas e aleloquímicos de plantas, (4) aptidão reprodutiva e (5) transmissão de vírus de plantas (Saurabh et al., 2014; Willow et al., 2021). No contexto da alimentação e digestão, as pragas ingerem as moléculas de dsRNA, estas são processadas em pequenos fragmentos de interferência de RNA (sRNAi), levando à degradação do mRNA do gene alvo. Isso resulta na inibição da expressão do gene e, conseqüentemente, pode levar à morte da praga ou à redução da sua capacidade de causar danos à planta. O RNAi é altamente específico para as espécies-alvo, minimizando os efeitos em organismo não alvo, e

representa uma alternativa segura e sustentável aos inseticidas químicos convencionais (He, 2022; Timani et al., 2023; Zotti & Smagghe, 2015).

Uma estratégia de RNAi foi utilizada para suprimir a expressão de um gene de inseto, afetando a sua alimentação e digestão, prejudicando o seu crescimento e causando a morte da praga. Nesse método, o dsRNA é expresso em cloroplastos de batata (*Solanum tuberosum*) e direcionado a um gene essencial do inseto, onde é absorvido pela praga durante a alimentação, levando a supressão da expressão do gene-alvo por meio do RNAi. Em estudos recentes, essa abordagem foi aplicada para controlar pragas, onde plantas de batata transplatómicas que expressam dsRNA longo direcionado ao gene b-Actina do inseto *Leptinotarsa decemlineata* acumularam altos níveis de dsRNA nas folhas, tornando-se mais eficazes na inibição da expressão do gene-alvo. O RNAi mediado por cloroplastos também teve efeitos significativos nas lagartas *Helicoverpa armigera* e *Manduca sexta*. Esses insetos-alvo possuem aparelhos bucais mastigadores que trituram e consomem tecidos vegetais sólidos, liberando

assim o dsRNA. Em ambos os casos, a expressão de dsRNA em plantas resultou numa redução significativa na sobrevivência e no crescimento desses insetos alimentados por plantas transplastômicas (He, 2022).

Num estudo recente publicado na revista científica nos Estados Unidos, PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences), foi descrita a aplicação de dsRNA expresso em cloroplasto para controlar o inseto não mastigador *Frankliniella occidentali*, conhecido com o tripé-da-flor-do-oeste. Este inseto é uma praga agrícola destrutiva e vetor de vírus que se alimenta de uma ampla variedade de culturas, tanto ao ar livre quanto em estufas. Os tripés-da-flor-do-oeste possuem peças bucais perfuradoras-sugadoras, as quais utilizam para agarrar as células vegetais e sugar os conteúdos celulares. Devido ao fato desses insetos consumirem o conteúdo das células vegetais, foi sugerido que o dsRNA transplastômico poderia ser uma estratégia eficiente de controlo. Para confirmar essa hipótese, os insetos foram alimentados com uma dieta artificial, plantas selvagens e plantas de tabaco transplastômicas expressando dsRNA direcionado ao gene da proteína flavoproteína

ubiquinona NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido) dresidrogenase 2 de *Helicoverpa armigera*, uma espécie relacionada. A análise de RT-PCR (Reação da Transcriptase Reversa Seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando RNA extraído dos insetos demonstrou que os tripés-da-flor-do-oeste absorveram o dsRNA expresso no cloroplasto ao se alimentarem das folhas das plantas transplastômicas. Além disso, os pesquisadores desenvolveram construções contendo dsRNAs e hpRNAs (RNA que forma uma estrutura de alça) direcionados a genes essenciais desses insetos, e os transformaram nos genomas do cloroplasto e do núcleo para gerar plantas transplastômicas e transgênicas nucleares, respetivamente. Foi observado que os níveis de dsRNAs e hpRNAs nas plantas transplastômicas eram significativamente mais altos do que nas plantas transgênicas nucleares. Quando os insetos se alimentaram de plantas transplastômicas expressando dsRNAs ou hpRNAs, houve uma significativa supressão da expressão dos genes-alvo nos insetos. Os bioensaios dos insetos revelaram uma maior mortalidade de larvas alimentadas com folhas de plantas transplastômicas em comparação com as plantas selvagens. Isso sugere que as

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

plantas transplastômicas apresentam uma resistência mais forte contra os tripés-da-flor-do-oeste, possivelmente devido aos elevados níveis de dsRNA e hpRNA produzidos nos cloroplastos. Ver Figura 10 (He, 2022).

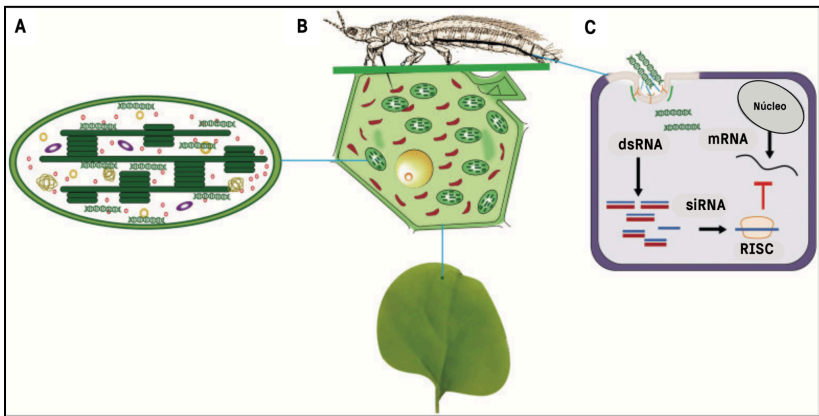


Figura 10. Expressão de dsRNA em Cloroplastos

Expressão de dsRNA em cloroplastos para controle de pragas por RNAi. **(A)** Cloroplastos geneticamente modificados para expressar dsRNA específico de inseto, sem processamento em sRNAi. **(B)** O inseto ingere os cloroplastos contendo dsRNA. **(C)** dsRNA é absorvido pelas células intestinais, processado em sRNAi e usado para silenciar mRNAs do inseto, causando mortalidade. Complexo RISC. Adaptado de He (2022).

Recentemente, pesquisadores exploram a RNAi como uma estratégia para desenvolver variedades de plantas resistentes a ervas daninhas parasitas. De acordo com Saurabh et al. (2014), num estudo conduzido por

pesquisadores, foram produzidas plantas de tomate transgênicas contendo uma sequência de dsRNA M6PR. Neste contexto, o dRNA M6PR foi utilizado para induzir o silenciamento do gene M6PR. Eles observaram que o nível de mRNA M6PR endógeno nos tubérculos e brotos subterrâneos da erva daninha *Orobanche aegyptiaca*, cultivadas em plantas de tomate transgênicas, foi reduzido em 60–80%. Isso resultou numa diminuição significativa nos níveis de manitol e um aumento na percentagem de tubérculos mortos de *Orobanche aegyptiaca*. Esse silenciamento gênico pode levar a efeitos desejados, como a diminuição da sobrevivência ou do crescimento da planta parasita (Saurabh et al., 2014).

Outras abordagens de pesquisas exploram a resistência de plantas a nemátodes por meio de RNAi. Utilizando o RNAi induzido pelo hospedeiro, pesquisadores direcionaram todos os quatro genes de parasitismo de nemátodes do cisto da beterraba sacarina (*Heterodera schachtii*), denominados 3B05, 4G06, 8H07 e 10A06, tendo como hospedeiro a planta *Arabidopsis thaliana*. Embora não tenha sido observada resistência completa, houve uma redução de 23–64% no número de

fêmeas maduras de nemátodes em diferentes linhas de RNAi. Em outro estudo, os pesquisadores direcionaram quatro genes diferentes para construções de RNAi, os quais apresenta alta similaridade com genes do nematoide essencial da soja, *Heterodera glycines*, e do nematoide *Caenorhabditis elegans* para avaliar a sua eficácia na redução de galhas formadas pelo nematoide *Meloidogyne incognita* em raízes de soja. Dos quatro genes, duas construções direcionadas aos genes que codificam a tirosina fosfatase (TP) e a proteína precursora de stresse mitocondrial-70 (MSP), conseguiram reduzir a formação de galhas em 92 e 94,7%, respetivamente, demonstrando o potencial de RNAi como uma estratégia para controlar parasitas de plantas (Saurabh et al., 2014).

O RNAi foi utilizado com sucesso para reduzir a carga viral do Vírus do Mosaico da Mandioca Africana (ACMV) em 99% nos transcritos do gene Rep e 66% no DNA viral. Embora a abordagem de sRNAi funcione somente para estirpes intimamente relacionadas do ACMV, mais de 40 supressores virais foram identificados em vírus de plantas. Além disso, estudos demonstraram a resistência mediada por RNAi à Doença da Estria

Marrom da Mandioca (CBSD), inclusive contra isolados genéticos distantes. Diversos pesquisadores também obtiveram sucesso ao utilizar o RNAi na geração de plantas transgênicas resistentes a diferentes vírus, como a recuperação do feijão-preto da infecção pelo Vírus do Mosaico Amarelo da *Vigna mungo* (MYMIV), feijão-comum resistente ao geminivírus e ao Mosaico Comum do feijoeiro (BCMV), tomate resistente ao Vírus do Enrolamento das Folhas Amarelas do Tomate (TYLC), arroz resistente ao Vírus do Tungro Baciliforme do Arroz (RTBV) e limão resistente ao Vírus da Tristeza dos Citros (CTV), destacando assim o potencial do RNAi na proteção de culturas contra infecções virais (Saurabh et al., 2014).

No caso da resistência bacteriana, estudos demonstraram que o RNAi reduz significativamente a produção de tumores bacterianos em plantas de galha do colo (*Agrobacterium tumefaciens*) para quase zero em *Arabidopsis thaliana*, sugerindo a possibilidade de engenharia de resistência em árvores e plantas ornamentais. Quanto à resistência fúngica, pesquisas mostram que plantas geneticamente modificadas com

RNAi demonstram uma defesa aprimorada contra infecções fúngicas, com a identificação de 24 mRNAs (pequenas moléculas de RNA não codificantes) que responderam à infecção por oídio causada pelo fungo biotrófico *Blumeria graminis f. sp. tritici*, e previram ainda 149 genes alvos que foram potencialmente regulados pelo novo RNAi de trigo (Saurabh et al., 2014).

A técnica de RNAi tem sido empregue para melhorar plantas cultivadas, conferindo-lhes resistência a pragas e reduzindo níveis de toxinas. Por exemplo, na cevada, foi usada para a resistência contra o vírus do nanismo amarelo. Em plantas de arroz, foi utilizada para reduzir o nível de glutamina, resultando num tipo de arroz com menor teor de proteína. Além disso, a RNAi foi usada para produzir sementes de algodão com níveis mais baixos de proteína dietética, tóxica para os seres humanos (Ferreira et al., Jun. 2023).

Vários patógenos de diferentes origens taxonómicas, incluindo bactérias, fungos e oomicetes, secretam e injetam efetores moleculares no apoplasto e citoplasma celular das plantas para estabelecer infecção e suprimir as defesas do hospedeiro. A proteína NPP1

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

(proteína indutora de necrose 1) é uma proteína associada ao oomicete *Phytophthora cinnamomi* e desempenha um papel importante no mecanismo de infecção desse fitopatógeno em plantas hospedeiras, como a *Castanea sativa*. A NPP1 é conhecida por induzir necrose nas folhas e raízes das plantas, levando eventualmente à morte da planta durante a fase necrótica da interação patógeno-hospedeiro. No estudo de Ferreira et al. (Jun. 2023), foi realizada uma análise morfológica das raízes da *C. sativa*. ver figura 11 e a RNAi foi utilizada para silenciar o gene NPP1 em *P. cinnamomi*, resultando numa redução significativa nos sintomas da doença em plantas infetadas. Através da SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida) observou-se que as estirpes transformadas de *P. cinnamomi* apresentaram uma redução significativa ou ausência completa da proteína NPP1. Em comparação com as estirpes selvagens, onde a proteína NPP1 é claramente visível, as estirpes silenciadas apresentaram bandas mais fracas ou inexistentes, ver figura 12. Nos ensaios de infecção, as raízes de *Castanea sativa* infetadas com estirpes silenciadas para NPP1 apresentaram significativamente menos necrose em comparação com aquelas infetadas com

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

cepas selvagens. Isso levou a uma redução dos sintomas da doença, sugerindo que o silenciamento do gene NPP1 teve um impacto positivo na interação patógeno-hospedeiro e sugerem o potencial do silenciamento gênico como uma ferramenta no manejo de doenças de plantas causadas por esse oomicete (Ferreira et al., Jun. 2023).



Figura 11. Análise Morfológica Raízes de *Castanea sativa* (a) controlo da raiz de *C. sativa* não infetada por *P. cinnamomi*. (b) Raiz de *C. sativa* infetada por *P. cinnamomi* após 12h apresentando alguma necrose. (c) Raiz de *C. sativa* infetada por *P. cinnamomi* após 24h com região de necrose intensificada. (d) Raiz de *C. sativa* infetada por *P. cinnamomi* após 36h, mostrando quase inteiramente o tecido necrótico. Imagem adaptada de Ferreira et al. (Jun. 2023).

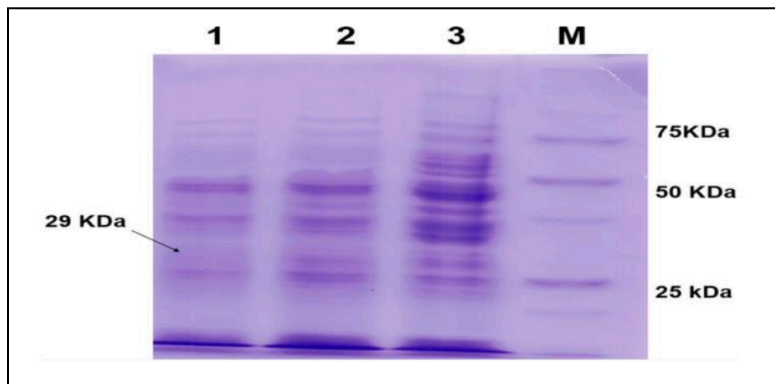


Figura 12. SDS-PAGE Expressão *Phytophthora cinnamomi*
 SDS-PAGE da expressão em *Phytophthora cinnamomi* selvagem/recombinante com 72 horas de indução. **(1)** Ausência de expressão da proteína NPP1 em *P. cinnamomi* transformado. **(2)** Expressão parcial de *P. cinnamomi*. **(3)** Expressão da proteína NPP1 em *P. cinnamomi* selvagem. M: Marcador de proteína de 250 kDa. Imagem adaptada de Ferreira et al. (Jun. 2023).

Posteriormente, em outro estudo, esses pesquisadores investigaram a infecção de *Castanea sativa* por estirpes transformadas de *Phytophthora cinnamomi* e o efeito do silenciamento do gene GIP no fenótipo da planta. O gene GIP codifica a proteína inibidora da glucanase, produzida por *P. cinnamomi* durante a infecção. A proteína GIP desempenha um papel crucial na interação entre o oomicete e a planta hospedeira, afetando os mecanismos de defesa. Após 72 horas uma análise morfológica revelou que as plantas infetadas com

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

P. cinnamomi transformado apresentaram uma pequena percentagem de folhas murchas e necrose radicular, enquanto as plantas infetadas com a forma não transformada, houve uma maior percentagem de folhas murchas e necrose radicular, ver figuras 13 e 14. Os resultados sugeriram que o silenciamento do gene GIP teve um impacto positivo na redução do RNAi no controlo da infeção e o seu efeito no fenótipo da planta hospedeira (Ferreira et al., Nov. 2023).



Figura 13. Infeção de raízes da *Castanea sativa* com *P. cinnamomi* transformado (à esquerda) e não transformado (à direita). Imagem adaptada de Ferreira et al. (Nov. 2023).

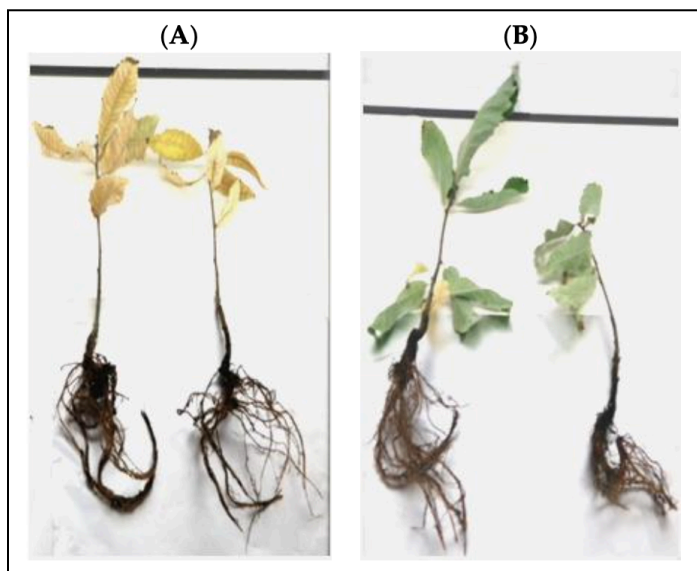


Figura 14. 72 horas de infecção de *Castanea sativa* 72 horas de infecção da *Castanea sativa* com **(A)** *P. cinnamomi* nativo e **(B)** *P. cinnamomi* transformado. Imagem adaptada de Ferreira et al. (Nov. 2023).

4.4 Comparação entre RNAi e CRISPR-Cas9

Tanto a interferência de RNA (RNAi) quanto a tecnologia CRISPR-Cas9 provaram ser ferramentas poderosas para manipular genes e regular a expressão génica. Ambos apresentam vantagens e desvantagens e por isso é importante entender os seus mecanismos de funcionamento antes de decidir qual utilizar no desenvolvimento de um projeto de pesquisa. As Figuras

15 e 16 ilustram os protocolos laboratoriais para esses dois procedimentos.

De uma forma geral, ao longo dos últimos anos a técnica de RNAi combinada com a inserção de mutantes tem sido amplamente utilizada para analisar a função de muitos genes, nomeadamente, para tentar descobrir as suas funções, mas também para interromper ou reduzir a sua expressão normal. O uso de *knockdowns* fornecidos pelo RNAi pode proporcionar diversas vantagens relativamente aos *knockouts*, resultantes do surgimento da tecnologia CRISPR/Cas9. Os *knockdowns* são importantes quando o objetivo principal é a redução temporária da expressão génica e não a modificação do próprio código genético. Além disso, se a exclusão completa da função do gene for prejudicial à célula, o uso de *knockdowns* também pode ser uma grande vantagem, ao causar apenas uma perda parcial da função (Barrangou et al., 2015; Boettcher & McManus, 2015; Moreira et al., 2020).

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

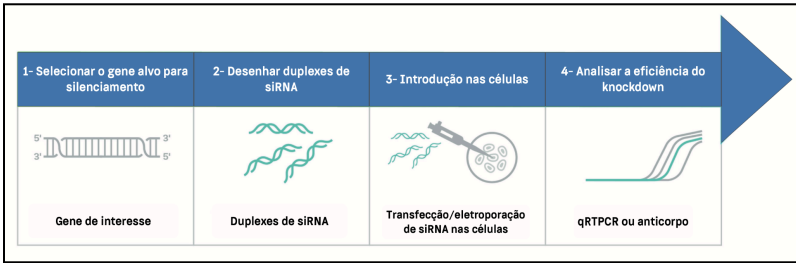


Figura 15: Protocolo Laboratorial para RNAi

O protocolo laboratorial para silenciamento génico mediado por RNAi envolve a seleção do gene de interesse para silenciar, projetar sRNAi, introduzi-los nas células e analisar a eficiência de *knockdown*. Imagem adaptada de Prabhune (2021).

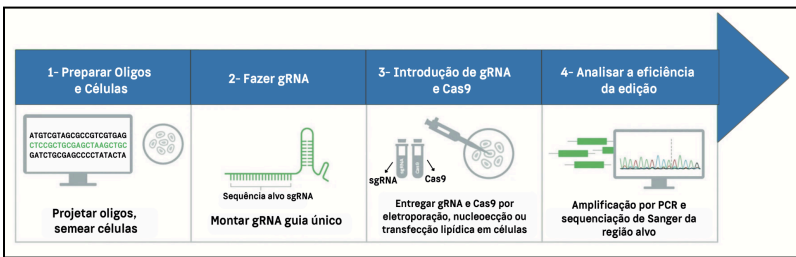


Figura 16: Protocolo Laboratorial para CRISPR-Cas9

O protocolo de laboratório para CRISPR-Cas9: projetar oligos, montar RNA guia único, entregar gRNA e Cas9 em células, amplificação por PCR e sequenciamento *Sanger*. Imagem adaptada de Prabhune (2021).

Por outro lado, a tecnologia CRISPR também apresenta diversas vantagens, permitindo nomeadamente a edição precisa do DNA (com substituições, eliminações e adições em sequências genómicas). As modificações causadas pelo CRISPR podem ser

transmitidas às células filhas, constituindo um grande benefício terapêutico no tratamento de doenças genéticas. A técnica CRISPR será abordada com mais detalhes no artigo de revisão intitulado “CRISPR/Cas9 é uma técnica simples, barata e eficaz para edição de genes” (Ferreira & Choupina, 2022) publicado durante o doutoramento. Em geral, a tecnologia CRISPR permite uma série de manipulações genômicas desde a introdução, inativação e correção de novos genes; no entanto, esta técnica também apresenta algumas desvantagens a mencionar, como o respetivo custo por requerer reagentes específicos, mas também a necessidade de utilizar o processo de sequenciação para avaliar se ocorreram mutações fora do alvo. Outra desvantagem do CRISPR é a possibilidade de mutações fora do alvo, ou seja, mutações que diferem do local pretendido (Jinek et al., 2012). Finalmente, o uso do CRISPR levanta questões éticas, particularmente no que diz respeito ao seu uso em células humanas (células germinativas e embriões) (Ferreira & Choupina, 2022; Jinek et al., 2012; Moreira et al., 2020; Rajput et al., (2021).

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

De forma geral, podemos dizer que ambas as ferramentas possibilitaram avanços na biologia molecular (Fig. 17). No entanto, é importante salientar que a escolha da ferramenta de manipulação desejada depende sempre dos objetivos específicos de cada projeto de investigação, e como tal será sempre necessária uma análise rigorosa e ponderada das vantagens e desvantagens de cada técnica. Se o objetivo da pesquisa é utilizar uma ferramenta que permita a análise da supressão da expressão génica por um determinado período, a tecnologia RNAi é a mais recomendada. Por outro lado, se o objetivo é realizar a manipulação genómica com grande precisão e causar alterações definitivas no genoma, a técnica de edição CRISPR será a mais adequada.

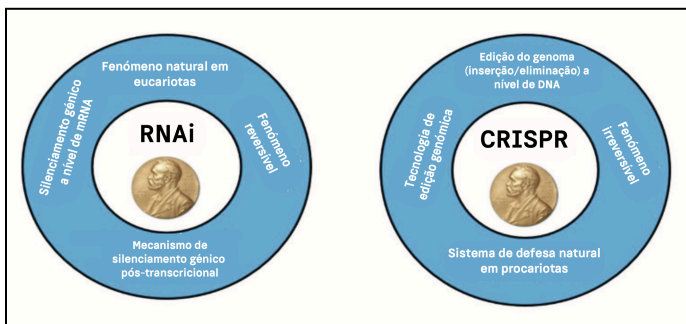


Figura 17: Comparação RNAi versus CRISPR-Cas9
Interferência de RNA versus tecnologia CRISPR-Cas9. Imagem adaptada de Rajput et al. (2021).

CAPÍTULO V

Aspetos Éticos e Políticos

As aplicações do uso da tecnologia de CRISPR-Cas9 levantaram questões morais e éticas na agricultura, na pecuária, na biotecnologia, na biomedicina e na reprodução. De acordo com Zhang et al. (2020) há duas preocupações principais para essa tecnologia: a edição fora do alvo e a experimentação ilegal ou irresponsável por parte da comunidade científica (Zhang et al., 2020).

5.1 Implicações Éticas e Segurança Alimentar

Vários estudos demonstraram efeitos fora do alvo da edição do genoma baseado em CRISPR-Cas9 em aplicações biomédicas e clínicas e em estudos funcionais do genoma vegetal. Vários relatórios mostraram efeitos fora do alvo do CRISPR-Cas9 em linhas celulares humanas, de camundongos e de ratos. Estudos recentes sobre outros sistemas CRISPR-Cas9, como sistemas de edição de base guiados por RNA, também indicaram atividades fora do alvo em mamíferos. A edição fora do

alvo apresenta sérios problemas em terapêutica porque pode causar mutações com perda de função em genes funcionais adequados ou reparo incorreto de genes causadores de doenças. É necessário muito cuidado relativamente à detecção de efeitos fora do alvo antes de qualquer aplicação de CRISPR-Cas9, particularmente na edição do genoma humano (Martin et al., 2020; Zhang et al., 2020).

A segunda preocupação se refere a possibilidade de experimentação ilegal na edição do genoma da linha germinativa ou a edição do genoma hereditário. Em novembro de 2018, o cientista chinês, Jiankui He, afirmou na 2.^a Cúpula Internacional sobre Edição de Genoma Humano em Hong Kong, que usou CRISPR-Cas9 para criar bebês geneticamente modificados imunes ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). A sua experimentação em humanos foi criticada por diversas academias e pesquisadores nacionais e internacionais por ser proibida a edição do genoma da linha germinativa para produzir embriões humanos para uso clínico devido a preocupações científicas e éticas. Até que os resultados da edição do

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

genoma possam ser melhor controlados, o sistema CRISPR-Cas9 não deve ser usado para modificações genéticas da linha germinativa em humanos (Martin et al., 2020; Zhang et al., 2020).

As plantas alimentícias desempenham um papel crucial na sobrevivência humana. No entanto, os métodos tradicionais não têm conseguido acompanhar e torna-se necessário o melhoramento para atender às crescentes demandas populacionais. Ao modificar geneticamente as plantas alimentícias para melhorar características como resistência a pragas, aumentos do rendimento e valor nutricional, surgem questões éticas sobre a segurança alimentar desses alimentos. Garantir um equilíbrio e as expectativas da tecnologia de edição do genoma, bem como uma análise científica dos seus potenciais riscos e desvantagens, é crucial para evitar as incertezas que surgiram com as plantas transgênicas. Portanto, a regulamentação e aplicação adequada da tecnologia de edição do genoma pode trazer imensos benefícios para a agricultura e a segurança alimentar. Ao avaliar cuidadosamente os benefícios e os riscos, é possível garantir que a tecnologia é utilizada de forma

responsável e ética para melhorar o rendimento, a qualidade e a resistência das culturas (Agapito-Tenfen et al., 2018; Chaudhry et al., 2023).

5.2 Impactos Ambientais e Socioeconômicos

No que diz respeito aos impactos ambientais, a edição genômica apresenta riscos imprevisíveis que podem ter consequências indesejadas no meio ambiente. Dependendo do tipo e escala da edição, organismos modificados geneticamente intencionalmente liberados no ambiente podem resultar em mutações fora do alvo, resistência evolutiva, perturbação e extinções ecológicas (Chaudhry et al., 2023; Kofler et al., 2018).

Num artigo sobre “Editando a Natureza”, Kofler et al. (2018) falam sobre possíveis riscos que a tecnologia de CRISPR-Cas9 poderia gerar caso um gene ‘drive’ projetado para suprimir uma espécie invasora escapasse do local de liberação e se espalhasse para uma população nativa, ou se uma espécie de coral editada geneticamente para se adaptar melhor aos "stressores" ambientais dominasse os ecossistemas de recifes em detrimento da diversidade de espécies de corais que evoluem

naturalmente e dos peixes que dependem delas. Animais com genes editados podem ter diferentes interações com os seus ecossistemas, o que pode ter consequências indesejadas (Kofler et al., 2018; Ngeno, 2023).

As questões relacionadas aos impactos ambientais dos organismos modificados geneticamente merecem uma consideração aprofundada e precisam ser mais abordadas, sendo importante avaliar cuidadosamente os riscos ambientais associados às tecnologias genéticas antes da sua adoção generalizada. Críticos questionam a segurança da edição genética, principalmente quando a tecnologia é utilizada para a técnica do Gene Drive, devido à falta de compreensão total dos efeitos fora do alvo na edição do genoma. A pesquisa científica busca medidas para reduzir riscos previsíveis que podem ser minimizados por meio de técnicas mais precisas e específicas, incluindo testes rigorosos para avaliar a segurança e eficácia das edições genómicas (Agapito-Tenfen et al., 2018; Eckerstorfer et al., 2019; Idris et al., 2023).

Em termos socioeconómicos é importante enfatizar a responsabilidade corporativa, que abrange

preocupações tanto com o meio ambiente quanto com as pessoas, incluindo a concentração de poder nas mãos das empresas de biotecnologia e a dependência de agricultores em patentear variedades vegetais. No contexto da justiça social para novas inovações, um conjunto distinto de consequências não intencionais deve ser previsto ou antecipado, nas culturas e nos agricultores, e também no ambiente em que uma tecnologia específica é utilizada. As considerações de justiça social destacam a distribuição justa de benefícios e oportunidades, que também inclui a igualdade de acesso ao conhecimento e as tecnologias entre diferentes grupos sociais, nações e gerações (Idris et al., 2023; Martin et al., 2020).

Outra grande preocupação é relativamente aos riscos dos organismos modificados para a biossegurança no desenvolvimento de culturas com técnicas novas e emergentes de edição genética. As tendências científicas, técnicas, económicas e sociais aumentam a gama de potenciais riscos biológicos, multiplicando as rotas de exposição, expandindo as populações que podem estar expostas e aumentando o nível de suscetibilidade dessas

populações. Isso inclui preocupações com tecnologia de uso duplo, questões de biossegurança provenientes de armas biológicas desenvolvidas por atores estatais, organizações terroristas, indivíduos e grupos imprudentes. (Agapito-Tenfen et al., 2018; Martin et al., 2020).

5.3 Aceitação Pública

A aceitação pública das tecnologias de edição genómica varia dependendo do país, tendo sido influenciada por diversos fatores, incluindo aspetos culturais, religiosos e educacionais, bem como preocupações com a segurança alimentar, a saúde humana e o meio ambiente (Bechtold, 2018; Eckerstorfer et al., 2019; Schiemann et al., 2020).

A compreensão do público sobre a tecnologia desempenha um papel crucial na aceitação pública. Em muitos casos as crenças culturais, a falta de conhecimento ou compreensão adequada sobre a tecnologia de edição genómica pode levar à resistência, enquadradas por narrativas distópicas sobre a biotecnologia (Martin et al., 2020).

Além disso, a confiança nas instituições científicas e nas organizações que desenvolvem e regulamentam essas tecnologias desempenham um papel crucial na aceitação pública. A transparência nas práticas de pesquisa, comunicação eficaz sobre os benefícios e riscos, e a consideração ética são elementos importantes para diminuir a incerteza e aumentar a confiança do público. (Bechtold, 2018; Eckerstorfer et al., 2019; Martin et al., 2020; Schiemann et al., 2020).

5.4 Políticas Regulatórias de CRISPR-Cas9

A tecnologia de CRISPR-Cas9 é amplamente utilizada na modificação genômica de diversos organismos, incluindo humanos, para tratar ou prevenir doenças genéticas. No entanto, há uma significativa preocupação sobre a possível aplicação dessa técnica na edição da linha germinativa de embriões humanos, devido à compreensão insuficiente do estatuto do embrião humano. Embriões humanos foram editados pela primeira vez em 2015, gerando conscientização global e levando a diversas respostas éticas e políticas (Zhang et al., 2020).

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

A edição do genoma da linha germinativa é proibida internacionalmente pela Declaração da UNESCO sobre Genoma Humano. Vários países estabeleceram leis e diretrizes regulatórias para a edição genética da linha germinativa humana para fins reprodutivos, variando de restrições nos Estados Unidos, proibição legal no Reino Unido, proibição por diretrizes no Japão, China, Irlanda e Índia, e proibições ambíguas na Rússia, Argentina, África do Sul, Chile, Eslováquia, Peru, Colômbia, Islândia e Grécia. Os critérios regulatórios para plantas editadas pelo CRISPR-Cas9 também são discutidas globalmente, especialmente sobre se devem ser reguladas como organismos geneticamente modificados (OGM). Assim, os debates continuam em todo o mundo sobre as distinções éticas e práticas da edição do genoma relativamente a outras biotecnologias (Zhang et al., 2020).

Nos Estados Unidos (EUA), a regulamentação de OMGs é abrangente e envolve várias agências. A abordagem é focada no produto, com avaliação de risco voluntária e colaboração entre empresas e agências reguladoras. A Administração de Alimentos e

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

Medicamentos (FDA) avalia alimentos geneticamente modificados, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) supervisiona a liberação de plantas modificadas, e a Autoridade de Proteção Ambiental (EPA) regula plantas que expressam proteínas pesticidas. A rotulagem de alimentos geneticamente modificados é discutida e regulamentada em alguns estados. As políticas estão sujeitas a mudanças, e os avanços na tecnologia genética podem levar a ajustes nas abordagens regulatórias (Wolt & Wolf, 2018; Zhang et al., 2020).

O Canadá possui um quadro de regulamento concentrado nas características inovadoras do produto, não no processo da produção. A Agência de Inspeção de Alimentos (CFIA) avalia novas plantas com base nas suas novas características e não no processo utilizado para produzir essas plantas. Assim, plantas de diferentes processos, incluindo edição genética, passam pelo mesmo processo de aprovação regulamentar. A Environment Canada é responsável pelos microrganismos geneticamente modificados e a Health

Canadá pela segurança de novos alimentos (Eckerstorfer et al., 2019; Zhang et al., 2020).

A União Europeia (UE) e o Reino Unido têm políticas que incluem OGMs abrangendo plantas modificadas por diversas técnicas, incluindo edição genética. A interpretação das regulamentações varia, gerando debates sobre se a regulamentação deve se basear no processo ou no produto resultante. Alguns estados-membros da UE têm políticas específicas sobre rotulagem e aceitação de culturas geneticamente editadas. A tomada de decisões na UE baseia-se num procedimento altamente complexo e demorado que envolve a Comissão Europeia e todos os Estados-Membros, uma vez que a avaliação de riscos tenha sido realizada sob a liderança da (EFSA) Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (Eckerstorfer et al., 2019; Zhang et al., 2020).

Na Austrália, a aplicação de técnicas de edição de genoma, incluindo o sistema CRISPR-Cas9 foi restrita, e o uso desta tecnologia para pesquisa foi restringido pelos mesmos regulamentos que para as modificações genéticas convencionais que exigem permissão de um

comité de biossegurança endossado pelo Escritório Regulador de Tecnologia Genética (OGTR). As regulamentações foram revistas em 2019 para permitir o uso de tecnologias de edição de genoma em plantas e animais, desde que não introduzam novo material genético. As técnicas que utilizam modelos ou introduzem novo material genético continuam sujeitas a regulamentação do OGTR (Jenkins et al., 2021; Zhang et al., 2020).

Em 2001, o Conselho de Estado da China emitiu o Regulamento sobre a Administração de Segurança de Organismos Geneticamente Modificados Agrícolas para a gestão e avaliação de riscos de produtos geneticamente modificados, incluindo aqueles produzidos por edição genética. O quadro regulador está sujeito a avaliação caso a caso, com a definição de OGM abrangendo organismos com material genético alterado por edição genética. Em 2016, criaram o Comitê Nacional de Biossegurança (NBC) para prestar assistência técnica em avaliações de risco para novas tecnologias, incluindo a edição do genoma (Zhang et al., 2020).

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) regula a liberação de organismos geneticamente modificados. A Resolução Normativa n.º 16 (RN16) avalia a consulta com base num sistema caso a caso, considerando se produtos criados por novas técnicas, incluindo a CRISPR-Cas9, será considerado organismo convencional ou transgênico dependendo das características do produto (Jenkins et al., 2021; Zhang et al., 2020).

A Argentina emitiu regulamentações específicas para produtos obtidos por edição genética. O Conselho da Comissão Nacional em Biotecnologia Agrícola (CONABIA) avalia e regulamenta se os cultivos modificados com técnicas de melhoramento contêm nova combinação de material genético e se os transgenes foram removidos antes da comercialização. Assim, o marco regulatório avalia os OGMs como produtos novos e não se concentra no procedimento utilizado (Jenkins et al., 2021; Zhang et al., 2020).

No Chile, agências governamentais do Ministério da Agricultura estabeleceram procedimentos de avaliação para produtos obtidos por novas tecnologias,

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

isentando-os do escopo de organismos geneticamente modificados se estiverem conforme as normas. A Divisão de Defesa Florestal e Agrícola do Serviço Agropecuário (SAG) realiza a análise caso a caso dos produtos obtidos nas novas técnicas de melhoramento (Jenkins et al., 2021; Zhang et al., 2020).

Na Nova Zelândia, os organismos geneticamente modificados são regulamentados por uma estrutura rigorosa com base na Lei de Substâncias Perigosas e Novos Organismos (HSNO) que inicialmente isentou as edições do genoma do quadro regulador. No entanto, o Conselho de Sustentabilidade recorreu à decisão inicial anulada, e os regulamentos foram alterados para limitar expressamente o escopo das exclusões de mutagéneses a tratamentos químicos ou de radiação, passaram a considerar que todas as técnicas de edição de genoma são regulamentadas como OGMs (Eckerstorfer et al., 2019; Jenkins et al., 2021; Zhang et al., 2020).

No Japão, existem três agências reguladoras que supervisionam diferentes aspectos do uso de OGM, o Ministério do Meio Ambiente (MOE), o Ministério da Agricultura, Florestas e Pesca (MAFF) e o Ministério da

Saúde, Trabalho e Bem-Estar (MHLW) que esclarecem quando os regulamentos existentes sobre OGM se aplicam a produtos com genoma editado quando não o fazem. O Painel Consultivo sobre OGM do MOE regulamentou que qualquer organismo vivo com nucleótidos estranhos remanescentes no genoma do hospedeiro deve ser regulamentado, independente de os nucleótidos estranhos serem detetáveis. No entanto, edições do SDN-1 (nuclease 1 dirigida ao local) estão fora do escopo dos regulamentos sobre plantas geneticamente modificadas (Jenkins et al., 2021; Zhang et al., 2020).

Estamos num momento crucial no cenário regulatório e político da edição genética de plantas, enfrentando questões urgentes de sustentabilidade global. As nações possuem técnicas modernas e inovadoras de melhoramento genético, oferecendo amplas oportunidades para alcançar objetivos compartilhados no contexto agrícola. A abordagem regulatória varia entre países, como, por exemplo, na União Europeia e na Nova Zelândia, onde avaliam produtos editados geneticamente com base no processo,

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

enquanto nos Estados Unidos adotam uma perspectiva baseada no produto. Governos implementam abordagens proporcionais ao risco, fundamentadas na ciência, para estimular pesquisas e inovações na melhoria da reprodução das plantas. Essa postura é essencial para avançar em direção às metas globais de sustentabilidade na agricultura (Jenkins et al., 2021; Zhang et al., 2020).

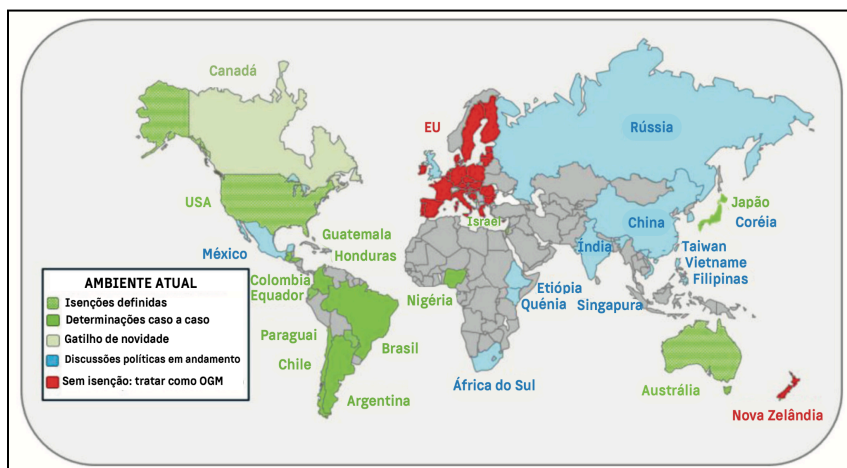


Figura 18. Mapa Mundial de Políticas Regulatórias

Mapa mundial do cenário atual das políticas regulatórias para produtos vegetais com genoma editado. **Verde quadriculado:** isenções definidas. **Verde:** políticas caso a caso. **Verde-claro:** políticas baseadas na novidade. **Azul:** discussões em andamento. **Vermelho:** plantas editadas tratadas como OGM por tribunais. Adaptado de Jenkins (2021).

CONCLUSÃO

O sistema CRISPR-Cas9 é uma ferramenta molecular revolucionária que permite a edição precisa e eficiente do genoma de diversos organismos, especialmente no contexto do melhoramento genético vegetal. Nesta revisão sistemática, foram explorados os impactos abrangentes desta tecnologia, desde os fundamentos até as suas aplicações na proteção vegetal e no controlo de pragas agrícolas, considerando os aspetos éticos e regulamentações em diversos países. Os resultados das pesquisas mostraram que o sistema CRISPR-Cas9 tem o potencial de melhorar a resistência das plantas a stresses bióticos e abióticos, bem como no controlo de pragas agrícolas, por meio da modificação genética de insetos, fungos e oomicetes. Adicionalmente, foram comparadas as tecnologias de CRISPR-Cas9 e RNA de interferência (RNAi), discutindo-se as vantagens do uso de RNAi para criar imunidade vegetal e resistência a stresses bióticos. Contudo, foram destacados os desafios e as limitações dessa tecnologia, como também as implicações éticas, de segurança alimentar, os impactos ambientais e socioeconómicos,

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

além da aceitação pública e as políticas regulatórias em diversas nações. Portanto, embora o CRISPR-Cas9 apresente grande promessa no avanço da agricultura, é necessário aprofundar a investigação científica e fomentar debates éticos e políticos para garantir que essa tecnologia seja utilizada de forma responsável, segura e sustentável, com benefícios reais para a saúde humana, o meio ambiente e o setor agrícola global.

REFERÊNCIAS

1. Agapito-Tenfen SZ, Okoli AS, Bernstein MJ, Wikmark OG, Myhr AI. Revisiting Risk Governance of GM Plants: The Need to Consider New and Emerging Gene-Editing Techniques. *Front Plant Sci.* 2018 Dec 21;9:1874. doi: 10.3389/fpls.2018.01874. PMID: 30622546; PMCID: PMC6308909. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30622546/>.
2. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell.* 2014 Apr 24;54(2):234-44. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011. PMID: 24766887; PMCID: PMC4025954. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24766887/>.
3. Barrangou R, Birmingham A, Wiemann S, Beijersbergen RL, Hornung V, Smith Av. Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2015 Apr 20;43(7):3407-19. doi: 10.1093/nar/gkv226. Epub 2015 Mar 23. PMID: 25800748; PMCID: PMC4402539. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25800748/>.
4. Bechtold S. Beyond Risk Considerations: Where and How Can a Debate About Non-safety Related Issues of Genome Editing in Agriculture Take Place? *Front Plant Sci.* 2018 Nov 26;9:1724. doi: 10.3389/fpls.2018.01724. PMID: 30534131; PMCID: PMC6275233. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30534131/>.
5. Boettcher M, McManus MT. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell.* 2015 May 21;58(4):575-85. doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.028. PMID:

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

26000843; PMID: PMC4441801. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26000843/>.

6. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading)*. 2005 Aug;151(Pt 8):2551-2561. doi: 10.1099/mic.0.28048-0. PMID: 16079334. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16079334/>.
7. Bortesi L, Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv*. 2015 Jan-Feb;33(1):41-52. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006. Epub 2014 Dec 20. PMID: 25536441. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25536441/>.
8. Butt H, Eid A, Ali Z, Atia MAM, Mokhtar MM, Hassan N, Lee CM, Bao G, Mahfouz MM. Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Using a Chimeric Single-Guide RNA Molecule. *Front Plant Sci*. 2017 Aug 24;8:1441. doi: 10.3389/fpls.2017.01441. PMID: 28883826; PMID: PMC5573723. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28883826/>.
9. Chaudhry A, Hassan AU, Khan SH, Abbasi A, Hina A, Khan MT, Abdelsalam NR. The changing landscape of agriculture: role of precision breeding in developing smart crops. *Funct Integr Genomics*. 2023 May 19;23(2):167. doi: 10.1007/s10142-023-01093-1. PMID: 37204621. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37204621/>.
10. Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annu Rev Plant Biol*. 2019 Apr 29;70:667-697.

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

- doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100049. Epub 2019 Mar 5. PMID: 30835493. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30835493/>.
11. Cox DB, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med.* 2015 Feb;21(2):121-31. doi: 10.1038/nm.3793. PMID: 25654603; PMCID: PMC4492683. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25654603/>.
 12. Daneholt B. Advanced Information on the Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. The Nobel Assembly at Karolinska Institute Karolinska Institute; Stockholm, Sweden: 2006. Disponível em <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/advanced-information/>.
 13. Dash, S.K., Sushil, K.M., and N, M.H. (2015). RNA Interference a fine tuner of gene regulation: A review. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 6, 35–39. Article Number: 13DDB2F53798. DOI: 10.5897/IJBMBR2014.0213. Disponível em https://academicjournals.org/article/article1435327689_Dash%20et%20al.pdf.
 14. Dong H, Huang Y, Wang K. The Development of Herbicide Resistance Crop Plants Using CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. *Genes (Basel).* 2021 Jun 12;12(6):912. doi: 10.3390/genes12060912. PMID: 34204760; PMCID: PMC8231513. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34204760/>.
 15. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014 Nov 28;346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096.

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

PMID: 25430774. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25430774/>.

16. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. 2020 Feb;578(7794):229-236. doi: 10.1038/s41586-020-1978-5. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32051598; PMCID: PMC8992613. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32051598/>.
17. Eckerstorfer MF, Engelhard M, Heissenberger A, Simon S, Teichmann H. Plants Developed by New Genetic Modification Techniques-Comparison of Existing Regulatory Frameworks in the EU and Non-EU Countries. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019 Feb 19;7:26. doi: 10.3389/fbioe.2019.00026. PMID: 30838207; PMCID: PMC6389621. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30838207/>.
18. Ferreira P, Choupina AB. CRISPR/Cas9 a simple, inexpensive and effective technique for gene editing. *Mol Biol Rep*. 2022 Jul;49(7):7079-7086. doi: 10.1007/s11033-022-07442-w. Epub 2022 Jun 18. PMID: 35716290; PMCID: PMC9206401. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35716290/>.
19. Ferreira P, Chahed A, Costa R, Branco I, Choupina A. Use of RNAi in the post-transcriptional gene silencing of necrosis-inducing *Phytophthora* protein 1(NPP1) in *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Biol Rep*. 2023 Aug; 50(8):6493-6504. doi: 10.1007/s11033-023-08562-7. Epub 2023 Jun 16. PMID: 37326749; PMCID: PMC10374718. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37326749/>.
20. Ferreira P, Chahed A, Estevinho LM, Seixas N, Costa R, Choupina A. Post-Transcriptional Gene Silencing of

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

- Glucanase Inhibitor Protein in *Phytophthora cinnamomi*. *Plants* (Basel). 2023 Nov 10; 12(22):3821. doi: 10.3390/plants12223821. PMID: 38005719; PMCID: PMC10675509. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38005719/>.
21. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11. doi: 10.1038/35888. PMID: 9486653. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9486653/>.
22. Gill, R. A., Scossa, F., King, G. J., Golicz, A. A., Tong, C., Snowdon, R. J., ... Liu, S. (2021). On the Role of Transposable Elements in the Regulation of Gene Expression and Subgenomic Interactions in Crop Genomes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 40(2), 157–189. Disponível em <https://doi.org/10.1080/07352689.2021.1920731>.
23. Gostimskaya I. CRISPR-Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry* (Mosc). 2022 Aug;87(8):777-788. doi: 10.1134/S0006297922080090. PMID: 36171658; PMCID: PMC9377665. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36171658/>.
24. Guo N, Liu JB, Li W, Ma YS, Fu D. The power and the promise of CRISPR/Cas9 genome editing for clinical application with gene therapy. *J Adv Res*. 2022 Sep;40:135-152. doi: 10.1016/j.jare.2021.11.018. Epub 2021 Dec 4. PMID: 36100322; PMCID: PMC9481961. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36100322/>.

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

25. Green, Emily. Development of genetic control strategies for insect pests using CRISPR/Cas9. Animal genetics. Université de Strasbourg, 2019. English. NNT: 2019STRAJ100. HAL Id: tel-03336532. Disponível em <https://theses.hal.science/tel-03336532>.
26. He G. Engineering chloroplasts for insect pest control. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 May 31; 119(22):e2205125119. doi: 10.1073/pnas.2205125119. Epub 2022 May 20. PMID: 35594388; PMCID: PMC9295759. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35594388/>.
27. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 2014 Jun 5; 157(6): 1262-1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010. PMID: 24906146; PMCID: PMC4343198. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24906146/>.
28. Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Jan; 9(1):22-32. doi: 10.1038/nrm2321. PMID: 18073770. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18073770/>.
29. Idris SH, Mat Jalaluddin NS, Chang LW, 曾立纬. Ethical and legal implications of gene editing in plant breeding: a systematic literature review. J Zhejiang Univ Sci B. 2023 Jul 6:1-13. English, Chinese. doi: 10.1631/jzus.B2200601. Epub ahead of print. PMID: 37423764. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37423764/>.
30. Innovative Genomics Institute. (2023, Oct. 24). CRISPR-Cas9-based gene drive architecture for control of agricultural pests. Disponível em

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

<https://innovativegenomics.org/es/crujientepedia/crispr-en-la-agricultura/>.

31. Innovative Genomics Institute. (2023, Oct. 24). CRISPRpedia. CRISPR in Agriculture. Disponível em <https://innovativegenomics.org/projects/crispr-cas9-based-gene-drive-architecture-control-agricultural-pests/>.
32. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. *History of CRISPR-Cas* from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J Bacteriol.* 2018 Mar 12; 200(7): e00580-17. doi: 10.1128/JB.00580-17. PMID: 29358495; PMCID: PMC5847661. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29358495/>.
33. Jenkins D, Dobert R, Atanassova A, Pavely C. Impacts of the regulatory environment for gene editing on delivering beneficial products. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2021; 57(4):609-626. doi: 10.1007/s11627-021-10201-4. Epub 2021 Aug 19. PMID: 34429575; PMCID: PMC8376113. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34429575/>.
34. Jiang W, Marraffini LA. CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. *Annu Rev Microbiol.* 2015; 69:209-28. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104441. Epub 2015 Jul 22. PMID: 26209264. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26209264/>.
35. 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 Aug 17; 337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22745249; PMCID:

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

- PMC6286148. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22745249/>.
36. Karavolias NG, Horner W, Abugu MN, Evanega SN. Application of Gene Editing for Climate Change in Agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2021 Set 07. doi:10.3389/fsufs.2021.685801. Disponível em <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2021.685801/full>.
37. Kieu NP, Lenman M, Wang ES, Petersen BL, Andreasson E. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. *Sci Rep*. 2021 Feb 24; 11(1):4487. doi: 10.1038/s41598-021-83972-w. PMID: 33627728; PMCID: PMC7904907. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33627728/>.
38. Kofler N, Collins JP, Kuzma J, Marris E, Esvelt K, Nelson MP, Newhouse A, Rothschild LJ, Vigliotti VS, Semenov M, Jacobsen R, Dahlman JE, Prince S, Caccone A, Brown T, Schmitz OJ. Editing nature: Local roots of global governance. *Science*. 2018 Nov 2; 362(6414):527-529. doi: 10.1126/science.aat4612. Epub 2018 Nov 1. PMID: 30385564. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30385564/>.
39. Li X, Liu Y, Tan X, Li D, Yang X, Zhang X, Zhang D. The high-affinity phosphodiesterase PcpDeH is involved in the polarized growth and pathogenicity of *Phytophthora capsici*. *Fungal Biol*. 2020 Mar-Apr;124(3-4):164-173. doi: 10.1016/j.funbio.2020.01.006. Epub 2020 Jan 31. PMID: 32220377. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32220377/>.

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

40. Lunardon A, Johnson NR, Hagerott E, Phifer T, Polydore S, Coruh C, Axtell MJ. Integrated annotations and analyses of small RNA-producing loci from 47 diverse plants. *Genome Res.* 2020 Mar; 30(3):497-513. doi: 10.1101/gr.256750.119. Epub 2020 Mar 16. PMID: 32179590; PMCID: PMC7111516. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32179590/>.
41. Lunardon A, Kariuki SM, Axtell MJ. Expression and processing of polycistronic artificial microRNAs and trans-acting sRNAs from transiently introduced transgenes in *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 2021 May; 106(4):1087-1104. doi: 10.1111/tpj.15221. Epub 2021 Mar 28. PMID: 33655542. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33655542/>.
42. MacDonald IC, Deans TL. Tools and applications in synthetic biology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Oct 1; 105(Pt A):20-34. doi: 10.1016/j.addr.2016.08.008. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27568463. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27568463/>.
43. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Nov; 13(11):722-36. doi: 10.1038/nrmicro3569. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26411297; PMCID: PMC5426118. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26411297/>.
44. Mamta, B., Rajam, M.V. (2018). RNA Interference: A Promising Approach for Crop Improvement. In: Gosal, S., Wani, S.

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

(eds) *Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 2*. Springer, Cham. Disponível em https://doi.org/10.1007/978-3-319-90650-8_3.

45. Martin P, Morrison M, Ilke Turkmendag, Brigitte Nerlich, Aisling McMahon, Stevienna de Saille & Andrew Bartlett (2020) Genome editing: the dynamics of continuity, convergence, and change in the engineering of life, *New Genetics and Society*, 39:2, 219-242. Disponível em [DOI: 10.1080/14636778.2020.1730166](https://doi.org/10.1080/14636778.2020.1730166).
46. Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity against phages: its effects on the evolution and survival of bacterial pathogens. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003765. doi: 10.1371/journal.ppat.1003765. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24348245; PMCID: PMC3861508. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24348245/>.
47. Min T, Hwarari D, Li D, Movahedi A, Yang L. CRISPR-Based Genome Editing and Its Applications in Woody Plants. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 5; 23(17):10175. doi: 10.3390/ijms231710175. PMID: 36077571; PMCID: PMC9456532. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36077571/>.
48. Mohanta TK, Bashir T, Hashem A, Abd Allah EF, Bae H. Genome Editing Tools in Plants. *Genes (Basel).* 2017a Dec 19; 8(12):399. doi: 10.3390/genes8120399. PMID: 29257124; PMCID: PMC5748717. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29257124/>.
49. Mohanta TK, Bashir T, Hashem A, Abd Allah EF. Systems biology approach in plant abiotic stresses. *Plant Physiol Biochem.* 2017b Dec; 121:58-73. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.10.019. Epub 2017 Oct 21. PMID:

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

29096174. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29096174/>.
50. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol.* 1995 Jul; 17(1):85-93. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x. PMID: 7476211. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7476211/>.
51. Moon TT, Maliha IJ, Khan AAM, Chakraborty M, Uddin MS, Amin MR, Islam T. CRISPR-Cas Genome Editing for Insect Pest Stress Management in Crop Plants. *Stresses.* 2022; 2(4):493-514. <https://doi.org/10.3390/stresses2040034>. Disponível em <https://www.mdpi.com/2673-7140/2/4/34>.
52. Moreira D, Pereira AM, Lopes AL, Coimbra S. The best CRISPR/Cas9 versus RNA interference approaches for Arabinogalactan proteins' study. *Mol Biol Rep.* 2020 Mar; 47(3):2315-2325. doi: 10.1007/s11033-020-05258-0. Epub 2020 Jan 16. PMID: 31950325. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31950325/>.
53. Muñoz IV, Sarrocco S, Malfatti L, Baroncelli R, Vannacci G. CRISPR-Cas for Fungal Genome Editing: A New Tool for the Management of Plant Diseases. *Front Plant Sci.* 2019 Feb 15; 10:135. doi: 10.3389/fpls.2019.00135. PMID: 30828340; PMCID: PMC6384228. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30828340/>.
54. Ngeno, K. (2023). Utilization of Genome Editing for Livestock Resilience in Changing Environment. *Black Sea Journal of*

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

- Agriculture , 6 (3) , 314-320. DOI: 10.47115/bsagriculture.1263027. Disponível em <https://doi.org/10.47115/bsagriculture.1263027>.
55. Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, Zhao HY, Wang Y, Kan Y, Shrock E, Lesha E, Wang G, Luo Y, Qing Y, Jiao D, Zhao H, Zhou X, Wang S, Wei H, Güell M, Church GM, Yang L. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*. 2017 Sep 22; 357(6357):1303-1307. doi: 10.1126/science.aan4187. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28798043; PMCID: PMC5813284. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28798043/>.
56. Pathak, K., and Gogoi, B. (2016). RNA interference (RNAi): Application in crop improvement: A review. *Agric. Rev.* 37, 245–249. DOI: 10.18805/ag.v37i3.3540. Disponível em <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20173151245>.
57. Poddar S, Tanaka J, Running KLD, Kariyawasam GK, Faris JD, Friesen TL, Cho MJ, Cate JHD, Staskawicz B. Optimization of highly efficient exogenous-DNA-free Cas9-ribonucleoprotein mediated gene editing in disease susceptibility loci in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front Plant Sci.* 2023 Jan 10; 13:1084700. doi: 10.3389/fpls.2022.1084700. PMID: 36704157; PMCID: PMC9872142. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36704157/>.
58. Prabhune, M (2021). RNAi vs. CRISPR: Guide to selecting the best gene silencing method. *Synthesgos The Bench Blog*. Disponível em <https://www.synthesgo.com/blog/rnai-vs-crispr-guide#co>

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

- [mparison-between-crispr-and-rn-ai](#). Accessed September 12, 2023.
59. Rajput M, Choudhary K, Kumar M, Vivekanand V, Chawade A, Ortiz R, Pareek N. RNA Interference and CRISPR/Cas Gene Editing for Crop Improvement: Paradigm Shift towards Sustainable Agriculture. *Plants (Basel)*. 2021 Sep 14; 10(9):1914. doi: 10.3390/plants10091914. PMID: 34579446; PMCID: PMC8467553. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34579446/>.
 60. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clin Cancer Res*. 2017 May 1; 23(9):2255-2266. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300. Epub 2016 Nov 4. PMID: 27815355; PMCID: PMC5413401. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27815355/>.
 61. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014 Apr; 32(4):347-55. doi: 10.1038/nbt.2842. Epub 2014 Mar 2. PMID: 24584096; PMCID: PMC4022601. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24584096/>.
 62. Saurabh S, Vidyarthi AS, Prasad D. RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*. 2014 Mar; 239(3):543-64. doi: 10.1007/s00425-013-2019-5. Epub 2014 Jan 9. PMID: 24402564. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24402564/>.
 63. Schiemann J, Robiński J, Schleissing S, Spök A, Sprink T, Wilhelm RA. Editorial: Plant Genome Editing - Policies and Governance. *Front Plant Sci*. 2020 Mar 11; 11:284. doi: 10.3389/fpls.2020.00284. PMID: 32218798; PMCID:

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

- PMC7078341. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32218798/>.
64. Schuster M, Kahmann R. CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genet Biol*. 2019 Sep; 130:43-53. doi: 10.1016/j.fgb.2019.04.016. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31048007. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31048007/>.
65. Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JE. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J*. 2017 Feb; 15(2):207-216. doi: 10.1111/pbi.12603. Epub 2016 Aug 17. PMID: 27442592; PMCID: PMC5258859. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27442592/>.
66. Singh, S.; Rahangdale, S.; Pandita, S.; Saxena, G.; Upadhyay, S.K.; Mishra, G.; Verma, P.C. CRISPR/Cas9 for Insect Pests Management: A Comprehensive Review of Advances and Applications. *Agriculture* 2022, 12, 1896. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111896>. Disponível em <https://www.mdpi.com/2077-0472/12/11/1896>.
67. Timani K, Bastarache P, Morin PJ. Leveraging RNA Interference to Impact Insecticide Resistance in the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insects*. 2023 Apr 27; 14(5):418. doi: 10.3390/insects14050418. PMID: 37233046; PMCID: PMC10231074. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37233046/>.
68. Tran MT, Doan D'TH, Kim J, Song YJ, Sung YW, Das S, Kim EJ, Son GH, Kim SH, Van Vu T, Kim JY.

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

- CRISPR/Cas9-based precise excision of SHyPRP1 domain(s) to obtain salt stress-tolerant tomato. *Plant Cell Rep.* 2021 Jun; 40(6):999-1011. doi: 10.1007/s00299-020-02622-z. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33074435. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33074435/>.
69. Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem.* 2016 Jun 2;85:227-64. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27145843. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27145843/>.
70. Wang L, Chen H, Li J, Shu H, Zhang X, Wang Y, Tyler BM, Dong S. Effector gene silencing mediated by histone methylation underpins host adaptation in an oomycete plant pathogen. *Nucleic Acids Res.* 2020 Feb 28; 48(4):1790-1799. doi: 10.1093/nar/gkz1160. PMID: 31819959; PMCID: PMC7039004. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31819959/>.
71. Willow J, Taning CNT, Cook SM, Sulg S, Silva AI, Smagghe G and Veromann E (2021) RNAi Targets in Agricultural Pest Insects: Advancements, Knowledge Gaps, and IPM. *Front. Agron.* 3:794312. doi: 10.3389/fagro.2021.794312. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.794312>.
72. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys.* 2013;42:217-39. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130404. PMID: 23654304; PMCID: PMC5895182. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23654304/>.

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

73. Wolt JD, Wolf C. Policy and Governance Perspectives for Regulation of Genome Edited Crops in the United States. *Front Plant Sci.* 2018 Nov 8;9:1606. doi: 10.3389/fpls.2018.01606. PMID: 30467510; PMCID: PMC6236124. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30467510/>.
74. Yamato T, Handa A, Arazoe T, Kuroki M, Nozaka A, Kamakura T, Ohsato S, Arie T, Kuwata S. Single crossover-mediated targeted nucleotide substitution and knock-in strategies with CRISPR/Cas9 system in the rice blast fungus. *Sci Rep.* 2019 May 15; 9(1):7427. doi: 10.1038/s41598-019-43913-0. PMID: 31092866; PMCID: PMC6520371. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31092866/>.
75. Ying YAN, Roswitha A. AUMANN, Irina HÄCKER, Marc F. SCHETELIG. CRISPR-based genetic control strategies for insect pests. *Journal of Integrative Agriculture*, Volume 22, Issue 3, 2023, Pages 651-668, ISSN 2095-3119, <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.11.003>. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095311922002763>
76. Zhang, F. (2019). Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 52, E6. doi:10.1017/S0033583519000052. Disponível em <https://doi.org/10.1017/S0033583519000052>.
77. Zhang D, Hussain A, Manghwar H, Xie K, Xie S, Zhao S, Larkin RM, Qing P, Jin S, Ding F. Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective. *Plant Biotechnol J.* 2020 Aug; 18(8):1651-1669. doi: 10.1111/pbi.13383. Epub 2020 Apr 30. PMID:

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

32271968; PMID: PMC7336378. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32271968/>.

78. Zhu Y. Advances in CRISPR/Cas9. *Biomed Res Int.* 2022 Sep 23; 2022:9978571. doi: 10.1155/2022/9978571. PMID: 36193328; PMID: PMC9525763. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36193328/>.

79. Zotti MJ, Smagghe G. RNAi Technology for Insect Management and Protection of Beneficial Insects from Diseases: Lessons, Challenges and Risk Assessments. *Neotrop Entomol.* 2015 Jun; 44(3):197-213. doi: 10.1007/s13744-015-0291-8. Epub 2015 Apr 17. PMID: 26013264. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26013264/>.

GLOSSÁRIO

ACMV — Vírus do Mosaico da Mandioca Africana

AGO — Abreviação da proteína ARGONAUTE

ALS — Inibidores de acetolactato sintase

ARGONAUTE — Família de proteínas com papel central no silenciamento de RNA

ARGOS8 — Gene que regula o crescimento das plantas

Avr1b — Gene de virulência presente no oomicete *Phytophthora sojae*

BCMV — Mosaico Comum do Feijoeiro

BS — Bispiribac sódico

CAR-T — Célula T recetora de antígeno quimérico

Cas9 — Endonuclease que age como uma “tesoura molecular”

CBSD — Doença da Estria Marrom da Mandioca

CFIA — Agência de Inspeção de Alimentos do Canadá

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

cgRNA — Molécula quimérica de RNA de guia único

CONABIA — Conselho da Comissão Nacional em Biotecnologia Agrícola da Argentina

Corpos P — Estruturas citoplasmáticas encontradas em células eucarióticas

crRNA — é o RNA CRISPR

CRISPR — Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas CRISPR-Cas9 — Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associada a nuclease Cas9

CRISPR-GSS — cepas de sexagem genética projetada por CRISPR

CRISPRSRD — distorção da proporção sexual
CRISPR-Cas9

CTNBio — Comissão Técnica Nacional de Biossegurança do Brasil

CTV — Vírus da Tristeza dos Citros

DNA — Ácido Desoxirribonucleico

DSB — Quebras de fita dupla

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

dsRNA — RNA de fita dupla

EFSA — Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

EPA — Autoridade de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

EUA — Estados Unidos da América

FDA — Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos

GD — Gene Drive

Genes Bt — Genes de bactérias fotossintéticas

Genes R — Genes de Resistência

Genes S — Genes de Suscetibilidade

GIP — Proteína inibidora de glucanase

hpRNA (*hairpin RNA*) — Molécula de RNA que forma uma estrutura de alça

IAP — Isoenzima da fosfatase alcalina

IGI — Innovative Genomics Institute

HIV — Vírus da imunodeficiência humana

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

HET — Genes que codificam proteínas envolvidas na determinação do fenótipo heterocariótico em fungos

HyPRP1 — Proteína rica em prolina hidroxilada

HSNO — Lei de Substâncias Perigosas e Novos Organismos da Nova Zelândia

MAFF — Ministério da Agricultura, Florestas e Pesca do Japão

MHLW — Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar do Japão

mRNAs — pequenas moléculas de RNA não codificantes

MLO (*Mildew-Resistance Locus O*) — Genes do *locus O* de resistência ao oídio

mRNA — RNA mensageiro

MOE — Ministério do Meio Ambiente do Japão

MYMIV — Vírus do Mosaico Amarelo da *Vigna mungo*

NBC — Comité Nacional de Biossegurança da China

NPP1 — Proteína indutora de necrose 1

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

- OGM — Organismos geneticamente modificados
- OGTR — Escritório Regulador de Tecnologia Genética da Austrália
- OsARM1 — Gene presente no arroz envolvido no transporte de ferro
- OsERF922 — Fator de transcrição presente no arroz
- OsHAK1 — Gene presente no arroz que regula a absorção de potássio
- OsNramp5 — Gene presente no arroz que regula a absorção de ferro
- OsSWEET13 — Gene presente no arroz que regula a transportadora de açúcar
- PAM — Motivo adjacente do proto-espaçador
- PcPdeH — Fosfodiesterase de alta afinidade encontrada em *Phytophthora capsici*
- PD1 — Proteína 1 de morte celular programada
- PERV — Retrovírus endógeno suíno
- pgSIT — SIT guiado com precisão
- Rep — genes replicase presentes em vírus de plantas

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

RISC — Complexo de silenciamento induzido por RNA

RNAi — interferência de RNA

RN16 — Resolução Normativa n.º 16 do Brasil

Rps1b — Gene de resistência presente em algumas variedades de soja

RNA — Ácido Ribonucleico

RTBV — Vírus do Tungro Baciliforme do Arroz

SDN-1 — Nuclease 1 dirigida ao local

SDS-PAGE — Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS).

SGA — Divisão de Defesa Florestal e Agrícola do Serviço Agropecuário do Chile

SIHyPRP1 — Gene que codifica uma proteína rica em prolina hidroxilada

sRNAi — Pequenos fragmentos de RNA de interferência

SIT — Técnica do inseto estéril

SNP — Polimorfismo de Nucleótido Único

CRISPR-CAS9 EM PLANTAS

TALENs — Transcription Activator-Like Effector
Nucleases

TaMLO (*Mildew-Resistance Locus O*) — Genes do *locus O*
de resistência ao oídio

tracrRNA — RNA de transativação

TYLC — Vírus do Enrolamento das Folhas Amarelas
do Tomate

USDA — Departamento de Agricultura dos Estados
Unidos

UNESCO — Organização das Nações Unidas para a
Educação, a Ciência e a Cultura

ZFNs — Zinc Finger Nucleases


SOBRE OS AUTORES

Altino Branco Choupina nasceu na freguesia de Serapicos, Concelho e Distrito de Bragança, no dia 6 de Novembro de 1961. É Doutor na área científica de Biotecnologia pela Universidade Técnica de Lisboa (Instituto Superior Técnico) e Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pelo Universidade Técnica de Lisboa, possuindo ainda uma pós graduação (Curso de Doutorado) em Enzimologia e Regulação Metabólica pela Universidade de Salamanca (Espanha). Desde 1982 e até 1989 exerceu funções de docência em várias escolas do Ensino Secundário tendo exercido também e simultaneamente várias funções como Director de Escola e por inerência, Presidente dos Conselhos Consultivos, Presidente dos Conselhos Pedagógicos e Director dos Cursos Noturnos. Desde 1989 e até ao presente tem desenvolvido funções docentes na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, tendo leccionado várias disciplinas quer de Licenciaturas quer de Mestrados (Química, Biologia, Bioquímica, Ecologia, Microbiologia, Genética, Biologia Molecular, Engenharia Genética, Genómica, Bioinformática e Métodos de Diagnóstico Molecular) no departamento de Biologia e Biotecnologia. Durante este período foi ainda, membro do Conselho Pedagógico e do Conselho Científico, Vice-Presidente da Assembleia de Representantes, Vice-Coordenador do Departamento de Biologia e Biotecnologia e Director do curso de Biologia e Biotecnologia. Simultaneamente no período 1995 a 2001 foi docente convidado de várias disciplinas no Instituto Jean Piaget em Macedo de Cavaleiros com autorização do Presidente do Instituto Politécnico de Bragança e ao abrigo de um protocolo entre as instituições. Participa/participou como membro da equipa de investigação em vários projectos nacionais e internacionais tendo sido responsável na instituição do projecto financiado pela FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) PTDC/AGR-AAM/67628/2006 – Identificação, caracterização e

papel de factores moleculares associados ao mecanismo de infecção de espécies de Fagaceae por *Phytophthora cinnamomi*, com a duração de 2007 a 2010 e foi Responsável e Coordenador Científico do projecto internacional de desenvolvimento regional “COMBATINTA- Combate à doença da Tinta do castanheiro e outras culturas regionais por padrões moleculares.-SP2.P11/02” INTERREG III-A, financiado com fundos FEDER, em colaboração com a Universidade de Salamanca e com a duração de 2004 a 2008. Tem orientado diversas teses de Mestrado e de Doutoramento e Dissertações/Relatórios de Estágio Profissional/Trabalhos de Projecto em Biotecnologia e estágios de natureza profissional em áreas da Biotecnologia Alimentar e Agrícola, para além de participar regularmente em actividades de divulgação científica. Publicou até ao momento vários artigos em revistas científicas nacionais e internacionais (incluindo indexados ao ISI/Scopus) e atas de congressos e é co-autor de 4 capítulos de livros de carácter técnico e científico no âmbito da Biotecnologia. Nos últimos anos tem realizado investigação sobre pesquisa de genes e proteínas em Oomicetes fitopatogénicos, expressão genética e obtenção de produtos alimentares por extrusão. A partir de 2004/2005 tem lecionado também várias disciplinas na Escola Superior de Saúde de Bragança. Atualmente é Professor Adjunto na Escola Superior Agrária do IPB. A investigação desenvolvida é concordante com a atividade docente, com maior incidência na Biologia Molecular e Engenharia Genética, e na avaliação da Expressão Genética aplicada às áreas Alimentar e Agrícola e muito particularmente no estudo de Oomicetes fitopatogénicos do género *Phytophthora*. É membro do Centro de Investigação de Montanha (CIMO) e do Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC) do Instituto Politécnico de Bragança (IPB).

Kelly Vieira, natural de Minas Gerais, Brasil, é licenciada em Biologia e Biotecnologia pelo Instituto Politécnico de Bragança (IPB) em Portugal, e graduada em Administração pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG) no Brasil. Durante a sua formação em Biotecnologia, participou do Programa Erasmus Estudos na Universidad de Jaén, na Espanha, e Erasmus Estágio no laboratório da mesma instituição. Com mais de uma década de experiência na área administrativa de empresas, desenvolveu habilidades organizacionais e gerenciais que complementam o seu interesse pela ciência e tecnologia. Mãe dedicada, concretizou o sonho de estudar Biotecnologia, conciliando os desafios da maternidade com a vida acadêmica. Entusiasta de leitura e escrita, segue empenhada no objetivo de se tornar mestre e doutora em Biotecnologia, pois acredita no conhecimento científico para inspirar e transformar.

Patrick Ferreira nasceu em Fribourg, Suíça, é PhD em Engenharia de Biosistemas (Cum Laude) com especialização em edição de genomas (RNAi, CRISPR) e Mestre em Biotecnologia para Ciências da Saúde. Tem experiência profissional em engenharia de controlo de qualidade para sistemas de saúde, biologia molecular e sequenciação de nova geração. Atualmente trabalha como engenheiro de controlo de qualidade com especialização em testes de automação, desempenho e segurança.



NA OBRA “CRISPR-CAS9 EM PLANTAS: DESAFIOS ÉTICOS, CIENTÍFICOS E OPORTUNIDADES”, OS AUTORES EXPLORAM O IMPACTO REVOLUCIONÁRIO DA TECNOLOGIA CRISPR-CAS9 NO MELHORAMENTO GENÉTICO VEGETAL. COM UMA REVISÃO SISTEMÁTICA ABRANGENTE, O LIVRO EXPLORA O FUNCIONAMENTO DESSA FERRAMENTA MOLECULAR, SUAS APLICAÇÕES NA PROTEÇÃO DE PLANTAS CONTRA PRAGAS AGRÍCOLAS E SUA RESISTÊNCIA A STRESSES ABIÓTICOS E BIÓTICOS, ALÉM DE ABORDAR ESTRATÉGIAS COMPLEMENTARES COMO O RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAI). PARA ALÉM DOS AVANÇOS CIENTÍFICOS, O LIVRO DISCUTE OS DESAFIOS ÉTICOS, AMBIENTAIS E SOCIOECONÓMICOS RELACIONADOS À ADOÇÃO DESSA TECNOLOGIA, DESTACANDO A NECESSIDADE DE REGULAMENTAÇÃO E DEBATES PÚBLICOS PARA GARANTIR SEU USO SEGURO E SUSTENTÁVEL NA AGRICULTURA.