

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PONTA GROSSA
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELENTIANE DA SILVA PAES
GABRIEL SALVADOR MIRANDA

CRISPR: DA CONCEPÇÃO A SALA DE AULA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2022

ELENTIANE DA SILVA PAES
GABRIEL SALVADOR MIRANDA

CRISPR: DA CONCEPÇÃO A SALA DE AULA
CRISPR: FROM CONCEPTION TO CLASSROOM

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas, do DAENS / COLIC, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Silva

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Frasson

PONTA GROSSA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

TERMO DE APROVAÇÃO

CRISPR: DA CONCEPÇÃO A SALA DE AULA

ELENTIANE DA SILVA PAES
GABRIEL SALVADOR MIRANDA

Trabalho de Conclusão de Curso **APROVADO** como requisito parcial para conclusão do curso de LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

MARCIO SILVA
Professor Orientador
Universidade Tecnológica Federal Do Paraná - UTFPR

ANTONIO CARLOS FRASSON
Professor Coorientador
Universidade Tecnológica Federal Do Paraná - UTFPR

LETÍCIA CUCOLO KARLING
Professor do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas
Universidade Tecnológica Federal Do Paraná - UTFPR

MARCIO CRISTIANO DURA CAVAGNARI
Professor Externo
Secretaria da Educação e do Esporte - SEED/PR

Ponta Grossa, 25 de novembro de 2022.

Este TERMO DE APROVAÇÃO assinado encontra-se no processo SEI de defesa do TCC e na Coordenação do Curso

AGRADECIMENTOS

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela oportunidade de fazer o curso.

Ao Colégio Estadual Padre Carlos Zelesny por ceder o espaço para trabalharmos com os alunos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de nossa formação.

RESUMO

Na última década a edição genética RNA-programável CRISPR-Cas9 vêm se tornando a base para diversas inovações na biologia, proporcionando avanços em nosso entendimento sobre o desenvolvimento direto do genoma. Essa técnica vislumbra sustentar aplicações na biomedicina, biotecnologia e biologia sintética, facilitando o desenho ou o redesenho de sistemas biológicos. Dentro do contexto do ensino de Ciências e suas Tecnologias, a carência de uma ponte entre pesquisadores, professores e sociedade torna delicado o processo de comunicação. Para contribuir na viabilização da divulgação científica em biologia molecular e biotecnologia, esse trabalho fora realizado em torno de uma intervenção pedagógica em formato de atividade prática no Colégio Estadual Padre Carlos Zelesny, onde CRISPR trouxe o diálogo inicial sobre biotecnologia, estabelecendo uma relação entorno da biotecnologia e suas inovações, e realizou-se uma atividade prática representativa, onde os alunos trabalharam com a montagem do DNA, transcrição e tradução. O rendimento da atividade foi satisfatório e foi possível notar o envolvimento geral dos estudantes com os conceitos que foram se construindo durante a prática mediante suas relações biotecnológicas; portanto CRISPR mostrou-se uma ferramenta de potencial didático para estudantes do ensino médio.

Palavra – Chave: biotecnologia; divulgação científica; prática docente.

ABSTRACT

In the last decade, RNA-programmable CRISPR-Cas9 gene editing has become the basis for several innovations in biology, providing advances in our understanding of the direct development of the genome. This technique envisages sustaining applications in biomedicine, biotechnology and synthetic biology, facilitating the design or redesign of biological systems. Within the context of teaching Science and its Technologies, the lack of a bridge between researchers, teachers and society makes the communication process delicate. To contribute to the viability of scientific dissemination in molecular biology and biotechnology, this work was carried out around a pedagogical intervention in the form of a practical activity at Colégio Estadual Padre Carlos Zelesny, where CRISPR brought the initial dialogue on biotechnology, establishing a relationship around biotechnology and its innovations, and a representative practical activity was carried out, where the students worked with DNA assembly, transcription and translation. The performance of the activity was satisfactory and it was possible to notice the general involvement of the students with the concepts that were being built during the practice through their biotechnological relations; therefore CRISPR proved to be a tool of didactic potential for high school students.

Keywords: biotechnology; scientific divulgation; teaching practice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Experimento de Hershey-Chase	18
Figura 2 - Representação do complexo de clivagem por sgRNA/Cas9 e DNA-alvo	21
Figura 3 - Modelo tridimensional da spCas9	24
Figura 4 - Via de reparo por junção de pontas não homólogas (NHEJ)	26
Figura 5 - Recombinação homóloga e <i>knock-in</i> das fitas de DNA	26
Figura 6 - Kit construindo as moléculas da vida	32
Figura 7 - Cartilha de instruções	32
Figura 8 - Alunos e seus modelos didáticos	35
Figura 9 - Representação da ligação peptídica	35
Figura 10 - Gráficos das respostas ao questionário	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BNCC	Banco Nacional Comum Curricular
CNT	Ciências da Natureza e suas Tecnologias
CRISPRi	Interferência por CRISPR
crRNA	CRISPR- <i>derived</i> RNA
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSB	<i>Double-Stranded Break</i>
dsRNA	<i>Double-Strand</i> RNA
EM	Ensino Médio
gRNA	<i>guide</i> -RNA
HDR	<i>Homologous Direct Recombination</i>
KO	<i>Knockout</i>
mRNA	RNA mensageiro
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGH	Projeto Genoma Humano
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de Interferência
tracrRNA	Trans-Activating CRISPR-derived RNA
ZFN	<i>Zinc-Finger Nucleases</i>
Cas	CRISPR <i>Associated Proteins</i>
Cas9	CRISPR <i>Associated Protein 9</i>

COVID-19	<i>Corona Virus Disease</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>
INEP	Instituto Nacional de Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira
TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>
UNESCO	<i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	PROBLEMA	13
1.2	OBJETIVO GERAL	13
1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
1.4	JUSTIFICATIVA.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	A HEREDITARIDADE DE MENDEL E O DNA	16
2.2	TECNOLOGIAS DO DNA E CRISPR	20
2.3	MECANISMO BÁSICO DA TÉCNICA CRISPR	21
2.3.1	Reparo De Dna em Extremidades Abruptas	24
2.3.2	Diversidade e Aplicabilidade da Técnica CRISPR	27
2.4	QUESTÕES ÉTICAS ENVOLVIDAS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	ATIVIDADE PRÁTICA	34
4.2	QUESTIONÁRIO	36
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICE A	43

1 INTRODUÇÃO

Na era da internet informações são divulgadas tão rapidamente que é impossível auferir ou acompanhar a discussão, diferentemente dos curadores da era pré-internet, e ao invés de ouvirmos exclusivamente às fontes profissionais de comunicação e mídia, somos deixados aos nossos próprios meios para julgar o que é válido. Isso se deve a um impulso instintivo de nos proteger emocionalmente e fisicamente onde verdades tem o potencial de nos ameaçar.

Para tanto, é compreensível a falta de entendimento de parte da sociedade sobre mecanismos e objetos básicos da ciência e sócio tecnológicos, que é intensificada por temas como a pandemia de COVID-19 e pela polarização ideológica.

Dentro dessa questão também é possível observar que há uma carência de alfabetização científica na formação cidadã, embora faça parte da base curricular do ensino o despertar da reflexão e da criticidade a respeito de assuntos como o progresso científico-tecnológico, ainda é um tema pouco abordado, levando em conta até mesmo os movimentos que surgiram em pleno século 21 como os anti-vacina, sendo uma problemática também diretamente ligada com a globalização como afirma SILVA (2021), cientes de que os motivos que geram a hesitação ou a recusa vacinal refletem os conflitos de cada época, é possível compreender que, no século XXI, na era da globalização, a manipulação e a publicação das notícias falsas referentes à vacinação ainda se repetem e, como em 1904, a resistência à vacinação não é algo “exclusivo da população pobre e/ou analfabetas. Sendo visível assim a necessidade de assuntos biotecnológicos serem discutidos em sala de aula.

Desde a descoberta da dupla fita do DNA, inúmeras tecnologias para a manipulação dessa importante molécula foram desenvolvidas levando a avanços em pesquisa e no entendimento da biologia celular e molecular. Dentre essas tecnologias, destaca-se a manipulação sítio-dirigida como o uso de nucleases *zinc fingers* (ZFNs) e nucleases TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*). Ambas as manipulações sítio-dirigidas são altamente informativas, porém limitadas no campo da biologia estrutural e de síntese.

Essas dificuldades potencialmente tendem a ser superadas a partir do uso da tecnologia CRISPR¹ (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*).

O sistema CRISPR foi primeiramente identificado e descrito nos principais domínios bacterianos e *archaea*. Trata-se de uma região conservada no genoma de *archaea* e bactéria

¹ CRISPR, em tradução livre para língua portuguesa significa: aglomerado de repetições palindrômicas curtas regularmente intercaladas. Característica que descreve uma matriz genômica de certos microorganismos.

que é caracterizada por regiões de genes regularmente agrupados que contém repetições curtas e palindrômicas.

Somente na primeira década do século XXI, o loco CRISPR foi caracterizado como sistema imune adaptativo de procariotos que codificam RNAs-guias (gRNAs) de origens virais que se unem a cascatas de proteínas denominadas Cas contempladas ao loco CRISPR e integralmente realizam o reconhecimento por complementaridade de pares de base, resultando na clivagem do alvo. A tecnologia CRISPR-Cas9 é derivada do tipo II dos três tipos de sistemas CRISPR encontrados em procariotos. Tem como princípio básico uma endonuclease (Cas9) com ação de clivagem guiada através complexo de *single-guide* RNA (sgRNA) até o gene alvo.

Na última década a técnica de edição genética RNA-programável CRISPR-Cas9 vêm se tornando a base para diversas inovações na biologia, proporcionando avanços em nosso entendimento sobre o desenvolvimento direto do genoma. Essa técnica vislumbra sustentar aplicações na biomedicina, biotecnologia e biologia sintética, facilitando o desenho ou o redesenho de sistemas biológicos.

Em suma, a técnica revoluciona o cenário da biologia e biotecnologia não por trazer algo novo, mas por sua simplicidade, precisão e versatilidade. Essas características são atraentes não só para o campo da biotecnologia, mas podem também ser incorporadas no processo de discussão voltado para a divulgação científica visto que engloba aspectos socialmente relevantes da Ciência e Tecnologia (C&T).

Segundo dados da UNESCO, até 2018 o Brasil tinha um pesquisador para cada mil cidadãos brasileiros, pesquisadores estes que têm suas responsabilidades de informar e orientar a população sobre os avanços das ciências e suas tecnologias.

Dentro do contexto do ensino de Ciências e suas Tecnologias, a carência de uma ponte entre pesquisadores, professores e sociedade torna delicado o processo de comunicação, facilitando a interferência de processos como a chamada “nova mídia” que forma parcela das opiniões relacionadas à CRISPR, e podem abordar discursos de caráter determinístico e salvacionista tecnológico; discursos de medo e discursos relativistas (MACHADO, R.; NETO, A.; MORAES, F. 2019).

Em viés crítico da C&T o determinismo e salvacionismo tecnológico, bem como discursos que incitam o medo são potencialmente perturbantes e prejudiciais à imagem da ciência.

Visto isso, é razoável afirmar que a educação básica em biologia que não se preocupa com a discussão de suas tecnologias e não interconecta as relações entre C&T é diretamente

responsável pela promoção da banalização, da simplificação do método e do desconhecimento dos cidadãos em torno das tecnologias do DNA.

Por um lado, a banalização da técnica é advinda de discussões simplórias (comumente circuladas em redes sociais) e culmina em um ideário raso e superficial onde é provável a propagação de conceitos equivocados e ausentes de preceitos *sine qua non* da tecnologia. Da mesma forma, o desconhecimento dos conceitos básicos de qualquer tecnologia desqualifica uma condição de cidadania apta a discutir o papel destas em suas sociedades e comunidades.

Para contribuir na viabilização da divulgação científica em biologia molecular e biotecnologia, este trabalho busca realizar uma intervenção pedagógica no Colégio Estadual Padre Carlos Zelesny, na turma do 3º ano noturno, utilizando CRISPR como ferramenta de abordagem biotecnológica, estabelecendo a relação entorno dos conhecimentos base de biotecnologia suas aplicações e inovações. A proposta se estabelece através de uma atividade prática representativa.

1.1 PROBLEMA

Seria CRISPR uma alternativa viável para a ampliação do debate/divulgação científica a respeito da tecnologia do DNA recombinante?

1.2 OBJETIVO GERAL

Incentivar a observação, discussão e análise dos componentes básicos da biotecnologia abordada em sala de aula através da técnica de edição genética CRISPR.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a abordagem de biotecnologia em sala de aula por meio de questionário.
- Fazer uso da abordagem em biotecnologia baseada em CRISPR-Cas9 para desenvolver os conhecimentos base em biologia molecular através de ferramentas representativas do DNA, RNA e aminoácidos.
- Realizar a transposição didática do tema CRISPR através de uma intervenção pedagógica.

1.4 JUSTIFICATIVA

Apresenta-se aqui a importância da discussão e divulgação científica baseada na hipótese da falta de criticidade que o ensino básico proporciona em relação às Ciências da Natureza, portanto o presente trabalho objetiva-se na abordagem didática de um tema relacionado à biotecnologia e enredado à revolução biotecnológica.

A Base Nacional Comum Curricular (BNCC) da área de Ciências da Natureza e suas Tecnologias (CNT) para o Ensino Médio (EM) preconiza garantir aos estudantes habilidades e competências específicas e provê, dentre elas: a capacidade de se analisar e utilizar interpretações sobre a dinâmica da Vida em suas formas e níveis de organização; interpretar textos de divulgação científica; analisar e debater situações sobre a aplicação do conhecimento das CNT, tais como tecnologias do DNA (BRASIL, 2018, p. 559). Além de ressaltar que:

No Ensino Médio, a área deve, portanto, se comprometer, assim como as demais, com a formação dos jovens para o enfrentamento dos desafios da contemporaneidade, na direção da educação integral e da formação cidadã. Os estudantes, com maior vivência e maturidade, têm condições para aprofundar o exercício do pensamento crítico, realizar novas leituras do mundo, com base em modelos abstratos, e tomar decisões responsáveis, éticas e consistentes na identificação e solução de situações-problema. (BRASIL, 2018, p. 463)

Esses debates que deveriam ocorrer no ambiente escolar acontecem de maneira rasa, causando certas disforias no processo de ensino, exemplos como o flagelo da COVID-19 e o desenvolvimento de biotecnologias baseadas em CRISPR-Cas potencialmente apressam o que James Watson chamará de “próximo avanço mais importante da biologia”, a terceira grande revolução da modernidade. Provavelmente, descobrir se devemos editar nossos genes e como fazê-lo venha a ser uma das questões mais importantes do século XXI.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

As discussões embasadas desde o desenvolvimento do conceito genético de Mendel às novas tecnologias do DNA e CRISPR² São importantes para realizar a contextualização histórica do momento em que o fato científico ocorre, compreender a comunidade e o fator investigado.

Estas circunstâncias facilitam o entendimento do leitor para que se possa estabelecer uma compreensão não só do tema, mas de todo processo de desenvolvimento para que a divulgação da informação possa alcançar desde um público já inteirado do assunto até pessoas que estão iniciando sua jornada neste processo.

Ao mesmo tempo, há a convergência da crescente possibilidade de reescrever o código da vida em companhia de recorrentes fontes de desinformação, torna-se imprescindível compreender as ciências da vida, suas tecnologias, potencialidades e seus segmentos éticos e humanos.

Em contraponto às propostas curriculares da BNCC, homologadas em 2017, as Diretrizes Curriculares da Educação Básica (DCE) em Biologia da Secretaria de Estado da Educação do Paraná (SEED, 2008) dissertam sobre os conteúdos curriculares de maneira a separar os conteúdos estruturantes em quatro modelos interpretativos do fenômeno “vida” para o ensino da disciplina de biologia e do pensamento biológico: descritivo, mecanicista, evolutivo e da manipulação genética. Aqui discutiremos sobre o pensamento biológico da manipulação genética, presentes na DCE e suas correlações com a pedagogia no ensino de biologia na educação básica.

Desde a década de 1970, o contexto acerca das ciências naturais definia a fragilidade da concepção da ciência ainda limitada a uma epistemologia empírica (SEED, 2008) que culmina na separação dos componentes do estudo de sistemas biológicos onde, na atualidade, a biologia molecular é considerada o centro dos interesses biológicos. Ainda na DCE os autores afirmam:

Esses conhecimentos geram conflitos filosóficos, científicos e sociais e põem em discussão a manipulação genética e suas implicações sobre o fenômeno VIDA. Essas controvérsias contribuem para que um novo modelo explicativo se constitua como base para o desenvolvimento do pensamento biológico da manipulação genética. (SEED, 2008).

² Respectivo ao termo CRISPR ou CRISPR-Cas, nos referimos em geral aos sistemas do tipo II ou derivados.

Ainda como conteúdos estruturantes no currículo de biologia, na perspectiva dos avanços no campo da biologia molecular e manipulação genética, existe a necessidade de:

Compreender e explicar como determinadas características podem ser inseridas, modificadas ou excluídas do patrimônio genético de um ser vivo e transmitidas aos seus descendentes por meio de mecanismos biológicos que garantem sua perpetuação. Ao propor este conteúdo estruturante, ampliam-se as explicações sobre como novos sistemas orgânicos se originam e como esse conhecimento interfere e modifica o conceito biológico VIDA. (SEED, 2008).

Ou seja, os conceitos relacionados à manipulação genética dos seres vivos devem ser trazidos aos alunos não apenas como conceitos de biologia aplicada, meramente tecnológicos, mas também aquiescido de uma reflexão do próprio conceito de vida como fato natural e por consequente suas implicações éticas.

Referente ao currículo escolar, há nas Diretrizes Curriculares da Educação Básica em Biologia ensaios e orientações de caráter reflexivo, exploratório e crítico frente às tecnologias do DNA, enquanto na BNCC justapostas essas questões, são dotadas de condições conteudistas e deliberadamente vagas, opacas às relações de discussão e interpretação do currículo.

Visto estas relações, a abordagem da técnica CRISPR em sala de aula traz consigo uma contemporaneidade necessária à *práxis* da docência nos anos finais da educação básica, aqui, sem desvincular as delicadas discussões éticas relacionadas ao uso da ferramenta nos seus diferentes meios de circulação. A técnica de edição genética CRISPR permite a exploração no nicho genético e consequente, bioquímico e da biologia molecular. Visto que, as peças centrais dessa tecnologia baseiam-se em um sgRNA, uma enzima endonuclease (Cas-9) e sua interação com o DNA, na prática pedagógica, invertemos o raciocínio progressivo destes conceitos para reforçar e analisar as bases da biotecnologia para com os alunos.

2.1 A HEREDITARIEDADE DE MENDEL E O DNA

Em 20 de julho de 1822 nascia um dos maiores nomes da biologia, Gregor Johann Mendel, que desde muito novo demonstrava grandes interesses pelos estudos, tinha o sonho de se tornar professor, mas como era de uma família humilde, não tinha condições financeiras para custear os estudos sozinho.

A predisposição para o estudo levou-o a se tornar membro do Mosteiro da Ordem de Santo Agostinho, um local que à época era referência em questões de educação, onde Mendel pode enfim realizar seus estudos. Sendo as plantas uma de suas maiores afinidades, ele então passa a cuidar dos jardins e praticar experimentos.

Desses experimentos um dos mais marcantes para o histórico da biologia está o cruzamento de ervilhas para verificar a hereditariedade, visto que no século XIX ainda se tinha a ideia que as características hereditárias poderiam resultar em uma semelhança apenas de um dos seus progenitores.

Os experimentos realizados tornaram possível estabelecer as hoje conhecidas três leis de Mendel, quais sejam: A Lei da pureza dos gametas que diz que cada caráter é condicionado por um par de genes alelos, os mesmos realizam a segregação entre eles, mantendo uma probabilidade equivalente durante a formação do gameta. Dessa forma irá apenas um gene para o gameta, neste momento surgem os termos dominantes e recessivos relacionados aos genes. A lei da segregação independente consiste, na formação do gameta, a distribuição de alelos que não influenciam sobre caracteres individuais, permitindo a variabilidade de características.

A lei da distribuição independente realiza a afirmação de que uma característica não se torna dependente de outra, sendo por exemplo fatores como, cor dos olhos, dos cabelos, altura, fatores independentes uns dos outros.

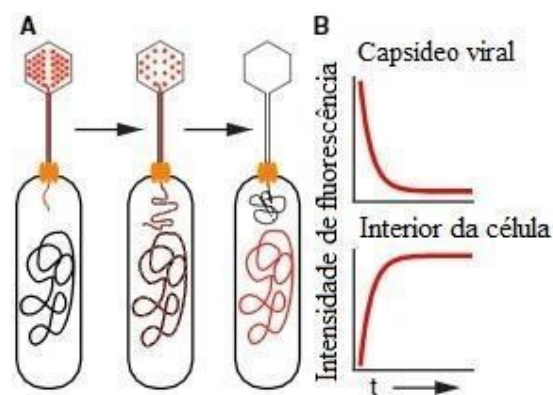
Com o passar dos anos as experimentações genéticas avançam com novas pesquisas e com a finalidade de desvendar os mistérios do ácido desoxirribonucleico (ADN). Investigações conduzidas por vários pesquisadores como Friedrich Miescher, médico suíço nascido em 1844 que ao oposto de Mendel tinha interesse em se juntar a vida religiosa e tornar-se padre, mas como sua família era deveras importante na sociedade Friedrich então ingressou na medicina, durante a guerra da Criméia atuou como médico, em um desses trabalhos isolou a com o auxílio da pepsina (uma enzima presente no estômago de mamíferos), o composto obtido a partir do isolamento foi denominado de nucleína, que apresentava quantidades significativas de nitrogênio e fósforo, essa descoberta abriu portas para novas investigações.

Frederick Griffith (1877-1941) foi um médico inglês que atuou em diversas pesquisas em torno da cura para pneumonia, sua pesquisa que obteve maior êxito no auxílio da criação de antibióticos mais eficazes contra as bactérias foi o experimento de Griffith no qual utilizando a bactéria *Streptococcus pneumoniae* no qual pode observar a atuação genética, utilizando ratos como parte de seu experimento Griffith classificou duas cepas de bactérias, uma que tinha compostos capazes de infectar os ratos e outra cepa com o vírus inativado por meio de calor, na esperança de que a bactéria não causasse danos ao indivíduo, mas do contrário que se esperava a troca de material genético entre as cepas as tornou letal para o animal, com esse experimento foi possível visualizar a variabilidade dessas bactérias, as pesquisas não foram publicadas inicialmente. Anos mais tarde, Oswald T. Avery (1877-1955), Colin MacLeod (1909-1972) e Maclyn McCarty (1911-2005) deram continuidade às pesquisas de Griffith e constataram que

as bactérias haviam sido modificadas pelo DNA, de forma que a transformação genética havia ganhado então uma linha de pesquisa.

Em 1952 Martha Chase e Alfred Hershey realizaram um experimento denominado experimento de Hershey-Chase (Figura 1) onde através de bacteriófagos foi possível realizar a definitiva identificação do material que estava presente no fago era passado para a bactéria, essa confirmação então foi capaz de classificar a função do DNA e a obtenção de que esse material não era uma proteína.

Figura 1 - Experimento de Hershey-Chase



Fonte: Adaptado de: VALE, D. V, et al., (2012).

As especulações sobre a estruturação do DNA, após essa nova descoberta se tornaram ainda mais frenéticas, visto que, não se tinham informações de como essas propriedades do núcleo celular eram passadas de progenitores para descendentes, isso fez com que Erwin Chargaff se dedicasse a obter as estruturas químicas da composição do DNA, apresentou que a porcentagem de Adenina e Timina eram equivalentes, assim como as porcentagens de Citosina e Guanina.

A estrutura do DNA foi vista pela primeira vez por meio de uma imagem de difração de raio-x realizada por Rosalind Franklin no *King's College* em Londres, a denominada imagem 51 tomou notoriedade pois com ela tornou-se possível a visualização da dupla hélice do DNA, essas informações futuramente iriam auxiliar Watson e Crick no processo de elaboração da estrutura do DNA, porém seu sucesso não foi imediato.

Por conta de equívocos na experimentação, decidiram que o grupo fosfato deveria estar presente na parte interna da estrutura helicoidal e o que acreditavam que a o DNA seria composto por três cadeias de nucleotídeos (nt), além de conter a presença de íons de magnésio. Ao tomar conhecimento de um artigo escrito por Linus Pauling que tratava a estrutura do DNA

como uma tripla-hélice, percebendo que o DNA seria protonado segundo esse modelo, Watson e Crick repensaram a estrutura molecular do DNA. Em 1953, após saber da conclusão de Rosalind Franklin - de que os fosfatos deveriam estar na parte externa do polímero - Watson percebeu que as ligações A - T, C - G satisfaziam-se e permitiram que a estrutura da hélice se mantivesse com diâmetros aproximados entre seus pares.

Depois de publicado na revista *Nature*, sugeriu-se um esquema de replicação do DNA, por Watson. Crick obteria seu título de doutor no ano seguinte e mais tarde colabora juntamente com Brenner para aprimorar o entendimento da síntese proteica e do código genético. Watson e Crick receberam o título Nobel de Medicina ou Fisiologia em 1962 pela descoberta da estrutura de DNA e originaram-se um marco na história da ciência, estreando o campo da Biologia Molecular e posteriormente ao conceito de engenharia genética.

Com a desmistificação da estrutura do DNA o campo da biologia molecular ganha maior visibilidade e desperta maior interesse, no final do século XX início do século XXI um dos projetos mais relevantes foi a realização do Projeto Genoma Humano (PGH) uma colaboração de diversos países que levou quinze anos para identificar todos os genes estruturais, foram encontrados cerca de 25.000 genes codificadores na espécie humana, em comparativo com um camundongo é uma quantidade inferior, diante dessas afirmações obtidas foi possível estabelecer a análise de que a quantidade de gene não interferia na complexidade da espécie.

Com a codificação do genoma foi possível desenvolver novas técnicas que em diversos aspectos melhoraram a qualidade de vida do ser humano, como a possibilidade de identificar predisposição genética para doenças como o câncer de mama, síndrome de Down, Alzheimer, trombose venosa, entre outras. Já a partir da clonagem molecular e da tecnologia do DNA recombinante, que consiste na manipulação de sequências genéticas que permitam a modificação de características intrínsecas ao genoma, ou seja, a inserção, deleção ou perturbação de um determinado gene, essas possibilidades de utilização do DNA recombinante trouxeram diversos benefícios para o ser humano como a fabricação sintética de insulina a partir da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), a fabricação de vacinas, hormônios de crescimento, o desenvolvimento dos testes como o de paternidade também denominado teste de DNA foram de grande importância não só para a área médica mas também para a área de perícia criminal.

A discussões embasadas no processo de desenvolvimento biotecnológico geram inúmeros questionamento não somente em busca do que esse processo possa proporcionar em benefício dos seres humanos, mas também questões com preocupações éticas, para efetuar uma correlação entre essas preocupações e possíveis inovações a técnica de CRISPR torna-se um possível aliado na produção de uma discussão no processo de divulgação científica.

2.2 TECNOLOGIAS DO DNA E CRISPR

Os sistemas CRISPR-Cas assemelham-se com outras estratégias ao campo da edição genética. Quanto à caracterização do mecanismo de ação, CRISPR segue um princípio quimérico já denotado anteriormente em outros mecanismos, e atua de forma análoga ao RNA de interferência (RNAi) eucariótico.

Guiado por RNAs de fita-dupla (dsRNAs) o RNAi é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, capaz de reconhecer uma sequência específica de RNA mensageiro (mRNA) e mediar sua clivagem ou resultam em inibição da tradução. Por compartilharem mecanismos de atuação em comum, ou seja, tanto os sistemas CRISPR e os RNAi apresentam endonucleases que clivam ácidos nucleicos através de pequenos RNAs que guiam até uma sequência-alvo, alguns autores classificam CRISPR como um *RNAi-like process* (KUMAR et al., 2015).

Outras ferramentas de uso para modificações genéticas dirigidas, amplamente usadas e bem caracterizadas em células eucarióticas são as nucleases ZNFs (BIBIKOVA, M.; GOLIC, M.; GOLIC, K. G.; CARROLL, D. 2002.) e TALENs (CHRISTIAN, M.; CERMAK, T.; DOYLE, E. L.; et al., 2010).

Proteínas ZNFs englobam diversas famílias estruturais, um dos domínios genéticos mais comuns representa a segunda proteína mais regularmente codificada no genoma humano, o domínio Cys2–His2 de proteínas ZNFs (Gaj., Thomas; Gerbach., Charles; Barbas., Carlos., 2013). Cada ZNF consiste em média cerca de 30 aminoácidos em configuração estrutural de duas folhas- β antiparalelas e uma α -hélice, seus resíduos conservados em complexo com um íon de zinco contatam as cadeias laterais do DNA, de modo que cada domínio de uma proteína ZNF podem interagir com 3 ou 4 pares de bases. As proteínas ZNFs foram, por muitos anos, o único caminho disponível para a interferência de proteínas e enzimas ligantes ao DNA. Por este motivo, ZFNs são alvos de projetos de bioengenharia e construções que buscam alvejar uma maior densidade de sítios-alvo em sequências nucleotídicas.

TALENs são proteínas constituídas por repetições entre 33 a 35 aminoácidos onde cada aminoácido fornece reconhecimento para um par de base, cuja especificidade é determinada por aminoácidos chamados di-resíduos variáveis de repetição. Diferentemente das ZNFs, as TALENs apresentam dificuldades de elaboração de múltiplas clonagens, de se re-engenheirar em seu *design* estrutural e o sítio ligante desta deve começar com uma base T, fatores que consequentemente dificultam a habilidade de ligação em sítios-específicos, embora haja uma

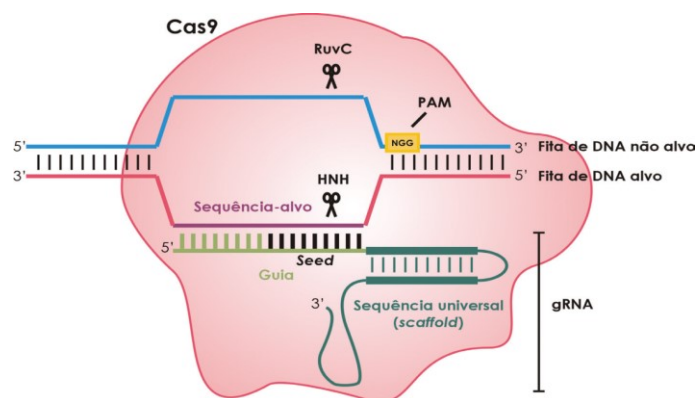
base de estudos (KIM, Y. et al. 2013) que buscam sofisticar a utilização de TALENs para aplicações rotineiras.

CRISPR não é um sistema desprovido de falhas, a *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) comparado aos ZNFs e TALENs possui taxa alta de mutações e efeitos *off-target* variáveis, mas também contém uma densidade de maior de sítios-alvo (1 a cada 8 pares de base), é de citotoxicidade baixa e possibilita a construção de bibliotecas para edição em escala genômica, que anteriormente, era possível com o uso de TALENs mas contava com problemas de efeitos *off-target*.

2.3 MECANISMO BÁSICO DA TÉCNICA CRISPR

Como CRISPR é uma técnica de edição genética baseada em um processo biológico de imunidade adaptativa de procariotos, é importante separar o processo biológico da síntese artificial. Os RNAs chamados crRNAs (*CRISPR-derived RNA*) e tracr-RNA (*trans-activating CRISPR-derived RNA*) que, respectivamente, direcionam e ativam a endonuclease até seu alvo encontram-se apenas nos sistemas naturais. A técnica laboratorial simplifica estas etapas dependentes das duplas de RNAs e atua sob a “fusão” destes numa única fita de RNA, (DOUDNA, J., CHARPENTIER, E., 2012). Essa fita tem a função tanto ativadora quanto direcionadora - o *single-guided RNA*, composto pela sequência-guia - que inclui cerca de 20 nucleotídeos 5', cada um específico para um alvo - e uma sequência universal (*scaffold*) que se dobra em forma de grampo (Figura 2), com cerca de 80 nt 3' que naturalmente faz parte do guia.

Figura 2 - Representação do complexo de clivagem por sgRNA/Cas9 e DNA-alvo.



Fonte: LEAL-BALBINO; T. C.; PEREIRA, T.; BARROS, M. (2016).

A nuclease que se liga a sgRNA é a Cas9, originária de sistemas CRISPR bacterianos tipos II e é proveniente de *Streptococcus pyogenes*. Essa é a enzima utilizada mais corriqueiramente

em processos envolvendo a técnica CRISPR-Cas9, muito embora outras nucleases sejam atualmente utilizadas em sistemas alternativos, como a Cpf1 (YAMANO et al., 2016). Como endonuclease, a Cas9 é capaz de clivar o DNA-alvo em sua região interna (corte duplo) e em sua estrutura terciária (Figura 3) é possível visualizar duas regiões lobuladas: um lóbulo de atividade nucleásica (NUC), e outro lóbulo de reconhecimento (REC). O lóbulo NUC possui os domínios catalíticos HNH, RuvC e o domínio de interação com a região PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) do DNA-alvo. No modelo cristalográfico da SpCas9 (JINEK, M. et al., 2014) observa-se que fendas no lóbulo de nuclease e no lóbulo helicoidal, revelam conformações engatilhadas pela ligação e clivagem de DNA, e a ativação e regulação mediada por RNA.

Domínios estruturais conservados na proteína Cas9, próximos a região C-terminal (*C-terminal Domain*; CTD) indicam homologia a enzima topoisomerase II de levedura (JINEK et al., 2014) e sequências ricas em arginina podem estar envolvidas com ligação do crRNA/tracrRNA. Estudos conduzidos por Sampson et al (2013) corroboram com essa suposição, uma vez que mostram que mutações nessa região em *Francisella novicida* levam à perda do alvejamento por RNA *in vivo*.

A atividade de endonuclease Cas9 requer um domínio PAM presente no DNA-alvo para reconhecimento e direcionamento e sua clivagem. No caso da *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) essa sequência é composta por três nucleotídeos “NGG” onde “N” é qualquer nucleotídeo, dispostos ao término da sequência-alvo sentido 3’ 5’.

Os resíduos de aminoácidos que interagem com os nucleotídeos “NGG” são Arginina 1333 a 1335, no sentido 5’ 3’ é o resíduo Lisina 1107 (LEAL-BALBINO, T. C. et al., 2016). O domínio de interação com a PAM (PI) atua apenas nas duas fitas do DNA-alvo e promove a abertura entre as cadeias do DNA. Esta abertura permite a interação com o RNA-guia que começa pela sequência *seed* de ~8 nt para então iniciar a formação do heteroduplex DNA-sgRNA. A carga negativa consolidada pelo pareamento é acomodada pelos lóbulos positivos, REC e NUC da Cas9. Nesse momento acontece a clivagem das duas fitas, por volta de 3-4 pares de base (pb) a montante da PAM (JINEK et al., 2012).

Pelo fato da sequência PAM ser essencial para a atividade da Cas9, essa limita seu potencial para uso. Embora a enzima Cas9 não seja a única a reconhecer sítios suscetíveis a aplicações de edição de genoma, muitas vezes a exigência do sítio PAM pode ocasionar dificuldades para reconhecer e clivar o alvo com a precisão necessária. Cabe destacar que a Cas9 selvagem utiliza essa sequência para evitar a clivagem em seu próprio gene.

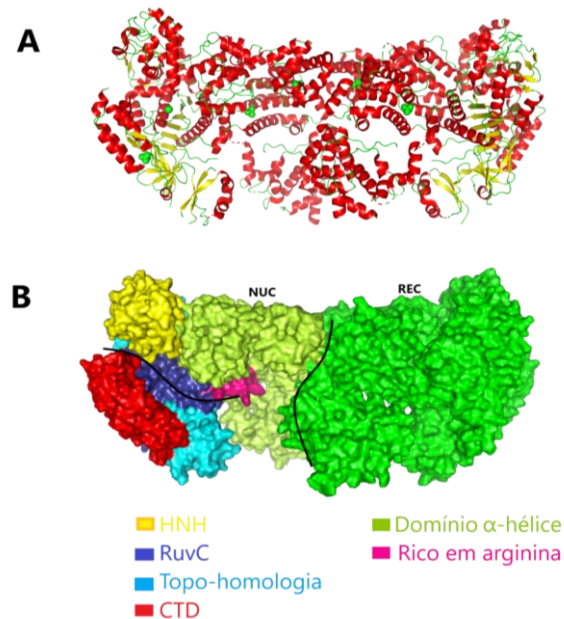
Para minimizar a limitação do sistema, estudos baseados na estrutura molecular de SpCas9 investigaram a possibilidade de variações e maneiras de modificar novas sequências

PAM. Uma abordagem incluindo *design* combinatório e evolução direcionada foi capaz de encontrar versões mutantes da SpCas9 que podem reconhecer outras sequências PAM como “NGCG” e “NGA” em células humanas e *zebrafish* (KLEINSTIVER et al., 2015). Após comprovadas variações na sequência PAM, foram verificadas variantes ortólogas da Cas9 (RAN, F et al., 2015) que possuem diferentes requerimentos de sequências PAM, além de uma diversidade de estudos que buscam engenheirar variantes Cas9 para obterem afinidade com perfis PAM globais (JIANG, W et al., 2013).

Alternativas diversas que buscam a proposição automática de regiões suscetíveis a modificação por CRISPR estão sendo investigadas. Dentre estas destacam-se ferramentas que podem procurar sítios PAM e fazer a montagem do RNA-guia, como por exemplo ©Benchling da Google e *softwares* que buscam minimizar a incidência de clivagens não intencionadas (*off-targets*) como CRISPR*direct* (NAITO, Y. et al., 2015) e que buscam designs de gRNAs com alta especificidades e sensibilidade (CHUAI, G. et al., 2018). Portanto, a técnica CRISPR inicialmente demanda apenas dois elementos exógenos para aplicação em células-alvo: a Cas9 e o sgRNA, que concedem facilidade ao procedimento experimental.

No modelo cristalográfico da endonuclease SpCas9 (figura 3) representado por estrutura secundária. Fitas- β estão representadas em amarelo, α -hélices em vermelho e regiões desordenadas (loops) em verde. Íons divalentes são mostrados como esferas verdes (A), enquanto no modelo de superfície da SpCas9 (B) ressaltando domínios do lóbulo de nucleases, supostas fendas de ligação ao ácido nucleico são demonstradas em linhas pretas, à esquerda da imagem encontra-se o NUC, e à direita o REC.

Figura 3 - Modelo tridimensional da SpCas9



Fonte: Autoria própria.

É importante ressaltar que a Cas9 do tipo selvagem só é capaz de fazer a clivagem dupla, ou *double-stranded breaks* (DSBs) produzindo extremidades cegas. Essa característica diferencia a Cas9 de enzimas de restrição que geralmente realizam a clivagem com extremidades coesivas³. Esse é o caso da CPF1 que possui um domínio PAM compatível com os nucleotídeos 5’-“YTN”-3’, onde Y é qualquer pirimidina (YAMANO et al., 2016). A *nickases* Cas9n desenvolvida a partir da Cas9 selvagem também promove cortes coesivos que é mais acessível a depender da aplicação. Isto se deve à inativação de um de seus domínios catalíticos, HNH ou RuvC (JINEK et al., 2012).

2.3.1 Reparo de DNA em Extremidades Abruptas

A versão inicial da técnica de edição genética baseada no sistema CRISPR-Cas9 consiste na clivagem gerando extremidades abruptas (DSB) de um DNA-alvo. Esse mecanismo *in vivo*, resulta em reparos no DNA via junção de pontas não homólogas (NHEJ em inglês, *non homologous end joining*) ou reparo direcionado por homologia (HDR em inglês - *homology direct repair*). Ambas vias de reparo podem ocasionar mutações pontuais ou alterações precisas na sequência de DNA-alvo (LEAL-BALBINO, T; et al., 2016).

³ Extremidades coesivas resultam da clivagem entre um grupo carboxila 3’ de um nt e o fosfato 5’ de um nt adjacente, possibilitando o emparelhamento por complementaridade.

As extremidades abruptas geralmente não possuem complementaridade entre si. O DSB gera um trauma celular, que pode levar à apoptose. Mais presente em células de mamíferos, na via de reparo NHEJ, o processo contínuo envolve as proteínas MRE11, RAD50 e Nibrina (complexo MRN) e as proteínas Ku70 e Ku80 que são capazes de reconhecer extremidades quebradas, formando um heterodímero que serve de suporte para a ancoragem de outras proteínas DNA-*Protein Kinases catalitic subunits* (DNA-PKcs), XRCC4 e APLf que fosforilam e estabilizam a molécula. Depois de serem processadas, as fitas podem ser religadas por enzimas como Artemis, a DNA polimerase e DNA ligase (Figura 4).

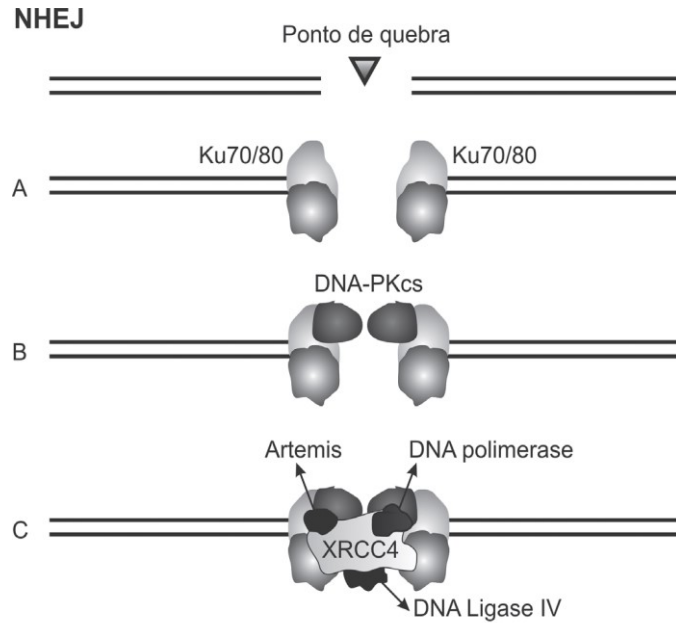
Segundo Doudna e Charpentier (2014), a ação da Cas9 seguida de reparo por NHEJ é propensa a erros, gerando mutações de inserções ou deleções de poucos nucleotídeos (*indel*) próximos ao local do reparo. Quando essas mutações comprometem o produto final do gene-alvo, resultam na inativação (nocaute ou KO) gênica. Na biologia molecular, biomedicina, genética e afins, o KO gênico pode ser aplicado para diversas linhas de estudo, pois ao inativar um gene é possível evidenciar suas funções biológicas. Outros exemplos da aplicação dessa metodologia são o combate as patologias associadas a resistências aos fármacos, na inativação de genes repressores e assim por diante. Contudo, NHEJ não permite controle da mutação resultante do processo, *indels* em um múltiplo de três nucleotídeos na fita 5' resultam na adição ou remoção de um a poucos aminoácidos na proteína. A depender da sequência de aminoácidos essa alteração pode ou não ter efeito significativo.

Quando a clivagem por DSB do DNA gera extremidades homólogas ou contém a presença de um DNA homólogo ou DNA doador, a via de reparo baseada em recombinação homóloga - HDR - pode ser recrutada, diferentemente da NHEJ, a via HDR pode usar a cromátide irmã ou um cromossomo homólogo como *template* (modelo) (Figura 5). Esse tipo de mecanismo de reparo no DNA pode ocorrer mais especificamente na fase S e G2 da divisão celular, a fim de recuperar os danos e as partes perdidas dos nucleotídeos. Porém, a homologia entre as extremidades de um DNA que sofre quebra raramente é comum. Pertinente ao uso de CRISPR em linhas gerais, a recombinação homóloga pode partir de três formas: conversão gênica, anelamento de uma única fita de DNA ou o reparo induzido por quebra.

Apesar de geralmente as fitas danificadas não possuírem homologia, a HDR pode ser engatilhada pela introdução de um DNA doador, que permite a substituição alélica, chamada de "*knock-in*", realizando a correção do gene ou a introdução de um transgene em uma região intergênica. Nesse caso, a Cas9 é direcionada a um corte específico, como VIEIRA, G. V. et al., (2016) afirma:

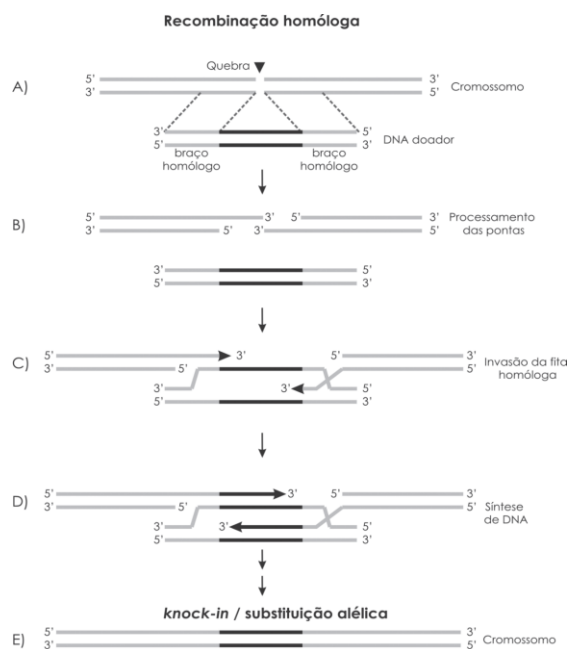
Logo após a clivagem o HDR irá promover o reparo deste dano usando como molde o DNA doador. Se o DNA doador apresentar uma variação nucleotídica em relação ao DNA-alvo (como um *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP), o evento resultará em uma substituição alélica. Contudo, se o DNA doador for um transgene flanqueado por sequências homólogas ao sítio de clivagem, o reparo resultará na integração sítio-específica do transgene (VIEIRA, G. V. et al., 2016, p. 48).

Figura 4 – via de reparo por junção de pontas não homólogas (NHEJ)



Fonte: Adaptado de: LEAL-BALBINO, T. C.; PEREIRA, T.; BARROS, M. (2016).

Figura 5 - Representação da recombinação homóloga e *knock-in* das fitas de DNA



. Fonte: LEAL-BALBINO, T. C.; PEREIRA, T.; BARROS, M. (2016).

A recombinação homóloga é mais comumente associada ao uso de *nickases* pois produzem as rupturas coesivas vistas na etapa B da imagem acima. HDR e NHEJ são vias de reparo comuns entre procariotos e eucariotos, e fornecem substrato para o reparo de DNA endógeno em uma diversidade de células/modelo, onde CRISPR pode atuar.

2.3.2 Diversidade e Aplicabilidade da Técnica CRISPR

Embora CRISPR em geral seja associado à edição genética ou edição genômica, ou seja, capaz de, respectivamente, alterar a sequência nucleotídica do gene-alvo ou alterar regiões cromossômicas e/ou alterar múltiplos genes-alvo simultaneamente. Atualmente CRISPR utilizado além da edição genética, e incluem utilizações em funções de: regulação da expressão, clivagem de RNAs, marcação de DNA, rastreamento de DNA e mapeamento de genes. Neste tópico será abordado, de forma breve, como as alterações do protocolo experimental permitem que a tecnologia alcance tal versatilidade.

Como já mencionado na subseção anterior, o nocaute gênico resulta na perda da atividade funcional de um gene. Esse efeito advém da inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos, resultando em um códon de parada prematura, ou ainda no seu percurso pós-transcricional e traducional.

O HDR pode responder mais precisamente comparado a NHEJ e também permite o nocaute gênico através da inserção de um gene nocauteado. O uso de HDR habilita a inserção de qualquer gene flanqueado por sequências homólogas, o DNA doador pode ser um gene codificador de proteína fluorescente (*Green Fluorescent Protein* ou GFP), proteína vermelha fluorescente (RFP) ou um gene de resistência a antibióticos.

O uso desses métodos facilita a seleção de células modificadas. Porém, a inserção de sequências codificadoras pode afetar a expressão de genes próximos ou de outros genes do genoma, principalmente quando se tem o interesse de modificar características poligênicas. Nesse sentido há a necessidade da busca por regiões seguras para diferentes organismos e células modelo. Quando há interesse em efetivar KO em um ou mais genes-alvo, a inativação por NHEJ ou HDR eventualmente pode mostrar-se não satisfatória, gerando alelos não nulos, ou seja, que mesmo após o KO, o gene de interesse ainda resulta em atividade parcial. CRISPR permite a deleção de genes inteiros, pela quebra de uma única fita ou por DSB.

A marcação de DNA (*DNA labeling*) associada à CRISPR pode ser elaborada através da hibridização da Cas9 mutante com sítios catalíticos inativos (*deadCas9* ou dCas9). A proteínas GFP, que possibilitam detecção tridimensional de à locos gênicos, sem a ocorrência

de desnaturação do DNA pode ser aplicada em células vivas ou fixadas. Pela associação de diversas dCas9 com gRNAs respectivos aos sítios de ligação do loco gênico, aumentando a concentração de fluorescência na região tornando visível, por meio de microscopia de fluorescência de alta resolução.

O CRISPR *labeling* consiste em um eficaz instrumento para o entendimento de questões associadas à regulação gênica, principalmente para o registro em relação aos mecanismos de tempo e espaço em células vivas, pois anteriormente, diversas técnicas de marcação que utilizavam a hibridização *in situ* a ácidos nucleicos fluorescente (FISH) causavam a desnaturação do DNA e impossibilitaram a precisão dessas informações em células vivas.

A dCas9 também proporciona a função de uma proteína transportadora, devido à sua especificidade e alta precisão, a associação de proteínas reguladoras de transcrição gênica passou a relacionar a indução ou repressão gênica através de sistemas CRISPR-Cas. O uso da dCas9 permite atingir diferentes níveis de regulação, variações de gRNAs e de dCas9 são determinantes para atingir seu objetivo apropriado. A expressão de múltiplos gRNAs possibilita a indução de transcrição de vários genes simultaneamente e pode ser feita a partir de promotores endógenos da célula. No entanto, o posicionamento da proteína indutora e da dCas9 pode obstaculizar a ligação da RNA polimerase, além disso, a ligação do gRNA pode ser dificultada pelos níveis de compactação da cromatina.

O uso da dCas9 para a repressão gênica é uma tarefa relativamente fácil. Como já citado, a inativação gênica é uma das melhores maneiras para se determinar a função de uma proteína. Normalmente as alternativas para a realização do KO gênico anteriores a CRISPR são pouco efetivas, sobretudo com a presença de RNAs longos não codificantes (lncRNA). Logo que a técnica CRISPR ganhou notoriedade e corpo passou a ser a técnica de escolha para esse procedimento utilizando a Interferência via CRISPR (CRISPRi). Segundo GILBERT et al., (2013) um gRNA efetivo é capaz de suprimir até 80% da transcrição, além da possibilidade de usar múltiplos gRNAs simultaneamente. A dCas9 pode ser utilizada unicamente ou em associação com um repressor de transcrição. A CRISPRi também pode ser usada na repressão direta do mRNA.

O alvejamento e precipitação de RNAs específicos também vêm sendo um dos objetos de estudo associados à CRISPR, onde já foram identificadas outras enzimas parte da família Cas que são naturalmente capazes de clivar RNAs.

O mapeamento gênico é um campo da genética que busca determinar quais e onde os genes que constituem características fenotípicas estão no genoma através de marcadores genéticos. Através de sítios PAM polimórficos em indivíduos com perda de heterozigidade,

é possível gerar eventos de recombinação mitótica com maior frequência e acessar qualquer região do genoma (SADHU et al., 2016). Essa metodologia permite o melhor entendimento dos mecanismos genéticos por trás das características fenotípicas.

Este estudo indica também a aplicabilidade do reparo de alelos pela ação de DSBs próximos ao alelo patogênico e a substituição pelo alelo sadio, no caso de sequências de difícil acesso por CRISPR.

Poucos anos depois do desenvolvimento da tecnologia, CRISPR se tornou uma ferramenta cada vez mais expansiva e a literatura científica do tema evolui cada vez mais depressa, de acordo com PUBMED, de 2012 a 2020, num gráfico crescente foram publicados ~9.000 artigos. As áreas de atuação da tecnologia CRISPR vão desde a ciência fundamental, na produção de materiais e outras vias de edição genética, da terapia gênica *in vivo*, da biomedicina humana até projetos ecológicos de extinção (*De-Extinction*) (NOVAK, B. J. 2018).

As ferramentas discutidas aqui, dentre outras derivadas, têm o potencial de, pela primeira vez na história, termos o controle do futuro genético da nossa e outras espécies em troca de levantar ou potencializar delicadas questões éticas.

2.4 QUESTÕES ÉTICAS ENVOLVIDAS

O debate ético em torno da engenharia genética é de grande importância para se estabelecerem pontos em comum que possam auxiliar no desenvolvimento humano de maneira sustentável e consciente. O assunto CRISPR, tomou maior notoriedade nas mídias em 2018 quando o pesquisador Chinês He Jianku, realizou a modificação em embriões humanos utilizando a técnica de CRISPR-Cas9. He Jianku publicou um vídeo em uma plataforma digital onde comunicou o nascimento dos primeiros bebês geneticamente modificados. Naquele caso o procedimento tinha como objetivo introduzir resistências em humanos ao HIV (*human immunodeficiency virus* ou vírus da imunodeficiência humana).

Na ocasião, diversas premissas éticas foram quebradas causando um grande mal estar na comunidade científica internacional, cientistas declaram que, em um documento formal, que ‘qualquer tentativa’ de fazer mudanças em embriões humanos implantados é ‘uma loucura’ e que dar à luz um bebê nessas condições é um “alto risco” (SGANZERLA, A; PESSINI, L. 2020 p. 53).

A forma com que as inovações tecnológicas são trabalhadas nos meios de divulgação comumente acabam se tornando estereotipadas, presas em discursos que variam do salvacionismo ao negacionismo, a falta de neutralidade para abordar temas científicos é

compreensível, visto que em diversos momentos da história se tornaram partes complexas para a população compreender como em momentos vividos durante a pandemia de COVID-19 onde surgiu uma onda em que a população se negava a tomar as vacinas ou até mesmo tentava escolher vacinas de determinados laboratórios.

São problemas como os citados que professores e pesquisadores encontram muitas vezes dificuldade ao transpor o conhecimento científico, até mesmo a linguagem utilizada na produção acadêmica acaba nutrindo o misticismo que se estabelece no processo de comunicação, é entendido que para o ambiente acadêmico seja necessário um padrão estabelecido pelas instituições, mas esses parâmetros em inúmeros momentos torna difícil o acesso da sociedade a trabalhos científicos, o que proporciona um espaço para a fixação de informações e pensamentos dos quais não se tem fontes capacitadas para a transmissão do conhecimento científico.

A proposta de divulgação científica através de um tema como CRISPR é um caminho um tanto quanto meticuloso a percorrer. Não obstante, as questões éticas que traz para a discussão se fazem de grande importância para o ambiente educacional., No caso do procedimento realizado pelo pesquisador He Jianku, onde foi possível observar o descontentamento da comunidade científica com um a execução tão precoce utilizando o CRISPR-Cas9 que infringiu inúmeras regras da comunidade, a constituição do pensamento crítico em torno da ética é fundamental para a construção de uma ciência que possa contribuir para todos os membros de uma comunidade de forma equitativa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho realizado tem caráter qualitativo, no qual Goldenberg (1997, p. 34) não considera um fator preocupante a relação com representatividade numérica, mas considera o aproveitamento de determinada comunidade, de uma organização, etc. Para tanto, a pesquisa bibliográfica toma sua forma a partir de materiais previamente elaborados, onde são compostos a princípio de artigos científicos e livros (GIL, 2008).

O delineamento do trabalho deu-se a partir da premissa de que é pouco discutido sobre biotecnologia no ensino médio, ressaltando a importância de se gerar uma argumentação em torno da biotecnologia, não somente de cunho mecanicista, onde esteja relacionada somente a técnica, mas também a abordagem que busque discutir com os alunos sobre a biotecnologia e seus desafios, pois além do caráter científico é preciso relacionar o caráter crítico que os alunos possam vir a desenvolver.

O plano de aula, conforme descrito no anexo A, foi desenvolvido para o 3º ano, pois é o estágio do ensino básico onde os objetos de conhecimento mais se assimilam aos conceitos abordados pela técnica CRISPR. Foi definido a turma em que iria ser realizada a intervenção pedagógica, sendo a turma escolhida do 3º ano noturno do colégio estadual Padre Carlos Zelesny.

Seguindo os conceitos propostos por GASPARIN (2009, p. 142) foi elaborado o plano de aula para ser utilizado como orientação no decorrer das atividades da intervenção na escola, dentro das propostas foi estabelecida uma atividade prática utilizando material didático, na qual foi utilizado o material Kit construindo as moléculas da vida: DNA e RNA. (Figura 6)

A sequência didática iniciou-se pela abordagem do CRISPR como meio de problematização em sala de aula. Foram apresentados os conceitos básicos da técnica e seu funcionamento tanto como sistema imune adaptativo de bactérias e *archeas*, quanto suas aplicações desde *knockouts* em bactérias resistentes, até sua utilização em embriões humanos.

Dado este cenário, rapidamente começamos a executar a atividade prática com os materiais à disposição, toda sequência didática foi acompanhada do uso do *Educatron* e do uso de giz e quadro.

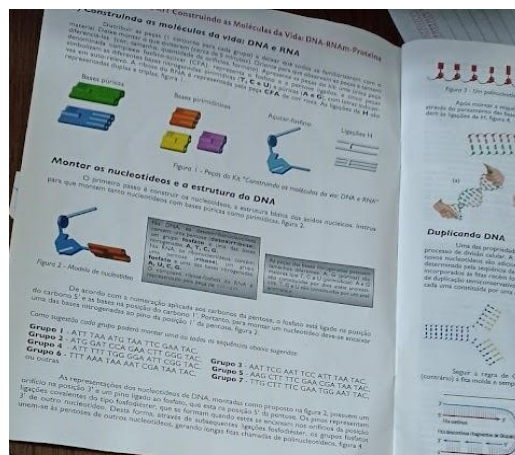
Figura 6 - Kit construindo as moléculas da vida



Fonte - Instituto de Física de São Carlos (2015)

Para que o material pudesse ser aproveitado foram utilizadas as sequências genômicas do material (Figura 7), essas foram divididas de maneira aleatória entre os 7 grupos, com cerca de 5 alunos na sala de aula.

Figura 7 - Cartilha de instruções.



Fonte: Autoria própria

A partir da sequência genômica foi proposto que os alunos montassem as respectivas fitas do DNA e a fita complementar.

Após a etapa de montagem concluída seguiu-se de uma nova explicação sobre o processo de tradução, com um vídeo ilustrado para proporcionar melhor entendimento a partir deste procedimento os alunos montaram o RNA e seus cadernos, para que fosse viável identificar os aminoácidos que seriam provenientes no processo da tradução, assim para que eles pudessem montar seus aminoácidos.

Posterior as explicações o questionário com perguntas abertas foi aplicado para que os alunos pudessem responder, sendo essas perguntas abertas nas quais são definidas por (CHAER, et al) “sendo as perguntas abertas são aquelas que permitem liberdade ilimitada de respostas ao informante. Nelas poderá ser utilizada linguagem própria do respondente. Elas trazem a vantagem de não haver influência das respostas pré-estabelecidas pelo pesquisador, pois o informante escreverá aquilo que lhe vier à mente.”

Sendo assim, o questionário vem para somar com os levantamentos bibliográficos a respeito do conhecimento prévio sobre biotecnologia e as tecnologias do DNA no ensino médio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE PRÁTICA

Durante a atividade prática foi possível realizar uma sequência de observações desde o primeiro contato que os alunos tiveram com o material, o qual foi um misto de curiosidade e euforia para conhecer as peças do material didático e como seria realizada a montagem.

A reação dos alunos foi um tanto quanto positivamente surpreendente que por se tratarem de alunos do turno noturno onde já se tem um desafio maior para o ensino, no qual é tido muitas vezes como improdutivo segundo SANTOS (2013):

Debater o ensino noturno é um grande desafio que se põe em todos os espaços em que ele é vivenciado, discutido, refletido e estudado. Trazer o ensino noturno para o debate, atrelado a sua demanda constituída, significativamente, de alunos que trabalham, é um desafio ainda maior, visto que se trata de uma relação importante: o ensino noturno improdutivo e o aluno-trabalhador inserido, ou não, em um mercado altamente competitivo e desumanizado. (SANTOS, 2013)

Foi uma atividade que de certa forma resistiu aos paradigmas, pois apresentou uma fluida participação dos alunos, o interesse em desenvolver a atividade e a satisfação com a conclusão das demandas da prática.

Os alunos então seguiram montando com o auxílio da sequência de DNA sorteada, realizaram a montagem da fita molde e depois a fita complementar. Foi possível notar a coordenação de cada grupo para compreender cada peça respectiva à sua posição correta na molécula, a complementaridade de bases e a observação quanto a razão de 1:1 de bases purina e pirimidina de acordo com a regra de Chargaff.

Posteriormente realizaram o processo de transcrição do DNA para RNA. Nesta etapa importante da atividade, notou-se que alguns grupos tiveram dificuldade ao transcrever a fita e que comumente era visto os alunos transcrevendo ambas as fitas de DNA. Demos a atenção às dificuldades dos alunos, explicamos que a leitura da RNA polimerase ocorria sempre em relação à fita 5' do DNA.

Logo em seguida, com o auxílio de um quadro do código genético, realizaram a montagem dos aminoácidos durante o processo de tradução, nesta etapa eles ficaram um pouco perdidos no início e foi necessário realizar uma nova explicação do processo de tradução, como ele funciona e como se faz de grande importância para a formação das proteínas, os grupos conseguiram realizar a atividade prática e se mostraram bem atentos ao que estava sendo trabalhado.

Na etapa de tradução, foi possível abordar a questão de mutações e expor a capacidade de conservação e reparo do DNA. Neste sentido, não coube na prática entrar em detalhes sobre as proteínas, então centralizamos a didática quanto ao papel do RNAm e as codificações que acontecem via ribossomo e outros RNAs em aminoácidos.

Aproximando-se ao final do tempo de aula, pedimos para os grupos de alunos que nos indicassem as ligações peptídicas entre aminoácidos. Nesta etapa também pode-se ter uma noção da dinâmica espacial entre os grupos R.

Figura 8 - Alunos e seus modelos didáticos.



Fonte: Autoria própria

Figura 9 - Representação da ligação peptídica

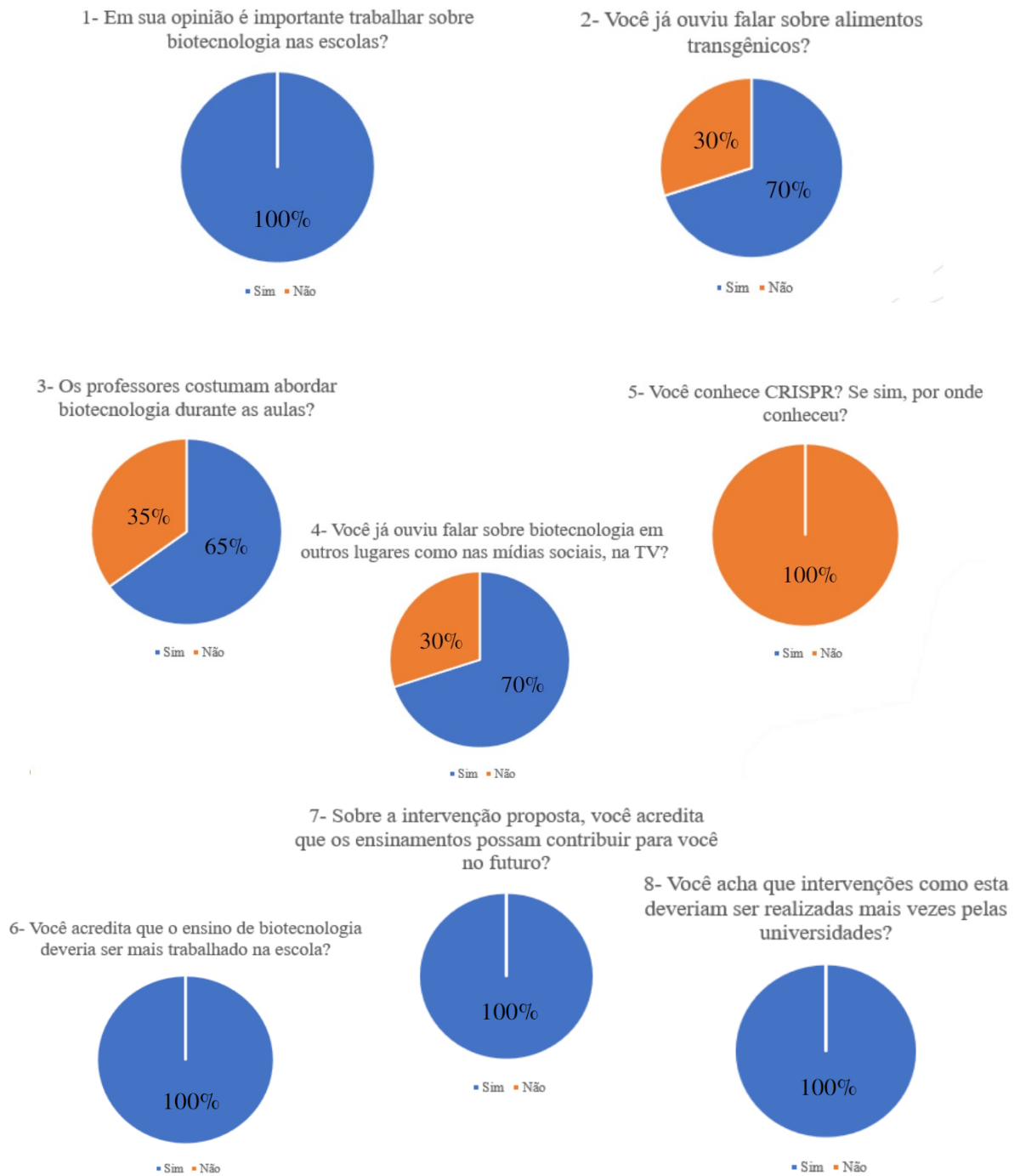


Fonte: Autoria própria

4.2 QUESTIONÁRIO

Para a interpretação dos dados obtidos com o questionário foi realizado um gráfico para cada pergunta com a representação em porcentagem correspondente a afirmativa ou a negativa diante das respostas.

Figura 10 - Gráficos das respostas ao questionário



Fonte: Autoria própria

De acordo com a competência da BNCC EM13CNT304 anteriormente citada, teoricamente, biotecnologia deveria ser um assunto mais explorado durante as atividades de ensino, visto que o assunto gera inúmeros debates na sua estratégia de desenvolvimento, sendo assim, mesmo estando dentro de uma normativa de forma explícita pouco é desenvolvido sobre o assunto.

Tendo em mãos os dados que foram coletados com o questionário são evidenciados o desejo e a consciência dos adolescentes em trabalharem mais sobre biotecnologia no ambiente escolar a afirmação corrobora com (ZALESKI, 2009) “Mais recentemente, o advento da internet e das redes sociais tem levado aos alunos um grande número de informações. A questão da ação dos meios de comunicação em massa sobre crianças e jovens exerce uma forte educação informal, porém, de procedência duvidosa.”

É notório destacar que os conceitos que abrangem CRISPR e suas ferramentas são de complexidade avançada para o ensino médio, no entanto, apenas as peças fundamentais da técnica foram abordadas na atividade, como forma também de transpor este conhecimento científico.

A partir deste panorama, é sabido que os alunos notam os avanços biotecnológicos em sua volta, como no caso dos transgênicos que é citado no questionário para que seja possível realizar uma mediação do conhecimento prévio que o aluno carrega, é citado por um aluno durante a resposta do questionário quando perguntado se havia ouvido falar sobre transgênicos o mesmo afirma que: “Sim, já vi no Globo Rural”, esta afirmação carrega consigo a confirmação de que os jovens estão expostos a inúmeras notícias sobre as tecnologias do DNA, sendo assim as escolas precisam estar dispostas a abrirem esse espaço de diálogo com os alunos, para que possam compreender o mundo a sua volta e expressar suas opiniões com embasamento.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que as problemáticas abordadas no presente trabalho derivam de um déficit correspondente a ações estruturais que concernem a prática pedagógica e questões periféricas aos conceitos trabalhados em sala de aula.

Entende-se que as estratégias utilizadas em nossa prática seriam melhor aproveitadas se incorporadas e planejadas a bordo de todo o planejamento pedagógico e não simplesmente como uma prática isolada.

O rendimento da atividade foi satisfatório e foi possível notar o envolvimento geral dos estudantes com os conceitos que foram se construindo durante a prática mediante suas relações biotecnológicas; portanto CRISPR mostrou-se uma ferramenta de potencial didático para estudantes do ensino médio.

O material didático utilizado faz parte de um kit didático doado para as escolas estaduais pela SEED do Paraná e deveria complementar as aulas de biologia, especialmente tratando-se da biologia molecular, no senso comum os conteúdos curriculares são apresentados de maneira abstrata, o que dificulta a construção do pensamento científico e a superação do conhecimento vulgar. A atividade com o material didático leva a interpretação das estruturas moleculares para um outro sentido, que permite a compreensão de como a complexidade das reações e processos biológicos levam a informação contida desde o DNA à síntese de proteínas e estas, como blocos de construção dos seres vivos.

Ao conduzir a o conteúdo estruturante da manipulação genética, presente no currículo de biologia, a abordagem do tema CRISPR possibilita também as discussões éticas e filosóficas sobre os potenciais usos da tecnologia, que no caso de CRISPR já apresenta exemplos práticos e tangíveis na materialidade.

Além disso, a simplicidade da tecnologia permite a explorar além da teoria, mas também pode proporcionar a prática em sala de aula para estudantes do ensino médio, onde os alunos poderiam por exemplo, transformar um gene bacteriano tolerante à lactose em intolerante à lactose através do uso da técnica CRISPR e conduzir este experimento usando-o como um tema gerador para diversas correlações interdisciplinares para estudos.

REFERÊNCIAS

BIBIKOVA, M.; GOLIC, M.; GOLIC, K. G.; CARROLL, D. **Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases**. *Genetics*, v. 161, n. 3, p. 1169–1175, 2002. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12136019/>>. Acesso em: 24 Julho 2021.

BUENO, Belmira O. **O método autobiográfico e os estudos com histórias de vida dos professores: a questão da subjetividade**. *Educação e Pesquisa*. Vol 28 no. 1. São Paulo Jan/Junho 2002.

BRASIL. Ministério da Educação. Base Nacional Comum Curricular. Brasília, 2018.

CHAER, G.; DINIZ, R. R. P.; RIBEIRO, E. A. **A técnica do questionário na pesquisa educacional**. *Revista Evidência*, v. 7, n. 7, p. 251–266, 2012. Disponível em: <http://www.uniaraxa.edu.br/ojs/index.php/evidencia/article/view/201>. Acesso em: 27 Julho 2021.

CHRISTIAN, M.; CERMAK, T.; DOYLE, E. L.; et al. **Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases**. *Genetics*, v. 186, n. 2, p. 757–761, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20660643/>. Acesso em: 24 Julho 2021.

CHUAI, G.; MA, H.; YAN, J.; et al. **DeepCRISPR: optimized CRISPR guide RNA design by deep learning**. *Genome Biology*, v. 19, n. 1, p. 80, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1459-4>. Acesso em: 01 Agosto 2021.

DA SILVA, Junielson Soares *et al.* **Modelos didáticos de DNA no ensino de genética: experiência com estudantes do ensino médio em uma escola pública**. *Research, Society and Development*, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12005/11400> Acesso em: 10 out. 2022.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. **The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9**. *Science*, v. 346, n. 6213, 2014. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/346/6213/1258096>. Acesso em: 20 junho 2021.

FACHIN, O. **Fundamentos De Metodologia**. 5. ed. São Paulo. Saraiva, 2008. 209p.

GILBERT, L. A.; LARSON, M. H.; MORSUT, L.; et al. **CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes**. *Cell*, v. 154, n. 2, p. 442–451,

2013. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741300826X>. Acesso em 23 Julho 2021.

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. **Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering**. Cell, v. 157, n. 6, p. 1262–1278, 2014. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>. Acesso em 22 Julho 2021.

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; et al. **A Programmable Dual-RNA Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity**. Science, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012. American Association for the Advancement of Science. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/337/6096/816> . Acesso em 22 Julho 2021.

JINEK, M.; JIANG, F.; TAYLOR, D. W.; et al. **Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation**. Science, v. 343, n. 6176, 2014.

KIM, Y. et al. **A library of TAL effector nucleases spanning the human genome**. Nat. Biotechnol. 31, 251–258. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.2517>. Acesso em 24 Julho 2021.

KLEINSTIVER, B. P.; PREW, M. S.; TSAI, S. Q.; et al. **Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities**. Nature, v. 523, n. 7561, p. 481–485, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26098369>. Acesso em: 23 Julho 2021.

KUMAR, M. S; PLOTKIN, J.B; HANNENHALLI, S. **Regulated CRISPR Modules Exploit a Dual Defense Strategy of Restriction and Abortive Infection in a Model of Prokaryote-Phage Coevolution**. PLOS Comput Biol. 2015.

KRIMSKY, S. **Ten ways in which He Jiankui violated ethics**. Nature Biotechnology, v. 37, n. 1, p. 19–20, 2019. Nature Publishing Group. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.4337>. Acesso em: 25 Julho 2021.

LEAL-BALBINO, T. C.; PEREIRA, T.; BARROS, M.; et al. **Introdução à técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016.

LEISTNER-SEGAL, S.; BITTELBRUNN, A.; BIAZÚS, J.; et al. **Genética e câncer de mama**. , v. 21, n. 2, p. 191–197, 2001. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/163838>>. Acesso em: 30 Julho 2021.

LEITE, Beatriz Eulália Vivanco *et al.* **CRISPR-CAS9: aspectos bioéticos e normativos do método**. Revista Brasileira de Bioética, 2018. Disponível em:

<https://scholar.archive.org/work/4ue7yfaut5egfeobt3pc44z7kq/access/wayback/https://periodicos.unb.br/index.php/rbb/article/download/24733/21911> Acesso em: 10 out. 2022.

MACHADO, R; MONTALVÃO, A. L; MORAES, F. N. **Controvérsias Sobre as Tecnologias do DNA no Youtube: Que Discursos Pautam Os Canais De Divulgação Científica?**. 6º Encontro de Divulgação de Ciência e Cultura. Campinas. v.6, p. 136–146, 2019.

MASHIMO, T. **Gene targeting technologies in rats: Zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats**. *Development Growth and Differentiation*, v. 56, n. 1, p. 46–52, 2014.

NAITO, Y.; HINO, K.; BONO, H.; UI-TEI, K. **CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites**. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 31, n. 7, p. 1120–1123, 2015. Oxford University Press. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25414360>. Acesso em: 30 julho 2021.

NOVAK, B. J. **De-extinction**. *Genes*, v. 9, n. 11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes9110548>. Acesso em: 03 Agosto 2021.

PAGANI, R. N.; KOVALESKI, J. L.; RESENDE, L. M. **Methodi Ordinatio: a proposed methodology to select and rank relevant scientific papers encompassing the impact factor, number of citation, and year of publication**. *Scientometrics*, v. 105, n. 3, p. 2109–2135, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11192-015-1744-x>. Acesso em 3 Agosto 2021.

SADHU, M. J.; BLOOM, J. S.; DAY, L.; KRUGLYAK, L. **CRISPR-directed mitotic recombination enables genetic mapping without crosses**. *Science*, v. 352, n. 6289, p. 1113–1116, 2016. American Association for the Advancement of Science. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/352/6289/1113>. Acesso em 31 Julho 2021.

SANTOS, Edvaldo Albuquerque et al. **TRABALHO E EDUCAÇÃO: LIMITES E POSSIBILIDADES NA ESCOLA NOTURNA**. IV Colóquio Internacional Educação e Contemporaneidade, [s. l.], 2013. Disponível em: <https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/10349/13/12.pdf>. Acesso em: 9 nov. 2022.

SAMPSON, T. R. et al. **A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence**. *Nature*, v. 497, n. 7448, p. 254–257, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature12048> . Acesso em 27 Julho 2021.

SCHEID, N. M. J.; FERRARI, N.; DELIZOICOV, D. **A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA.** *Ciência & Educação (Bauru)*, v. 11, n. 2, p. 223–233, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-73132005000200006>. Acesso em: 25 Julho 2021.

SGARZELA, A.; PESSINI, L. **Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas.** *Saúde em Debate [online]*. v. 44, n. 125, pp.530. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-1104202012519> . Acesso em: 29 Julho 2021.

SECRETARIA DE ESTADO DA EDUCAÇÃO. *Diretrizes Curriculares da Educação - Biologia.* Paraná, 2008.

RAN, F. A.; CONG, L.; YAN, W. X.; et al. **In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9.** *Nature*, v. 520, n. 7546, p. 186–191, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature14299>. Acesso em 23 Julho 2021.

SILVA, D.; LOPES, A. **A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus.** *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 10, n. 1, p. 234–245, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2012.101.234245>. Acesso em: 25 Julho 2021.

THIEMANN, O. H. **A Descoberta da Estrutura do DNA: de Mendel a Watson e Crick.** *Química Nova na Escola*, v. 17, p. 13–15, 2003. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001711349>. Acesso em: 23 Julho 2021.

VIEIRA, G. V; CECÍLIO, N. T; ARRUDA, L. M; SALES, K. U. Visão geral do mecanismo básico de ação. *In: LEAL-BALBINO, T. C. et al., Introdução à técnica de CRISPR.* Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016. cap. 2, p. 40-49.

YAMANO, T.; NISHIMASU, H.; ZETSCHKE, B.; et al. **Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA.** *Cell*, v. 165, n. 4, p. 949–962, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416303944>. Acesso 28 Julho 2021.

ZALESKI, T. **Fundamentos Históricos do Ensino de Ciências.** Curitiba: IBPEX, 2009.

APENDICE A - Plano de aula.

PLANO DE AULA DNA E SUAS TECNOLOGIAS (Sequência de Aulas)

Escola/Colégio: Escola Estadual Padre Carlos Zelesny

Acadêmicos (as): Elentiane Paes, Gabriel Miranda

CONTEÚDOS ABORDADOS	Tecnologias do DNA
QUANTIDADE DE AULAS	3

1. Quadro Síntese:

BNCC	
HABILIDADE(S)	(EM13CNT304)); (EM13CNT305)
COMPETÊNCIA ESPECÍFICA DE CIÊNCIAS DA NATUREZA PARA O ENSINO MÉDIO	Analisar e debater situações controversas sobre a aplicação de conhecimentos da área de Ciências da Natureza (tais como tecnologias do DNA, tratamentos com células-tronco, produção de armamentos, formas de controle de pragas, entre outros), com base em argumentos consistentes, éticos e responsáveis, distinguindo diferentes pontos de vista.
COMPETÊNCIA ESPECÍFICA DE CIÊNCIAS DA NATUREZA PARA O ENSINO MÉDIO	Investigar e discutir o uso indevido de conhecimentos das Ciências da Natureza na justificativa de processos de discriminação, segregação e privação de direitos individuais e coletivos para promover a equidade e o respeito à diversidade.
OBJETIVOS DE APRENDIZAGEM	Fazer uso da abordagem em biotecnologia baseada em CRISPR-Cas9 para desenvolver os conhecimentos base em biologia molecular através de ferramentas representativas do DNA, RNA e aminoácidos.
OBJETO(S) DE CONHECIMENTO	Tecnologias do DNA e princípios de biotecnologia, níveis de organização e dinâmica da Vida, mutações genéticas e bioética.

2. Tema Geral da Sequência de Aulas:

DNA e suas tecnologias.

Nobel de Química 2020 vai para Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna pelo desenvolvimento do Crispr, método de edição do genoma

<https://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2020/10/07/nobel-de-quimica-2020-vai-para-emmanuelle-charpentier-e-jennifer-a-doudna.ghtml> Acesso: 10 out.2022

Esta reportagem será fundamental para correlacionar com ampliação dos conhecimentos de CRISPR e a relevância que a tecnologia vem apresentando nas discussões biotecnológicas.

Cientista chinês que criou bebês geneticamente modificados é condenado a três anos de prisão.

<https://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2019/12/30/cientista-chines-que-criou-bebes-geneticamente-modificados-condenado-a-tres-anos-de-prisao.ghtml> Acesso: 10 out. 2022

Reportagem necessária para ressaltar o debate ético e questionamentos sobre as regulamentações que são impostas no uso da biotecnologia.

3. Problematização:

QUAL A REALIDADE A SER QUESTIONADA?

Como as tecnologias do DNA podem ser discutidas em sala de aula com apoio de um modelo prático.

QUESTÕES PROBLERMATIZADORAS/DESAFIADORAS DA REALIDADE					
SOCIAL	CULTURAL	POLÍTICA	ECONÔMICA	TECNOLÓGICA	CIENTÍFICA
Qual o papel da biotecnologia na compreensão dos alunos e como ela pode ser questionada?	Porque culturalmente baseamos nosso conhecimento sobre tecnologias do DNA em suposições que causam temor?	O uso de biotecnologia atrelado a monopólios científicos e seu impacto na vida como um todo?	Qual o papel do agronegócio na produção de sementes geneticamente modificadas?	Como os estudos em torno da biotecnologia podem ser significativos para tratamento de doenças?	Como divulgação científica é importante para compreender melhor o uso das tecnologias do DNA, sendo assim refinando o conhecimento em torno deste assunto, tentando desviar de estigmas imposto?

4. Conteúdos:

CONTEÚDOS/CONCEITOS SELECIONADOS	
COMPONENTE CURRICULAR CIÊNCIAS	COMPONENTE CURRICULAR INTERDISCIPLINAR
Tecnologias do DNA	Os assuntos abordados nas aulas envolvem a formação do DNA, suas estruturas e envolve conceitos de sociologia e filosofia pois aborda temas que estão dispostos a serem questionados e discutidos, os impactos causados pela produção de sementes modificadas, medicamentos, o seu uso em alimentos, tratamentos medicinais, entre outras possíveis aplicações.

5. Vivência cotidiana dos conteúdos:

O QUE OS ESTUDANTES JÁ SABEM	O QUE PRECISAM SABER MAIS
O que é o DNA. Qual a importância do DNA na formação da vida.	Como ocorre o processo de transcrição e tradução do DNA. Breve histórico de CRISPR. Como ocorre o processo de utilização de CRISPR. Como CRISPR fomenta o debate sobre tecnologias do DNA.

6. Encaminhamentos para cada aula:

AULA 01 (50 MINUTOS)		
TEMPO (MINUTOS)	AÇÕES DOCENTES	AÇÕES DISCENTES
Aprox. 50 min	No primeiro momento será implementada uma breve revisão sobre DNA, posteriormente a explicação sobre os processos de transcrição e tradução, para que possam estabelecer uma conexão com CRISPR começando por sua descoberta.	Os estudantes terão como ações principais a observação e discussão dos processos abordados em aula, fornecendo informações que possam complementar o processo didático.
Aprox. 50 min	Os alunos irão ver detalhadamente sobre como funciona a técnica de CRISPR, ver como é uma técnica que requer muito estudo, trazendo à	

	tona as discussões sobre os princípios bioéticos.	
Aprox. 50 min	Os alunos irão realizar uma atividade utilizando material didático de montagem do DNA, e dos aminoácidos, para que possa também atuar como um exercício de fixação. No último momento os alunos devem responder um questionário com perguntas sobre suas considerações da prática aplicada e também sobre como veem o ensino de biotecnologia na escola.	Produção da fita do DNA com o auxílio de uma sequência genômica aleatória, realizar a transcrição no caderno, identificar os aminoácidos e realizar a tradução de no mínimo dois aminoácidos.

7. Atividades avaliativas/Estratégias de avaliação:

DESCRIÇÃO DETALHADA DA(S) ATIVIDADE(S)	INSTRUMENTO(S)	CRITÉRIO(S)
Atividades previstas. A explicação sobre DNA e o processo de transcrição e tradução se deu de forma verbal, com auxílio de slides e um vídeo para melhor fixação do conteúdo. A atividade prática foi realizada com o auxílio do material didático correspondente a peças que simulam o DNA e os aminoácidos, fazendo alusão a uma montagem de quebra-cabeças.	Vídeo 1. https://www.youtube.com/watch?v=6nxRxoGME_I	O processo de avaliação se dá pela elaboração da atividade sugerida e pela resposta do questionário.

8. Prática social final:

NOVA ATITUDE PRÁTICA – INTENÇÕES	COMPROMISSO DE AÇÃO
Estimular o debate sobre biotecnologia, para que os alunos venham a desenvolver um certo entendimento crítico de como essas tecnologias do DNA funcionam e não criem estigmas sem ao menos conhecerem.	Estudar e correlacionar com sua realidade a importância dos estudos biotecnológicos, não apenas de maneira química, mas como a produção de recursos que possam vir a melhorar a qualidade de vida dos seres humanos.

Fonte: Autoria própria