CENTRO EDUCACIONAL DE ENSINO SUPEIOR DE PATOS LTDA
CENTRO UNIVESITARIO DE PATOS UNIFIP
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

ANA KAROLINA ROCHA DOS SANTOS

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): REVOLUCIONANDO A ENGENHARIA GENÉTICA

PATOS-PB
2022

ANA KAROLINA ROCHA DOS SANTOS

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): REVOLUCIONANDO A ENGENHARIA GENÉTICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Educacional de Ensino Superior de Patos LTDA do Centro Universitário de Patos UNIFIP, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina pela referida instituição.

Orientador:

Prof.ª Dra. Giselle Medeiros da Costa One

PATOS-PB
2022

ANA KAROLINA ROCHA DOS SANTOS

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): REVOLUCIONANDO A ENGENHARIA GENÉTICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Educacional de Ensino Superior de Patos LTDA do Centro Universitário de Patos UNIFIP, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina pela referida instituição.

Aprovado em: 27 /01/ 2022

Giselle Medeiros da C. One

Prof. Dra. GISELLE MEDEIROS DA COSTA ONE
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE PATOS UNIFIP
(ORIENTADOR (A))

Paula Regina Rodrigues Salgado

Prof. Dra. PAULA REGINA RODRIGUES SALGADO
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE PATOS UNIFIP
(1° MEMBRO)

Maria Helena do Nascimento

MARIA HELENA DO NASCIMENTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA UFPB
(2° MEMBRO)

FICHA CATALOGRÁFICA
Dados de Acordo com AACR2, CDU e CUTTER

Biblioteca Central - UNIFIP

Santos, Ana Karolina Rocha dos.
S237c CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): revolucionando a engenharia genética. / Ana Karolina Rocha dos Santos. – Patos –PB:UNIFIP, 2021.
39 fls.

Orientador(a): Prof. Dra. Giselle Medeiros da Costa One

Monografia - Bacharelado em Biomedicina

1. Cas9, 2. Embriões, 3. Doenças 4. Genéticas, 5. Vantagens e ética. I. Título II. Centro Universitário de Patos – UNIFIP

UNIFIP/BC CDU: 616.15

Francisco C. Leite – Bibliotecário. CRB 15/0076

A Deus, aos meus pais, família e a todos ao meu redor que sempre acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus que me deu força, fé, paciência e esperança. Por nunca ter me desamparado, quando mais precisei, e por cumprir sua promessa, de estar onde estou.

Aos meus pais, Edson Antonio e Zilma Rocha, por serem meu alicerce, as pessoas em que eu mais confio na vida, me deram a vida, e hoje são a minha vida, vocês criaram e educaram uma menina de sonhos, e um dos meus sonhos se concretiza agora, dar orgulho a quem mais me orgulha.

Ao meu namorado e companheiro de vida Gustavo Melo, por todo apoio e paciência, por ter me ajudar a ser uma pessoa melhor todos os dias, por ser meu braço direito e sempre me apoiar nas decisões.

À minha família, em especial minha avó Rita Pereira *(In memoriam)* e meu tio Lourival *(In memoriam)*, por serem parte da minha trajetória, pelo consolo nos momentos tristes e pelos ensinamentos que me fazem ser o que eu sou hoje. Partiram e deixaram saudades, mas, se fazem presentes na minha memória.

À todos os meus amigos, por todo apoio e por todos os momentos felizes e tristes.

À todos meus professores da vida acadêmica, por todo ensinamento e por agregarem tanto em minha vida, em especial, Hélder Vieira, por ser uma inspiração para mim.

Á minha orientadora Giselle Medeiros, pela oportunidade de compartilhar conhecimentos e por se empenhar tanto nesse momento tão importante para mim.

Por fim, e não menos importante, à melhores pessoas que eu poderia conviver nesses últimos 5 anos, meus inesquecíveis amigos, Hithallo Figueiredo e Luana Amorim, por terem sido absolutamente tudo, no decorrer da vida acadêmica. Deus sempre coloca as pessoas certas, na hora certa, obrigada por tudo, sem vocês nada faria sentido, jamais os esquecerei.

"Nunca houve no mundo duas opiniões iguais, nem dois fios de cabelos ou grãos. A qualidade mais universal é a diversidade."

Michael de Montaigne

RESUMO

CRISPR/Cas9 é uma técnica revolucionária na genética com abordagem em embriões humanos visando editar genes defeituosos através da edição gênica do DNA,“cortar e colar”, este sistema é uma grande conquista na medicina e biologia molecular.O presente estudo teve como objetivo verificar os avanços da técnica CRISPR, associando sua aplicação a edição de embriões humanos na cura de doenças genéticas. O trabalho constituiu-se de uma revisão literária sistemática qualitativa, utilizando como base de dados: PubMED, Scielo, Periodicos CAPES, por meio das seguintes palavras-chaves: Cas9, embriões, doenças genéticas, vantagens e ética, o qual possibilitou selecionar os artigos. O conhecimento que se tem hoje acerca do CRISPR é resultado de uma dedicação ao longo de vinte anos por cientistas de todo o mundo. Devido a sua variabilidade genética e de adaptação, a técnica tem sido utilizada em muitas áreas da genética e biologia molecular. Atualmente a técnica CRISPR é o foco atual dos pesquisadores na corrida tecnológica, devido sua eficiência e precisão, definitivamente uma nova era da engenharia e manipulação genética. Todas as promessas feitas pelo CRISPR/Cas9 continuam verídicas, o pré-diagnóstico de doenças e suas possíveis correções, e possíveis transplantes de órgãos modificados, trazendo esperança para um futuro promissor na engenharia genética.

Palavras-chaves: Cas9, embriões, doenças genéticas, vantagens e ética.

ABSTRACT

CRISPR/Cas9 is a revolutionary technique in genetics with an approach in human embryos aiming to edit defective genes through DNA gene editing, "cut and paste", this system is a great achievement in medicine and molecular biology. The present study aimed to verify advances in the CRISPR technique, associating its application to the editing of human embryos in the cure of genetic diseases. The work consisted of a qualitative systematic literary review, using as a database: PubMED, Scielo, CAPES periodicals, using the following keywords: Cas9, embryos, genetic diseases, advantages and ethics, which made it possible to select the articles . The knowledge that we have today about CRISPR is the result of a dedication over twenty years by scientists from all over the world. Due to its genetic variability and adaptation, the technique has been used in many areas of genetics and molecular biology. Currently the CRISPR technique is the current focus of researchers in the technological race, due to its efficiency and precision, definitely a new era of genetic engineering and manipulation. All the promises made by CRISPR/Cas9 remain true, the pre-diagnosis of diseases and their possible corrections, and possible transplants of modified organs, bringing hope for a promising future in genetic engineering.

Keywords: Cas9, embryos, genetic diseases, advantages and ethics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Crispr/Cas9

FIGURA 2: Uma representação visual dos principais componentes de edição principal

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Artigos levantados nas bases de dados PubMed, SciELO e Periodicos CAPES, com suas caracterizações segundo a autoria, ano de publicação, objetivos e principais achados.

LISTA DE ABREVIATURAS

CRISPR	Clustered Regulary Interspaded Short Palindromic Reapeats
Cas	Crispr associated protein
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 OBJETIVOS 15
2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO 15
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS 15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 16
3.1 FUNCIONAMENTO DA TÉCNICA EM EMBRIÕES 16
3.2 VANTAGENS DO MÉTODO EM RELAÇÃO AS DOENÇAS 17
3.3 QUESTÕES ÉTICAS 19
4 METODOLOGIA 21
4.1 TIPO E LOCAL DE ESTUDO 21
4.2 POPULAÇÃO 21
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO 21
4.4 INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS 21
4.5 ANÁLISE DOS DADOS 22
5 ARTIGO 23
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 34

1 INTRODUÇÃO

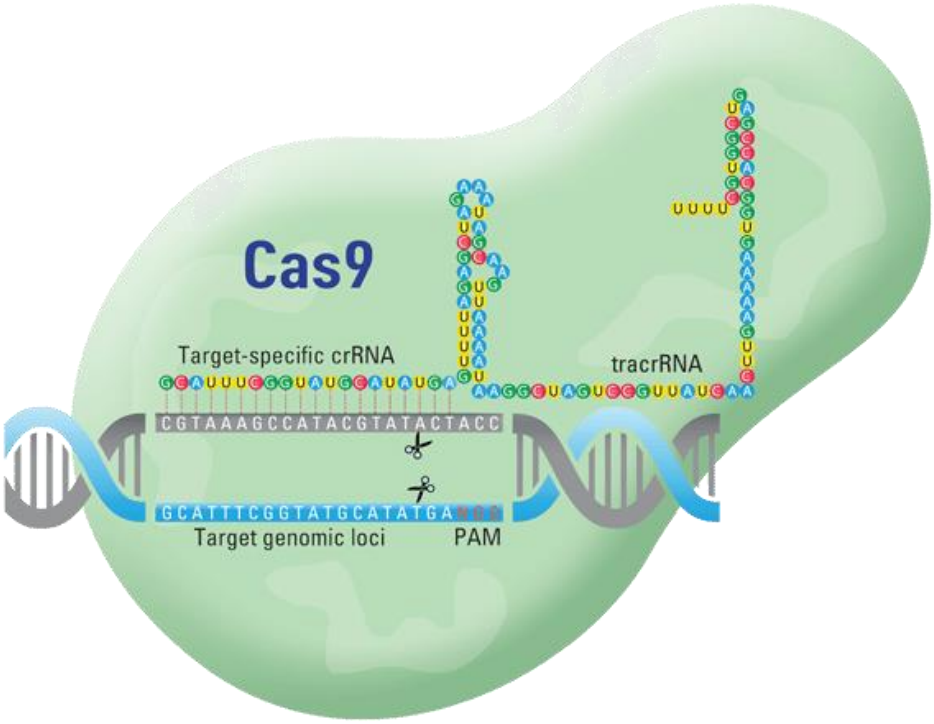
Em 1991, James Watson afirmou: “Muitos indivíduos dizem-se preocupados com as alterações nos nossos genes. Mas estes (genes), são o fruto do avanço. Todos sabemos, o quão imperfeitos somos. Por que não melhorar para sobrevivermos?”. Baseado nessa afirmativa, a habilidade de gerar modificações locais no genoma humano tem sido o objetivo da medicina, desde a compreensão do DNA como unidade básica da hereditariedade (MUKHERJEE, 2016).

No passado, para saber a respeito do futuro, consultavam-se os astros, já atualmente, os genes tem sido a aposta para prever o futuro, a fim de decifrar o ser humano. Nesse âmbito, a humanidade começa a ter conhecimentos e ferramentas na biologia molecular, genética e da aplicação da engenharia genética, que prometem revolucionar a tecnologia. Vive-se em uma parte da história da humanidade que se denomina antropoceno, ou seja, uma era que o ser humano se responsabiliza por alterações genéticas em si próprio, assim como também no planeta terra (SAMPEDRO, 2005).

Ao longo dos últimos anos, uma sequência de instrumentos de edição de genomas foram criados, e o mais fundamental nesse ramo foi a técnica CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) - Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas, que é como um dispositivo de defesa bacteriana e tem diversas finalidades. Com esta tecnologia, é possível modificar e/ou retirar qualquer sequência de um genoma em bilhões de nucleotídeos (BECÚ-VILLALOBOS, 2017; GIONO, 2017; LACADENA, 2017).

Graças a esses progressos podem-se corrigir genes defeituosos em embriões humanos, mutações as quais antes eram inviáveis. O CRISPR guia e adapta a enzima Cas9, para agir e romper a cadeia de DNA no local desejado pelo pesquisador. A mesma funciona como um percussor editor, utilizando os métodos habituais de ajuste no DNA que as células dispõem. Isso, até aparenta ser ficção científica, mas é possível e parcialmente simples como programas de bioinformática em procedimentos de biologia molecular (BECÚ-VILLALOBOS, 2017).

Figura 1 - CRISPR-Cas9



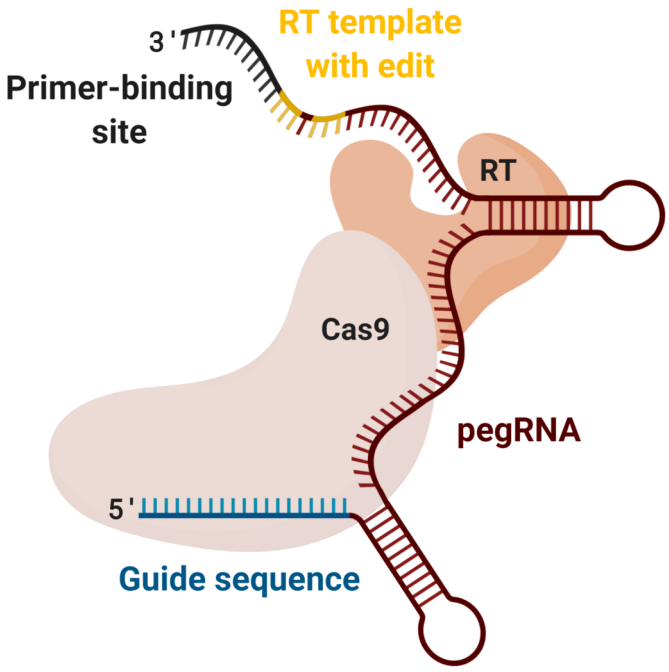
Fonte: Technocracy News & Trends, 2016.

Depois de toda sua fama, o CRISPR/Cas9 o qual altera os genes defeituosos, continua sendo utilizada em estudos por ter sido específica, porém, ainda é um pouco propensa a erros inesperados. Atualmente, uma alternativa desenvolvida, e que está sendo aperfeiçoada oferece maior controle sobre os cortes dos genes, mais um avanço que pode ser particularmente importante para o desenvolvimento de terapias genéticas (ANZALONE et al., 2019).

Esta inovação é denominada de edição principal, ou em inglês “primer editing”, que aumenta as chances de os pesquisadores terem apenas as edições que eles programaram. Uma vez que antes, era uma mistura de mudanças não previstas. A ferramenta recente, também reduz os erros fora do alvo, que o sistema CRISPR/Cas9 ainda permite. Isso com certeza seria mais seguro para as pessoas(ANZALONE et al., 2019).

O novo método funciona da seguinte forma: a molécula encontra o local do DNA que necessita ser reparado, e carrega consigo uma cópia do trecho que se pretende inserir. Ela reduz o número de alterações não intencionais em um genoma, inserindo as edições que os pesquisadores desejam no próprio DNA, tornando possível o reparo de até 89% das variantes genéticas humanas patogênicas conhecidas. Isso contrasta com o CRISPR/Cas9, pois depende do sistema de reparo da célula para fazer as alterações (LEDFORD, CYRANOSKI, 2019)

Figura 2 - Uma representação visual dos principais componentes de edição principal.



Fonte: Medium, 2020.

Mesmo com todas essas descobertas desde o primeiro trabalho publicado no final da década de 1980, até os mais atuais entre 2019 e 2020, temos de um lado, o entusiasmo dos pesquisadores e, por outro, as inquietações éticas decorrentes das inúmeras possibilidades de manipulação dos genes (BRENDAN, 2016).

O estudo dessa técnica é de suma importância para atualidade, uma vez que o mundo está em constante evolução e a tecnologia atual nos proporciona diversos feitos, apesar do tema ser um pouco disseminado. A mesma se baseia na desmistificação do método CRISPR, abordando um dos principais feitos, que se fundamenta na resolução de doenças genéticas em embriões, que apesar disso ainda enfrenta algumas barreiras éticas.

Com os avanços da tecnologia, tem-se a esperança de melhoramentos consideráveis no DNA humano. Podemos afirmar que o CRISPR será sim uma ferramenta promissora utilizada para resolução de doenças genéticas em embriões humanos.

Por fim, a pesquisa irá contribuir no futuro das áreas da genética e biologia molecular, que vem ganhando mais destaque nos dias de hoje, levando a informação para comunidade acadêmica da saúde, como também a sociedade no geral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Verificar os avanços da técnica CRISPRna cura de doenças genéticas, através da edição de embriões humanos.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- ·Analisar as vantagens do método CRISPR em relação as doenças;
- · Identificar o funcionamento da técnica em embriões;
- · Averiguar a questão ética da utilização do método CRISPR.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 FUNCIONAMENTO DA TÉCNICA EM EMBRIÕES

A técnica CRISPR, com suas várias proteínas Cas e RNA guia, é um sistema imunológico bacteriano ou arquea necessário que clivam uma sequência alvo especifica. O CRISPR-Cas permite a edição direcionada de alguns genes em vários organismos, como exemplo principal: humanos (MA et al., 2017; JIANG et al., 2013; KLEINSTIVER et al., 2016).

Toda a vida celular está sob constante ameaça de invasão por elementos genéticos estranhos. O que levou a evolução de diversos mecanismos de defesa, como as repetições palindrômicas curtas regularmente intercaladas CRISPR (PINILLA-REDONDO et al, 2020).

A terapêutica baseada em CRISPR associadas à proteína Cas9, especialmente aquelas que podem corrigir mutações genéticas por meio de reparo direcionado por homologia, têm o potencial de revolucionar o tratamento de doenças genéticas. No entanto, é um desafio desenvolver terapias baseadas em reparo dirigido por homologia, porque eles requerem a entrega simultânea in vivo de proteína Cas9, RNA guia e DNA do doador (LEE et al., 2017).

Têm ocorrido muitos esforços para identificar a presença e prevenir a formação de mutações fora do alvo. Com propósito de superar as limitações quanto à sensibilidade dos métodos atuais com base na análise de todo o genoma, foi desenvolvido um método para amplificar e detectar pequenas quantidades de mutações fora do alvo em genes intracelulares gerados pelo CRISPR (KIM et al., 2015; TSAI et al., 2017).

O método de detecção usando amplificação CRISPR com enriquecimento de DNA específico do alvo tem várias vantagens. Primeiramente, tem-se uma quantidade pequena de DNA mutante pode ser enriquecida em uma rodada de amplificação CRISPR, e a amplificação passo a passo mostra alta sensibilidade na detecção de fragmentos de DNA mutante. Posteriormente, os genes mutantes podem ser facilmente amplificados com alto rendimento. Por fim, como um RNA guia e efetor CRISPR são usados, o método pode ser extensamente utilizado a inserções / deleções e substituições de base única geradas por vários efetores CRISPR. Além disso, é possível aplicar o método para analisar precisamente se as mutações são induzidas em sequências fora do alvo usando novas técnicas, como o primer editing (ANZALONE et al., 2019).

Porém, quando o sistema CRISPR reconhece sequências parecidas ao alvo, podem ocorrer mutações deletérias indesejadas, especificamente em humanos, devido aos seus grandes genomas, o que pode levar ao mau funcionamento da técnica. Com isso, há uma necessidade de controle preciso da função CRISPR-Cas , que vise o locus desejado, evitando efeitos fora do alvo, antes que os efetores CRISPR possam ser introduzidos para fins terapêuticos humanos(FU et al., 2013; LEE et al., 2019).

Prevemos que a aplicação do método de amplificação CRISPR pode fornecer informações de especificidade importantes para determinar se uma determinada abordagem de edição de genoma manifesta efeitos fora do alvo com potencial suficientemente baixo para fins como o uso para terapia genética e engenharia de genoma de ultra-precisão (KANG et al., 2020).

3.2 VANTAGENS DO MÉTODO EM RELAÇÃO AS DOENÇAS

O desenvolvimento de sistemas de edição de genoma com base na endonuclease Cas9 facilitou muito a eliminação de genes e alterações genéticas direcionadas. A edição precisa de genes-alvo sem efeitos fora do alvo é crucial para prevenir efeitos adversos em aplicações clínicas. Embora vários métodos tenham sido relatados para resultar em menos efeitos fora do alvo associados à tecnologia CRISPR, eles geralmente exibem menor eficiência de edição. Portanto, a tecnologia CRISPR eficiente, precisa e inócua ainda é necessária (MATSUMOTO et al., 2020).

Alterações nos níveis de expressão gênica acima ou abaixo de certo limite podem ter um impacto significativo no fenótipo e levar a uma ampla variedade de doenças humanas. A identificação do CRISPR/Cas ressalta quantas invenções avançaram na biologia molecular, desde a pesquisa básica até os mecanismos naturais de replicação, reparo e defesa do DNA contra vírus. Uma vez que o mecanismo subjacente ao seu funcionamento foi compreendido, suas possíveis aplicações em biologia molecular e genética puderam ser visualizadas (RIVEROS-MAIDANA, 2020).

O método CRISPR/Cas9 revolucionou laboratórios em todo o mundo devido às suas aplicações inovadoras: permite a análise sistemática das funções dos genes de células de mamíferos, estudos de rearranjo e progressão de cânceres e outras doenças, potencialmente permite corrigir mutações responsáveis por doenças hereditárias. Além disso, foi usado com

sucesso para corrigir as mutações que causam fibrose cística, anemia falciforme, hemofilia, deficiência da alfa1-antitripsina e β-talassemia em linhas de células humanas (XIE et al., 2014; FIRTH et al., 2015; BURT, 2018).

Os sistemas CRISPR têm sido amplamente aplicados para editar genes e sequências genômicas para desenvolver modelos de câncer, fornecendo um sistema rápido, simples e de baixo custo para identificar e estudar determinantes genéticos de câncer e alvos terapêuticos, facilitando a descoberta de novos alvos, com estudos de triagem genética *in vitro* e *in vivo*. A adaptação tem sido para melhorar a eficácia das imunoterapias, aumentando sua potência, mitigando a toxicidade, reduzindo o custo de fabricação e facilitando a descoberta e o desenvolvimento de novas estratégias imunoterapêuticas. Como plataforma de diagnóstico, o CRISPR pode ser usado para detectar um baixo número de células cancerosas ou mutações raras em amostras clínicas (YIN, XUE e ANDERSON, 2019).

A edição do genoma pode ser alcançada in vitro ou in vivo ao fornecer o maquinário de edição *in situ*, que adiciona, remove e "corrige" genes de forma poderosa, bem como realiza outras modificações genômicas altamente direcionadas. As alterações direcionadas ao DNA começam a partir da geração de quebras de fita dupla induzidas por nuclease (DSBs), que levam à estimulação de mecanismos de recombinação altamente eficientes do DNA celular em células de mamíferos (GAJ et al., 2013; KOSICKI et al., 2018; ROUET et al., 1994).

A mudança do DNA significa uma edição irreversível e permanente das informações do genoma, e esse processo também enfrenta incontáveis riscos de segurança e problemas éticos. Além disso, alguns tipos de células, como neurônios, são difíceis de modificar o DNA usando a edição mediada por CRISPR/Cas9, o que limita o uso de terapia gênica para doenças do sistema nervoso. Como resultado, estratégias de edição de genoma que apenas editam e modificam o RNA também foram propostas por cientistas (ABUDAYYEH et al., 2017; MERKLE et al., 2019).

Como um produto intermediário da transcrição do DNA, o RNA é responsável por guiar a produção de proteínas. Com o uso da tecnologia CRISPR, a mutação do RNA é modificada brevemente, o que não apenas evita a modificação irreversível do genoma, mas também pode reparar a função da proteína em quase todas as células para tratar uma variedade de doenças. O CRISPR/Cas9 é agora uma ferramenta indispensável na pesquisa biológica (LI et al., 2020).

3.3 QUESTÕES ÉTICAS

No início da revolução na biologia molecular, considerações éticas e preocupações sobre a alteração do DNA humano, levou Bernard Davis a levantar uma perspectiva de "modificar o padrão de genes de um ser humano". Desde então, muito tem sido escrito sobre este tópico a partir de uma ampla variedade de pontos de vista, incluindo bioética, religião, antropologia, filosofia, direito, sociologia e medicina (DAVIS, 1970).

Devido à sua multifuncionalidade, o CRISPR/Cas9 tornou-se um método muito popular de edição de genes, comparado a outras técnicas já existentes. Embora seja de grande importância saber como funciona e suas possíveis aplicações, para solucionar problemas atuais ou desenvolver soluções mais eficientes, não se podem descuidar da ética em pesquisa, por ser uma tecnologia de alto impacto na sociedade. É constante a discussão sobre a técnica nas perspectivas, como social, política, econômica e ambiental, para que se possa conduzi-la de uma forma agradável e sustentável (ELSEVIER, 2016; RIVEROS-MAIDANA, 2020).

Em 2015, aconteceu uma modificação no DNA de embriões humanos, usando CRISPR/ Cas9 por cientistas chineses, no que resultou em uma declaração, que mencionava o seguinte: "Seria irresponsável prosseguir com qualquer uso clínico de edição de linha germinativa, a menos e até que as questões relevantes de segurança e eficácia tenham sido resolvidas e haja amplo consenso social sobre a adequação da aplicação proposta" (BALTIMORE et al., 2015).

Mesmo após a aprovação dos órgãos responsáveis, os requisitos pós-comercialização de produtos aprovados de terapia gênica e edição de genoma provavelmente serão rigorosos, incluindo a documentação da proficiência dos médicos no uso adequado da tecnologia e entrada de dados nos registros de pacientes (COLLER, 2019).

Nas decisões éticas, é fundamental considerar a gama de resultados possíveis, as probabilidades de cada instanciação e as possíveis justificativas que direcionam os resultados de qualquer um. As preocupações éticas sobre a tecnologia de engenharia do genoma CRISPR são em grande parte devido a algumas razões. Primeiro, existem preocupações sobre o poder e as limitações técnicas do método CRISPR, que inclui as possibilidades de eficiência limitada. Segundo, é a preocupação com o futuro dos organismos modificados: se eles serão afetados indefinidamente e se os genes editados serão transferidos para as gerações futuras, potencialmente afetando-os de maneiras inesperadas. Finalmente, a visão cética é que, mesmo que o genoma seja editado conforme o esperado e o resultado funcional desejado seja alcançado no momento, a complexa relação entre a informação genética e os fenótipos biológicos não é totalmente

compreendida. Portanto, a consequência biológica da edição de um gene em células germinativas e/ou somáticas pode não ser clara, dependendo do contexto (BROKOWSKI e ADLI, 2019).

Uma das maiores controvérsias sobre a técnica CRISPR surge de sua aplicação potencial em embriões humanos, devido à falta de clareza sobre o status do embrião humano. Embora alguns na comunidade científica sustentem que é eticamente inadmissível fazer experimentos em embriões humanos após 14 dias, é impossível decidir o status de um embrião humano e se e precisamente quando ele tem "personalidade". Apesar dessa complexidade desconcertante, as decisões de uma forma ou de outra devem ser executadas, porque prosseguir com a pesquisa ou deixar de fazê-lo tem consequências: banir ou limitar significativamente a pesquisa em embriões humanos impede o progresso, pelo menos, tornando indisponível ou restringindo uma opção para investigar a terapêutica potencial das células-tronco e a biologia das células totipotentes, que atualmente não são conhecidos por estarem presentes em quaisquer outras fontes viáveis de tecido humano (BROKOWSKI e ADLI, 2019).

CRISPR está beneficiando e melhorando significativamente a imunoterapia, engenharia genética, inteligência artificial modificação do gene da doença em embriões humanos viáveis. O sistema oferece um potencial quase ilimitado para promover o progresso no combate de doenças. O potencial tanto para adquirir conhecimento quanto para desenvolver tratamentos em humanos parece quase infinito (BROKOWSKI e ADLI, 2019).

De acordo com, Sganzerela (2020), se as poderosas ferramentas do CRISPR pararem nas mãos de *bio-hackers*, podendo assim agir como verdadeiros terroristas genéticos, eles poderiam alterar o genoma de alguma doença, tornando-a mais potente e ocasionando uma epidemia mundial, colocando em risco a vida de muitas pessoas.

Os bioeticistas enfatizam que as novas técnicas de edição gênica em embriões, têm um grande potencial promissor, porque poderiam erradicar doenças genéticas devastadoras e incuráveis antes do bebê nascer. Outros mais cautelosos dizem que essa técnica ultrapassa uma linha ética de grande perigo, pois mudanças da linha germinal são hereditárias e poderiam ter um efeito imprevisível sobre as gerações futuras, além da ameaça sempre presente da prática da eugenia e da criação de ‘super-raças’. Uma realidade contraditória, consequências imprevisíveis e indesejáveis sobre as gerações futuras. Eticamente é inaceitável (SGANZERLA, 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO E LOCAL DE ESTUDO

O presente estudo constituiu-sede uma revisão literária sistemática qualitativa. Segundo Ercole, Melo e Alcoforado (2014), a revisão sistemática é um método de pesquisa fundamentada, na qual se investiga a literatura e proporciona o conhecimento abrangente do tema.

4.2 POPULAÇÃO

Foi composto por 41 artigos publicados entre 1970 a 2021. Assim sendo, na busca e amostragens da literatura foram analisadas as bases de dados seguindo os critérios de inclusão e exclusão.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Como critérios de inclusão foram adotados: artigos publicados de 1970 a 2021, escritos em inglês e espanhol, que abordassem o CRISPR, e que tivessem correlação com os descritores utilizados no presente estudo. Como critério de exclusão, todos os artigos que não informassem sobre o assunto principal.

4.4 INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS

Na busca dos dados, foram utilizados artigos científicos em diferentes bases cientificas de indexação, como: PubMED, Scielo, Periodicos CAPE. Tendo como descritores: Cas9, embriões, doenças genéticas, vantagens e ética.

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Foi efetuado uma seleção de artigos, a partir da análise dos dados, por meio da apreciação e interpretação dos resultados, a fim de complementar a discussão do presente trabalho.

5 ARTIGO

CRISPR: (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): REVOLUCIONANDO A ENGENHARIA GENÉTICA

ARTIGO ORIGINAL

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): REVOLUCIONANDO A ENGENHARIA GENÉTICA

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats):

Ana Karolina Rocha dos Santos[1], Giselle Medeiros da Costa One[2],

[1]Centro Universitário de Patos, UNIFIP, Patos, PB, Brasil.[2]Centro Universitário de Patos, UNIFIP, Patos, PB, Brasil.

Correspondência:

E-mail: karolrocha16@hotmail.com[1], gisellemedeiroscs@gmail.com[2]

RESUMO

CRISPR/Cas9 é uma técnica revolucionária na genética com abordagem em embriões humanos visando editar genes defeituosos através da edição gênica do DNA,“cortar e colar”, este sistema é uma grande conquista na medicina e biologia molecular.O presente estudo teve como objetivo verificar os avanços da técnica CRISPR, associando sua aplicação a edição de embriões humanos na cura de doenças genéticas. O trabalho constituiu-se de uma revisão literária sistemática qualitativa, utilizando como base de dados: PubMED, Scielo, Periodicos CAPES, por meio das seguintes palavras-chaves: Cas9, embriões, doenças genéticas, vantagens e ética, o qual possibilitou selecionar os artigos. O conhecimento que se tem hoje acerca do CRISPR é resultado de uma dedicação ao longo de vinte anos por cientistas de todo o mundo. Devido a sua variabilidade genética e de adaptação, a técnica tem sido utilizada em muitas áreas da genética e biologia molecular. Atualmente a técnica CRISPR é o foco atual dos pesquisadores na corrida tecnológica, devido sua eficiência e precisão, definitivamente uma nova era da engenharia e manipulação genética. Todas as promessas feitas pelo CRISPR/Cas9 continuam verídicas, o pré-diagnóstico de doenças e suas possíveis correções, e possíveis transplantes de órgãos modificados, trazendo esperança para um futuro promissor na engenharia genética.

Palavras-chaves: Cas9, embriões, doenças genéticas, vantagens e ética.

ABSTRACT

CRISPR/Cas9 is a revolutionary technique in genetics with an approach in human embryos aiming to edit defective genes through DNA gene editing, "cut and paste", this system is a great achievement in medicine and molecular biology. The present study aimed to verify advances in the CRISPR technique, associating its application to the editing of human embryos in the cure of genetic diseases. The work consisted of a qualitative systematic literary review, using as a database: PubMED, Scielo, CAPES periodicals, using the following keywords: Cas9, embryos, genetic diseases, advantages and ethics, which made it possible to select the articles . The knowledge that we have today about CRISPR is the result of a dedication over twenty years by scientists from all over the world. Due to its genetic variability and adaptation, the technique has been used in many areas of genetics and molecular biology. Currently the CRISPR technique is the current focus of researchers in the technological race, due to its efficiency and precision, definitely a new era of genetic engineering and manipulation. All the promises made by CRISPR/Cas9 remain true, the pre-diagnosis of diseases and their possible corrections, and possible transplants of modified organs, bringing hope for a promising future in genetic engineering.

Keywords: Cas9, embryos, genetic diseases, advantages and ethics.

INTRODUÇÃO

Watson como um dos responsáveis da descoberta da dupla hélice do DNA mencionou: E se aprendermos a alterar intencionalmente o genoma humano? Até meados dos anos 1980, o único mecanismo para modificar o genoma humano para “sermos um pouco melhores” geneticamente falando, era identificar as mutações genéticas bastante penetrantes e gravemente malignas. Nos fins dos anos 1990, a chegada da terapia gênica mudou os termos dessa questão: possibilitou mudar intencionalmente os genes em corpos humanos. Foi a ressurreição da “eugenia”, porém de uma forma positiva, em vez de eliminar seres humanos portadores de genes defeituosos, os cientistas agora podiam cogitar na possibilidade de corrigir estes genes e, com isso, tornar o genoma “um pouquinho melhor” (MUKHERJEE, 2016).

Com a inovação na engenharia genômica atual e sua capacidade de corrigir genes defeituosos em enfermos e até mesmo embriões humanos, foi descoberto o mecanismo da proteína bacteriana Cas9, e que todo o sistema era “programável”, ou seja, o corte seria feito no local desejado do gene. Baseado nesses estudos, Jeniffer Dodna e Emanuele Charpentier, descobriram que era possível manipular ainda mais, utilizando uma sequência de ribonucleotídeos, que acomoda a enzima Cas9, e todo o aparato foi projetado para encontrar a sequência que irá cortar-se no local desejado, além de que as extremidades do DNA se rearranjavam, e o denominaram de CRISPR/Cas9(MUKHERJEE, 2016; BECÚ-VILLALOBOS, 2017).

Desta maneira, o presente trabalho teve o objetivo de verificar por meio de uma revisão bibliográfica os avanços e funcionamento do mecanismo CRISPR, associando sua aplicação com ênfase na edição de embriões humanos na cura de doenças genéticas, pensando e analisando as vantagens do método em relação as mesmas, averiguando também a questão ética que engloba o ramo.

METODOLOGIA

O presente estudo constituiu-se de uma revisão literária sistemática qualitativa. Segundo Ercole, Melo e Alcoforado (2014), a revisão sistemática é um método de pesquisa fundamentada, na qual se investiga a literatura e proporciona o conhecimento abrangente do tema. Foi composto por artigos publicados entre 1970 a 2021. Assim sendo, na busca e

amostragem da literatura foram analisadas as bases de dados seguindo os critérios de inclusão e exclusão. Como critérios de inclusão foram adotados: artigos publicados de 1970 a 2021, escritos em inglês e espanhol, que abordassem o CRISPR, e que tivessem correlação com os descritores utilizados no presente estudo. Como critério de exclusão, todos os artigos que não informassem sobre o assunto principal. Na busca dos dados, foram utilizados artigos científicos em diferentes bases cientificas de indexação, como: PubMED, Scielo, Periodicos CAPE, totalizando 98 artigos relacionados a temática, dos quais 6 artigos foram selecionados a partir dos seguintes descritores: Cas9, embriões, doenças genéticas, vantagens e ética.Foi efetuado uma seleção de artigos, a partir da análise dos dados, por meio da apreciação e interpretação dos resultados, a fim de complementar a discussão do presente trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Artigos levantados nas bases de dados Scielo, PubMed e Periódicos CAPE, com suas caracterizações segundo a autoria, ano de publicação, objetivos e principais achados.

Título do artigo	Autores/Ano	Objetivos	Principais Achados
El Sistema Crispr/Cas9 ¿Cambiará el genoma de la humanidad?.	Becú-Villalobos D, 2017.	Avaliou os grandes avanços tecnológicos do CRIPSR / Cas9 nas diversas áreas biomédicas, como uma ferramenta biotecnológica única.	A edição do gene trouxe promessas de salvação para milhares de indivíduos que sofrem condições incuráveis, além de estarem livres da doença, também não passariam para seus filhos. Destacando-se no presente estudo a geração de porcos geneticamente modificados como doadores de órgãos humanos.
Ethics: Moral Considerations for Applicationsof a Powerful Tool.	Brokowski C, Adlim M, 2019.	Uma breve revisão sobre questões éticas da utilização do CRISPR, com algumas indagações, como: brecha investigativa, acesso limitado, pesquisa em seres humanos e regulamentos	Para se tomar decisões éticas, necessitam de muitos experimentos que comprovem os benefícios do CRISPR, em resumo é proposto um estabelecimento de uma organização

		internacionais.	que decidirá a melhor conduta que aborda as complexidades éticas.
CRISPR/Cas9 y la terapia gênica.	Giono L E, 2017.	Destacou a importância do avanço no sistema CRISPR/ Cas9, um mecanismo de defesa bacteriana que permite editar e corrigir com precisão e eficiência genoma de células vivas, sendo um dos principais objetivos da pesquisa biomédica.	Ocorreram várias tentativas de correção de células e/ou embriões humanos pela técnica CRISPR/Cas9, onde se observou efeitos fora do alvo e mosaicismo. Evidenciando então a necessidade de um aprofundamento da técnica.
The biologyof CRISPR-Cas: BackwardandForward.	Hille F et al., 2018.	O foco desta revisão foi a biologia dos sistemas CRISPR/Cas9 e o recente progresso. Além de delinear os temas comuns da imunidade mediada por CRISPR/Cas9 nos vários tipos e subtipos, também destacamos a diversidade de proteínas e mecanismos nesses sistemas.	O CRISPR/Cas9 é uma das descobertas mais significativas e importantes das ciências modernas, sendo destaque em muitas áreas. Porém pesquisas revelam uma complexidade e diversidade do mesmo, mesmo com tantos trabalhos publicados e cientistas incansáveis, falta muito pela frente. Espera-se que a compreensão do CRISPR, vá além do que já se sabe.
CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea.	Marraffini L A, Sontheimer E J, 2010.	Forneceu uma compreensão de como os elementos CRISPR foram descobertos, sua classificação genômica bacteriana. Discutindo os avanços e suas aplicações atuais de	A ligação do CRISPR as 45 famílias de proteínas Cas, curiosamente há relatos de genes Cas envolvidos na formação de biofilme. Sendo assim, o CRISPR pode limitar a disseminação de

		papel importante nessa via de interferência genética.	cepas resistentes aos antibióticos em hospitais, interferindo na troca de material genético entre plasmídeos. Futuramente diversas pesquisas expandirão o repertorio experimental e esclarecerão muitas duvidas.
Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos.	Ma, H.et al., 2017	Descreveu a correção da mutação MYBPC3 (cardiomiopatia) em embriões humanos, utilizando o CRISPR/Cas9, onde foi implantando com eficiência de reparo, ativando resposta do DNA.	A eficiência e precisão sugeriram como potencial para ser utilizada para correções em mutações hereditárias em embriões humanos, complementando assim o diagnóstico pré-implantacional. A correção do gene da cardiomiopatia em embriões humanos ficou sendo um marco na história da edição genética em embriões humanos.

Elaborado pelo autor, 2022.

O conhecimento que se tem hoje acerca do CRISPR/Cas9, é resultado de uma dedicação construída ao longo vinte anos por pesquisadores de todo o mundo (GIONO, 2017). Ishino et al., (1987), clonaram e sequenciaram um gene iap, foi observado que junto ao gene, estava um conjunto de 29 nucleotídeos, separadas por sequências, não repetitivas e igualmente curtas (MARRAFFINI e SONTHEIMER, 2010).

Dr Mojica (1995), um biólogo molecular e microbiologista, também deu o grande passo, ao identificar uma sequência repetidas microbianas, que eram repetidas em intervalos regulares no genoma, futuramente veio a ser o CRISPR (BECÚ-VILLALOBOS, 2017).

A revolução do CRISPR, dá-se a muitas razões, mas, as acessibilidades econômicas e seguras da técnica trazem consigo a importância desse feito no campo da genética molecular.

Com isso foi possível alguns estudos de adaptação, como ligar e desligar genes, ou seja, evitando os efeitos indesejados (GIONO, 2017).

Giono (2017) e Hille (2018), descrevem uma memória adaptativa do CRISPR, servindo como um arquivo de infecções anteriores, quando a nuclease Cas9 (*Crispr associated protein nine*), corta e elimina a sequência desejada, um sistema imunológico flexível permitindo orientar a Cas9 especificamente para outras sequências, foi comentado também a variedade dos genes Cas, e suas afinidades com o sistema CRISPR , o Cas mais cotado até o momento e derivado da bactéria *Streptococcus pyogenes*, o Cas9 (GIONO, 2017; HILLE, 2018).

Marraffini e Sontheimer (2010), de acordo com à análise bioinformática do CRISPR, mencionam sobre a variabilidade genética do mesmo, abordando classificações e subtipos dos Cas (MARRAFFINI e SONTHEIMER, 2010).

Além disso, com o conhecimento dessa variedade, utilizando o CRISPR para manipular, pode-se limitar a disseminação de cepas resistentes à antibióticos em hospitais, interferindo na troca de material genético entre plasmídeos, como também aplicar os princípios da técnica na bactéria *Streptococcus thermophilis* para melhorar a sustentabilidade da cultura e de sua vida útil, mais um grande passo na medicina. Apesar de todo o aparato, necessita-se de mais esclarecimento, principalmente no funcionamento da adaptação imunológica (MARRAFFINI e SONTHEIMER, 2010).

O conhecimento é limitado até certo ponto, a explicação cientifica pretende ir mais profundo quando se trata de corrida tecnológica (HILLE, 2018). Um estudo feito por Ma et al., (2017), descreve a correção da mutação MYBPC3 (cardiomiopatia) em embriões humanos, utilizando o CRISPR/Cas9, os resultados, expressam claramente a eficiência e potencial dessa técnica quando utilizada para correções em mutações hereditárias em embriões humanos, complementando o diagnóstico pré-implantacional (MA, 2017).

Ética e moral, são questões bastante comentadas acerca do sistema CRISPR, não diferente, Brokowski e Adli, (2019) acham justo considerar os vastos resultados das possibilidades de edição de genes. Porém possíveis erros nas edições como mosaicismo (efeitos fora do alvo), são preocupações futuras que já correm em tramito de melhoras significativas, além disso, é necessário enxergar mais a frente, sobre os organismos modificados e como a sociedade lidará com este fato, avaliando os riscos e benefícios da técnica. O acesso limitado tem haver com a regulamentação de cada país, no quesito de ser permitido os estudos, principalmente sem seres humanos (BROKOWSKI e ADLI, 2019).

Atualmente a técnica trouxe promessas para muitos indivíduos, com diversas aplicações, mencionando a edição de porcos, modificando os genes para que eles fossem possíveis doadores de órgãos humanos, o objetivo ético seria a prevenção de doenças genéticas hereditárias (BECÚ-VILLALOBOS,2017).

CONCLUSÃO

Conclui-se que, as vantagens que o CRISPR/Cas9 apresenta, está ligada diretamente com sua eficácia, precisão e com sua facilidade de tratar as doenças hereditárias. A edição do genoma poderia complementar o diagnostico pré-implantacional, no caso de mutações parentescas herdadas, isto é extremamente promissor, pois, aumenta a esperança da erradicação das patologias genéticas.

Os estudos correlacionados a embriões humanos, definem que a técnica é segura na edição dos defeitos em células progenitoras, ou seja, o reparo pode ser feito com precisão nos embriões, tendo sucesso no objetivo que é o gene corrigido. O aprofundamento de trabalhos acerca do tema seja em embriões humanos ou de outros seres vivos, como os suínos, mostram-se avançados, na prática de modificar geneticamente embriões suínos, para que o porco adulto mutado seja fonte de transplante de órgãos como, rim, coração, córnea e pulmão, evitando assim as esperas das filas de transplante, estudo no qual está em tramite, sobre a responsabilidade da geneticista Mayana Zatz, na universidade USP.

O que ainda limita o avanço com os estudos e uso da técnica são as questões éticas envolvidas em relação ao seu uso na edição gênica. A sociedade continua prevendo os problemas éticos, pois a aceitação irá variar de acordo a regulamentação de cada país. Em alguns países, por exemplo, o diagnóstico antes da implantação de embriões é aprovado, o que propicia descartar aqueles defeituosos. É como se a declaração que James Watson fez em 1991, previsse o futuro que está acontecendo ou ainda estar por vir com a edição genética através do CRISPR/Cas9.

Embora, observe-se que a temática é de suma importância, faz-se necessário aguardar os experimentos que estão surgindo, a fim de proporcionar uma maior segurança da modificação no nosso genoma, com intuito de expandir a técnica para diversos países. Portanto, os resultados já estão sendo fantásticos, tornando-se o futuro não distante das edições. Todas as promessas feitas pelo CRISPR/Cas9 continuam verídicas, o pré-diagnóstico de doenças e suas possíveis correções, e possíveis transplantes de órgãos modificados só mostram que estamos indo no caminho certo.

REFERÊNCIAS

BECÚ-VILLALOBOS D, **El Sistema Crispr/Cas9 ¿Cambiará el genoma de la humanidad?**, **Scielo**, Buenos Aires, (77): n.6, 2017

BROKOWSKI C, ADLI M. CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applicationsof a Powerful Tool- **J Mol Biol**. 431(1):88-101, 2019

GIONO L E, CRISPR/Cas9 y la terapia gênica, **Scielo**, Buenos Aires, (77): n.5, 2017

HILLE, F. et al. The biologyof CRISPR-Cas: BackwardandForward - **Cell** - 172 , 1239–1259, 2018

MARRAFFINI L A; SONTHEIMER E J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea, **PubMed**, *11*(3): 181-90, 2010

MUKHERJEE S, Genetictherapies: post-human gene therapy, In: Mukherjee S. O gene: uma história íntima. Scribner. New York, (34), 415, 2016.

6CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da pesquisa realizada, estudou-se os avanços da técnica CRISPR, associando sua aplicação a edição de embriões humanos na cura de doenças genéticas.Os resultados aqui expostos são de fundamental importância para futuras pesquisas do tema, agregando conhecimento e contribuindo no futuro das áreas da genética e biologia molecular, levando a informação para comunidade acadêmica da saúde, como também a sociedade no geral.

Em suma, estudos de revisão bibliográfica contribuem para o alcance dos objetivos desse trabalho, sobre a hipótese de que com os avanços da tecnologia,tem-se a esperança de melhoramentos consideráveis no DNA humano. Podemos afirmar que o CRISPR será sim uma ferramenta promissora utilizada para resolução de doenças genéticas em embriões humanos.

REFERÊNCIAS

ABUDAYYEH, OO et al. Direcionamento de RNA com CRISPR-Cas13. **Nature**. 550 , 280-284, 2017

ANZALONE, AV et al. Edição de busca e substituição do genoma sem quebras de fita dupla ou DNA de doador. **Nature**, 576, 149–157, 2019

BALTIMORE D et al.,.A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 36-38, 2015.

BECÚ-VILLALOBOS D,El Sistema Crispr/Cas9 ¿Cambiará el genoma de la humanidad?, **Scielo**, Buenos Aires, (77): n.6, 2017

BRENDAN PF. Gene Editing: New Technology, Old Moral Questions, **The New Atlantis**, 3-15, 2016

BROKOWSKI C, ADLI M. CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applicationsof a Powerful Tool- **J Mol Biol**. 431(1):88-101, 2019

BURT A, CRISANTI A. Gene Drive: EvolvedandSynthetic - **ACS ChemBiol** - 13 (2): 343-6, 2018

COLLER BS. EthicsofHumanGenomeEditing - **AnnuRev Med**. 70:289-305, 2019

ELSEVIER. Infográfico CRISPR. **Inteligência de pesquisa**. 2016

DAVIS B D. Prospects for GeneticIntervention in Man. **Science**, 170(3964), 1279–1283, 1970.

FIRTH AL, et al. Correção de gene funcional para fibrose cística em células epiteliais pulmonares geradas a partir de iPSCs de paciente - **Cell Rep** - 12 (9): 1385-90, 2015

FU, Y. et al. Mutagênese fora do alvo de alta frequência induzida por nucleases CRISPR-Cas em células humanas - **Nat. Biotechnol** - 31 , 822–826, 2013

GAJ, T, ET al. CA & Barbas, CF 3rd ZFN, TALEN e métodos baseados em CRISPR / Cas para engenharia de genoma- **TrendsBiotechnol**. 31 , 397–405, 2013

GIONO L E, CRISPR/Cas9 y la terapia gênica, **Scielo**, Buenos Aires, (77): n.5, 2017

HILLE, F. et al. A biologia do CRISPR-Cas: para trás e para a frente- **Cell** - 172 , 1239–1259, 2018

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. **J.Bacteriol.** 169:5429-5433, 1987

JIANG, W. et al. RNA-orientededitionofbacterialgenomesusing CRISPR-Cas systems - **Nat. Biotechnol**- 31 , 233–239, 2013

KANG, S. *et al*. Validação fora do alvo CRISPR altamente sensível baseada em predição usando enriquecimento de DNA específico do alvo-**Nat Commun**- 11, 3596, 2020

KIM, D., Bae, S., Park, J. *et al.* Digenome-seq: genome-wideprofilingof CRISPR-Cas9 off-target effects in humancells - **Nat Methods** -12, 237–243, 2015

KLEINSTIVER, BP et al. Especificidades de todo o genoma de nucleases CRISPR-Cas Cpf1 em células humanas - **Nat. Biotechnol**- 34 , 869–874, 2016

KOSIKI, M, ET al. A. O reparo de quebras de fita dupla induzidas por CRISPR-Cas9 leva a grandes deleções e rearranjos complexos- **Nat. Biotechnol**. 36 , 765–771, 2018

LACADENA J R, Edicióngenómica: ciencia y ética, **Revista Iberoamericana de Bioética**, Madrid, Espanha, (n.3): 3-4, 2017

LEE, K, *et al*. A entrega de nanopartículas de ribonucleoproteína Cas9 e DNA do doador in vivo induz o reparo de DNA direcionado por homologia. **Nat BiomedEng** - 1**,**889–90, 2017

LEE, SH, Park, YH, Jin, YB, Kim, SU & Hur, JK CRISPR diagnóstico e terapêutica com precisão de par de base único - **Trends Mol. Med** - 26 , 337-350, 2019

LEDFORD, H, CYRANOSKI D, Precise Crispr Tool CouldTacckle Host OfGeneticDiseases, **Nature**, 464-465, 2019

LI, H, *et al.* Aplicações da tecnologia de edição de genoma na terapia direcionada de doenças humanas: mecanismos, avanços e perspectivas - **SigTransduct Target Ther**- 5, 1, 2020

MA, H. et al. Correção de uma mutação de gene patogênico em embriões humanos. **Nature**, 548 , 413–419, 2017

MARRAFFINI L A; SONTHEIMER E J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea, **PubMed**, *11*(3): 181-90, 2010

MATSUMOTO, D., TAMAMURA, H. & NOMURA, W. Um sistema de ativação CRISPR-Cas9 dependente do ciclo celular baseado em uma proteína anti-CRISPR mostra precisão de edição de genoma melhorada -**CommunBiol**- 3**,** 601, 2020

MOJICA F J. et al. 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**. 17: 85-97, 1995

MERKLE, T. et al. Edição precisa de RNA recrutando ADARs endógenos com oligonucleotídeosantisense- **Nat. Biotechnol** . 37 , 133–138, 2019

MUKHERJEE S, Genetictherapies: post-human gene therapy, In: Mukherjee S. O gene: uma história íntima**. Scribner**. New York, (34), 415, 2016.

PINILLA-REDONDO, R, *et al.* A descoberta de vários anti-CRISPRs destaca o agrupamento de genes anti-defesa em elementos genéticos móveis. **Nat Commun**- 11, 5652, 2020

RAMOS A D. CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias. 2016. **Monografia** - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016

RIVEROS-MAIDANA, Rocío et al . Sistema CRISPR/Cas: Edicióngenómica de precisión. **Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud**, Asunción , v. 18, n. 1, p. 97-107, 2020

ROUET, P, et al. Expression of a site-specific endonuclease estimula a recombinação homóloga em células de mamíferos. **Proc. Natl Acad. Sci**. – *EUA*- 91 , 6064–6068, 1994

SAMPEDRO J, O homem decide seu destino biológico. Começa o debate sobre a alteração do genoma humano. **El Pais** – 22, mar, 2015

SGANZERLA A., PASSINI L. Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas. **Saúde debate**. 44 (125) 2020.

TSAI, SQ et al. CIRCLE-seq: uma triagem in vitro altamente sensível para alvos fora de nuclease CRISPR-Cas9 em todo o genoma. **Nat. métodos** - 14 , 607-614, 2017

XIE F, et al. Correção perfeita do gene de mutações β-talassêmicas em iPSCs específicas do paciente usando CRISPR / Cas9 e piggyBac. **Genome Res** - 24 (9): 1526-33, 2014

Yin, H., Xue, W. & Anderson, D.G. CRISPR–Cas: a tool for câncer research and therapeutics. **Nat RevClinOncol**- 16**,** 281–295, 2019.