

# **A APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE EDIÇÃO DE GENOMAS CRISPR-CAS9 NA ENGENHARIA GENÉTICA: benefícios à ciência e sociedade e impasses éticos frente ao desconhecido, em especial na edição embrionária humana.**

Thiago Caetano Andrade Belo<sup>1</sup>  
Priscila Henrique Moraes Paiva<sup>2</sup>  
Nelson Delú- Filho<sup>3</sup>

## **RESUMO**

Este trabalho descreve a utilização da técnica de edição de genomas CRISPR-Cas9 na Engenharia Genética, evidenciando a vantagem do seu emprego para a ciência e os benefícios que esta poderá acarretar à sociedade, em contraste com os impasses bioéticos que a mesma enfrenta no presente, especialmente em experimentos que envolvem a manipulação de células da linhagem germinativa humana. Tal abordagem justifica-se pelo fato de que manipular materiais genéticos atualmente não é algo inalcançável como era considerado a algumas décadas e devido a esta possibilidade, facilitada pelo avanço do CRISPR-Cas9, muitos embaraços éticos de diversas esferas sociais surgem, criando um tabu que precisa ser superado. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica em artigos científicos publicados no *Pubmed*, *Google Scholar* e *SciELO*, que expliquem desde o descobrimento e a sua formulação para a edição de materiais genéticos, os resultados e benefícios já alcançados até os impactos que esta enfrenta na sociedade contemporânea, em especial a manipulação de embriões humanos. A análise demonstrou o quão promissor é a técnica e os grandes proveitos que são proporcionadas pelo seu uso na manipulação gênica e estudos genéticos, que por mais que em alguns experimentos realizados sejam perigosos, audazes, arriscados e que devem ser discutidos atualmente e muitas vezes barrados, não é considerada antiética.

**Palavras-chave:** CRISPR-Cas9. Bioética. Embriões. Edição gênica.

## **1 INTRODUÇÃO**

Este trabalho aborda, mediante revisão bibliográfica, a aplicação da técnica de edição de genomas CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* cujo tradução significa *Repetições Palindrômicas Curtas, Agrupadas e Regularmente Interespaçadas*) em células somáticas e da linhagem germinativa em humanos e animais, sendo esta altamente específica na edição de materiais genéticos, evidenciando os benefícios promitentes da técnica à ciência moderna e os impasses éticos que esta enfrenta. A utilização desta é útil para o estudo de doenças que não possuem cura, como, por exemplo, o HIV, câncer e doenças monogênicas, além de possibilitar avanços na criação de organismos resistentes a pragas na agropecuária e animais com genes nocautes. Sendo este um assunto desconhecido pela população em geral, a possibilidade de edição de genomas ainda é considerada um tabu, tanto para da sociedade leiga, quanto para alguns segmentos da ciência contemporânea, visto que a modificação do material genético traz em si uma grande dose de incerteza, já que é algo intrínseco dos indivíduos, sendo credo de grande parte das pessoas a não modificação pela ciência devido a diversos fatores, como socioculturais. Com efeito, a técnica gera debates éticos efervescidos sobre o quão perigosa esta pode ser, abordando principalmente a manipulação genética de células da linhagem germinativa humana. Mediante a isto, este artigo desenvolve-se a partir de uma busca bibliográfica no *PubMed*, *Google Scholar* e *Scielo* e objetiva avaliar as argumentações propostas por autores entre os anos de 2012 a 2020 que são a favor ou não da utilização da técnica para a edição de genomas, estabelecendo assim uma linha de discussão para apresentar o quão promissor é a técnica, mesmo sendo arriscada e audaz em alguns experimentos. Por conseguinte, este artigo se faz necessário por apresentar à população científica, de diversas áreas de estudo, um conhecimento sólido sobre esta metodologia, os avanços que esta trouxe para fins terapêuticos e de pesquisa biomédica e os impasses bioéticos envolvidos nos ramos que envolvem a modificação de materiais genéticos da linhagem germinativa humana, abordando questões científicas e sociais sobre a temática.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Do Sistema Imune procariótico à formulação de uma técnica para Manipular Materiais Genéticos**

As *archaea* e bactérias são seres unicelulares procarióticos que habitam o planeta há milhares de anos. Estas ordens podem ser infectadas por bacteriófagos, vírus que possuem tropismo por células procarióticas (TORTORA, 2017). Para defenderem-se de infecções de materiais genéticos não próprios, as bactérias e arqueias possuem um amplo sistema que visa a destruição destes, por meio da criação de mecanismos que impossibilitem a adsorção de fagos, sistemas de exclusão por superinfecção e proteínas intracelulares, atuando nas etapas cruciais da multiplicação de bacteriófagos e desenvolvimento de sistemas de restrição que impedem a infecção por estes microrganismos, sendo estes equivalente a imunidade inata dos seres humanos (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; CHOPIN; CHOPIN; BIDNENKO, 2005). Em 1987, através de estudos com a bactéria *Escherichia coli* (ISHINO et al., 1987), foi descoberto que estes seres desenvolveram para se protegerem destas infecções virais um sistema imunológico adaptativo específico a determinados patógenos, conhecido como CRISPR-Cas, no qual ocorre o reconhecimento específico de sequências de materiais genéticos por meio de sequências curtas do DNA viral no loci CRISPR, podendo ser encontrado no material genético cromossômico ou plasmidial. Com isto, as mesmas conseguem degradar os ácidos nucleicos invasores, impedindo assim que o ciclo viral se concretize, sejam estes líticos ou lisogênicos (RATH et al., 2015; BARRANGOU et al., 2007; HALE et al., 2009).

O CRISPR faz parte de um grupo de repetições em *tandem* que confere às *archaea* e bactérias imunidade contra o ataque de patógenos previamente expostos. Essas sequências procarióticas variam de 23 a 47 pares de bases, que são separadas pela introdução do material genético viral de sequências com tamanhos similares, denominados espaçadores (GRISSA et al., 2007; MOJICA et al., 2005). Analogamente, têm-se as proteínas Cas, que são nucleases, com função de fragmentar as ligações entre os nucleotídeos da sequência do DNA viral quando este posteriormente infectar a célula (FU et al., 2013; FU et al., 2014).

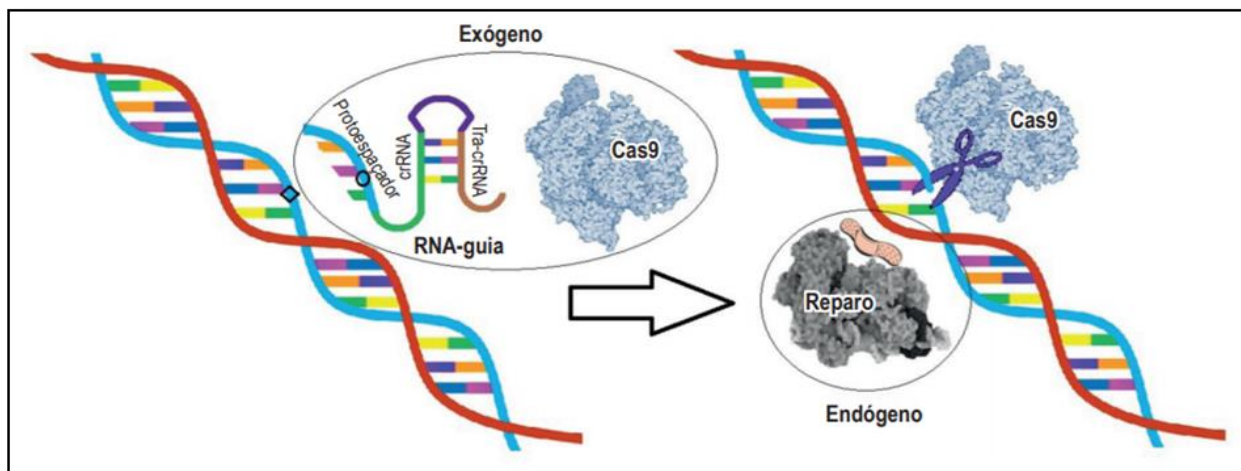
É fato que o sistema CRISPR, em especial o CRISPR-Cas9, depois de sua descoberta, foi proposto para ser usado para editar genomas humanos, baseando-se no princípio do sistema imune bacteriano. Em suma, este sistema de edição de genomas é preciso e se supera quando comparado aos existentes, ZFN (Nucleases Dedos de Zinco) e TALEN (Nucleases Efetoras do Tipo Ativador da Transcrição), sendo necessário somente uma subclonagem de oligonucleotídeos para a formulação do RNA guia ao invés da elaboração de proteínas diferentes específicas para cada gene. Através deste, é possível realizar a clivagem do DNA em loci específicos do DNA

humano e também de outros animais, como, por exemplo, o de camundongos, com custos mais acessíveis (GUPTA et al., 2019; SEGAL; MECKLER, 2013). Além disso, a endonuclease Cas9 reduz uma possível atividade mutagênica neste processo, como, por exemplo, alterações fora do alvo (CONG et al., 2013) e pode ser entregue a célula alvo por microinjeção (CRISPO et al., 2015), eletroporação (VÉRON et al., 2015), injeção hidrodinâmica (YIN et al., 2014), vetores virais (SWIENCH et al., 2015) e vetores não virais, como peptídeos de penetração celular, e nanopartículas (RAMAKRISNA et al., 2014; MOUT et al., 2017).

A terapia gênica vem sendo amplamente estudada desde a descoberta do DNA, fundamentando-se na melhoria genética por meio das alterações de genes ou pares de bases que sofreram mutações, e sua aplicação em laboratórios apresenta-se promissora ao desenvolvimento científico (GONÇALVES; PAIVA, 2017). O sistema CRISPR-Cas 9 mostra-se propício na terapia gênica, já que a enzima Cas9 consegue fragmentar o material genético em loci específicos de células eucarióticas, guiados pelo RNA guia, que direciona a enzima Cas9, possuindo funções de ativação, repressão gênica ou de inserção de uma nova sequência de DNA, modificando o genoma, que posteriormente serão reparadas por recombinação homóloga ou união não homóloga. A recombinação homóloga torna-se facilitada, visto que o alelo selvagem (sem manipulação humana) serve como um molde, evitando potenciais erros, pois utiliza sequências similares, sendo as mais utilizadas, o que pode não acontecer com a união não homóloga, pois no processo de reparo podem ocorrer uma inserção ou deleção (*indels*) de determinados genes ou pares de bases (bp), conduzindo o material genético a uma mutação na sequência a ser editada (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; RICHTER; RANDAU; PLAGENS, 2013).

O RNA, que serve como guia, e a Cas9 podem ser inseridos *in vitro* em células que desejam-se realizar alguma alteração gênica, provocando a quebra de fita dupla de DNA. Em seguida, o próprio mecanismo de reparo celular é utilizado para alterar a sequência do material genético, podendo ser utilizado tanto no restabelecimento da função de determinado gene quanto na indução de novas mutações, criando um gene nocaute ou inserindo no DNA partes de genes que por meio da recombinação homóloga, citado anteriormente, entram na posição da clivagem, reabilitando a função de determinado gene e sua expressão proteica (Figura 1) (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2017; SANDER; JOUNG 2014; RICHTER; RANDAU; PLAGENS, 2013).

**Figura 1** - Edição gênica pelo CRISPR-Cas 9, no qual o RNA guia reconhece a sequência alvo que será alterada. Em seguida, ocorre o pareamento entre as bases através do anelamento com o loci gênico e o protoespaçador do RNA guia, que sucedem então as modificações, ativando a nuclease Cas 9, causando a clivagem das fitas. Desta forma, ocorre a ativação do sistema de reparo celular, que será conduzido pelas modificações realizadas anteriormente pelo RNA guia (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2017).



Fonte: AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2017.

## 2.2 Avanços propiciados pelo CRISPR-Cas9 na terapêutica de doenças humanas.

Com o desenvolvimento deste sistema e sua aplicação *in vitro* para a edição estável de células somáticas e germinativas, este tornou-se o alvo de estudo de diversas patologias que acometem humanos e até o momento não possuem cura, conseguindo resultados satisfatórios, evidenciando o quanto esta técnica vêm beneficiando estudos científicos de modificação genômica, fornecendo respostas que buscavam-se a décadas. Segue abaixo uma tabela (Tabela 1) que demonstram os principais avanços e experimentos significativos utilizando o CRISPR-Cas 9 em estudos de doenças humanas.

**Tabela 1:** Avanços obtidos com o CRISPR-Cas9 em estudos realizados com o foco de compreender e tratar patologias humanas.

Experimentos realizados utilizando a técnica de Edição de Genomas CRISPR-Cas 9	Resultados obtidos	Referência
Criação de modelos de camundongos que expressam a enzima conversora de angiotensina humana II (ECA2) para o estudo do SARS-Cov-2.	Foi observado que os camundongos com expressão de ECA2 continham altas cargas virais, em diferentes tecidos, quando comparados com camundongos do tipo selvagem.	SUN et al., 2020.
Restauração da distrofina em modelos caninos e camundongos para o estudo da Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).	Remoção da mutação que ocasiona deficiência desta proteína em tecidos musculares.	AMOASSI et al., 2018; KOO et al., 2018.
Eliminação do genoma do HIV-1 de células TCD4 humanas infectadas latentemente.	Inibição da infecção pelo HIV-1 em células TCD4 humanas primárias cultivadas e suprimiu a replicação viral <i>ex-vivo</i> em células mononucleares e TCD4 obtidas do sangue periférico de pacientes HIV-1 positivo, sem causar genotoxicidade no DNA do hospedeiro.	KAMINSKI et al., 2016.

A utilização do CRISPR-Cas 9 no estudo de diversos tipos de cânceres e propostas terapêuticas.

Inibição do crescimento tumoral no câncer de mama, em sua disseminação e resistência aos quimioterápicos. A utilização do BC20 como marcador prognóstico e possível alvo para o controle do câncer de mama. Diminuição da malignidade do câncer de próstata. Averiguação de marcadores prognósticos para o câncer de endométrio e a relação inversa entre o supressor de tumor PR e o gene MYC. RAZA et al., 2016; SINGH et al., 2016; EMGEL et al., 2016; KAVLASHVILI et al., 2016; KAWAMURA et al., 2015.

Estratégias curativas para  $\beta$ -hemoglobinopatias utilizando CRISPR-Cas 9.

Foi constatado que a edição de genomas mediados pelo CRISPR-Cas 9 é uma ótima alternativa para terapias celulares baseadas em células tronco-hematopoiéticas. DEVER et al., 2016.

Correção da funcionalidade de genes em células-tronco pluripotentes induzidas para fibrose cística em células epiteliais pulmonares.

Correção do gene CFTR em células tronco dos pacientes doadores, sendo posteriormente diferenciadas para células epiteliais pulmonares. FIRTH et al., 2015.

CRISPR-Cas 9 cliva o vírus da Hepatite B.

Utilizando o CRISPR-Cas 9, conseguiu-se clivar regiões específicas do vírus da Hepatite B, levando a supressão da expressão gênica e replicação do vírus. RAMANAN et al., 2015.

Criação de macacos nocaute para o estudo de doenças relacionados à genes de doenças humanas.

Criação de macacos (*Macaca fascicularis*) nocautes para os genes Ppar- $\gamma$  e Rag1 para o estudo dos receptores que são ativado por peroxissoma Gama e para o gene de codificação de proteínas Rag1 no estudo de patologias, como, por exemplo, a linfopenia. NIU et al., 2014.

<p>A criação de camundongos para ao estudo de carcinomas humanos.</p>	<p>Edição gênica utilizando o CRISPR-Cas 9, a fim de formular camundongos para desenvolverem tumores a serem estudados, como, por exemplo, adenocarcinoma pulmonar (translocação dos genes EML4 e ALK no braço curto do cromossomo 2), câncer de fígado (mutação dos genes Pten, p53 e Ctnnb1), adenocarcinoma ductal pancreático (deleção do gene LKB1), meduloblastoma (deleção do gene Ptch1), glioblastoma (deleção dos genes Trp53, Pten e Nf1), câncer de mama (interrupção do gene Pten por células iniciadoras de câncer de mama invasivo e inativação dos genes Ptpn22 ou Mll3) e câncer ovariano (deleção nos genes p53 e Brac2).</p>	<p>MADDALO et al., 2014; BLASCO et al., 2014; SANCHEZ-RIVEIRA et al., 2014; XUE et al., 2014; CHIOU et al., 2014; MAZUR et al., 2015; ZUCKERMANN et al., 2015; ANNUZIATO et al., 2016; WALTON et al., 2016.</p>
<p>Alteração do gene PCSK9 <i>in-vivo</i> para a perda de função com o intuito proteção de doenças cardiovasculares coronarianas.</p>	<p>Diminuição nos níveis plasmáticos da pró-proteína convertase subtilisina kexina tipo 9 (PCSK9) e aumento dos receptores no fígado para lipoproteínas de baixa densidade (LDL), diminuindo sua concentração no sangue de camundongos.</p>	<p>DING et al., 2014.</p>
<p>Edição <i>in-vivo</i> de camundongos portadores da Tirosinemia hereditária 1.</p>	<p>Modificação do gene FHA em camundongos adultos, sendo perceptível no fenótipo, restaurando a perda de peso.</p>	<p>YIN et al., 2014.</p>
<p>A utilização do CRISPR-Cas 9 para a cura da catarata.</p>	<p>Camundongos que possuíam o gene CRYGC, responsável pela catarata, conseguiram por meio de injeção da Cas9 e o RNA-guia em zigotos, a modificação do mesmo, sendo este caráter transmitido para as próximas gerações.</p>	<p>WU et al., 2013.</p>



### **2.3 Considerações ético-sociais envolvendo o CRISPR-Cas 9 na edição embrionária e os efeitos da modificação genética em indivíduos na sociedade contemporânea**

Um dos ramos de pesquisa que mostrou-se em pauta com a criação desta tecnologia é a manipulação de embriões humanos, que geram grande comoção científica e social. Atualmente, muito se discute sobre a manipulação genética destes em questões humanas e éticas, visto que o CRISPR-Cas 9 possui alta precisão e incomplexidade na técnica, sendo o alvo da pesquisa científica realizar alterações gênicas em embriões, com o intuito de curar doenças genéticas, melhorando assim a qualidade de vida destas pessoas.

Por ser uma técnica recente, desconhecem-se os impactos que a mesma pode ter para os próprios indivíduos no futuro e em gerações posteriores, o que faz com que a técnica em si possa ser considerada perigosa e em alguns experimentos inaceitáveis, segundo Lamphier e colaboradores (2015). O autor defende que devem-se realizar mais estudos, pois os efeitos da modificação do organismo como um todo podem ser imprevistos e desconhecidos até o momento do nascimento ou gerar mosaicos genéticos, fato este se a célula entrar em mitose antes da edição completa do alvo CRISPR-Cas9, fazendo com que a edição seja incompleta ou não edite todas as células pretendidas; e que a técnica, se for utilizada, deverá ser somente para fins terapêuticos ou em células somáticas, a fim de eliminar ou induzir mutações corretoras de genes que conduzem à patologias.

Segundo Baltimore e colaboradores (2015) é possível avaliar os efeitos da modificações em células germinativas e seus efeitos na vida adulta de diversos organismos, como nos animais, porém é irreal a edição do material genético em embriões humanos e fazer projeções sobre este em longa escala após a implantação intrauterina e nascimento, já que o CRISPR-Cas9 é uma técnica recente, e por mais que se mostre promissora, envolve riscos, como toda pesquisa, indo contra a lei natural da vida. Os autores, por conseguinte, indagam se seria responsável utilizar a técnica para a cura de doenças, pois a interação gene-ambiente pode ocasionar consequências imprevistas *in vitro*, sendo necessário a elucidação destes fatores antes de ratificar o seu uso clinicamente, realizando-se mais estudos específicos.

Além disso, Peng e colaboradores (2014) afirmam que para a técnica ser utilizada na prática, devem-se realizar estudos que aprimorem o modo de entrega do CRISPR em seus alvos celulares e nucleares, já que estes podem ter efeitos fora do alvo, por mais que sejam altamente

precisos, como já demonstrados em plasmídeos bacterianos. Isto faz com que a mesma possa ser arriscada em experimentos embrionários humanos, pois pode modificar partes do genoma não intencionais, trazendo complicações que só serão perceptivas após o nascimento, capaz de serem irreversíveis (CRIBBS; PERERA, 2017).

Em meio a todo esse debate bioético envolvendo o CRISPR-Cas9 em experimentos com células germinativas, em fevereiro de 2016, Callaway e colaboradores (2016) relataram que cientistas britânicos conseguiram uma licença legal para a edição de embriões humanos saudáveis pela HFEA (*Human Fertilisation and Embryology Authority*, traduzindo *Autoridade de Fertilização e Embriologia Humana* do Reino Unido), no qual iriam alterar genes de embriões nos primeiros dias e interromper os experimentos após sete dias do estudo, com o objetivo de estudar genes envolvidos na fase inicial da formação embrionária, aumentando as taxas de sucesso da fertilização *in vitro* (FIV). Liang e colaboradores (2015) realizaram, da mesma forma, edições em zigotos tripronucleares (embriões não saudáveis), porém os resultados não foram satisfatórios, já que o reparo por recombinação homóloga após a clivagem pelo CRISPR-Cas9 no gene da  $\beta$ -globina foi baixo, gerando embriões mosaicos e com mutações não previstas anteriormente. Este trabalho foi publicado pelo periódico *Protein Cell*, sendo rejeitados pela *Science* e *Nature* devido a impasses éticos (CRESSEY; CYRANOSKI, 2015).

Com isto, é notório que a escassez de conhecimentos práticos sobre a manipulação de embriões humanos em campos de estudos relacionados a mutagênese é vasto, e que para realizar-se estas pesquisas devem ser analisados todos os fatores possíveis que possam vir a ocorrer antes da parte prática do experimento, bem como este ser supervisionado por terceiros (MULVIHILL et al., 2017). Guttinger (2018), em acréscimo, afirmou que quando modifica-se o genoma de um organismo, deve-se levar em consideração os efeitos que este pode acarretar, pois um determinado gene pode alterar posteriormente a função de outro e o CRISPR-Cas9, por ser recente, não têm-se conhecimentos suficientes sobre a precisão da técnica, o que leva a crer que a proibição da edições de embriões humanos na contemporaneidade está passando por um exercício de autoconfiança, já que experimentos como estes confrontam com valores morais de certos grupos sociais.

Em controvérsia, Savulescu e colaboradores (2015) afirmaram que devem ser realizados experimentos utilizando embriões humanos sempre que possível e necessário, pois seria irresponsabilidade por parte da ciência ignorar experimentos que futuramente possam salvar

vidas, e se os pesquisadores obstem-se destes ramos de pesquisas, moralmente, estão sendo responsáveis por mortes que poderiam ser evitadas utilizando a engenharia genética, e que experimentos como estes não devem ser proibidos, porém permitidos baseados em regulamentações cujo o foco é promover a saúde e bem estar populacional. Isto corrobora com os resultados já obtidos com o CRISPR-Cas9 e seus efeitos genômicos em experimentos obtidos com materiais genéticos humanos e animais em diversos loci específicos, como citados.

A fim de barrar o uso irracional da manipulação de genomas foram propostos conselhos internacionais que visam estabelecer limites entre os riscos e benefícios dos mesmos, iniciando em 1975 em relação a tecnologia do DNA recombinante, intitulado-se proibição de Asilomar (BERG et al., 1975). Esta gerou resultados eficazes no que se diz respeito a criar plasmídeos de replicação autônoma possuindo genes de resistência a antibióticos e combinações com DNA viral de cepas oncogênicas, criando assim uma linha tênue segura entre uma pesquisa confiável a ser desenvolvida e os riscos que o método empregado pode proporcionar. Porém, os dizeres da proibição de Asilomar não é aplicável ao CRISPR-Cas9, devido à falta de conhecimento sobre os efeitos que acarretam a modificação do material genético humano com esta técnica recente, apesar de que deve-se propiciar um espaço seguro para os experimentos. É válido ressaltar que se processo de modificação de bactérias e plantas com o DNA recombinante falhar o descarte é realizado, o que não seria plausível utilizando embriões humanos (GUTTINGER, 2018; NATURE, 2015).

Para se realizar pesquisas com embriões humanos, Hyun e colaboradores (2016) relataram que há o limite de 14 dias para que os experimentos ocorram, sendo necessários interromper o desenvolvimento do embrião após este período. Esta política foi proposta inicialmente pelo Conselho Consultivo de Ética do Departamento de Saúde, Educação e Bem-Estar dos Estados Unidos no ano de 1979, sendo posteriormente aderidos a outros países, que defendem que neste período podem-se realizar estudos científicos. Porém, muito discutiu-se para a sua criação, bem como quando surgiram ideias para a sua modificação, pois esta representa um equilíbrio entre os objetivos das ciências e condutas morais de diversos segmentos da sociedade. No Brasil, de acordo com o artigo 6 da lei 11.105, inciso II, III e IV, é expressamente proibido o uso da engenharia genética *in vitro* em células humanas germinais, zigoto, embriões humanos e clonagem humana (PRESIDENCIA DA REPÚBLICA, 2005), contudo experimentos utilizando o CRISPR-Cas9 em células germinativas são realizados em sua totalidade no exterior. Desta forma,

é evidente que cada país possui em suas leis e dizeres sobre a manipulação de embriões, porém o genoma é compartilhado entre todos, sendo necessários debates para a formulação de normas e leis, como acontece, por exemplo, em cúpulas internacionais.

Em 2015, foi realizado em Washington DC (Estados Unidos da América) uma declaração de Cúpula Internacional sobre a edição de genes humanos, em especial a edição embrionária e de células-tronco, com pesquisadores especialistas em ética, políticos e membros das principais universidades do mundo. Nesta, fatores como a edição incompleta no processo de manipulação gênica que podem gerar mosaicismos, já demonstrados em experimentos utilizando o CRISPR-Cas9, como, por exemplo, o de Laing e colaboradores (2015), a dificuldade de prever efeitos de uma modificação no genoma para a pessoa, e que a partir do momento que esta alteração for inserida em uma população será difícil retirá-la, implicando nas gerações posteriores do indivíduo e poder ser tornar um fator atenuante de discriminações socioculturais, afetando o convívio social do modificado, foram discutidos, demonstrando-se que seria irresponsável por parte da ciência promover ensaios clínicos até que estes fatores sejam elucidados (INTERNACIONAL SUMMIT OF HUMAN EDITING, 2015).

Em compensação, no final do ano de 2018, em Hong Kong (China) foi realizado a segunda Cúpula Internacional sobre edição genética em humanos com o objetivo de traçar as possíveis aplicações clínicas e as reações que a sociedade possa desenvolver sobre o tema, ficando acordado e apoiado os avanços crescentes que vêm-se alcançando em relação a manipulação genética em células somáticas, porém devido a fatores já citados, continuou barrado o uso clínico da edição na linha germinativa humana. Em discussão, ficou claro que a edição da linhagem germinativa poderia propiciar que pais com doenças genéticas conseguissem ter filhos fisiologicamente saudáveis, porém a edição da linhagem germinativa traz em pauta uma grande quantidade de riscos. Debateu-se que futuramente a edição da linhagem germinativa possa ser algo aplicável se estes problemas forem selecionados e esta for a única opção de tratamento a um paciente, corroborando com o que a Unesco propõe (UNESCO, 2015) se houver garantia que estes pacientes terão acompanhamento médico e supervisão independente concreta e rigorosa, além de atenção aos efeitos sociais e diálogo amplo e aberto entre representantes da população e cientistas (INTERNACIONAL SUMMIT OF HUMAN EDITING, 2018).

Segundo a *International Society for Stem Cell Research* (2016), os objetivos e ideias propostas pela Segunda Cúpula Internacional complementam-se, pois a mesma é a favorável a

manipulação embrionária realizados sob supervisão, a fim de entender os fenômenos envolvidos, sem a implantação posterior destes embriões. Desta forma, qualquer tentativa de modificação embrionária com o objetivo de implantação deve ser barrada, já que os conhecimentos possuídos pelos pesquisadores atualmente são incompletos.

Em contrapartida, Montgomery e colaboradores (2016) afirmaram que ao se editar um embrião, deve-se levar os aspectos sociais em consideração da mesma forma que os aspectos biológicos, pois deve-se analisar como seria a vida de uma pessoa geneticamente modificada em sociedade futuramente, além de averiguar como se daria a organização social após isto ocorrer. Seria a edição genética um limiar de discriminação social para pessoas com deficiência após se tornar acessível a cura destas pela sociedade no futuro, tratando-se, por exemplo, de aneuploidias? (BENJAMIN et al., 2015). Não é irreal pensar nesta possibilidade, pois têm-se exemplos desta natureza na história, como a cirurgia plástica, que inicialmente foi proposta para fins terapêuticos, e atualmente a mesma é utilizada para fins estéticos (BROKOWSKI; POLLACK; POLLACK, 2015; CRIBBS et al., 2017), além de propiciar uma eugenia no corpo social e a criação de expectativas de modificação no ser humano com o propósito de adquirirem resultados irreais (MULVIHILL et al., 2017), como muitas vezes são apresentados pela indústria cinematográfica e literária, aguçando a imaginação da população em geral para resultados fictícios inalcançáveis.

Ademais, em toda a história da humanidade, fatores como a cor da pele estão associados a preconceitos e segregação no corpo social, seria o CRISPR-Cas9 uma ferramenta de manipulação gênica capaz de alterar a cor do tegumento humano de futuros seres humanos em embriões? Pois em estudos realizados por Yoshimi e colaboradores (2014), foi possível realizar a alteração de cor na pelagem de ratos (*Rattus norvegicus*), recuperando o fenótipo albino, não aguti e encapuzados através da troca, integração ou eliminação de genes específicos.

Segundo Sawyer e colaboradores (2013), em um estudo realizado com 1.700 mulheres, que utilizaram o banco de espermatozoides providos de doadores, 1.597 delas afirmaram que, além dos aspectos fisiológicos e da saúde da família do doador, levaram em considerações aspectos étnicos, corporais e intelectuais. Com isso, é possível afirmar, caso a edição embrionária seja uma realidade no futuro, fatores como estes poderiam ser levados em considerações e discutidos por determinados grupos sociais, apesar de serem irreais para a prática da ciência moderna. Aspectos econômicos, além dos citados, poderiam ser outro fator corroborante na

edição gênica embrionária e o limiar de preconceito social, já que famílias com alto poder aquisitivo estariam em vantagem na edição embrionária, possuindo filhos com características preferíveis (OTIENO, 2015).

Impasses religiosos e reflexões filosóficas são grandes questões que norteiam a opinião pública sobre manipulação genética de embriões. No cristianismo, há um dualismo sobre o tema, possuindo cristãos que concordam com determinados procedimentos de estudos em relação a manipulação embrionária, contudo a grande vertente desta comunidade seguem preceitos descritos na bíblia que condenam determinadas práticas, já que o embrião humano não é somente células aleatórias e sim uma vida (CESARINO et al., 2007; DOLGIN et al., 2003; PESSINI et al., 2002). Durante a Segunda Cúpula Internacional sobre Edição Genética em Humanos, Mohammed Ghaly afirmou que tais experimentos trazem grandes impasses religiosos islâmicos, pois manipular embriões humanos possui um impacto maior do que se realizar uma terapia genética com células somáticas, já que os humanos não são donos do próprio corpo, o que culmina em uma controvérsia, pois para o islamismo o início da vida ocorre 120 dias após a fecundação (ROSAR; GUIMARÃES, 2005). Satoshi Kodama afirmou que no Japão os embriões são considerados brotos da vida humana e que sua dignidade devem ser mantidas a qualquer custo, sendo no país atualmente permitido somente utilizar embriões remanescentes de clínicas de reprodução assistida para o aprimoramento dessas tecnologias, sendo proibidos criar embriões para a pesquisa (INTERNACIONAL SUMMIT OF HUMAN EDITING, 2018). Para o hinduísmo, a vida têm início quando a matéria e a alma se encontram, sendo a fecundação este ato, indo contra o estudo e a pesquisa de células derivados de embriões (INFANTE, 2008), o judaísmo permite que se utilizem pesquisas com células troncos desde que não firam seu dogmatismo (ROSAR; GUIMARÃES, 2005).

É notório que a manipulação genética de células embrionárias para fins terapêuticos envolvam uma gama de aspectos biológicos, científicos e sociais e por mais que a tecnologia do CRISPR-Cas9 possua mais precisão e é de fácil manipulação comparado com as tecnologias existentes, diversos fatores são necessários ser solucionados antes de sua aplicação clínica que visam criar organismos geneticamente modificados a partir da edição da linhagem germinativa, pois ao se utilizar esta tecnologia para a edição de células somáticas em adultos, o mesmo já está consciente de suas escolhas e aprovou que determinada terapia seja realizada, além de possuírem baixo-risco para a integridade física e social do paciente (BAUMANN, 2016), o que não acontece

com embriões, mesmo que sejam para fins terapêuticos com benefícios nítidos ao futuro ser humano.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É evidente o avanço promitente que o CRISPR-Cas 9 trouxe à ciência, possibilitando o estudo da edição gênica para diversos fins, desde a deleção ou mutação de um determinado gene até a formulação de um organismo como todo por meio da edição de células de linhagem germinativa. Esta é uma técnica extremamente precisa, de fácil manipulação e com custo mais acessível, sendo uma porta aberta para novas descobertas, especialmente na área da saúde. Contudo, diversos fatores devem ser averiguados na sua utilização em experimentos específicos, sobretudo nas linhas de pesquisa envolvendo a manipulação de embriões humanos com objetivos terapêuticos, pois há uma linha tênue entre os avanços que a técnica vislumbra e dos progressos que prometem *versus* impasses sociais de diversas vertentes que precisam ser avaliadas antes que decisões sejam tomadas, e para que isto progrida de maneira saudável entre partes são necessários que amplos diálogos sejam estabelecidos, entre pesquisadores, entidades políticas e representantes dos diversos grupos sociais.

Compreende-se então que a técnica é auspiciosa e que seus avanços trazidos até os dias atuais são de extremo valor científico que homologarão em benefícios a sociedade, especialmente no campo terapêutico. Percebe-se, porém, que mesmo alguns experimentos sejam audazes e arriscados, a técnica em si não é considerada antiética, sugerindo a hipótese de que a técnica CRISPR-Cas9 não é antiética e traz avanços consideráveis às ciências modernas de edição gênica.

***THE APPLICATION OF CRISPR-CAS9 GENOME EDITING TECHNIQUE IN GENETIC ENGINEERING: benefits to science and society and ethical bottlenecks in view of the unknown, especially in human embryonic editing.***

#### ***ABSTRACT***

*This paper describes the CRISPR-Cas9 genome editing technique in Genetic Engineering application, highlighting the advantage of its use for science and the benefits it can bring to*

*society in contrast to the bioethical bottlenecks it faces at present, especially in experiments involving the manipulation of human germ line cells. Such an approach is justified by the fact that manipulating genetic materials nowadays is not something unattainable as it was considered a few decades ago and due to this possibility, facilitated by the development of CRISPR-Cas9, many ethical obstacles from sundry social spheres arise, creating a taboo that needs be overcome. The purpose of this work was to carry a bibliographic review out in scientific articles published in Pubmed, Google Scholar and SciELO, explaining from the discovery and its formulation for the edition of genetic materials, the results and benefits already achieved to the impacts it deal with on contemporary society, in particular the human embryos manipulation. The analysis showed how promising is the technique and the great gains that are provided by its use in gene manipulation and genetic studies, that even though in some experiments realized are dangerous, daring, risky and should be discussed currently and often barred, it is not considered unethical.*

**Keywords:** CRISPR-Cas9. Bioethics. Embryos. Gene edition.

#### **4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AMOASSI, L.; HILDYARD, J. C. W.; LI, H.; SANCHEZ-ORTIZ, E.; MIREAULT, A.; CABALLERO, D.; HARRON, R.; STATHOPOULOU, T.; MASSEY, C.; SHELTON, J. M.; BASSEL-DUBY, R.; PIERCY, R. J.; OLSON, E. N. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. **Science**, V. 362, N. 6410, P. 86 – 91, 2018.

ANNUZIATO, S.; KAS, S. M.; CETHE, M.; YUCEL, H.; BRAVO, J. D.; PRITCHARD, C.; ALI, R. B.; GERWEN, B.; SITEUR, B.; DRENTH, A. P.; SCHUT, E.; VEM, M.; BOELEN, M. C.; KLARENBECK, S.; HUIJBERS, I. J.; MILTENBURG, M. H.; JONKERS, J. Modeling invasive lobular breast carcinoma by CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing of the mammary gland. **Genes Development**, v. 30, n. 12, p. 1470 – 1480, 2016.

AREND, M. C.; PEREIRA, J. O.; MARKOSKI, M. M. O Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia. **Arq Bras Cardiology**, v. 108, n. 1, 2017.

BALTIMORE, D.; BERG, P.; BOTCHAN, M.; CARROLL, D.; CHARO, R. A.; CHURCH, G.; CORN, G. Q.; DALEY, G. Q.; DOUDNA, J. A.; FENNER, M.; GREEELY, H. T.; JINEK, M.; MARTIN, S.; PENHOET, E.; PUCK, J.; STERNBERG, S. H.; WEISSMAN, J. S.; YAMAMOTO, K. R. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. **Science**, v. 348, 2015.



BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, n. 315, 2007.

BAUMANN, M. CRISPR/Cas9 genome editing – new and old ethical issues arising from a revolutionary technology. **NanoEthics**, v. 10, n. 2, p. 139 – 159, 2016.

BENJAMIN, R. INTERROGATING EQUITY: A DISABILITY JUSTICE APPROACH TO GENETIC ENGINEERING, 2015. Disponível em: <[http://nationalacademies.org/cs/groups/pgasite/documents/webpage/pgasite\\_170455.pdf](http://nationalacademies.org/cs/groups/pgasite/documents/webpage/pgasite_170455.pdf)> acesso em: 16 out. 2019.

BERG, P.; BALTIMORE, D.; BRENNER, S.; ROBLIN, R. O.; SINGER, M. F. Summary Statement of the Asilomar Conference on Recombinant DNA Molecules. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 72, n. 6, p. 1981 – 1984, 1975.

BROKOWSKI, C.; POLLACK, M.; POLLACK, R. Ethics in Biology, Engineering and Medicine: An International Journal. **Ethics in biology engineering & medicine**, v. 6, p. 263 – 279, 2015.

CALLAWAY, E. UK scientists gain licence to edit genes in human embryos. **Nature**, v. 530, n. 7588, 2016.

CESARINO, L. N. Nas fronteiras do "humano": os debates britânico e brasileiro sobre a pesquisa com embriões. **Mana**, v. 13, n. 2, 2007.

CHIOU, S. H.; WINTERS, I. P.; WANG, J.; NARANJO, S.; DUDGEON, C.; TAMBURINI, F. B.; BRADY, J. J.; YANG, D.; GRUNER, B. M.; CHUANG, C. H.; CASWELL, D. R.; ZENG, H.; CHU, P.; KIM, G. E.; CARPIZO, D. R.; KIM, S. K.; WINSLOW, M. M. Pancreatic cancer modeling using retrograde viral vector delivery and in vivo CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing. **Genes Development**, v. 29, n. 14, p. 1576 – 1585, 2015.

CHOPIN, M. C.; CHOPIN, A.; BIDNENKO, E. Phage abortive infection in lactococi: variations on a theme. **Elsevier**, v. 8, n. 4, p. 473 – 479, 2005.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; SHU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFGINI, L. A.; ZHANG, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819 – 823, 2013.

CRESSEY, D.; CYRANOSKI, D. Human-embryo editing poses challenges for journals. **Nature**, v. 520, n. 7549, 2015.

CRIBBS, A. P.; PERERA, S. M. W. Science and Bioethics of CRISPR-Cas9 Gene Editing: An Analysis Towards Separating Facts and Fiction. **Yale Journal Biol. Med**, v. 90, n. 4, p. 625 – 634, 2017.

CRISPO, M.; MULET, A. P.; TESSON, L.; BARRERA, N.; CUADRO, F.; NETO, P. C. S.; NGUYEN, T. H.; CRÉNÉGUY, A.; BRUSSELLE, L.; ANEGÓN, I.; MENCHACA, A. Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. **PLoS One**, v. 10, n. 8, 2015.

DEVER, D. P.; BAK, R. O.; REINISCH, A.; CAMARENA, J.; WASHINGTON, G.; NICOLAS, C. E.; PAVEL-DINU, M.; SAXENA, N.; WILKENS, A. B.; MANTRI, S.; UCHIDA, N.; HENDEL, A.; NARLA, A.; MAJETI, R.; WEINBERG, K. I.; PORTEUS, M. H. CRISPR/Cas9 Beta-globin Gene Targeting in Human Hematopoietic Stem Cells. **Nature**, v. 539, n. 7629, p. 384 – 389, 2016.

DING, Q.; STRONG, A.; PATEL, K. M.; NG, S. L.; GOSIS, B. S.; RAGEN, S. N.; RADER, D. J.; MUSUNURU. Permanent Alteration of PCSK9 With In Vivo CRISPR-Cas9 Genome Editing. **Cir. Res.**, n. 115, v. 5, p. 488 – 492, 2014.

DOLGIN, J. Embryonic discourse: abortion, stem cells, and cloning. **Florida State University Law Review**, v. 31, n. 1, 2003.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, 2014.

ENGEL, B. J.; BOWSER, J. L.; BROADDUS, R. R.; CARSON, D. D. MUC1 stimulates EGFR expression and function in endometrial cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 32796 – 32809, 2016.

FIRTH, A. L.; MENON, T.; PARKER, G. S.; QUALLS, S. J.; LEWIS, B. M.; KE, E.; DARGTZ, C. T.; WRIGHT, R.; KHANNA, A.; GAGE, F. H.; VERMA, I. M. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. **Cell Rep.**, v. 12, n. 9, 2015.

FU, Y.; FODEN, J. A.; KHAYTER, C.; MAEDER, M. L.; REYON, D.; JOUNG, J. K.; SANDER, J. D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. **Nat Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 822 – 826, 2013.

FU, Y.; SANDER, J. D.; REYON, D.; CASCIO, V. M.; JOUNG, J. K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 3, 2014.

GRISSA, I.; VERGNAUD, G.; POURCEL, C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. **BMC Bioinformatics**, v. 172, n. 8, 2007.

GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. M. A. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. **Einstein**, v. 15, n. 3, 2017.

GUPTA, D.; BHATTACHARJEE, O.; MANDAL, D.; SEM, M. K.; DEY, D.; DASGUPTA, A.; KAZI, T. A.; GUPTA, R.; SINHARROY, S.; ACHARYA, K.; CHATTOPADHYAY, D.; RAVICHANDIRAN, V.; ROY, S.; GHOSH, D. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. **Life Sciences**, v. 322, 2019.

GUTTINGER, S. Trust in Science: CRISPR-Cas9 and Ban on Human Germline Editing. **Springer Open Choice**, v. 24, n. 4, 2018.

HALE, C. R.; MAJUMDAR, S.; ELMORE, J.; PFISTER, N.; COMPTON, M.; OLSON, S.; RESCH, A. M.; GLOVER, C. V.; GRAVELEY, B. R.; TERNS, R. M.; TERNS, M. P. Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. **Mol Cell**, v. 45, n. 3, p. 292 – 302, 2012.

HYUN, I.; WILKERSON, A.; JOHNSTON, J. Embryology policy: Revisit the 14-day rule. **Nature**, v. 533, p. 169 – 171, 2016.

INFANTE, A. P. P. CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS: ofensas à dignidade?, 2008. Disponível em: <file:///C:/Users/usuario/Downloads/1641-3776-1-PB.pdf>. Acesso em: 16 out. 2019.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESEARCH (ISSCR), 2016. Disponível em: < <https://www.isscr.org/docs/default-source/all-isscr-guidelines/guidelines-2016/isscr-guidelines-for-stem-cell-research-and-clinical-translation.pdf?sfvrsn=4>>. Acesso em: 15 out. 2019.

INTERNACIONAL SUMMIT OF HUMAN EDITING, 2018. Disponível em: < <http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=11282018b>>. Acesso em: 15 out. 2019.

INTERNACIONAL SUMMIT OF HUMAN EDITING, 2015. Disponível em < <http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=12032015a>>. Acesso em: 15 out. 2019.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, 1987.

KAMINSKI, R.; CHEN, Y.; FISCHER, T.; TEDALDI, E.; NAPOLI, A.; ZHANG, Y.; KARN, J.; HU, W.; KHALILI, K. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. **Scientific Reports**, n. 6, v. 22555, 2016.

KAVLASHVILI, T.; JIA, Y.; DAI, D.; MENG, X.; THIEL, K. W.; LESLIE, K. K.; YANG, S. Inverse Relationship between Progesterone Receptor and Myc in Endometrial Cancer. **PLOS One**, v. 11, n. 2, 2016.

KAWAMURA, N.; NIMURA, K.; NAGANO, H.; YAMAGUCHI, S.; NONOMURA, N.; KANEDA, Y. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG and NANOGP8 decreases the malignant potential of prostate cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 22361 – 22374, 2015.

KOO, T.; LU-NGUYEN, N. B.; MALERBA, A.; KIM, E.; KIM, D.; CAPPELARI, O.; CHO, H.; DICKSON, G.; POPPLEWELL, L.; KIM, J. Functional Rescue of Dystrophin Deficiency in Mice Caused by Frameshift Mutations Using *Campylobacter jejuni* Cas9. **Molecular Therapy**, v. 6, n. 26, p. 1529 – 1538, 2018.

LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 317 – 327, 2010.

LANPHIER, E.; URNOV, F.; HAECKER, S. E.; WERNER, M.; SMOLENSKI, J. Don't edit the human germ line. **Nature**, v. 519, 2015.

LIANG, P.; XU, Y.; DING, C.; HUANG, R.; ZHANG, Z.; LV, J.; XIE, X.; CHEN, Y.; LI, Y.; SUN, Y.; BAI, Y.; SONGYANG, Z.; MA, W.; ZHOU, C.; HUANG, J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. **Protein Cell**, n. 6, v. 5, p. 363 – 372, 2015.

MADDALO, D.; MANCHADO, E.; CONCEPCION, C. P.; BONETTI, C.; VIDIGAL, J. A.; HAN, Y. C.; OGRODOWSKI, P.; CRIPPA, A.; REKHTMAN, N.; STANCHINA, E.; LOWE, S. W.; VENTURA, A. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. **Nature Medicine**, v. 516, n. 7531, 2014.

MAZUR, P. K.; HERNER, A.; MELLO, S. S.; WIRTH, M.; HAUSMANN, S.; RIVERA, S. J. S.; LOFGREN, S. M.; KUSCHMA, T.; HAHN, S. A.; VANGALA, D.; ARSIC, MARIJA, T.; GUPTA, A.; HEID, I.; NOEL, P. B.; BRAREN, R.; ERKAN, M.; KLEEFF, J.; SIPOS, B.; SAYLES, L. C.; HEIKENWALDER, M.; HEBMANN, E.; ELLENRIDER, V.; ESPOSITO, I.; JACKS, T.; BRADNER, J. E.; KHATRI, P.; CORDERO, E. A. S.; ATTARDI, L. D.; SCHMID,

R. M.; SCHNEIDER, G.; SAGE, J.; SIVEKE, J. T. Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. **Nature Communication**, v. 21, n. 10, 2015

MOJICA, F. L.; DIEZ-VILLASENOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ALMENDROS, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. **Microbiology Society**, v. 155, n. 3, 2009.

MONTGOMERY, J. Nuffield Council on Bioethics Report: Genome editing, 2016. Disponível em: <<http://nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/Genome-editing-an-ethical-review.pdf>> acesso em: 15 out. 2019.

MOUT, R.; RAY, M.; YESILBAG, T. G.; LEE, Y. W.; TAY, T.; ROTELLO, V. M. Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. **ACS Nano**, v. 11, n. 3, p. 2.452 – 2.458, 2017.

MULVIHILL, J. J.; CAPPS, B.; JOLY, Y.; LYSAGHT, T.; ZWART, H. A. E.; CHADWICK, R. Ethical issues of CRISPR technology and gene editing through the lens of solidarity. **British Medical Bulletin**, v. 122, n. 1, p. 17-29, 2017.

NATURE. After Asilomar. **NATURE**, n. 526, p. 293 – 294, 2015.

NIU, Y.; SHEN, B.; CUI, Y.; CHEN, Y.; WANG, J.; WANG, L.; KANG, Y.; ZHAO, X.; SI, W.; LI, W.; ZIANG, A. P.; ZHOU, J.; GUO, X.; BI, Y.; SI, C.; HU, B.; DONG, G.; WANG, H.; ZHOU, Z.; LI, T.; TAN, T.; PU, X.; WANG, F.; JI, S.; ZHOU, Q.; HUANG, X.; JI, W.; SHA, J. Generation of gene-modified *cynomolgus* monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. **Cell**, v. 156, n. 4, 2014.

OTIENO, M. O. CRISPR-Cas9 human genome editing: challenges, ethical concerns and implications. **Journal of Clinical Research and Bioethics**, v. 6, n. 253, 2015.

PENG, R.; LIN, G.; LI, J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. **The FEBS Journal**, v. 283, n. 7, p. 1218 – 1231, 2016.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2005. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm)> Acesso em: 15 out. 2019.

PESSINI, L. Genética, clonagem e dignidade humana. **Parcerias Estratégicas**, v. 7, n. 15, 2002.

RAMAKRISHNA, S.; KWAKU, D. A. B.; BELLOR, J.; GOPALAPPA, R.; LEE, S. K.; KIM, H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. **Genome Red**, v. 24, n. 6, p. 1020 – 1027, 2014.

RAMANAN, V.; SHLOMAI, A.; COX, D. B. T.; SCHWARTZ, R. E.; MICHALIDIS, E.; BHATTA, A.; SCOTT, D. A.; ZHANG, F.; RICE, C. M.; BHATIA, S. N. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. **Scientific Reports**, v. 5, n. 19833, 2015.

RATH, D.; AMLINGER, L.; RATH, A.; LUNDGREN. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. **Biochimie**, v. 117, 2015.

RAZA, U.; SAATCI, O.; UHLMANN, S.; ANSARI, S. U.; EYUPOGLU, E.; YURDUSEV, E.; MUTLU, M.; ERSAN, P. G.; ALTUNDAG, M. K.; ZHANG, J. D.; DOGAN, H. T.; GULER, G.; SAHIN, O. The miR-644a/CTBP1/p53 axis suppresses drug resistance by simultaneous inhibition of cell survival and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 31, 0. 49859 – 49877, 2016.

RICHTER, H.; RANDAU, L.; PLAGENS, A. Exploiting CRISPR/Cas: Interference Mechanisms and Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 17, 2013.

RIVERA, F. J. S.; PAPAGIANNAKOPOULOS, T.; ROMERO, R.; TAMMELA, T.; BAUER, M. R.; BHUTKAR, A.; JOSHI, N. S.; SUBBARAJ, L.; BRONSON, R. T.; XUE, W.; JACKS, T. Rapid modeling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. **Nature**, v. 516, n. 7531, 2014.

ROSAR, S. R.; GUIMARÃES, A. C. M. BIODIREITO E DIVERGÊNCIA: QUANDO A VIDA HUMANA COMEÇA?, 2005.. Disponível em: <[http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC\\_2006/inic/inic/06/INIC0001281ok.pdf](http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2006/inic/inic/06/INIC0001281ok.pdf)>. Acesso em: 16 Out. 2019

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, -. 347 – 355, 2014.

SAVULESCU, J.; PUSH, J.; DOUGLAS, T.; GYNGELL, C. The moral imperative to continue gene editing research on human embryos. **Protein Cell**, n. 6, v. 7, p. 476 – 479, 2015.

SAWYER, N.; BLYTH, E.; KRAMER, W.; FIRTH, L. A survey of 1700 women who formed their families using donor spermatozoa. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 27, n. 4, p. 436 – 447, 2013.

SEGAL, D J.; MECKLER, J. F. Genome Engineering at the Dawn of the Golden Age. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 14, 2013.

SINGH, R.; GUPTA, S. C.; PENG, W. X.; ZHOU, N.; POCHAMPALLY, R.; ATFI, A.; WATABE, K.; LU, Z.; MO, Y. Y. Regulation of alternative splicing of Bcl-x by BC200 contributes to breast cancer pathogenesis. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 6, 2016.

SWIENCH, L.; HEIDENREICH, M.; BANERJEE, A.; HABIB, N.; LI, Y.; TROMBETTA, J.; SUR, M.; ZHANG, F. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 102 – 106, 2015.

SUN, S.; CHEN, Q.; GU, H.; YANG, G.; WANG, Y.; HUANG, X.; LIU, S.; ZHANG, N.; LI, X.; XIONG, R.; GUO, Y.; DENG, Y.; HUANG, W.; LIU, Q.; LIU, Q.; SHEN, Y.; ZHOU, Y.; YANG, X.; ZHAO, T.; FAN, C.; ZHOU, Y.; QIN, C.; WANG, Y. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. **Cell Host Microbe**, v. 1, n. 28, p. 124 – 133, 2020.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 73 - 102, 2017.

UNESCO, 2015. Disponível em: < <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000233258>>  
Acesso em: 15 out. 2019.

VÉRON, N.; QU, Z.; KIPEN, P. A.; HIRST, C. E.; MARCELLE, C. CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. **Dev. Biol**, v. 407, n. 1, 0. 68 – 74, 2015.

WALTON, J.; BLAGIH, J.; ENNIS, D.; LEUNG, E.; DOWSON, S.; FARQUHARSON, M.; TOOKMAN, L. A.; ORANGE, C.; ATHINEOS, D.; MASON, S.; STEVENSON, D.; BLYTH, K.; STRATHDEE, D.; BALKWILL, F. R.; VOUSDEB, K.; LOCKLEY, M.; MCNEISH, I. A. CRISPR/Cas9-mediated Trp53 and Brca2 knockout to generate improved murine models of ovarian high grade serous carcinoma. **Cancer Res**, n. 76, v. 20, p. 6119 – 6129, 2016.

WU, Y.; LIANG, D.; WANG, Y.; BAI, M.; TANG, W.; BAO, S.; YAN, Z.; LI, D.; LI, J. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. **Cell**, n. 13, v. 6, p. 659 – 662, 2013.

XUE, W.; CHEN, S.; YIN, H.; TAMMELA, T.; PAPAGIANNAKOPOULOS, T.; JOSHI, N. S.; CAI, W.; YANG, G.; BRONSON, R.; CROWLEY, D. G.; ZHANG, F.; ANDERSON, D. G.; SHARP, P. A.; JACKS, T. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. **Nature**, v. 514, n. 7522, 2014.

YIN, H.; XUE, W.; CHEN, S.; BOGORAD, R.; BENEDETTI, E.; GROMPE, M.; KOTELIANSKY, V.; SHARP, P. A.; JACKS, T.; ANDERSON, D. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 551 – 553, 2014.

YOSHIMI, K.; KANEKO, T.; VOIGT, B.; MASHUMO, T. Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR–Cas platform. **Nature Communications**, v. 5, n. 4240, 2014.

ZUCKERMANN, M.; HOVESTADT, V.; THOMSEN, C. B. K.; ZAPATKA, M.; NORTHCOTT, P. A.; SCHRAMM, K.; BELIC, J.; JONES, D. T. W.; TSCHIDA, B.; MORIARITY, B.; LARGAESPADA, D.; ROUSSEL, M. F.; KORSHUNOV, A.; REIFENBERGER, G.; PFISTER, S. M.; LICHTER, P.; KAWAUCHI, D.; GRONYCH, J. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. **Nature Communications**, v. 6, n. 7391, 2015.