

A EDIÇÃO DE DNA PELA TÉCNICA DE *CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS (CRISPR)*: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

DNA EDITING USING THE CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS (CRISPR) TECHNIQUE: A SYSTEMATIC REVIEW OF THE LITERATURE

Júlia Rodrigues Vidal¹, Kemelly Sott Tonial², Jairo Figueiredo Junior³, Renata Carneiro Ferreira Souto⁴, Rafael Souto⁵.

RESUMO

Introdução: A *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)* é uma técnica de edição genética que possibilita a modificação do material genético em organismos vivos. Essa tecnologia é baseada em um fenômeno natural que ocorre em algumas espécies de bactérias. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi estudar e verificar nas bibliografias já escritas, as finalidades, aplicações e o mecanismo de ação do sistema *CRISPR*, tendo em vista seus dilemas éticos. **Metodologia:** Para a realização deste trabalho, em primeiro lugar buscou-se o planejamento, que estava alinhado às etapas de pesquisa, triagem e análise do conteúdo. Foram analisados os mais relevantes estudos - publicados em inglês e português - baseados nos critérios de inclusão: disponibilidade do artigo na íntegra e artigos publicados no ano de 2023, sendo utilizada como referência a base de dados *PubMed*, bem como as palavras-chave: reparo de DNA, edição de DNA e *CRISPR*. Como critério de exclusão, foi definido: artigos que tangenciam ao tema. **Justificativa e Resultados:** A pesquisa sobre o assunto surge da necessidade de uma revisão completa que possa abarcar a tecnologia *CRISPR* e sua relação com as demais áreas, vantagens, desvantagens e aspectos éticos. Durante a preparação desta revisão, surgiram questões sobre a viabilidade do uso da atual técnica de edição de DNA, *CRISPR*. A análise dos dados permite-nos concluir que essa tecnologia ainda tem um grande caminho a percorrer até a sua aplicação em seres humanos. Isso porque existem vários dilemas éticos que dificultam o progresso dessa ciência. **Conclusão:** Dessa forma, esta revisão sistemática da literatura atende ao seu propósito porque analisa o conteúdo dos artigos sobre o tema, considerando a importância dos critérios e gerando conteúdo para bases de dados científicas sem viés de observação.

PALAVRAS-CHAVE: Reparo de DNA; Edição de DNA; *CRISPR*.

ABSTRACT

Introduction: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) is a gene editing technique that makes it possible to modify genetic material in living organisms. This technology is based on a natural phenomenon that occurs in some species of bacteria. **Objective:** The objective of this work was to study and verify in the bibliographies already written, the purposes, applications and mechanism of action of the CRISPR system, taking into account its ethical dilemmas. **Methodology:** To carry out this work, planning was a priority, making it aligned with the research, screening and content analysis stages. The most relevant studies were analyzed - published in English and Portuguese - based on the inclusion: full article availability and articles published in the year 2023, criteria and using the PubMed database as a reference, as well as the key words: DNA repair, DNA editing and CRISPR. As exclusion criterion: articles that strayed from the theme. **Justification and Results:** Research on the subject arises from the need for a complete review that can encompass CRISPR technology and its relationship with other areas, advantages, disadvantages and ethical aspects. During the preparation of this review, questions arose about the feasibility of using the current DNA editing technique, CRISPR. Data analysis allows us to conclude that this technology still has a long way to go before its application in human beings. This happens because there are several ethical dilemmas that hinder the progress of this scientific methodist. **Conclusion:** Therefore, this systematic literature review serves its purpose because it analyzes the content of articles on a topic, taking into account the importance of the criteria and generates content for scientific databases without observation bias.

KEYWORDS: Repair of DNA; DNA editing; *CRISPR*.

INTRODUÇÃO

A técnica de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) tem se consolidado como uma inovação significativa no campo da biotecnologia, promovendo uma revolução na manipulação genética¹. Desde sua introdução, a técnica tem demonstrado precisão, eficiência e acessibilidade, o que a torna uma ferramenta indispensável em diversos campos do conhecimento, incluindo a genética, a medicina e a agricultura². Sua principal aplicação está na capacidade de realizar edições específicas no genoma, com um vasto potencial para transformar o tratamento de doenças genéticas e aprimorar a produção agrícola³.

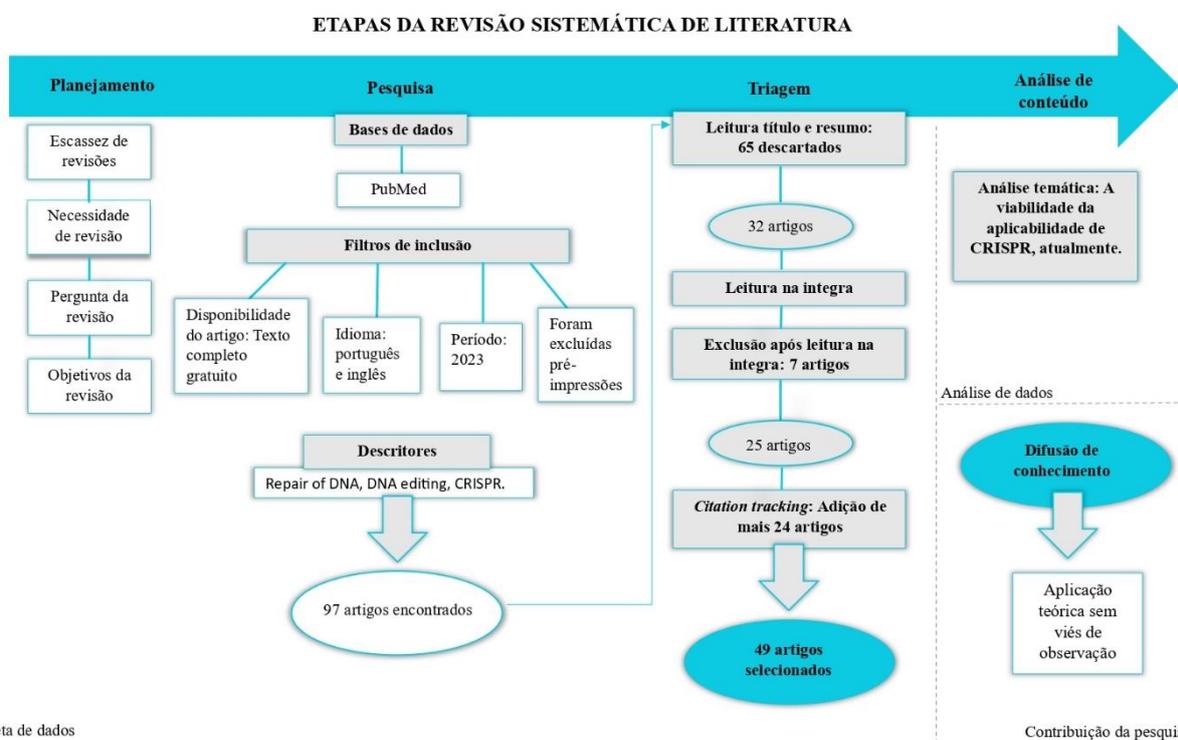
A importância da técnica extrapola o domínio da biotecnologia, uma vez que suas implicações se estendem a outras áreas, como a bioinformática, biologia molecular, farmacologia e ética¹. Nesse contexto, CRISPR não se apresenta apenas como um avanço científico, mas também suscita um debate ético e regulatório, especialmente no que tange à manipulação genética humana. As questões éticas relacionadas ao uso da tecnologia envolvem aspectos filosóficos, sociais e jurídicos, os quais desafiam os limites do que seria moralmente aceitável⁴.

Este estudo tem como objetivo realizar uma revisão sistemática da literatura, com foco nas publicações mais recentes sobre CRISPR, com a finalidade de caracterizar os avanços da técnica, suas inter-relações com outras áreas do conhecimento e as questões éticas decorrentes de sua aplicação. A intenção é proporcionar uma visão abrangente sobre os trabalhos existentes, esclarecer os desafios atuais e indicar possíveis direções para investigações futuras, contribuindo assim para o avanço do conhecimento acadêmico e para o aprofundamento do debate sobre os impactos desta tecnologia na sociedade contemporânea.

METODOLOGIA

Revisões sistemáticas são consideradas estudos secundários, baseando-se em dados provenientes de estudos primários⁵. Para a realização deste trabalho, em primeiro lugar buscou-se o planejamento, que estava alinhado às etapas de pesquisa, triagem e análise do conteúdo. Foram analisados os mais relevantes estudos, tendo em vista a necessidade de revisão sobre esta temática, que abrange não só as vantagens e desvantagens, mas também os limites éticos e morais da aplicação da técnica de CRISPR⁶.

Figura 1. Fluxograma de seleção metodológica de artigos para compor a revisão sistemática da literatura.



Fonte: Modificado de PRISMA, 2020. Legenda: Fluxograma da metodologia do trabalho⁶.

Subsequentemente, usando os critérios de inclusão, foram rastreados os estudos publicados originalmente na língua inglesa e portuguesa, tendo como referência a base de dados *PubMed*, a disponibilidade do artigo na íntegra e a data de publicação no ano 2023. Foram excluídas as pré-impresões. Os descritores utilizados na busca foram: *repair of DNA*, *DNA editing*, *CRISPR*. Ao final da pesquisa, 97 artigos foram encontrados nas bases de dados⁶.

Em seguida, ocorreu a triagem dos artigos identificados, iniciando-se pela leitura do título e resumo, como resultado, 65 artigos foram descartados por não estarem alinhados aos objetivos do tema pesquisado, restando 32 artigos. Após a leitura na íntegra, restaram 25 artigos que foram selecionados pelo critério de relevância. Por meio de *Citation tracking*, mais 24 artigos foram adicionados, resultando em 49 artigos finais para a realização da revisão^{5,6}. Todo o percurso metodológico da seleção de artigos supracitado foi esquematizado em forma de fluxograma. Neste sentido, o fluxograma será apresentado na *figura 1*, podendo ser visualizado abaixo⁶.

A análise de conteúdo buscou responder à questão científica da viabilidade da aplicação da técnica *CRISPR*, considerando a abordagem temática. Essa abordagem consiste em um método que investiga com detalhes um conjunto de informações, apontando as tendências das pesquisas, bem como facilita os estudos em análise quantitativa por possibilitar a compreensão e relação dos diferentes contextos^{7,8}. Assim, por meio da aplicação teórica, essa etapa visou compreender detalhadamente o atual cenário da sociedade e sua receptividade à técnica *CRISPR*, sem vieses de observação.

RESULTADOS

O quadro 1 sumariza os resultados encontrados nas literaturas científicas a respeito da técnica de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)*.

Quadro 1. Resultados obtidos por meio das buscas sistematizadas nas bases de dados de literatura científica.

Autores/ano	Título da obra	Objetivos	Resultados
Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E.2012 ¹	A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.	Investigar o mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas9, com foco no papel do tracrRNA e do crRNA na orientação da endonuclease Cas9 para a clivagem específica de DNA.	Demonstra que a estrutura tracrRNA:crRNA é capaz de guiar a Cas9 para induzir quebras de fita dupla em DNA alvo com alta especificidade. Além disso, mostrou que uma versão quimérica de RNA único também pode realizar essa função, evidenciando o potencial do sistema CRISPR/Cas9 como ferramenta de edição genômica programável por RNA.
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (BR). 2020 ²	Edição de genoma pelo sistema CRISPR-Cas9 e sua aplicação no melhoramento do milho.	O objetivo do artigo é apresentar o potencial da edição genômica por CRISPR-Cas9 no melhoramento do milho, destacando seus mecanismos, aplicações práticas e implicações regulatórias.	O artigo demonstra que o uso do CRISPR-Cas9 permite modificações genéticas precisas no milho, possibilitando a geração de variedades com características agrônômicas superiores e, em alguns casos, sem a inserção de transgenes, o que pode facilitar sua aceitação regulatória e comercial.
Molinari HBC, Vieira LR, Silva NV, Prado GS, Lopes Filho JH. 2020 ³	Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura.	Apresentar a evolução e o impacto das tecnologias de edição genômica, com ênfase no sistema CRISPR/Cas, e discutir suas aplicações, avanços e contribuições para a agricultura moderna, produtividade, sustentabilidade e acessibilidade tecnológica.	O CRISPR/Cas tem se destacado por sua eficiência, simplicidade e baixo custo, sendo amplamente aplicado na obtenção de culturas com melhor desempenho e resistência. A tecnologia permite edições genéticas precisas sem inserção de DNA exógeno, o que facilita a aceitação regulatória e amplia o acesso a inovações por pequenas empresas e instituições públicas, promovendo uma agricultura mais sustentável e democrática.
Sogayar MC, Moraes-Almeida MS, Jesus-Ferreira HC, Leal-Lopes C, Carreira ACO, Machado RAC.2022 ⁴	Edição gênica por CRISPR/CAS9: da teoria à prática.	Apresentar, de forma clara e acessível, os fundamentos teóricos, metodológicos e as aplicações práticas da tecnologia de edição gênica CRISPR/Cas9, capacitando pesquisadores a utilizá-la em estudos de genômica funcional.	O artigo demonstra, por meio de protocolos experimentais detalhados, que a tecnologia CRISPR/Cas9 permite gerar linhagens celulares com genes nocauteados de forma eficiente e específica, validando a edição por técnicas como PCR, qRT-PCR, Western blot e sequenciamento de Sanger.
Chávez M, Chen XY, Finn PB, Qi LS.2022 ⁹	Advances in CRISPR therapeutics. Stanford (CA): Nature Reviews Nephrology.	Apresentar os avanços no uso da tecnologia CRISPR/Cas em genomas de mamíferos, destacando o desenvolvimento de ferramentas para edição genética precisa e seu potencial terapêutico.	O artigo destaca a evolução dos sistemas CRISPR para além da simples deleção gênica, incluindo a modulação epigenética, correção de mutações complexas e edição de regiões não codificantes, ampliando significativamente as possibilidades de tratamento para doenças genéticas anteriormente intratáveis.
Peters JM, Silvis MR, Zhao D, Hawkins JS, Gross CA, S-Qi L.2015 ¹⁰	Bacterial CRISPR: accomplishments and prospects.	Revisar o desenvolvimento e aplicação do sistema CRISPR/Cas9 Tipo II na edição genômica e no controle transcricional em bactérias, destacando seu desempenho em comparação com outras técnicas.	A revisão evidencia que o CRISPR/Cas9 apresenta vantagens em termos de especificidade e flexibilidade em bactérias, e propôs a combinação com abordagens de alto rendimento como uma estratégia promissora para investigação funcional de genes bacterianos.

Zhao Z, Shang P, Mohanraju P. 2023 ¹¹	Prime editing: advances and therapeutic applications.	Apresentar os avanços recentes na tecnologia de edição primária como alternativa ao sistema CRISPR-Cas9 tradicional, com foco em sua aplicação terapêutica e na superação das limitações associadas à edição baseada em quebras de fita dupla.	O artigo demonstra que a edição primária permite modificações genéticas precisas sem induzir DSBs, tornando-se uma abordagem promissora para terapia genética. Apesar de ainda em desenvolvimento, melhorias em eficiência e estratégias de entrega mostram potencial significativo para aplicações clínicas futuras.
Barrangou R, Marraffini LA. 2014 ¹²	CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity	Explorar os mecanismos imunológicos do sistema CRISPR-Cas em procariotos, destacando suas semelhanças conceituais com o sistema imune adaptativo de mamíferos e seu potencial como ferramenta versátil de edição genômica.	Mostra que o sistema CRISPR-Cas funciona como um registro genético adaptativo de exposições a elementos exógenos e que suas endonucleases, guiadas por pequenos RNAs, apresentam alta flexibilidade e eficácia em aplicações como edição de genoma e regulação da transcrição.
Spilman M, et al. 2013 ¹³	Estrutura de um complexo silenciador de RNA do sistema imunológico CRISPR-Cas.	Revisar os avanços recentes nos sistemas CRISPR-Cas com capacidade de reconhecimento e clivagem de RNA, destacando seu potencial como alternativa à edição de DNA para modulação espaço-temporal da expressão gênica e como ferramenta emergente em diagnósticos e biotecnologia.	Apresenta os principais sistemas CRISPR-Cas direcionados a RNA e suas aplicações inovadoras, como edição genética sem modificação permanente do DNA, diagnóstico viral altamente sensível, uso como biossensores, biomarcadores e ferramentas de regulação transcricional. Os autores destacam que essas abordagens ampliam significativamente o escopo funcional da tecnologia CRISPR, abrindo caminho para intervenções mais precisas e reversíveis em diferentes contextos biológicos.
Nishimasu H, et al. 2014 ¹⁴	Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA.	Elucidar a estrutura tridimensional da endonuclease Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i> em complexo com o sgRNA e DNA alvo, visando compreender os mecanismos de reconhecimento e clivagem específicos de DNA.	A estrutura cristalina revelou que a Cas9 possui uma organização bilobada, com domínios especializados para reconhecimento do RNA/DNA e para atividade nucleásica. Os domínios HNH e RuvC são responsáveis pela clivagem das fitas de DNA, e o domínio C-terminal reconhece a sequência PAM. Esses dados estruturais explicam o mecanismo de ação da Cas9 e fundamentam melhorias em tecnologias de edição genômica.
Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. 2013 ¹⁵	Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.	Descrever um conjunto de ferramentas para edição genômica mediada por Cas9 via junção de extremidades não homólogas ou reparo direcionado por homologia em células de mamíferos, bem como geração de linhagens celulares modificadas para estudos funcionais posteriores.	O protocolo descrito permitiu a edição genômica eficiente e específica em células eucarióticas, demonstrando sucesso na introdução de mutações e inserções desejadas com alta reprodutibilidade.
Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. 2019 ¹⁶	DNA double strand break repair pathway choice in somatic mammalian cells.	Analisar os fatores moleculares e celulares que determinam a escolha entre as diferentes vias de reparo de quebras de fita dupla (DSBs) no DNA de células somáticas de mamíferos, com ênfase na regulação entre NHEJ e recombinação homóloga.	Demonstra que a escolha da via de reparo depende de uma complexa interação entre a fase do ciclo celular, a estrutura da quebra, o estado da cromatina e a ação coordenada de proteínas reguladoras como BRCA1, 53BP1 e RAD51, revelando mecanismos distintos para DSBs convencionais e danos em garfos de replicação.
Sander JD, Joung JK. 2014 ¹⁷	CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting.	Apresentar uma revisão abrangente sobre o sistema CRISPR-Cas9, destacando seus mecanismos de ação, aplicações em edição e regulação gênica, e estratégias para aumentar sua especificidade e eficiência.	Evidencia que o CRISPR-Cas9 é uma ferramenta poderosa, simples e versátil, capaz de transformar a engenharia genética, com aplicações promissoras em pesquisa biomédica e terapias genéticas.
Gratz SJ, et al. 2014 ¹⁸	Highly Specific and Efficient CRISPR/Cas9-Catalyzed Homology-Directed Repair in Drosophila.	Desenvolver e otimizar ferramentas para promover a edição precisa e eficiente do genoma de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizando o sistema CRISPR/Cas9 mediado por reparo direcionado por homologia.	Determina que a expressão de Cas9 na linha germinativa de <i>Drosophila</i> aumenta significativamente a eficiência e a precisão das edições genéticas por CRISPR/Cas9, possibilitando mutações, inserções via HDR e geração de alelos condicionais com alta eficácia e especificidade.

Nemudraia A, Nemudryi A, Wiedenheft B., 2023 ¹⁹	Repair of CRISPR-guided RNA breaks enables site-specific RNA editing in human cells.	Investigar o potencial do sistema CRISPR tipo III-A para realizar deleções programadas de RNA em células humanas por meio de clivagem e reparo de RNA.	Revela que é possível induzir deleções específicas em transcritos de RNA, restaurando a expressão de proteínas funcionais, como no caso da mutação W1282X do gene CFTR, com potencial terapêutico.
Carli F, Gillis C, Scheede-Bergdahahl C. 2017 ²⁰	Promover uma cultura de pré-habilitação para o paciente cirúrgico.	Propor a incorporação da pré-reabilitação como parte essencial do cuidado perioperatório de pacientes com câncer, visando melhorar a capacidade funcional e a recuperação pós-cirúrgica.	Programas de pré-reabilitação multimodal demonstraram que até 80% dos pacientes recuperaram a função física em 8 semanas após a cirurgia, em comparação a 40% no grupo controle.
Manta, FSN, 2013 ²¹	Marcadores inserção/deleção (Indel): estudo de ancestralidade e identificação humana na população brasileira [tese de doutorado].	Avaliar a aplicabilidade de marcadores genéticos do tipo Indels em análises forenses e de ancestralidade genética na diversa e miscigenada população brasileira.	Demonstraram que os marcadores Indels são ferramentas eficazes para identificação humana, estimativas de ancestralidade individual e populacional, revelando um predomínio europeu com variações regionais entre contribuições africanas e indígenas.
Costa CP, Assumpção MEOD, Goissis MD. 2021 ²²	Sistema CRISPR/Cas9 e perspectivas de aplicações na cadeia produtiva animal.	Explorar as aplicações da tecnologia CRISPR/Cas9 no melhoramento genético e na produção animal, destacando seu impacto na eficiência, bem-estar e saúde dos animais.	Conclui que a tecnologia CRISPR/Cas9 tem o potencial de revolucionar a produção animal, melhorando a produtividade, a resistência a doenças e o bem-estar dos animais, além de possibilitar a criação de novos produtos e modelos para pesquisas biomédicas.
Arend MC, Pereira JO, Markoski MM. 2017 ²³	O Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia.	Investigar o uso do sistema CRISPR/Cas9 como ferramenta de edição genética aplicada ao tratamento de doenças cardiovasculares.	Concluiu que o CRISPR/Cas9 apresenta potencial terapêutico para doenças cardiovasculares, com resultados promissores em modelos experimentais, embora ainda enfrente desafios para uso clínico.
Iriart JAB, Nucci MF, Muniz TP, Viana GB, Aureliano WA, Gibbon S. 2019 ²⁴	Da busca pelo diagnóstico às incertezas do tratamento: desafios do cuidado para as doenças genéticas raras no Brasil.	Analisar os itinerários terapêuticos de pacientes com doenças genéticas raras nas cidades do Rio de Janeiro, Salvador e Porto Alegre, tendo por foco os desafios materiais, emocionais e estruturais enfrentados na busca por diagnóstico e tratamento.	O estudo revelou que os pacientes enfrentam longos percursos até o diagnóstico, marcados por falhas estruturais, despreparo dos profissionais de saúde e barreiras burocráticas, evidenciando a necessidade urgente de políticas públicas mais eficazes e inclusivas.
Caetano GCG, Matos HOS, Simão PCR, Duarte RV, Barreto AS, Henriques IS. 2018 ²⁵	Técnica CRISPR-Cas9 e sua utilização na área laboratorial.	Analisar a técnica CRISPR-Cas9 e sua aplicabilidade na área laboratorial, destacando seu funcionamento, vantagens, desvantagens e o potencial de uso em terapias genéticas.	Observou-se que a técnica CRISPR-Cas9 se mostra promissora na edição gênica com alta precisão e baixo custo, sendo aplicável em diversos organismos e com grande potencial para tratamentos de doenças genéticas, apesar de ainda enfrentar desafios éticos e técnicos.
Yarnall MTN, et al. 2022 ²⁶	Drag-and-drop genome insertion of large sequences without double-strand DNA cleavage using CRISPR-directed integrases.	Desenvolver e otimizar um sistema de edição genômica capaz de inserir grandes sequências de DNA de forma precisa, eficiente e segura no genoma humano, sem causar quebras de fita dupla.	O sistema PASTE demonstrou alta eficiência e especificidade na inserção de genes terapêuticos em células humanas, inclusive não divididas, com mínima formação de indels e amplo potencial para aplicações clínicas e biotecnológicas.
Pontífice Bento XVI, 2008 ²⁷	Instrução Dignitas personae sobre algumas questões de bioética.	Oferecer orientações morais claras sobre as novas questões da biomedicina e da reprodução assistida, à luz da dignidade humana e da doutrina católica.	Reafirma a inviolabilidade da vida humana desde a concepção e estabelece critérios éticos para as práticas biomédicas, promovendo uma cultura da vida baseada na razão, na fé e no respeito integral à pessoa humana.

Fonte: Modificado de PRISMA, 2020.

DISCUSSÃO

A técnica CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas), do termo em inglês “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”, representa uma tecnologia revolucionária de edição genética que permite aos cientistas modificarem o material genético de organismos vivos com precisão e eficiência. Essa técnica configura um avanço significativo na biologia molecular e genética, oferecendo a capacidade de editar o DNA de maneira específica, rápida e acessível.



A estratégia *CRISPR* é baseada em uma característica natural que ocorre em 40% das espécies de bactérias, onde sequências de DNA específicas (os "*repeats*" e "*spacers*") são usadas como um sistema de defesa contra vírus invasores. As bactérias capturam pedaços do DNA viral e os incorpora em seu próprio DNA, permitindo-lhes reconhecer e combater esses vírus mais eficazmente no futuro. O sistema *CRISPR* inclui enzimas chamadas "endonucleases *CRISPR*" (geralmente a Cas9) que funcionam como "tesouras moleculares" para cortar o DNA em locais específicos¹⁰.

A aplicação mais notável da tecnologia *CRISPR* é a edição genética. Para usá-la, os cientistas projetam uma molécula de RNA chamada "RNA guia" que tem como alvo uma sequência específica de DNA no genoma de um organismo. Em seguida, eles anexam essa RNA guia a uma enzima Cas9 ou outra similar, que corta o DNA no local desejado. Uma vez que o DNA é dissociado, a célula tenta repará-lo, muitas vezes introduzindo mutações ou alterações no processo. Os cientistas podem direcionar esse mecanismo de reparo para criar mutações desejadas ou substituir genes defeituosos por versões corrigidas¹¹.

Inicialmente, foram descritos três tipos diferentes do sistema *CRISPR*-Cas (Tipo I, Tipo II e Tipo III), que são classificados com base na filogenia, na conservação dos genes CAS e na organização do *operon*. Os genes CAS codificam as proteínas Cas, um conjunto altamente diversificado conhecido por interagir principalmente com ácidos nucleicos. No total, nove tipos de proteínas Cas compõem esses sistemas. A Cas1 e a Cas2 estão envolvidas na adaptação e estão presentes nos três tipos de sistemas. Por outro lado, as proteínas Cas5, Cas6 e Cas7, compostas por diferentes subunidades, são encontradas apenas nos tipos I e III. As demais proteínas Cas são exclusivas de cada tipo de sistema¹².

O sistema *CRISPR*-Cas Tipo I é caracterizado pela presença da proteína Cas3, que, juntamente com o complexo Cascade (composto por Cse1, Cse2, Cas5e, Cas6e e Cas7), degrada a molécula de DNA invasora por meio do reconhecimento do motivo *PAM* (*Protospacer Adjacent Motif*), uma sequência de três nucleotídeos (5'-NGG-3') presente na molécula invasora¹³.

O sistema *CRISPR*-Cas Tipo II foi identificado em 2012 na bactéria *Streptococcus pyogenes*. Sua característica distintiva é a presença da proteína Cas9, que, em colaboração com o crRNA e o tracrRNA, degrada a molécula de DNA invasora através do reconhecimento do motivo *PAM*¹⁴. Esse sistema, devido à sua simplicidade, foi adaptado para edição de genomas de organismos mais complexos, originando o sistema de edição genômica conhecido como *CRISPR/Cas9* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Nuclease 9*)⁴. Este é o sistema que será enfatizado ao longo deste trabalho.

Por sua vez, o sistema *CRISPR*-Cas Tipo III parece ser o mais complexo. Ao contrário dos outros sistemas, não requer o motivo *PAM* para degradar o DNA invasor. Este sistema é marcado pela presença da proteína Cas10, que atua em conjunto com complexos semelhantes ao Cascade: Csm (Tipo III-A) ou Cmr (Tipo III-B). Enquanto os sistemas Tipo I e Tipo II visam exclusivamente moléculas de DNA, o sistema Tipo III pode direcionar tanto moléculas de DNA quanto de RNA⁴.

A estrutura molecular da endonuclease (Cas9) é composta por duas unidades: uma de reconhecimento (*REC*) e outra de nuclease (*NUC*) (Figuras 2A-2D). A subunidade *REC* pode ser subdividido em três regiões, incluindo uma longa hélice conhecida como hélice ponte (resíduos 60-93), o domínio *REC1* (resíduos 94-179 e 308-713) e o domínio *REC2* (resíduos 180-307) (Figuras 2A-2D). A subunidade *NUC* é composto pelos domínios *RuvC* (resíduos 1-59, 718-769 e 909-1098), *HNH* (resíduos 775-908) e interação *PAM* (PI) (resíduos 1099-1368) (Figuras 2D e E)¹⁴.

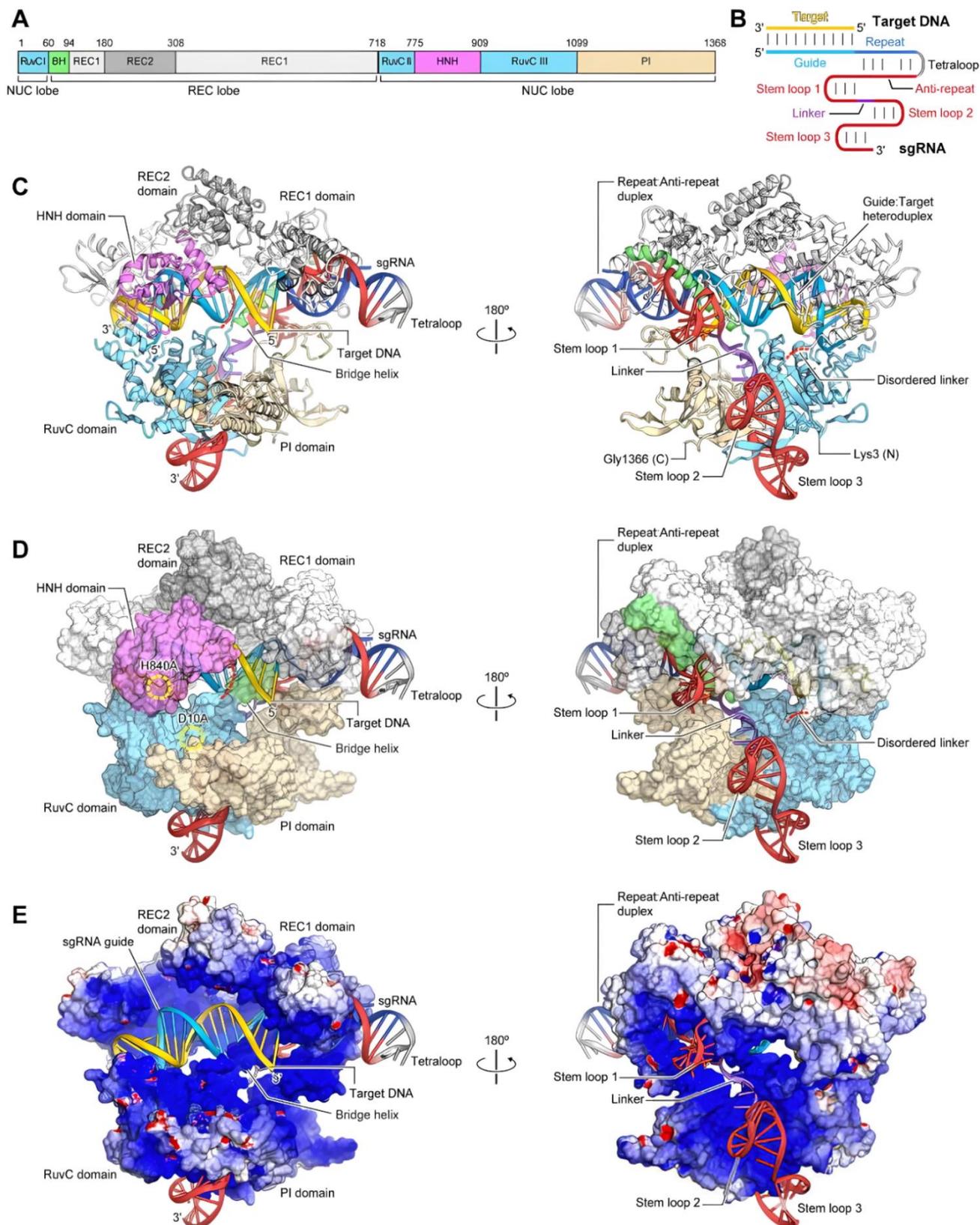
O heteroduplex sgRNA:DNA alvo, com carga negativa, é acomodado em um sulco carregado positivamente na interface entre as subunidades *REC* e *NUC* (consulte Figura 2E). No lóbulo *NUC*, o domínio *RuvC* é montado a partir dos três motivos *RuvC* divididos (*RuvC* I – III) e faz interface com o domínio PI para formar uma superfície carregada positivamente que interage com a cauda 3' do sgRNA (Figura 2E). O domínio *HNH* está situado entre os motivos *RuvC* II-III e forma apenas alguns contatos com o resto da proteína¹⁰.

O Sistema de Edição Genética - *CRISPR*-Cas9 surgiu como um instrumento importante para edição precisa do genoma em muitos organismos^{1,15}. O sistema depende da efetuação de quebras de fita dupla (DSBs) no DNA alvo, que são corrigidas pelos equipamentos celulares mediante a duas fundamentais vias: reparo dirigido por homologia (HDR) ou união de extremidades não homólogas (NHEJ)¹⁶.

Em direção a eventos precisos de edição genética, como a introdução de mutações, inserções ou deleções específicas, o HDR é a via eleita¹⁷. O HDR pode ser explorado eficientemente para inserir sequências de marcadores em regiões genéticas exclusivas de relevância por intermédio da criação de modelos de reparo de DNA englobando braços de homologia, um marcador rastreável opcional e a sequência de marcadores escolhida. No entanto, a clonagem de vetores de recuperação pode ser desafiadora e demorada, especialmente quando se trabalha com grandes regiões genômicas¹⁸.

A edição do genoma, apresenta potencial para tratar doenças genéticas, mas também pode causar alterações indesejadas no genoma, ativando respostas ao estresse celular e causando toxicidade. Em contraste com a edição de DNA, a edição de RNA pode ser usada para alterar programas celulares sem introduzir modificações genéticas no DNA. No entanto, as opções de edição de RNA são limitadas¹⁹.

Figura 2. Estrutura geral do complexo ternário Cas9 – sgRNA – DNA.



Fonte: Nishimasu, et al¹⁴. **Legenda:** (A) Organização de domínio de *S.pyogenes* Cas9. BH, ponte hélice. (B). Representação esquemática do complexo sgRNA: DNA alvo. (C) Representação em fita do complexo Cas9-sgRNA-DNA. Ligantes desordenados são mostrados como linhas pontilhadas vermelhas. (D) Representação de superfície do complexo Cas9-sgRNA-DNA. Os sítios ativos dos domínios RuvC (D10A) e HNH (H840A) são indicados por círculos amarelos tracejados. (E) Potencial de superfície eletrostático de Cas9. O domínio HNH é omitido para maior clareza¹⁴.

O *CRISPR*, desenvolvido com início em mecanismos moleculares do sistema imunológico bacteriano, pode editar genomas operando a clivagem do DNA por uma endonuclease (Cas9, no contexto do tipo II) dirigida por uma sequência de RNA que pode emparelhar bases com a sequência alvo³. Em organizações bacterianas, a estruturação genética do *CRISPR* compõe-se de repetições palindrômicas curtas agrupadas e constantemente intercaladas³. Reduzidos trechos do DNA invasor são integrados ao DNA genômico bacteriano, em configuração de protoespaçadores entre sequências repetidas, no complexo natural, originando os clusters que representam as regiões *CRISPR*¹⁴. Posteriormente, sendo processado pela enzima RNase III este agrupamento é transcrito em um RNA único denominado pré-crRNA, dando origem aos *CRISPR* RNAs (crRNAs)². Para relacionar-se com a endonuclease Cas9, tais moléculas estabelecem uma relação com um segundo tipo de RNA, o transactivating *CRISPR* RNA (tracrRNA), originando crRNA:tracrRNA, um híbrido. As sequências específicas do DNA invasor, alvo desse complexo ternário, são complementares à sequência de 20 nucleotídeos presentes na extremidade 5' do crRNA, situadas à jusante de um motivo *PAM*⁴.

A Cas9, após o pareamento, efetua a clivagem das duas fitas do material genético invasor. Esse processo é mediado por dois domínios catalíticos presentes em sua estrutura. O domínio HNH é responsável pela clivagem da fita complementar à sequência do crRNA, enquanto o domínio RuvC é encarregado de clivar a fita oposta, que não é complementar²⁰.

Composto apenas por dois elementos, o complexo adaptado consiste na endonuclease Cas9 e em um RNA guia (gRNA), o qual é derivado da fusão entre crRNA e tracrRNA. A Cas9 é guiada até a sequência complementar de 20 nucleotídeos presente no DNA alvo por meio de um gRNA, que possui uma sequência de cerca de 20 nucleotídeos em sua extremidade 5'. A presença de um motivo *PAM* adjacente é crucial para a conexão do complexo com o DNA alvo. Esse motivo é localizado na fita de DNA alvo não complementar⁴. A capacidade de personalizar o gRNA torna essa ferramenta altamente atrativa, permitindo que seja meticulosamente desenhada para se alinhar com precisão a qualquer região genômica desejada¹⁵.

Efetuada pela Cas9, a clivagem da dupla fita do DNA alvo, origina extremidades inesperadas que demandam ser reparadas pela célula, considerando que esse prejuízo pode induzir tanto à senescência quanto à apoptose. Para retificar o dano, dois mecanismos distintos de reparo podem ser ativados, sendo eles, reparo por recombinação não homóloga por meio da via de junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ou reparo por recombinação homóloga por meio da via de reparo direcionado por homologia (HDR)²⁰.

Quando ocorre a clivagem da dupla fita do DNA alvo, geralmente resulta em extremidades sem grau de homologia. Nessas circunstâncias, o mecanismo de reparo NHEJ entra em ação para unir outra vez as duas extremidades do DNA, por intermédio de aparatos independentes de homologia. Todavia, esse reparo é notadamente favorável a falhas, o que resulta na formação de inserções ou deleções (indels) no local da clivagem ou em sua proximidade⁴.

Uma categoria de mutação que é capaz de originar a inserção ou deleção de um ou poucos nucleotídeos e, à vista disso, modificar a fase de leitura do gene em análise é nomeada por "Indel"²¹. A ocorrência frequente dessa transformação resulta na produção de códons de parada prematuros, os quais têm um impacto pontual na função ou estrutura do produto gênico, resultando na formação de moléculas funcionais truncadas, logo, o gene-alvo é inativado².

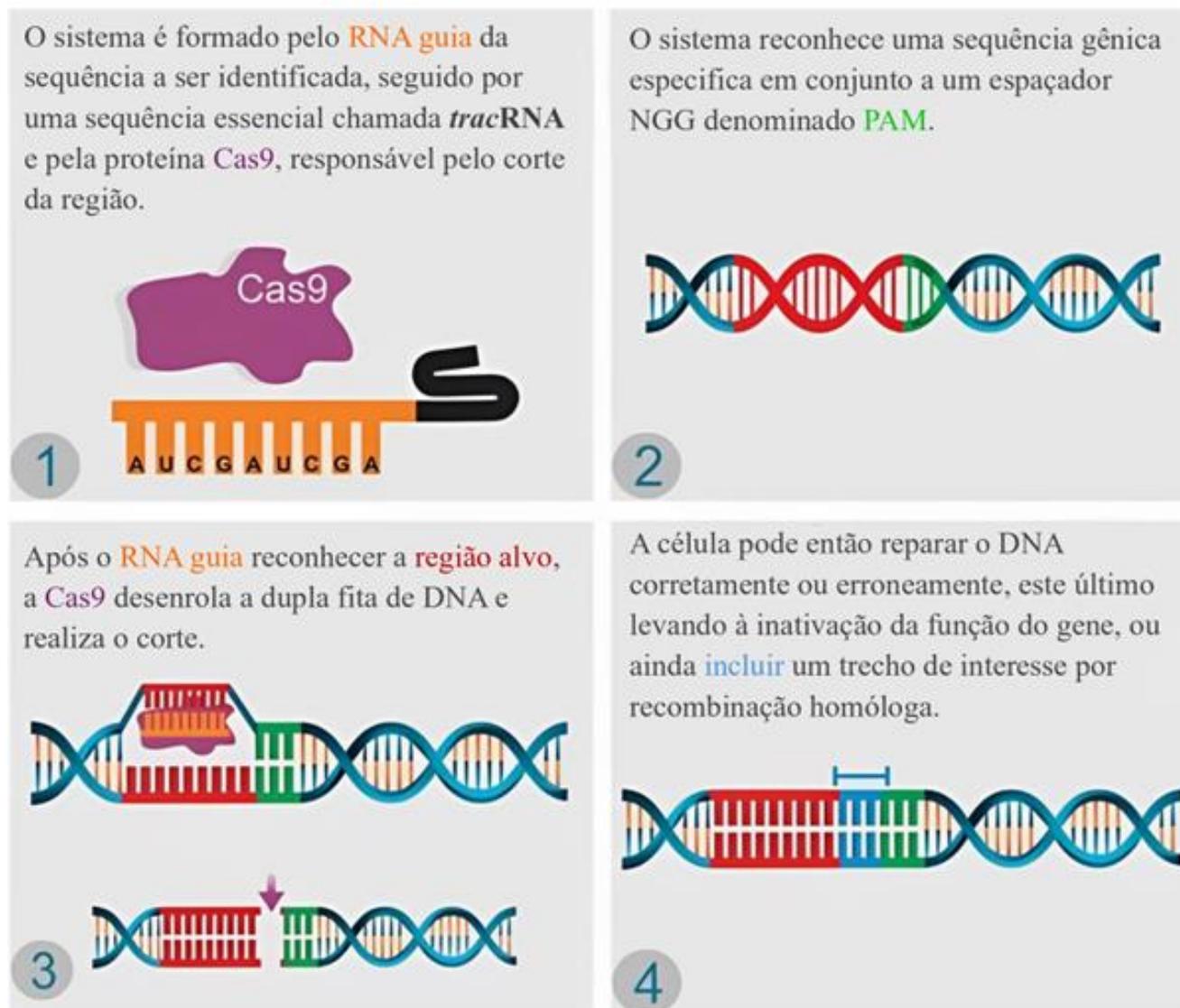
A via de reparo HDR é ativada quando ocorre a clivagem, podendo gerar extremidades com homologia mutuamente ou com uma molécula exógena de DNA doador. Nesse contexto, o gRNA e a endonuclease Cas9 são inseridos na célula juntamente com a molécula de DNA doadora. Esta abordagem leva ao reparo da região em questão ou à realização de modificações genéticas específicas, como a introdução de alterações pontuais ou a inclusão de sequências curtas⁴, Figura 3.

Tendo em vista o que foi apresentado, o complexo pode ser utilizado para corrigir mutações (restaurar a função do gene) e introduzir novas mutações, fazendo com que o gene seja derrotado. Portanto, ao acordar métodos moleculares e biotecnológicos requintados, o sistema *CRISPR/Cas9* foi apresentado para uso na edição de genoma e está hodiernamente à disposição comercialmente para inúmeros alvos²³. Tanto o RNA guia quanto as proteínas Cas9 produzidas in vitro podem ser ofertados às células operando uma multiplicidade de mecanismos, contendo o uso de vetores ou agentes químicos⁴.

As serventias mais compreensíveis do sistema *CRISPR* implicam modificações de bases únicas ou múltiplas de genes com relações alélicas claras. É significativo destacar que essas relações de dominância mendeliana devem ser levadas em consideração para atingir a função genética tanto para ativação quanto para repressão. Ainda assim, as modificações bialélicas também tiveram êxito. O uso de *CRISPR/Cas9* inclusive foi proposto na fase embrionária em modelos animais, onde a progênie pode produzir fundadores (via recombinação) contendo mutações alélicas que causam um efeito de derrota ou expressão reduzida⁴.

Nesse contexto, o sistema *CRISPR/Cas9* está sendo rapidamente elegido para a edição e modificação de genomas em vários tipos celulares, incluindo células-tronco, e mostrando bons resultados na edição de genes humanos²³. Assim surge o questionamento sobre a viabilidade da aplicabilidade da técnica de edição de genoma, *CRISPR*, hodiernamente.

Figura 3. Esquema ilustrado do funcionamento do sistema CRISPR/Cas9.



Fonte: modificado de Costa, et al.2021²². **Legenda:** 1. Componentes do sistema *CRISPR*: RNA guia e enzima Cas9. 2. Reconhecimento da sequência alvo seguida do *PAM* pelo RNA guia. 3. Quebra da dupla fita de DNA pela Cas9. 4. Reparo do DNA pela célula com possibilidade de manutenção, alteração, inclusão ou deleção de sequência²².

A técnica *CRISPR* estabelece relações diretas e indiretas com diversas áreas, sendo a mais notória a medicina, isso porque essa técnica de edição de genoma tem o potencial de revolucionar o tratamento de doenças genéticas ao permitir a correção de mutações responsáveis por essas condições. Dessa forma, também é possível relacioná-la à economia, visto que indivíduos portadores de doenças genéticas geram um custo maior para o estado; assim, a aplicação da técnica de *CRISPR* na medicina humana também impactaria no âmbito econômico²⁴.

Na área da agricultura, a ferramenta já possibilita a edição genética de plantas, criando, assim, culturas mais resistentes a doenças, pragas e condições ambientais adversas, aumentando a produção de alimentos e reduzindo a necessidade de pesticidas e fertilizantes, como ocorre no caso dos alimentos transgênicos⁴. É possível citar também a medicina veterinária, pois a técnica permite o estudo de diversos mecanismos que estão relacionados aos índices zootécnicos e ao melhoramento genético de rebanhos, uma busca constante do setor²².

A *CRISPR*, possui uma relação com a conservação da biodiversidade, por poder ser usada para ajudar na conservação de espécies ameaçadas, restaurando populações geneticamente viáveis e tornando os organismos mais adaptados a ambientes em mudança². Além disso, a *CRISPR* também está interligada com áreas como a bioinformática, que desempenha um papel fundamental na análise e no desenvolvimento de sequências de guias para a edição genética, e a nanotecnologia²³.

A aplicação desta ferramenta em humanos tem se mostrado muito promissora, pois através desta técnica podem ser introduzidas alterações no genoma para curar mutações genéticas que causam diversas doenças, como deficiências imunológicas, hemoglobinopatias, fibrose cística, entre outras. Outra possível aplicação desta tecnologia é no combate a



infecções causadas por vírus latentes no organismo ou integradas ao DNA do hospedeiro. A vantagem do sistema *CRISPR/Cas9* reside na elevada versatilidade, eficácia, especificidade e facilidade de utilização da tecnologia, o que proporciona uma oportunidade única de aplicação à terapia celular humana, possibilitando a correção de defeitos em células progenitoras e células genéticas, doenças e vários outros tratamentos²⁵. Esse sistema demonstrou ser altamente eficaz na eliminação de vírus de células infectadas, tumores e no tratamento de doenças monogênicas hereditárias^{25,26}. Outro benefício é que a proteína Cas9 permanece intacta mesmo após a indução de quebras de fita dupla (DSB). Ademais, a facilidade de manipulação do *CRISPR/Cas9* é de muito proveito para a produção de vetores atingir grandes sítios-alvo ou genomas extensos²⁵. Além disso, esse complexo pode modificar vários sítios genômicos simultaneamente, isto significa que múltiplos RNAs guia podem ser usados em paralelo na mesma célula²¹. A simplicidade e o mecanismo de clivagem de DNA, a capacidade de reconhecimento de alvos multiplexados e a existência de muitas variantes do sistema *CRISPR-Cas9* tipo II, podem permitir avanços significativos através de métodos econômicos e fáceis. Isso permite que esta tecnologia direcione, edite, modifique, controle e exiba locos genômicos com precisão e eficiência em vários tipos de células e organismos²³.

Com base em pesquisas anteriores, os pesquisadores anteciparam a possibilidade de que a tecnologia *CRISPR/Cas* eventualmente atacasse aleatoriamente segmentos de DNA fora da sequência alvo. Portanto, a maioria dos algoritmos de computador são usados para escanear todo o nível do material genético que está sendo testado e identificar áreas danificadas, que eventualmente serão danificadas ou acidentalmente “excluídas” após a intervenção²⁵.

Em testes, pesquisadores da universidade de Stanford e da universidade de Iowa conseguiram corrigir um gene que causa cegueira em ratos, mas, ocorreram mutações acidentais em nucleotídeos únicos (que contém uma única base de nitrogênio) e exclusões ou inserções maiores, envolvendo segmentos com uma letra ou mais. Outro risco associado à técnica de edição do genoma é a ocorrência de mutações, que, na maioria das vezes, surgem em regiões não codificantes, longe do alvo desejado. Posto isso, uma preocupação com a terapia gênica é estabelecida, associada à sua aplicabilidade terapêutica¹¹.

É inevitável nos depararmos com questões éticas quando se trata da manipulação de genomas, com a técnica de *CRISPR* não seria diferente. De acordo com o Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano nos Estados Unidos (NHI), em 2014, 40 países desencorajaram ou proibiram completamente pesquisas envolvendo edição genética de células germinativas humanas⁴.

Com o objetivo de regulamentar as pesquisas sobre os avanços das técnicas genéticas que possibilitam a manipulação de embriões humanos, criou-se no ano de 2015 a Cúpula Internacional sobre Edição de Genes Humanos. Já no Brasil, o artigo 6º da Lei de Biossegurança nº 11.105 de 2005 proíbe a engenharia genética em células germinativas, óvulos fertilizados ou embriões humanos. Globalmente, os especialistas na área concordam que a edição do genoma humano não deve ser utilizada para fins reprodutivos porque os benefícios potenciais da tecnologia não justificam os seus riscos⁴.

Ademais, nos esbarramos em questões religiosas, as quais se tornam uma barreira para a aplicabilidade da técnica *CRISPR*. A Igreja Católica, por exemplo, se posiciona contra o manuseio e edição de genoma humano para fins não terapêuticos, pois esta prática viola a dignidade humana e a Igreja Católica se posiciona contra a violação dessa dignidade em todas as ocasiões. Sendo este um aspecto ético de grande influência, pois a religião está enraizada na cultura dos cidadãos, estando ligada diretamente com o senso de moral da população²⁷.

Entretanto, existe também um interesse no uso da técnica de *CRISPR* com a finalidade terapêutica, que enfrenta dificuldades na sua implementação em decorrência desses aspectos éticos. Portanto, há uma necessidade cada vez maior de aprofundar esta tecnologia em termos de segurança, reprodutibilidade, efeitos em longo prazo e, principalmente, discussões sobre o estabelecimento de limitações ao seu uso⁴.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo da elaboração desta revisão surge o questionamento sobre a viabilidade da aplicabilidade da técnica de edição de DNA, *CRISPR*, para fins terapêuticos na atualidade. Através da análise de dados realizada, foi possível concluir que ainda há um longo caminho a ser percorrido para que a técnica *CRISPR* seja aplicada em humanos, isso porque existem diversos dilemas éticos, tais como a aceitação da população, a biossegurança, a legislação e a religião, que servem como barreira para que esse avanço científico aconteça, tornado, assim, essa aplicação não tão viável hodiernamente.

Esse sistema é de grande relevância, principalmente quando se trata de questões envolvendo terapias para doenças genéticas, pois essa é uma área dentro da engenharia genética que apresenta grande visibilidade e interesse da população. O sistema *CRISPR/Cas9* atrai diversos pesquisadores e acadêmicos, devido à sua elevada precisão e eficiência, sua relativa facilidade de utilização e versatilidade e o seu futuro promissor.

Algumas abordagens promissoras para futuras pesquisas poderiam ser a aplicação de estudos para aumentar a especificidade da técnica a fim de minimizar os efeitos indesejados e reduzir as taxas de erro, além de expandir a pesquisa para compreender melhor os impactos de longo prazo da edição genética em células humanas e embriões, outrossim, desenvolver terapias baseadas em *CRISPR* para tratar doenças genéticas específicas, o que inclui testes clínicos e regulamentação para garantir a segurança e eficácia dessas terapias.

Através dos resultados obtidos ao longo desse trabalho, é possível concluir que, a técnica ainda em estudo visa transformar essa realidade respeitando os limites éticos e ressaltando os benefícios terapêuticos, alcançando dessa maneira o objetivo desse trabalho. Desse modo, a revisão sistemática de literatura foi compatível com a finalidade, por analisar o conteúdo dos artigos encontrados a respeito do tema e criar um conteúdo para a base de dados científicos sem vieses de observação, tendo em vista a importância de tal critério.

AFILIAÇÃO

1. Acadêmicas de Biomedicina na Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO
2. Acadêmicas de Biomedicina na Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO
3. Mestre em Ciências Ambientais e Saúde. Professor da Pontifícia Universidade Católica de Goiás-PUC-GO.
4. Doutora em Medicina Tropical - área de concentração: Microbiologia pela Universidade Federal de Goiás. Professora da Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO.
5. Doutor em epidemiologia pela Universidade Federal de Goiás. Professor da Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO. Contato: rsouto.775@gmail.com

ACESSO ABERTO



Este artigo está licenciado sob Creative Commons Attribution 4.0 International License, que permite o uso, compartilhamento, adaptação, distribuição e reprodução em qualquer meio ou formato, desde que você dê crédito apropriado ao(s) autor(es) original(is) e à fonte, forneça um [link](#) para o Creative Licença Commons e indique se foram feitas alterações. Para mais informações, visite o site creativecommons.org/licenses/by/4.0/

REFERÊNCIAS

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821.
2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (BR). Edição de genoma pelo sistema CRISPR-Cas9 e sua aplicação no melhoramento do milho. 1. ed. Minas Gerais: Embrapa; 2020.
3. Molinari HBC, Vieira LR, Silva NV, Prado GS, Lopes Filho JH. Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura. 1. ed. Brasília: Embrapa; 2020. p.13-69.
4. Sogayar MC, Moraes-Almeida MS, Jesus-Ferreira HC, Leal-Lopes C, Carreira ACO, Machado RAC. Edição gênica por CRISPR/CAS9: da teoria à prática. 1. ed. São Paulo: Blucher; 2022. p.11-20.
5. Galvão TF, Pereira MG. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. *Epidemiol Serv Saúde*. 2014;183.
6. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. A declaração PRISMA 2020: diretriz atualizada para relatar revisões sistemáticas. *Rev Panam Salud Publica*. 2022;46:2-8.
7. Attride-Stirling JL. Becoming natural: an exploration of the naturalisation of marriage. London: Unpublished Doctoral Thesis;2001:1(3).
8. Braun V, Clarke V. Using thematic analysis in psychology. *Qual Res Psychol*. 2006;3(2):77-101.
9. Chávez M, Chen XY, Finn PB, Qi LS. Advances in CRISPR therapeutics. *Nat Rev Nephrol*. 2022;19:9-22.
10. Peters JM, Silvis MR, Zhao D, Hawkins JS, Gross CA, S-Qi L. Bacterial CRISPR: accomplishments and prospects. *Curr Opin Microbiol*. 2015;27:121-6.
11. Zhao Z, Shang P, Mohanraju P, GEIJSEN N. Prime editing: advances and therapeutic applications. *Trends Biotechnol*. 2023;41(8):1000-12.
12. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*. 2014;54(2):234-44.
13. Spilman M, Coczaki A, Hale C, Shao Y, Ramia N, Terns R, et al. Estrutura de um complexo silenciador de RNA do sistema imunológico CRISPR-Cas. *Mol Cell*. 2013;52:146-152.
14. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata S, Dohmae N, et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-949.
15. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;1.
16. Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. DNA double strand break repair pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(11):698-714.
17. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. *Nat Biotechnol*. 2014;32(4):347-355.
18. Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-Catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*. 2014;196:961-71.
19. Nemudraia A, Nemudryi A, Wiedenheft B. Repair of CRISPR-guided RNA breaks enables site-specific RNA editing in human cells. *BioRxiv*. 2023;1-12.
20. Carli F, Gillis C, Scheede-Bergdahahl C. Promover uma cultura de pré-habilitação para o paciente cirúrgico. *Acta Oncol*. 2017;56(2):128-133.
21. Manta, FSN. Marcadores inserção/deleção (Indel): estudo de ancestralidade e identificação humana na população brasileira [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2013. p. 16-54.
22. Costa CP, Assumpção MEOD, Goissis MD. Sistema CRISPR/Cas9 e perspectivas de aplicações na cadeia produtiva animal. *Rev Bras Reprod Anim*. 2021;45:18-32.
23. Arend MC, Pereira JO, Markoski MM. O Sistema CRISPR/Cas9 e a possibilidade de edição genômica para a cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2017;(108):81-3.
24. Iriart JAB, Nucci MF, Muniz TP, Viana GB, Aureliano WA, Gibbon S. Da busca pelo diagnóstico às incertezas do tratamento: desafios do cuidado para as doenças genéticas raras no Brasil. *Cien Saude Colet*. 2019;1:3637-3650.
25. Caetano GCG, Matos HOS, Simão PCR, Duarte RV, Barreto SA, Henriques IS. Técnica CRISPR-Cas9 e sua utilização na área laboratorial. *Braz J Surg Clin Res*. 2018;25(2):2317-4404.
26. Yarnall MTN, Ioannidi EI, Schmitt-Ulms C, Krajewski RN, Lim J, Viliger L, et al. Drag-and-drop genome insertion of large sequences without double-strand DNA cleavage using CRISPR-directed integrases. *Nat Biotechnol*. 2022;41(4):500-12.