

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO E PESQUISA
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – MODALIDADE MÉDICA

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

GOIÂNIA
2024

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO E PESQUISA
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – MODALIDADE MÉDICA

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

Projeto para desenvolvimento do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) a ser apresentado para apreciação de banca avaliadora como quesito obrigatório para graduação em Ciências Biológicas Modalidade Médica.

Orientador: Dr. Rafael Souto
Orientandas: Júlia Rodrigues Vidal e
Kemelly Sott Tonial

Linha de pesquisa: Genética Molecular

GOIÂNIA
2024

RESUMO

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.

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.

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 - baseado nos critérios de inclusão e sendo utilizado como referência a base de dados *PubMed*.

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 desta ciência.

Dessa forma, esta revisão sistemática da literatura atende ao seu propósito porque analisa o conteúdo dos artigos sobre um tema, levando em consideração a importância dos critérios e gera conteúdo para bases de dados científicas sem viés de observação.

Descritores: reparo de DNA, edição de DNA, CRISPR.

ABSTRACT

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.

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.

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 criteria and using the PubMed database as a reference.

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.

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.

Keyword: *repair of DNA, DNA editing, CRISPR.*

LISTA

Figura N.1. Ilustração da estrutura da endonuclease (Cas9).

Figura N.2. Esquema ilustrado do funcionamento do sistema CRISPR/Cas9.

Figura N.3. Fluxograma da metodologia do trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	07
	1.1 Conceito	
	1.2 Classificação dos sistemas	
	1.3 Estrutura Molecular da endonuclease (Cas9)	
	1.4 Finalidade	
	1.5 Mecanismo de ação	
	1.6 Relação com as demais áreas e suas aplicações	
	1.7 Vantagens da técnica	
	1.8 Desvantagens da técnica	
	1.9 Aspectos éticos	
2	OBJETIVOS	18
	2.1 Objetivo geral	
	2.2 Objetivos específicos	
3	MATERIAL E MÉTODO.....	19
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
5	REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

CONCEITO

A técnica *CRISPR* (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) do termo em inglês "*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*", é uma tecnologia revolucionária de edição genética que permite aos cientistas modificarem o material genético de organismos vivos com precisão e eficiência. Esta tecnologia surgiu como um avanço significativo na biologia molecular e genética, oferecendo a capacidade de editar o DNA de maneira específica, rápida e acessível (Chávez et al., 2022).

A tecnologia *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 incorporam 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 específicos (Peters et al., 2015).

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 corrigidas (Zhao et al., 2023).

CLASSIFICAÇÕES DOS SISTEMAS

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 sistema (Barrangou et al., 2014).

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 invasora (Spilman et al., 2013).

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* (Nishimasu et al., 2014). 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*) (Moraes-Almeida et al., 2022). Sendo este o sistema que iremos enfatizar ao longo do nosso 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 RNA (Moraes-Almeida et al., 2022).

ESTRUTURA MOLECULAR DA ENDONUCLEASE (Cas9)

A estrutura molecular da endonuclease (Cas9) é composta por dois lóbulos: um lóbulo de reconhecimento (*REC*) e um lóbulo de nuclease (*NUC*) (Figuras 1A-1D). O lóbulo *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 1A-1D). O lóbulo *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 1D e E) (Nishimasu et al., 2014).

O heteroduplex sgRNA:DNA alvo, com carga negativa, é acomodado em um sulco carregado positivamente na interface entre os lóbulos *REC* e *NUC* (consulte Figura 1E). 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 1E). O domínio *HNH* está situado entre os motivos *RuvC* II-III e forma apenas alguns contatos com o resto da proteína (Nishimasu et al., 2014).

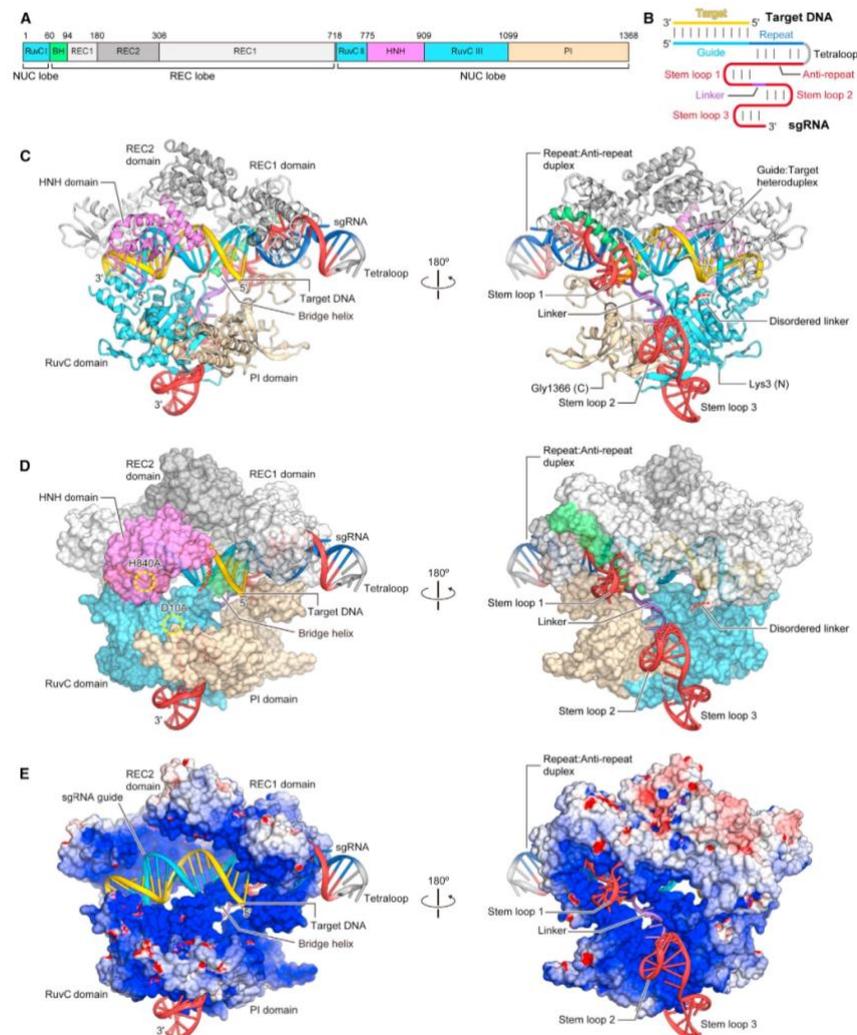


Figura 1. Estrutura geral do complexo ternário Cas9-sgRNA-DNA. (A) Organização de domínio de *S. pyogenes* Cas9. BH, ponte hélice. (B) Representação esquemática do complexo sgRNA: DNA alvo. (C) Representação em fita do complexo Cas9-sgRNA-DNA. Ligantes desordenados são mostrados como linhas pontilhadas 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 clareza (Nishimasu et al., 2014).

FINALIDADE

O sistema de edição genética *CRISPR-Cas9* surgiu como um instrumento importante para edição precisa do genoma em muitos organismos (Jinek et al., 2012; Ran et al., 2013). 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) (Scully et al., 2019).

Em direção a eventos precisos de edição genética, como a introdução de mutações, inserções ou deleções específicas, o HDR é a via eleita (Sander et al., 2014). 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 genômicas (Gratz et al., 2014).

A edição do DNA tem 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 limitadas (Nemudraia et al., 2023).

MECANISMO DE AÇÃO

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 alvo. Em organizações bacterianas, a

estruturação genética do *CRISPR* compõe-se de repetições palindrômicas curtas agrupadas e constantemente intercaladas (Molinari et al., 2020).

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* (Nishimasu et al., 2014). Posteriormente, sendo processado pela enzima RNase III este agrupamento é transcrito em um RNA único denominado pré-crRNA, dando origem aos *CRISPR* RNAs (crRNAs) (Embrapa, 2020).

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* (Moraes-Almeida et al., 2022).

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 complementar (Carli et al., 2017).

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 complementar (Moraes-Almeida et al., 2022). 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 desejada (Ran et al., 2013).

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 areo dano, dois mecanismos dissemelhantes 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) (Carli et al., 2017).

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 proximidade (Moraes-Almeida et al., 2022).

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” (Manta, 2013). 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 inativado (Embrapa, 2020).

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, a endonuclease Cas9 e o gRNA são introduzidos 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 curtas (Moraes-Almeida et al., 2022). (*Figura 2*).

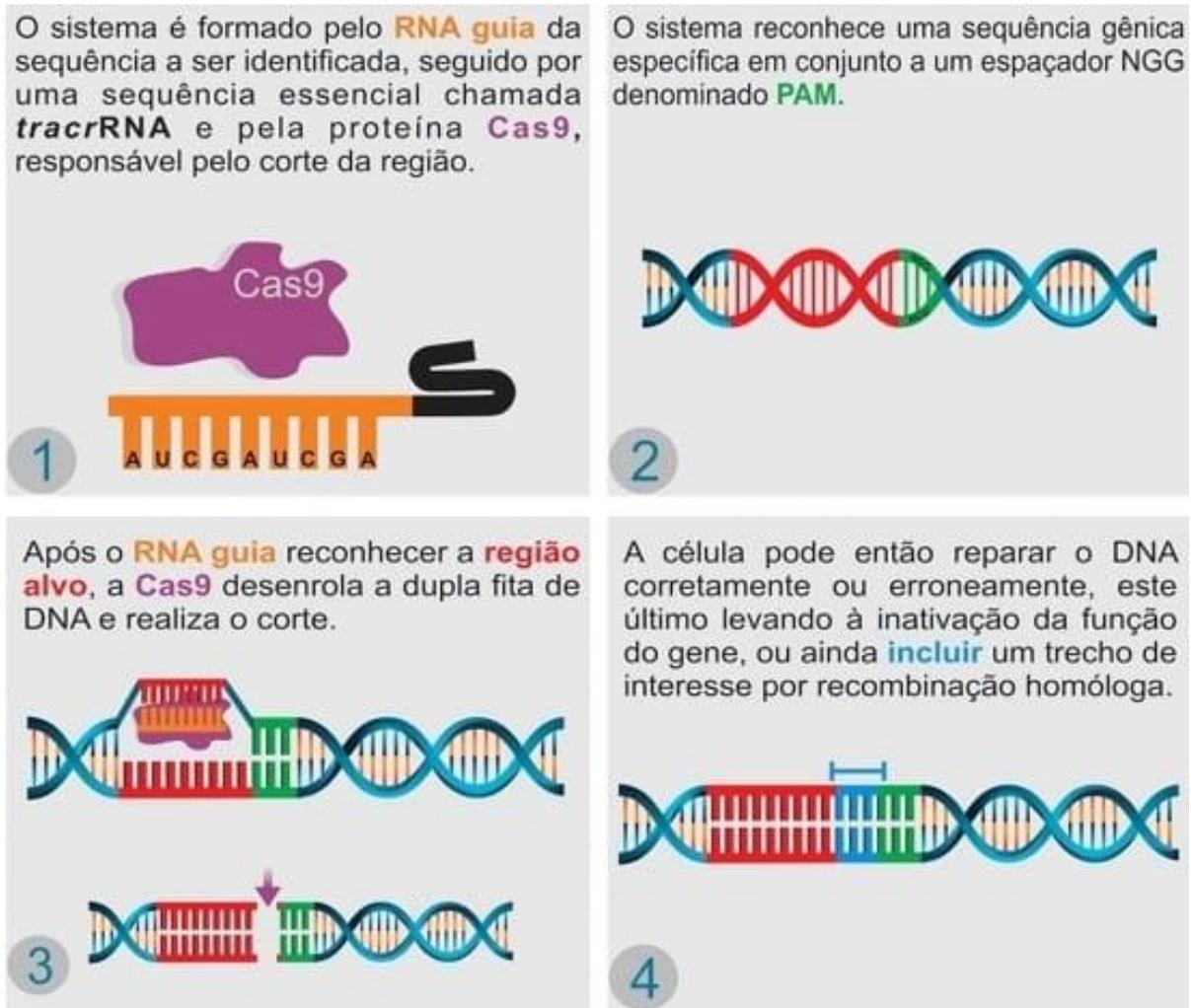


Figura 2. Esquema ilustrado do funcionamento do sistema CRISPR/Cas9. 1. Componentes do sistema CRISPR: RNA guia e enzima Cas9. 2. Reconhecimento da sequência alvo seguida do PAM pelo RNA guia. 3. Quebra da dupla fita de DNA pela Cas9. 4. Reparo do DNA pela célula com possibilidade de manutenção, alteração, inclusão ou deleção de sequência. (Costa *et al.*, 2021).

Isto posto, 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 alvos (Arend *et al.*, 2017). 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 químicos (Moraes-Almeida *et al.*, 2022).

As serventias mais compreensíveis do sistema *CRISPR* implicam modificações de bases únicas ou múltiplas de genes com relações alélicas claras. É significativo destacar que estas 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 reduzida (Moraes-Almeida et al., 2022).

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 humanos (Arend et al., 2017). Assim surge o questionamento sobre a viabilidade da aplicabilidade da técnica de edição de DNA, *CRISPR*, hodiernamente.

RELAÇÃO COM AS DEMAIS ÁREAS E SUAS POSSÍVEIS APLICAÇÕES

A técnica *CRISPR* estabelece relações direitas 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 a relacionar com a economia, visto que indivíduos portadores de doenças genéticas geram um custo maior para o estado, assim sendo, a aplicação da técnica de *CRISPR* na medicina humana impactaria também no âmbito econômico (Iriart et al., 2019).

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 é o caso dos alimentos transgênicos (Moraes-Almeida et al., 2022). 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 setor (Costa et al., 2021).

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 mudança (Embrapa, 2020). 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 nanotecnologia (Arend et al., 2017).

VANTAGENS DA TÉCNICA

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 integrados 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 germinativas, doenças e vários outros tratamentos (Caetano et al., 2018).

Este sistema demonstrou ser altamente eficaz na eliminação de vírus de células infectadas, tumores e no tratamento de doenças monogênicas hereditárias (Caetano et al., 2018; Yarnall et al., 2022). Outro benefício é que a proteína Cas9 permanece intacta mesmo após a indução de quebras de fita dupla (DBS). Por um lado, a facilidade de manipulação do *CRISPR/Cas9* é de muito proveito para a produção de vetores atingir grandes sítios-alvo ou genomas extensos (Caetano et al., 2018).

Esse complexo além disso pode modificar vários sítios genômicos simultaneamente, isto significa que múltiplos RNAs guia podem ser usados em paralelo na mesma célula (Manta, 2013). 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 organismos (Arend et al., 2017).

DESVANTAGENS DA TÉCNICA

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 intervenção (Caetano et al., 2018).

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 perigo adventício da técnica de edição de DNA é a mutação, na maioria ocorrem em regiões não codificantes, logo, fora do ponto pretendido. Posto isso, uma preocupação com a terapia gênica é estabelecida, associada à sua aplicabilidade terapêutica (Zhao et al., 2023).

ASPECTOS ÉTICOS

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 humanas (Moraes-Almeida et al., 2022).

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 riscos (Moraes-Almeida et al., 2022).

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 população (Bento XVI et al., 2008).

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 a longo prazo e, principalmente, discussões sobre o estabelecimento de limitações ao seu uso (Moraes-Almeida et al., 2022).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar na literatura os estudos sobre a técnica Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (*CRISPR*), sua principal finalidade, as interrelações com as demais áreas das ciências e aspectos éticos.

2.2. Objetivos Específicos

Identificar bibliografias na literatura que fazem menção das técnicas de edição de DNA, especificamente da *CRISPR*.

Filtrar estas bibliografias de acordo com os critérios pré-estabelecidos na metodologia.

Incluir as bibliografias que possuem metodologias e resultados relevantes.

Categorizar as bibliográficas incluídas.

Analisar os dados presentes nessas bibliográficas.

Interpretar os dados analisados.

Elaborar a revisão sistemática da literatura.

3 MATERIAL E MÉTODO

Revisões sistemáticas são consideradas estudos secundários, 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 uma revisão sobre esta temática que abrange não só as vantagens e desvantagens, mas também os limites éticos e morais da aplicação da técnica de *CRISPR* (Page et al., 2022).

Subsequentemente, usando os critérios de inclusão, rastrearam 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 do ano 2023. Foram excluídas as pré-impresões. Os descritores utilizados foram *repair of DNA*, *DNA editing*, *CRISPR*. Ao final da pesquisa, 97 artigos foram encontrados nas bases de dados (Page et al., 2022).

Em seguida, ocorreu a triagem dos artigos identificados, iniciando pela leitura título e resumo, logo, 65 descartados devido ao tangenciamento do tema do qual estamos pesquisando, 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. O percurso metodológico de seleção de artigos pode ser visualizado na *figura 3* (Page et al., 2022).

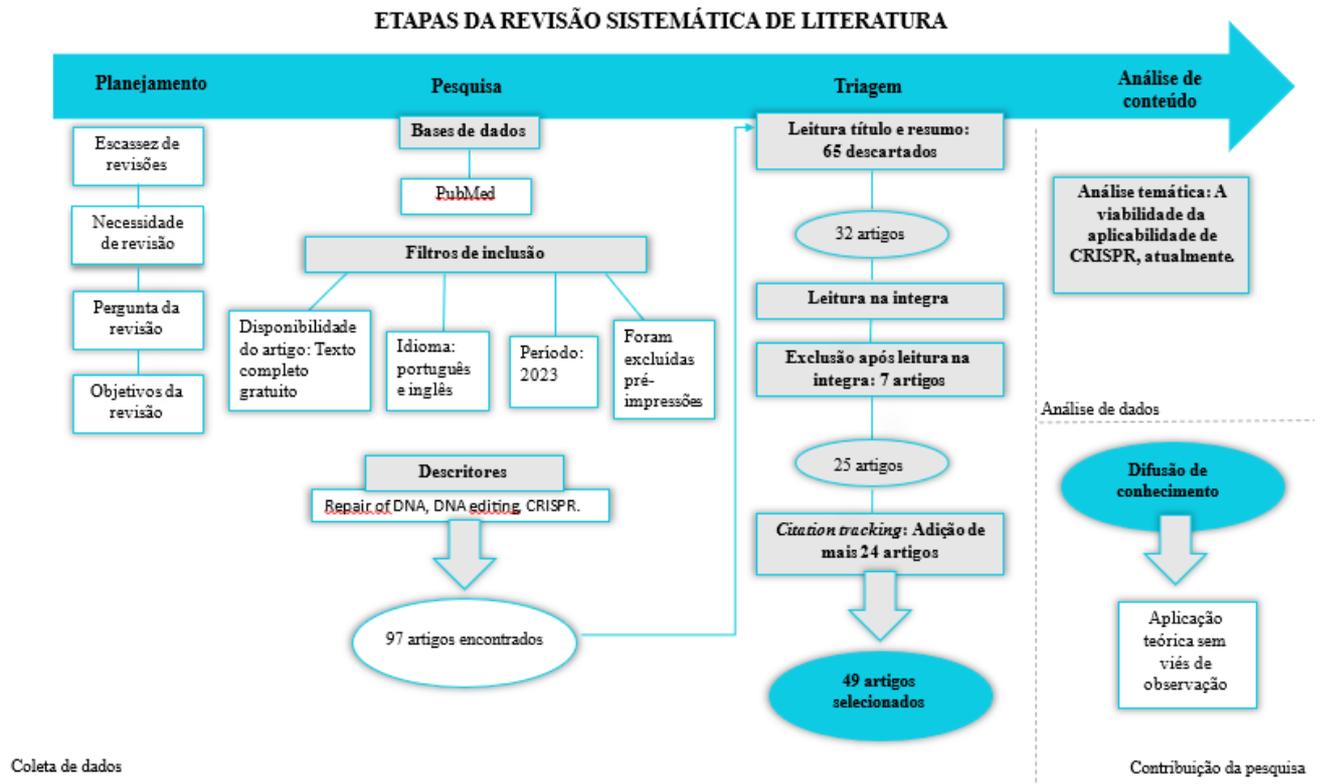


Figura 3. Fluxograma da metodologia do trabalho (Page et al., 2022) (Modificado).

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 (Attride-Stirling, 2001; Braun et al., 2006). Assim, através da aplicação teórica, essa etapa visou compreender detalhadamente o atual cenário da sociedade e sua receptividade à técnica *CRISPR*, sem vieses de observação.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da análise de dados, 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 populacional, a biossegurança, a legislação e a religião, que servem como barreira para que esse avanço científico aconteça, tornando 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 populacional. O sistema *CRISPR/Cas9* atrai diversos pesquisadores e acadêmicos, devido a 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, isso 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.

5 REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W. *et al.* PTPN22 R620W gene editing in T cells enhances low-avidity TCR responses. **eLife**, Seattle, v. 12, n. 1, p. 1-21, mar. 2023.
- AREND, M.C.; PEREIRA, J.O.; MARKOSKI, M.M. O Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 108, n. 1, p. 81-83, 2017.
- ATTRIDE-STIRLING JL. Becoming natural: an exploration of the naturalisation of marriage. **Unpublished doctoral thesis**, Londres, v.1, n.3, 2001.
- BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 234-44, 2014.
- BRAUN V; CLARKE V. Usando análise temática em psicologia. **Routledge**, v. 3, n. 2, p. 77-101, 2006.
- CAETANO, G.C.G. *et al.* TÉCNICA CRISPR-CAS9 E SUA UTILIZAÇÃO NA ÁREA LABORATORIAL CRISPR-CAS9's TECHNICAL AND ITS USE IN THE LABORATORY AREA. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR BJSCR**, v. 25, n. 2, p. 2317–4404, 2018.
- CARLI F; GILLIS C; SCHEEDE-BERGDAAHL C. Promover uma cultura de pré-habilitação para o paciente cirúrgico. **Acta Oncologia**, v.56, n.2, p. 128–133, 2017.
- CHAUHAN, V. P.; SHARP, P. A.; LANGER, R. Altered DNA repair pathway engagement by engineered CRISPR-Cas9 nucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 120, n. 11, p. 1-9, mar. 2023.
- CHAVEZ, M. *et al.* Advances in CRISPR therapeutics. **Nature Reviews Nephrology**, v. 19, n. 1, p. 9–22, out. 2022.

COSTA, C. P. DA; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D'ÁVILA; GOISSIS, M. D. Sistema CRISPR/Cas9 e perspectivas de aplicações na cadeia produtiva animal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 1, p. 18–32, 2021.

DORSET, S. R.; BAK, R. O. The p53 challenge of hematopoietic stem cell gene editing. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**, v. 30, n. 1, p. 83-89, jun. 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Edição de genoma pelo sistema CRISPR-Cas9 e sua aplicação no melhoramento do milho**. 1. ed. Minas Gerais (Brasil): Embrapa; 2020. p. 07-17.

FICHTER, K. M.; TAHEREH SETAYESH; MALIK, P. Strategies for precise gene edits in mammalian cells. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 32, n. 1, p. 536–552, jun. 2023.

GALVÃO, T. F.; PEREIRA, M. G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.1, n.1, p. 183, 2014.

GRATZ SJ. *et al.* Highly Specific and Efficient CRISPR/Cas9-Catalyzed Homology-Directed Repair in Drosophila. **Genetics**, Madison, v. 196, n.1, p. 961–971, 2014.

HAN, D.; CHURCHER, S.; NORDMAN, J. PCR cloning Intermediated Gibson assembly (PIG) for Constructing DNA Repair Templates in CRISPR-Cas9 Based Gene Editing. **PubMed**, v. 2023, n. 1, p.1-6, jan. 2023.

HEEB, L. *et al.* HDR-based CRISPR/Cas9-mediated Knockout of PD-L1 in C57BL/6 Mice. **Bio-protocol**, v. 13, n. 14, p. 1-13, jan. 2023.

HUANG, X. *et al.* Screening DNA aptamers that control the DNA cleavage, homology-directed repair, and transcriptional regulation of the CRISPR-(d) Cas9 system. **Molecular Therapy**, v. 31, n. 1, p. 260–268, jan. 2023.

IRIART, J. *et al.* Da busca pelo diagnóstico às incertezas do tratamento: desafios do cuidado para as doenças genéticas raras no Brasil. **Ciência saúde coletiva**, v. 1, n.1, p. 3637–3650, out. 2019.

JIANG, H. *et al.* CRISPR/Cas9 system and its applications in nervous system diseases. **Genes and Diseases**, v. 11, n. 2, p. 675–686, mar. 2024.

JIAXIAN, L. *et al.* Mass spectrometry-based assays for assessing replicative bypass and repair of DNA alkylation in cells. **RSC Advances**, v. 13, n. 23, p. 15490–15497, jan. 2023.

JINEK, M. *et al.* A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Howard Hughes Medical Institute**, v. 337, n. 6096, p. 816-821.

WOLFF, J.H.; MIKKELSEN, J.G. Prime editing in hematopoietic stem cells—From ex vivo to in vivo CRISPR-based treatment of blood disorders. **Frontiers in genome editing**, v. 5, n. 1, p. 1-9, mar. 2023.

KELLY, R.D. *et al.* Noncanonical functions of Ku may underlie essentiality in human cells. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1-15, jul. 2023.

LACKNER, M. *et al.* Detection of unintended on-target effects in CRISPR genome editing by DNA donors carrying diagnostic substitutions. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. 5, p. 1-9, jan. 2023.

LI, X. *et al.* Advances in the application of CRISPR-Cas technology in rapid detection of pathogen nucleic acid. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, n. 1, p. 1-10, set. 2023.

MANTA, F. Marcadores inserção/deleção (Indel): estudo de ancestralidade e identificação humana na população brasileira. **Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes**, Rio de Janeiro, v.1, n,1, p. 16-54, 2013.

MOLINARI, H. *et al.* **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2020. 13-69 p.

MORAES-ALMEIDA, M. *et al.* **Edição gênica por CRISPR/CAS9: da Teoria à Prática**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2022. 11-20 p.

NEMUDRAIA, A.; NEMUDRYI, A.; WIEDENHEFT, B. Repair of CRISPR-guided RNA breaks enables site-specific RNA editing in human cells. **BioRxiv**, v. 1, n. 1, p. 1-12, ago. 2023.

NISHIMASU, H. *et al.* Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. **Mol Cell**, v.156, n.1, p. 935-945, fev. 2014.

PAGE, M. *et al.* A declaração PRISMA 2020: diretriz atualizada para relatar revisões sistemáticas. **Rev Panam Salud Publica**, v.46, n.1, p. 2-8, 2022.

PETERS, J. E. *et al.* Bacterial CRISPR: accomplishments and prospects. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 121–126, out. 2015.

PONTÍFICE BENTO XVI. Instrução Dignitas personae sobre algumas questões de bioética. **Vaticano**. v.1, n.1, 2008.

RAN FA. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nat. Protoc**, v.1, n.1, 2013.

RICHARDSON, C. D.; KELSH, R. N.; RICHARDSON, R. New advances in CRISPR/Cas-mediated precise gene-editing techniques. **Disease Models & Mechanisms**, v. 16, n. 2, p. 1-15, fev. 2023.

RODRIGO, S.; KAVEESHA SENASINGHE; QUAZI, S. Molecular and therapeutic effect of CRISPR in treating cancer. **Medical Oncology**, v. 40, n. 2, p. 1-18, jan. 2023.

SANDER JD; JOUNG JK. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 4, p. 347–355, 2014.

SCULLY R. *et al.* DNA double strand break repair pathway choice in somatic mammalian cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 20, n. 11, p. 698-714, 2019.

SHY, B. R. *et al.* High-yield genome engineering in primary cells using a hybrid ssDNA repair template and small-molecule cocktails. **Nature Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 521–531, ago. 2022.

SPILMAN, M. *et al.* Estrutura de um complexo silenciador de RNA do sistema imunológico CRISPR-Cas. **Mol Cell**, v. 52, n. 1, p.146–152, out. 2013.

TABASSUM, T. *et al.* CRISPR-Cas9 Direct Fusions for Improved Genome Editing via Enhanced Homologous Recombination. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, p. 14701–14701, set. 2023.

TSUCHIDA, C. A. *et al.* Mitigation of chromosome loss in clinical CRISPR-Cas9-engineered T cells. **Cell**, v. 1 n. 1, p. 1-70, out. 2023.

VERMA, V. *et al.* Bioengineering of fungal endophytes through the CRISPR/Cas9 system. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1-6, mar. 2023.

WETTENGEL, J. M. *et al.* A Multifunctional and Highly Adaptable Reporter System for CRISPR/Cas Editing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 8271–8271, maio 2023.

WU, L.; JIA CHI TAN; GASCOIGNE, N. R. J. Generation of gene-of-interest double allele knockout clones in primary human T cells by CRISPR. **STAR Protocols**, v. 4, n. 3, p. 102445–102445, set. 2023.

YARNALL, M.T.N. *et al.* Drag-and-drop genome insertion of large sequences without double-strand DNA cleavage using CRISPR-directed integrases. **Nature Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 500–512, nov. 2022.

ZHAO, Z.; SHANG, P.; MOHANRAJU, P.; GEIJSEN, N. Prime editing: advances and therapeutic applications. **Trends in Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 1000–1012, mar. 2023.

ZHOU, L.; YAO, S. Recent advances in therapeutic CRISPR-Cas9 genome editing: mechanisms and applications. **Molecular Biomedicine**, v. 4, n. 1, p. 1-25, abr. 2023.