

CENTRO UNIVERSITÁRIO BARÃO DE MAUÁ

ÂNGELO LEONARDO TROVO BOTELHO DE LIMA

BEATRIZ MARIN LOMBARDI

JORGE OTAVIO DOMINGOS MISSIMA

VITOR CIPRIANO PITON

TECNOLOGIAS DE EDIÇÃO GÊNICA: REVISÃO DE LITERATURA

Ribeirão Preto

2020

**ÂNGELO LEONARDO TROVO BOTELHO DE LIMA
BEATRIZ MARIN LOMBARDI
JORGE OTAVIO DOMINGOS MISSIMA
VITOR CIPRIANO PITON**

TECNOLOGIAS DE EDIÇÃO GÊNICA: REVISÃO DE LITERATURA

Trabalho de conclusão de curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Barão de Mauá para obtenção do título de bacharel.

Orientadora: Dra. Lúcia Lopes

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

T253

Tecnologias de edição gênica: revisão de literatura/ Ângelo Leonardo Trovo Botelho de Lima; Beatriz Marin Lombardi; Jorge Otavio Domingos Missima; Vitor Cipriano Piton - Ribeirão Preto, 2020.

31p.il

Trabalho de conclusão do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Barão de Mauá

Orientador: Dra. Lúcia Lopes

1. Engenharia genética 2. Edição gênica 3. Genética molecular I. Lima, Ângelo Leonardo Trovo Botelho de II. Lombardi, Beatriz Marin III. Missima, Jorge Otavio Domingos IV. Piton, Vitor Cipriano V. Lopes, Lúcia VI. Título

CDU 575

Bibliotecária Responsável: Iandra M. H. Fernandes CRB⁸ 9878

ÂNGELO LEONARDO TROVO BOTELHO DE LIMA

BEATRIZ MARIN LOMBARDI

JORGE OTAVIO DOMINGOS MISSIMA

VITOR CIPRIANO PITON

TECNOLOGIAS DE EDIÇÃO GÊNICA: REVISÃO DE LITERATURA

Trabalho de conclusão de curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Barão de Mauá para obtenção do título de bacharel.

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lúcia Lopes
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto

Me. Lucila Costa Zini
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto

Dra. Soraya Duarte Varela
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto

Ribeirão Preto

2020

AGRADECIMENTO

Gostaríamos de agradecer a professora Lúcia Lopes, nossa orientadora, por todo esforço, paciência, dedicação, horas de trabalho a nós e ao nosso trabalho, sem ela nosso trabalho não seria possível.

Agradecemos também a professora Monica Magalhaes Costa Zini, pelas diversas correções e lapidações em nosso trabalho, se dedicando bastante para que tudo ficasse perfeito.

Aos nossos familiares, por estarem ao nosso lado, nos incentivando, apoiando neste ciclo, que se encerra hoje, sem eles, definitivamente, não teríamos chegado até aqui.

Aos docentes do Centro Universitário Barão de Mauá, por toda dedicação, resiliência, esforço, neste momento tão difícil que a humanidade está passando, fazendo com que tudo ficasse o mais próximo da normalidade.

Aos nossos colegas que estiveram conosco nestes 4 anos, que fizeram com que essa caminhada se tornasse mais leve.

RESUMO

O desenvolvimento da biologia molecular proporcionou avanços significativos em tecnologias de edição genômica. Esses avanços foram subsidiados, principalmente pela descoberta das enzimas de restrição, que são capazes de realizar cortes específicos na molécula de DNA. Nos últimos anos, diversas pesquisas estão sendo conduzidas para o desenvolvimento de ferramentas moleculares melhores e acessíveis para a realização da edição genômica. Dentre essas ferramentas, destacam-se *Zinc Finger Nuclease* (ZFN), em português: Nucleases Dedo de Zinco, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), que significa Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas e *Transcription Activator - Like Effector Nucleases* (TALENs), as Nucleases Efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs). No Brasil, essas principais técnicas de edição de genes têm sido aplicadas em diferentes áreas da Biologia, como em pesquisas sobre terapia gênica e para melhorias na agricultura e pecuária. Diante do exposto, essa revisão apresenta as tecnologias supracitadas e mostra o perfil das pesquisas sobre edição gênica, com base em publicações nacionais que abordam o tema. Os resultados obtidos apontam a tecnologia CRISPR-Cas9 como a mais citada em publicações sobre o assunto, nas quais o enfoque das pesquisas concentra-se nas categorias: terapia gênica e melhoramento genético de plantas e/ou animais.

Palavras-chave: Engenharia Genética. Edição Gênica. Genética Molecular. CRISPR Cas9. TALEN. ZFN.

ABSTRACT

The development of molecular biology provided significant advances in genomic edition technology. Those advances are mainly subsidized with the discovery of the restriction enzymes, that they are capable tolls to realize specific cuts in different regions of the DNA line. In the last few years, many researches are being conducted for the development of better and accessible molecular tolls that can be possible to realize the genetic edition of the DNA. Among these tools, we highlight (Zinc Finger Nuclease) ZFN, Short Grouped and Regularly Spaced Palindromic Repeats (CRISPR) and Transcription Activator - Like Effector Nucleases (TALENs). In Brazil, these mainly techniques of gene edition have been applied in different areas of biology, like gene therapy research, agriculture and livestock. In view of the above, this review presents the technologies above-mentioned showing the researches profile about gene edition, based on national publishing that approaches the topic. The obtained results point to the CRISPR-Cas9 technology as the most cited in publications about the subject, on which the focus concentrates in the categories of: gene therapy and genetical enhancement of plants and animals.

Keywords: Genetic Engineering. Gene Editing. Molecular Genetics. CRISPR Cas9. TALEN. ZFN.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	11
3	DESENVOLVIMENTO.....	12
3.1	Tecnologias de edição gênica	12
3.1.1	Nucleases Dedo de Zinco (ZFN).....	12
3.1.2	Nucleases Baseadas em ativadores de Transcrição (TALEN).....	13
3.1.3	Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associado à enzima nuclease Cas9 (CRISPR/ Cas9)	14
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

A edição de genes é um tema de grande interesse biotecnológico e corresponde ao conjunto de técnicas que podem ser utilizadas para a inserção, deleção ou outro tipo de alteração em regiões específicas do genoma de organismos. Nesse sentido, as tecnologias aplicadas para essa finalidade incluem a ação de enzimas.

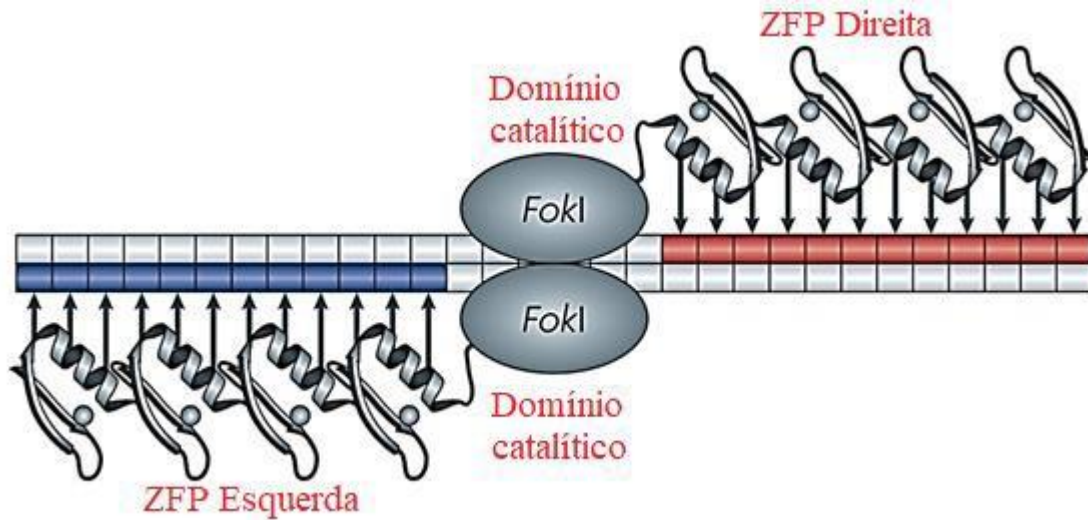
Os primeiros estudos que subsidiaram o avanço de tecnologias de edição gênica iniciaram-se na década de 70, quando pesquisadores descobriram as enzimas de restrição, materiais fundamentais para a separação de genes em locais específicos da molécula de DNA (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

No campo fértil do desenvolvimento científico da década supracitada, em 1977, Michael Wigler e Richard Axel realizaram a primeira correção genética em células de mamífero, cultivadas *in vitro*, que consistiu na inserção de um gene, em células portadoras de deficiência do mesmo, sendo um avanço significativo na manipulação gênica e no controle científico sobre os produtos relativos aos genes, as proteínas (MENCK; VENTURA, 2007).

Seguiram-se, na década de 80, experimentos inovadores, tais como os primeiros, envolvendo vírus não-patogênicos como vetores, ou seja, potenciais transportadores de genes entre genomas. O avanço biotecnológico permitiu, na década de 90, o desenvolvimento de metodologias de manipulação do DNA, que propiciaram o surgimento de novas técnicas para a manipulação da molécula de DNA. A metodologia pioneira, aplicada à edição de genes envolveu o estudo da proteína quimérica nuclease dedo de zinco, do inglês, *Zinc Finger Nuclease* (ZFN), por Kim e colaboradores (1996). Esses pesquisadores demonstraram a possibilidade da utilização de endonucleases de restrição do tipo II, associadas a domínios proteicos de ligação ao DNA, para a clivagem de um DNA alvo em locais estritamente definidos, *in vitro* (KIM; CHA; CHANDRASEGARAN, 1996).

Essa tecnologia é formada por um domínio proteico, que inclui as proteínas “dedos de zinco”, uma classe de fatores de transcrição de eucariotos, e um domínio baseado na enzima de restrição *Fok1*. De acordo com a referida formação estrutural, as ZFNs combinam a especificidade para a ligação ao DNA juntamente com uma robusta atividade de clivagem (URNOV *et al.*, 2010). A estrutura e os componentes dessa tecnologia estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1- Estrutura e componentes da tecnologia ZFN



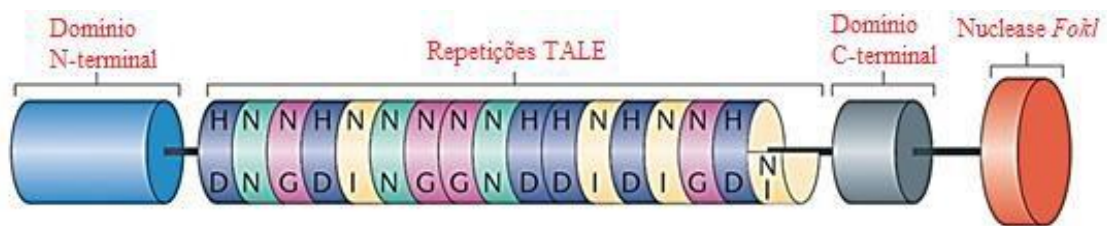
Fonte: Adaptado de Urnov *et al.* (2010).

As proteínas ZFNs são construídas como módulos de domínios “dedos de zinco” ligados ao domínio de clivagem de uma nuclease, geralmente a enzima de restrição FokI. Há atividade catalítica da referida enzima quando esta é dimerizada. Na aplicação dessa tecnologia a ruptura da fita dupla de DNA é feita por duas ZFNs diferentes que são introduzidas na célula simultaneamente e, após a quebra, os mecanismos de reparo celular são induzidos para a correção do dano (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016).

No ano de 2011, uma nova tecnologia, os efetores pseudo-ativadores de transcrição, do inglês, *Transcription Activator Like Effectors Nuclease* (TALEN) ganhou destaque, sendo citada pela revista *Nature Methods* em 2011, em método do ano. Essa tecnologia baseia-se no uso de proteínas provenientes de bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas spp.* Sabe-se que, durante a infecção, ativadores de transcrição como efetores TALEs são injetados em células vegetais, onde contribuem para a doença, ligando-se ao DNA e ativando genes do hospedeiro (BOGDANOVE; SCHORNACK; LAHAYE, 2010). Recentemente, nucleases efetoras, semelhantes aos ativadores de transcrição (TALENS) surgiram como uma alternativa para ZFNs para edição de genoma e compreendem um domínio de nuclease não específico, fundido a um domínio de ligação de DNA personalizável (JOUNG; SANDER, 2013). Ao comparar as TALENs com as ZFN, nota-se que ambas fazem

uso do domínio da endonuclease de restrição. Entretanto, nas TALENs o domínio de ligação de DNA é composto de uma série de repetições, sendo que cada uma delas possui dois aminoácidos adjacentes que são denominados de repetições de di-resíduo variável (do inglês, variable di-residue, RVD), que conferem especificidade para um dos quatro pares de bases de DNA (PAIXÃO, 2019). A representação estrutural de uma proteína TALE está apresentada na Figura 2.

Figura 2- Estrutura de uma proteína TALE

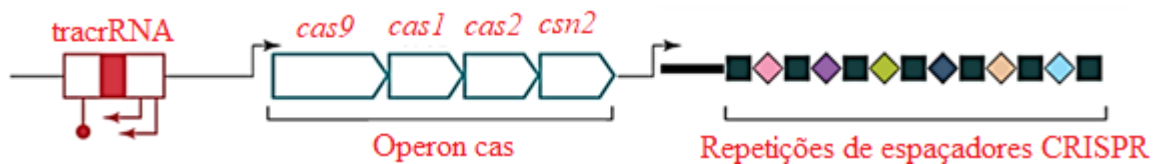


Fonte: Adaptado de Joung e Sander (2013).

As tecnologias de edição de genes, baseadas nas proteínas quiméricas, como as apresentadas acima, permitem realizar modificações genéticas precisas e específicas por meio da indução de quebras duplas nas cadeias de DNA, mas também apresentam como limitação a necessidade de desenhar, sintetizar e validar tais proteínas para que sejam aplicadas (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015). Nesse sentido, após a apresentação da metodologia TALENs, surgem as repetições palindrômicas curtas interespaçadas e regularmente agrupadas associadas à proteína Cas, do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated with Cas*, (CRISPR-Cas), que passaram a representar uma nova possibilidade para a edição de genes, com base em um mecanismo de imunidade adaptativa de bactérias e arqueas contra infecções. A tecnologia CRISPR-Cas9 se origina de sistemas CRISPR-Cas tipo II, que fornecem às bactérias, imunidade adaptativa a vírus e plasmídeos. No sistema bacteriano, a estrutura do CRISPR é formada por repetições palindrômicas curtas, agrupadas e regularmente interespaçadas que, quando transcritas, formam o RNA guia que orienta a enzima Cas9 ao alvo, como uma sequência de vírus parasita, por exemplo. Desse modo, é possível que a proteína Cas9 e o RNA guia, sejam inseridos em células com a finalidade de ocasionar quebras na fita dupla do DNA (AREND; PEREIRA; MAROSKI, 2017). Em síntese, o sistema CRISPR-Cas9 inclui uma endonuclease que usa uma sequência

guia, para formar pares de bases com seqüências alvos de DNA, permitindo que introduza uma quebra de fita dupla específica no local do DNA (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). A estrutura de um *locus* genômico CRISPR-Cas está apresentado na Figura 3.

Figura 3- Estrutura do *locus* CRISPR-Cas



Fonte: Adaptado de DOUDNA; CHARPENTIER (2014).

Sistemas que constituem as metodologias de edição gênica são caracterizados por uma relativa simplicidade de construção e alta eficiência funcional em células humanas, animais e vegetais, sendo amplamente utilizados na manipulação de genomas para diferentes objetivos, como no desenvolvimento de organismos mutantes ou em pesquisas sobre a base genética de doenças (BAKER, 2012; TOBITA; GUZMAN-LEPE; L'HORTET, 2015; NEMUDRYI *et al.*, 2014). Vale ressaltar que, com o desenvolvimento dessas tecnologias de edição gênica, questões éticas precisam ser discutidas por cientistas e pela sociedade em geral (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016). As diferentes possibilidades biotecnológicas promovidas pela era da edição genômica fazem com que os eventos e as publicações científicas a respeito desse tema se multipliquem progressivamente, bem como suas implicações culturais, sociais e éticas (SGANZERLA; PESSINI, 2020).

Atualmente, as tecnologias de edição gênica apresentadas são utilizadas em laboratórios de genética molecular no mundo todo, mas muitas de suas aplicações e potenciais consequências dessas manipulações do genoma ainda são desconhecidas pela sociedade em geral. Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão bibliográfica sobre as tecnologias de edição: ZFN, TALENs e CRISPR/Cas9 e suas aplicações, com base na análise da produção científica nacional, no período de 2010 a 2020.

2 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Para a confecção dessa revisão, foram utilizadas algumas publicações para o embasamento teórico do tema “tecnologias de edição gênica” e outras publicações compuseram os resultados e compreendem: artigos científicos, teses, revisões bibliográficas e monografias sobre o referido tema, do ano de 2010 até 2020, que permitiram a identificação das técnicas mais utilizadas e suas respectivas aplicações. Para a análise das publicações sobre tecnologias de edição gênica, no cenário nacional, nos últimos 10 anos, foi utilizada a biblioteca eletrônica “Scientific Electronic Library Online” – SciELO/Brasil e Google acadêmico. Os critérios estabelecidos para a inclusão dos artigos na análise realizada foram:

- A obtenção das publicações com base nas palavras-chave utilizadas nas buscas em bancos de dados. As palavras-chave utilizadas foram: ferramentas de edição gênica, edição gênica, edição de genes, engenharia genética, bioética, edição genética, edição genômica, manipulação genética, técnicas de edição gênica e terapia gênica.
- A aderência do conteúdo encontrado em cada publicação, com as tecnologias de edição gênica abordadas nessa pesquisa.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Tecnologias de edição gênica

Com o avanço das técnicas de engenharia genética, surgiram diferentes metodologias de edição, que passaram a ser aplicadas em diversas áreas das ciências biológicas, como em pesquisas de base, na busca pela cura de doenças, nas ciências ambientais, na agropecuária etc. (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Dentre as metodologias para edição gênica, destacam-se: ZFN, TALEN e CRISPR/Cas9 (QUADROS *et al.*, 2018). A habilidade de direcionar essa última técnica, CRISPR/Cas9, para locais específicos no genoma, expandiu a capacidade de fazer mudanças que incluem: deleções, inserções e substituições nas sequências de DNA. (LANIGAN; KOPERA; SAUNDERS, 2020).

3.1.1 Nucleases Dedo de Zinco (ZFN)

As ZFNs são proteínas quiméricas produzidas pela combinação de proteínas “dedo de zinco” (ZFP, do inglês: *zinc finger protein*) com endonucleases (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016) e algumas de suas principais aplicações incluem o silenciamento e a inserção genes, o que possibilita a alteração de genomas. A partir da ligação das ZFNs aos locais de reconhecimento, ocorre corte no DNA, o que induz a ativação dos sistemas de reparo no genoma (TOBITA; GUZMAN-LEPE; L'HORTET, 2015; VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016).

A tecnologia ZFN no campo da agricultura, é considerada uma tecnologia promissora, devido ao potencial no melhoramento genético de culturas de importância econômica, pois essa tecnologia tem sido apontada como uma alternativa mais rápida para a obtenção de alterações genéticas em plantas, que poderiam ser obtidas por retrocruzamentos em programas tradicionais de melhoramento de plantas (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016).

Na área de pesquisa envolvendo animais transgênicos, as ZFNs têm sido utilizadas com sucesso em organismos modelo. Dois dos primeiros modelos de ratos transgênicos com transtorno do espectro autista (TEA) foram produzidos a partir do uso dessa técnica para bloquear a expressão do gene da *Fragile X mental retardation protein* (FMRP) e do gene da proteína *Neurologin3* (NLGN3). De acordo com os resultados de testes posteriores à modificação, ratos modificados exibiram

anormalidades nos fenótipos relevantes para o TEA, que incluem: comportamento preservativo, comportamento juvenil e problemas sensório-motores. Este trabalho foi de especial importância, uma vez que ratos são preferidos a camundongos em estudos de neurociência, pois o circuito neural em ratos é mais semelhante ao dos humanos (VOLOBUEVA; OREKHOV; DEYKIN, 2019).

Na área da terapia gênica, a recombinação homóloga induzida por ZFNs já foi descrita para a correção de mutações causadoras de doença em células estaminais pluripotentes induzidas. (NUNES, 2014).

3.1.2 Nucleases Baseadas em ativadores de Transcrição (TALEN)

A tecnologia TALEN funciona de forma quase idêntica às ZFNs. Do mesmo modo, uma proteína quimérica apresenta um domínio de reconhecimento ao DNA, que pode ser associado a uma nuclease. A diferença para a tecnologia ZFNs está relacionada ao processo de identificação e ligação aos nucleotídeos do DNA-alvo. As TALENs (Transcription activator-like effector nucleases) são proteínas originadas da fusão entre o domínio de ligação ao DNA de um efetor TAL (efetores pseudo-ativadores de transcrição) e um domínio de clivagem do DNA (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015; SOKOLOWSKEI, 2019). Assim como na tecnologia ZFN, após a dimerização da nuclease e a clivagem da sequência de DNA pareada, os mecanismos intrínsecos de reparo celular, corrigirão a região alterada, finalizando o processo de edição gênica (SOKOLOWSKEI, 2019).

Laboratórios em todo o mundo estão utilizando essa tecnologia para tratamentos clínicos de distúrbios patológicos que variam desde o tratamento de hemoglobinopatias (CHANDRAKASAN; MALIK, 2014; SUN; ZHAO, 2013) até câncer (DUPUY *et al.*, 2013; OSBORN *et al.*, 2013).

Em um estudo mais amplo dessa aplicação tecnológica em células de bovinos e suínos, foi demonstrado que 23 de 36 TALENs (64%) tiveram alta atividade em células primárias em 15 *loci*, resultando em bloqueio da expressão de genes para os sítios-alvo. Além disso, até 75% dos embriões, nos quais a técnica foi utilizada, apresentaram eventos de bloqueio da expressão dos genes de interesse no estudo (CARLSON *et al.*, 2012).

Este sistema também é estudado na área de controle de insetos vetores de doenças. Há uma grande expectativa com relação à aplicação da TALEN para o

bloqueio, ou nocaute, da expressão de genes que controlam a fertilidade dos machos do gênero *Drosophila* (BASSETT; LIU, 2014).

3.1.3 Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associado à enzima nuclease Cas9 (CRISPR/ Cas9)

A tecnologia CRISPR-Cas9, mais recente em relação às anteriormente citadas, se origina de sistemas CRISPR-Cas tipo II, que fornecem às bactérias imunidade adaptativa a vírus e plasmídeos. Essa descoberta criou um sistema simples de dois componentes no qual mudanças na sequência guia são utilizadas para direcionar qualquer sequência de DNA de interesse (DOUDNA, CHARPENTIER, 2014).

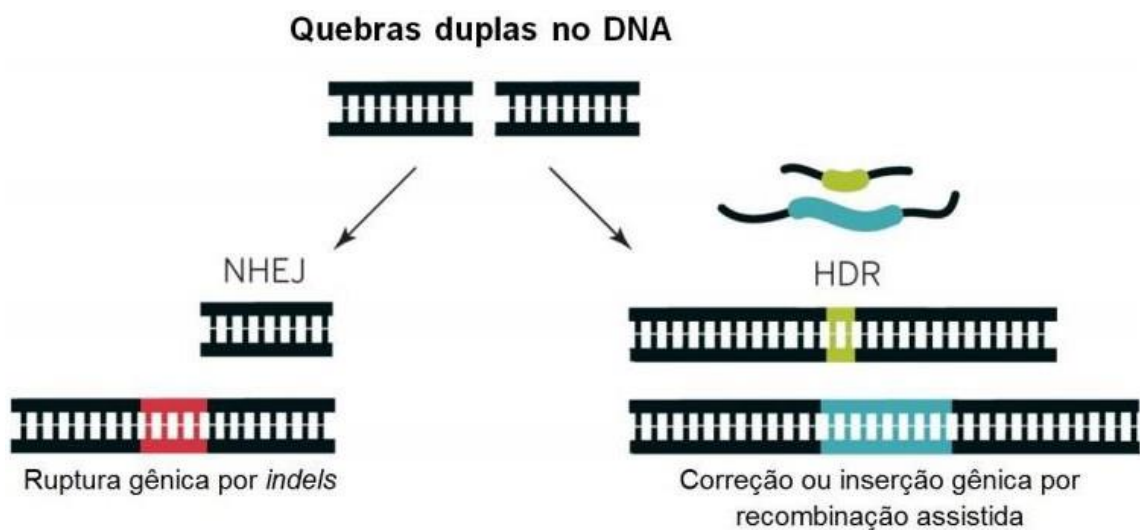
Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier são as responsáveis por desenvolver a técnica de CRISPR para a edição de genoma. O artigo publicado em 2014, titulado "*The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*", lhes concedeu o prêmio Nobel de Química, no ano de 2020 (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

A CRISPR-Cas9, faz uso do sistema CRISPR que possibilita a edição do genoma através da clivagem do DNA por uma endonuclease (Cas9), guiada a partir de uma sequência de RNA, que é capaz de se parear com as bases de uma sequência-alvo e clivar a dupla fita de DNA (AREND; PEREIRA; MAROSKI, 2017). O uso do RNA para reconhecer uma sequência de nucleotídeos, resulta em manipulações muito mais fáceis e rápidas, o que se torna um diferencial dessa metodologia de edição. Além disso, esse sistema permite ter como alvo muitos genes ao mesmo tempo (TOBITA; GUZMAN-LEPE; L'HORTET, 2015). A facilidade de planejamento para reconhecer e clivar sítios específicos de um gene alvo torna a aplicação dessa tecnologia bastante promissora para ser usada na edição de genomas, uma vez que, tecnicamente, as sequências de nucleotídeos do DNA podem ser reeditadas em regiões específicas. (QUADROS *et al.*, 2018).

A molécula de DNA conta com eficazes mecanismos de reparo e correção de mutações, onde as diferentes vias de reparo são cruciais na manutenção da estabilidade genética da molécula (CHATTERJEE; WALKER, 2017). Nesse contexto a edição de genomas através dessa ferramenta de edição gênica, pode promover o

acionamento de duas vias de reparo nuclear: União de extremidades não homólogas (inglês, Non homologous end joining, NHEJ) ou reparo por homologia direta (inglês, homology directed repair, HDR), sendo que a via NHEJ permite a adição aleatória de deleções e inserção na região alterada, denominada indels, e a via HDR possibilita o uso de sequências de DNA homólogas provenientes de cromátides irmãs ou DNA exógeno para corrigir mutações induzidas por quebras da fita dupla de DNA (SOKOLOWSKEI, 2019). O reparo está apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Reparo por NHEJ e HDR após a quebra da dupla fita de DNA



Fonte: Adaptado de Doudna e Charpentier (2014).

A tecnologia CRISPR/Cas9 também tem sido utilizada no melhoramento vegetal. Um dos cereais estudados, quanto à aplicação de técnicas de engenharia genética, é o trigo. Este cereal contém proteínas de glúten, que são responsáveis pelas propriedades viscoelásticas dos alimentos derivados do trigo, podendo desencadear certas patologias em indivíduos suscetíveis. Dentro dessas proteínas, destaca-se a família alfa-gliadina que é o principal grupo de proteínas associadas ao desenvolvimento de doença celíaca e sensibilidade ao glúten. Assim, a tecnologia CRISPR/Cas9 tem sido apontada por pesquisadores como uma ferramenta para atuar na redução, com precisão e eficiência, da quantidade de alfa-gliadina no grão da semente, fornecendo linhagens de trigo com baixo teor de glúten para consumidores intolerantes à essa proteína (SÁNCHEZ-LEÓN *et al.*, 2018).

Ademais, a técnica de CRISPR-Cas9 tem sido estudada como ferramenta

na produção de ovócitos, na reprodução de animais de criação (ARROYO; HERRERA; PÉREZ, 2019). Estudos recentes mostraram a obtenção de raças bovinas com características favoráveis para climas tropicais e quentes, como as observadas nos animais do gênero *Bos indicus* (Brahman, Gir, Nelore e Sahiwal) e *Bos taurus* (Romosinuano e Senepol). Nesse sentido, um estudo faz referência ao fato de que os animais modificados se tornaram mais resistentes aos efeitos de temperatura elevada nas células com função reprodutiva, do que em raças que evoluíram em climas mais frios (Angus, Holstein e Jersey) (HANSEN, 2014).

Com o surgimento das tecnologias de edição gênica, as tecnologias ZFN, TALEN e CRISPR/Cas9, revolucionaram o modo de edição dos genes, tornando-o mais preciso e específico para o potencial uso de ferramentas moleculares para a correção de doenças hereditárias (SOKOLOWSKEI, 2019) e para o melhoramento de animais e vegetais (ONGARATTO, 2019; KOLTUN *et al.*, 2018), por exemplo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as tecnologias de edição de genes apresentadas, esse estudo mostra o perfil de publicações sobre o tema, no território nacional, com base nos critérios de busca estabelecidos. As publicações estão organizadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Lista de artigos selecionados para análise

(Continua)

Título do trabalho (ano)	Autores	Técnica	Aplicação
A biotecnologia envolvida no sistema CRISPR (2019)	BARBOSA, K. L.; CAVALCANTE, G. S. S.	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
A revolução da edição genômica com o sistema CRISPR-CAS (2017)	MICHELS, F. L. N.	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
A tecnologia de Crispr- Cas9 na terapia gênica do câncer de pulmão (2019)	ALCANTARA, R. L. DE <i>et al.</i>	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
As características dos mecanismos e sistemas de edição genômica (2017)	LISTIK, E.; CARMO, A. C. V.	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
Biologia sintética e manipulação genética: Riscos, promessas e responsabilidades (2020)	ROHREGGER, R. <i>et al.</i>	NA	NA
Bioterrorismo e a facilidade de acesso à biotecnologia e seus insumos (2013)	GRISOLIA, K. C.	NA	NA
Caracterização de mutantes de Trypanosoma cruzi deficientes em dipeptidil peptidase 8 e produção de anticorpos contra proteínas ligadoras de RNA (UBP1Tc e UBP2Tc) (2019)	CASTRO, N. A. DE	Crispr/Cas9	Alteração gênica em microrganismos
Complexidade, Manipulação genética e Biocapitalismo. Compreensão das interações da engenharia genética na sociedade de risco (2011)	NINIS, A. B	NA	NA
Crispr Cas9: atuais aplicações no tratamento do HIV (2019)	BATISTA, F. C. C.; NUNES, C. P.	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
CRISPR-CAS9: aspectos bioéticos e normativos do método (2019)	VIVANCO, C. R. <i>et al.</i>	Crispr/Cas9	NA
Desafios para a regulamentação das novas tecnologias no Brasil: uma abordagem a partir da CRISPR- Cas9 para edição de genes (2018)	PINHO, T. F.	Crispr/Cas9	NA

(Continuação)

Título do trabalho (ano)	Autores	Técnica	Aplicação
Edição de genoma com nuclease "Zinc Finger" (2016)	VASCONCELOS, M. J. V. DE; FIGUEIREDO, J. E. F.	ZFN	Melhoramento genético de Plantas
Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-Cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas (2020)	SGANZERLA, A.; PESSINI, L.	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
Edição dirigida do genoma por CRISPR/Cas9: uma nova tecnologia para o melhoramento de plantas (2018)	QUADROS, O. F. <i>et al.</i>	Crispr/Cas9	Melhoramento genético de Plantas
Edição genética: riscos e desafios da modificação do DNA humano (2019)	FURTADO, R. N.	NA	NA
Edição gênica de cafeeiro via crispr-cas9: clonagem de sgRNAs de genes da biossíntese da cafeína (2019)	OLIVEIRA, F. F. DE <i>et al.</i>	Crispr/Cas9	Melhoramento genético de Plantas
Eficácia do sistema Crispr/Cas na edição gênica do gene da síndrome de wiskott-aldrich (2017)	MORAIS, C. C. P. DE L. DE	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
Estratégias para o aumento na eficiência de produção de suínos geneticamente modificados (2019)	ONGARATTO, F. L.	Crispr/Cas9	Melhoramento genético de Animais
Expressão heteróloga e deleção da otubaína de Trypanosoma cruzi (otuc) por intermédio do sistema CRISPR/Cas9 (2019)	BARROSO, A. M. A.	Crispr/Cas9	Alteração gênica em microrganismos
Fundamentos ontológicos do debate sobre seleção e edição do genoma (2020)	FURTADO, R. N.	NA	NA
Genetic improvement of horticultural crops mediated by CRISPR/Cas: a new horizon of possibilities (2018)	KOLTUN, A. <i>et al.</i>	Crispr/Cas9	Melhoramento genético de Plantas
Intervenções genéticas em seres humanos: aspectos éticos e jurídicos (2015)	LAUXEN, E. C. U.; GOLDIM, J. R.	Crispr/Cas9	NA
Manipulação gênica do protozoário Neospora caninum como ferramenta para o estudo das interações parasito-hospedeiro (2016)	MOTA, C. M.	Crispr/Cas9	Alteração gênica em microrganismos

(Conclusão)

Título do trabalho (ano)	Autores	Técnica	Aplicação
Mecanismo e aplicações de nucleases na edição de genomas (2019)	SOKOLOWSKEI, D.	Crispr/Cas9, ZFN, TALEN	Terapia gênica em humanos
Metodologias para a geração de mutantes funcionais em metarhizium anisopliae: CRISPR/Cas9 e RNAi (2016)	OLIVEIRA, T. C. DE	Crispr/Cas9	Alteração gênica em microrganismos
O gene Aire pode controlar mRNAs bem como os lncRNAs em células tímicas epiteliais medulares como evidenciado pela edição do genoma por CRISPR-Cas9 (2018)	DUARTE, M. J. DE S.	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
O Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia (2017)	AREND, M. C. <i>et al.</i>	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
Potencial do uso da terapia genética no tratamento de doenças (2019)	LUSTOSA, A. L. P.	Crispr/Cas9, ZFN, TALEN	Terapia gênica em humanos
Sistema CRISPR-Cas como ferramenta para pesquisas em diabetes: uma revisão (2017)	GERALDO, G. R.; SILVA, S. C. C. DA	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
Talen uma ferramenta na edição de genomas (2015)	VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J.E.F.	TALEN	Melhoramento genético de Plantas
Técnica CRISPR-Cas9 e sua utilização na área laboratorial (2018)	CAETANO, G. C. G. <i>et al.</i>	Crispr/Cas9	NA
Tecnologia CRISPR- Cas para Edição Genômica (2015)	VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J.E.F.	Crispr/Cas9	Melhoramento genético de Plantas
Terapia Gênica no Tratamento de Doenças (2019)	PAIXÃO, L. E. DA	Crispr/Cas9, ZFN, TALEN	Terapia gênica em humanos
Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas (2017)	GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. DE M. A.	Crispr/Cas9	Terapia gênica em humanos
Terapia gênica: o que é o que não é e o que será (2010)	LINDEN, R.	NA	Terapia gênica em humanos
Uso do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência de TAL effector nucleases para aumento de eventos gene targeting em células de cão (2014)	PINHO, R. DE M. E	TALEN	NA

Fonte: os autores Notas:

NA – Não Aplicável. Essa descrição se refere aos artigos que trataram do assunto de modo genérico, sem um enfoque de pesquisa específico para as tecnologias de edição e/ou aplicação classificadas pelos autores abordadas no texto.

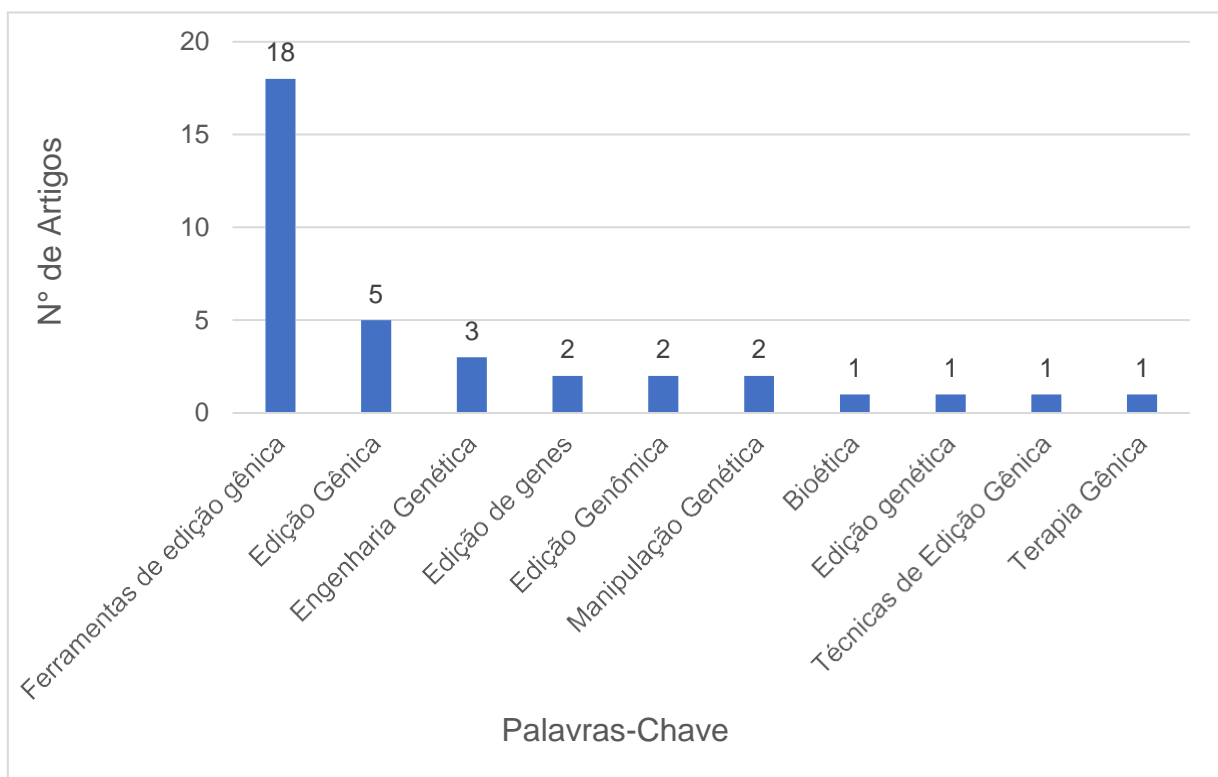
CRISPR/Cas9 - Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente

Interespaçadas associado à enzima nuclease Cas9

ZFN – Nucleases Dedo de Zinco; TALEN - Nucleases Baseadas em ativadores de Transcrição

Para a confecção dessa revisão, foram utilizadas no total 62 publicações, dentre as quais 26 publicações para o embasamento teórico do tema “tecnologias de edição gênica” e 36 publicações serviram de análise para a produção dos resultados. Em relação às palavras-chave utilizadas na busca, “Ferramentas de edição gênica” foi a combinação de palavras que possibilitou a identificação do maior número de publicações. Nessa etapa do trabalho, de busca por artigos, foram identificados 36 artigos. As palavras-chave, utilizadas na pesquisa e o número de publicações encontradas estão apresentados no Gráfico 1.

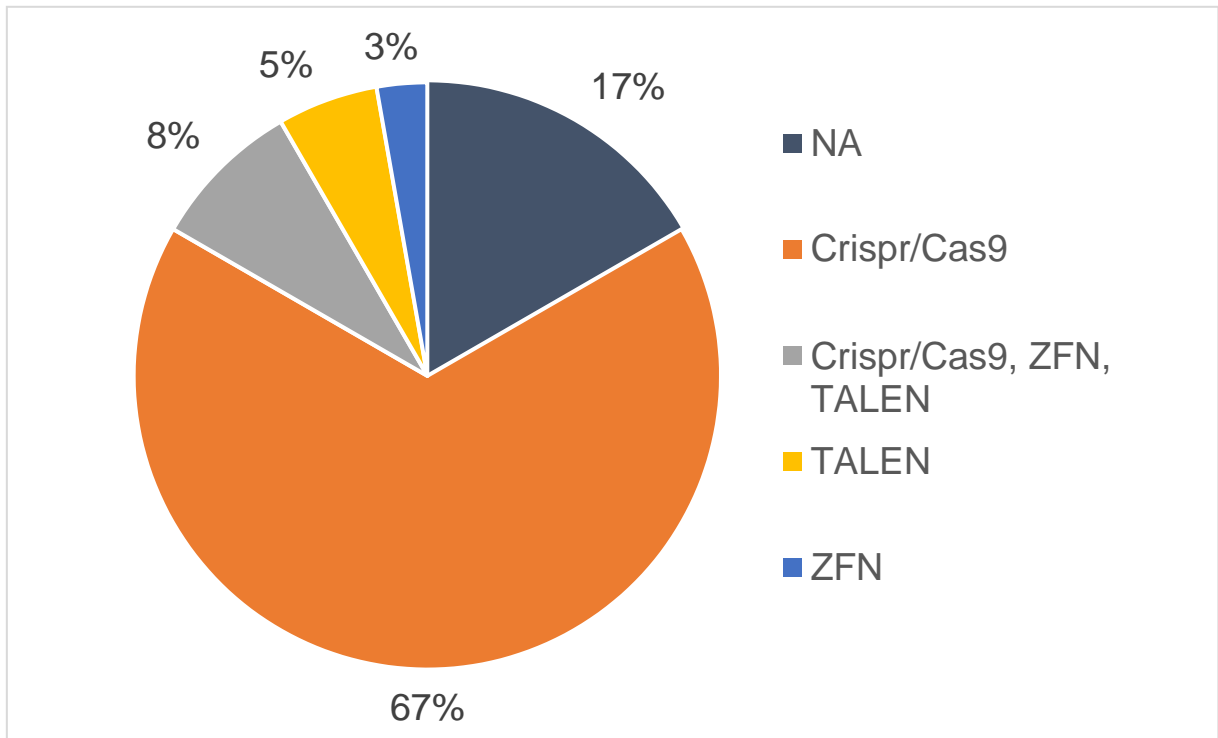
Gráfico 1- Relação do número de artigos pesquisados para cada palavra-chave



Fonte: os autores

A partir da busca inicial, os resultados demonstraram uma clara predominância de publicações relacionadas à CRISPR/Cas9, que pode ser observada no Gráfico 2.

Gráfico 2- Relação da porcentagem de artigos pesquisados para cada técnica molecular



Fonte: os autores Notas:

NA – Não Aplicável. Se refere às publicações que não tratam especificamente das tecnologias referidas nesse estudo

CRISPR/Cas9 - Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associado à enzima nuclease Cas9

ZFN – Nucleases Dedo de Zinco

TALEN - Nucleases Baseadas em ativadores de Transcrição

A predominância dessa tecnologia, nas publicações encontradas pode ser explicada pelo fato de incluir a Cas9, a principal nuclease envolvida no processo de clivagem de DNA e também a presença do RNA guia, o que torna a utilização do sistema CRISPR uma ferramenta revolucionária de engenharia genética (BARBOSA; CAVALCANTE, 2019), sendo a mais promissora para engenharia de genomas em células de diferentes organismos, dentre os quais, os mamíferos (HSU; LANDER; ZHANG, 2014). Nesse contexto, a tecnologia CRISPR/Cas9 tem sido fortemente explorada, principalmente em pesquisas relacionadas às doenças humanas (NICHOLSON; PEPPER, 2016).

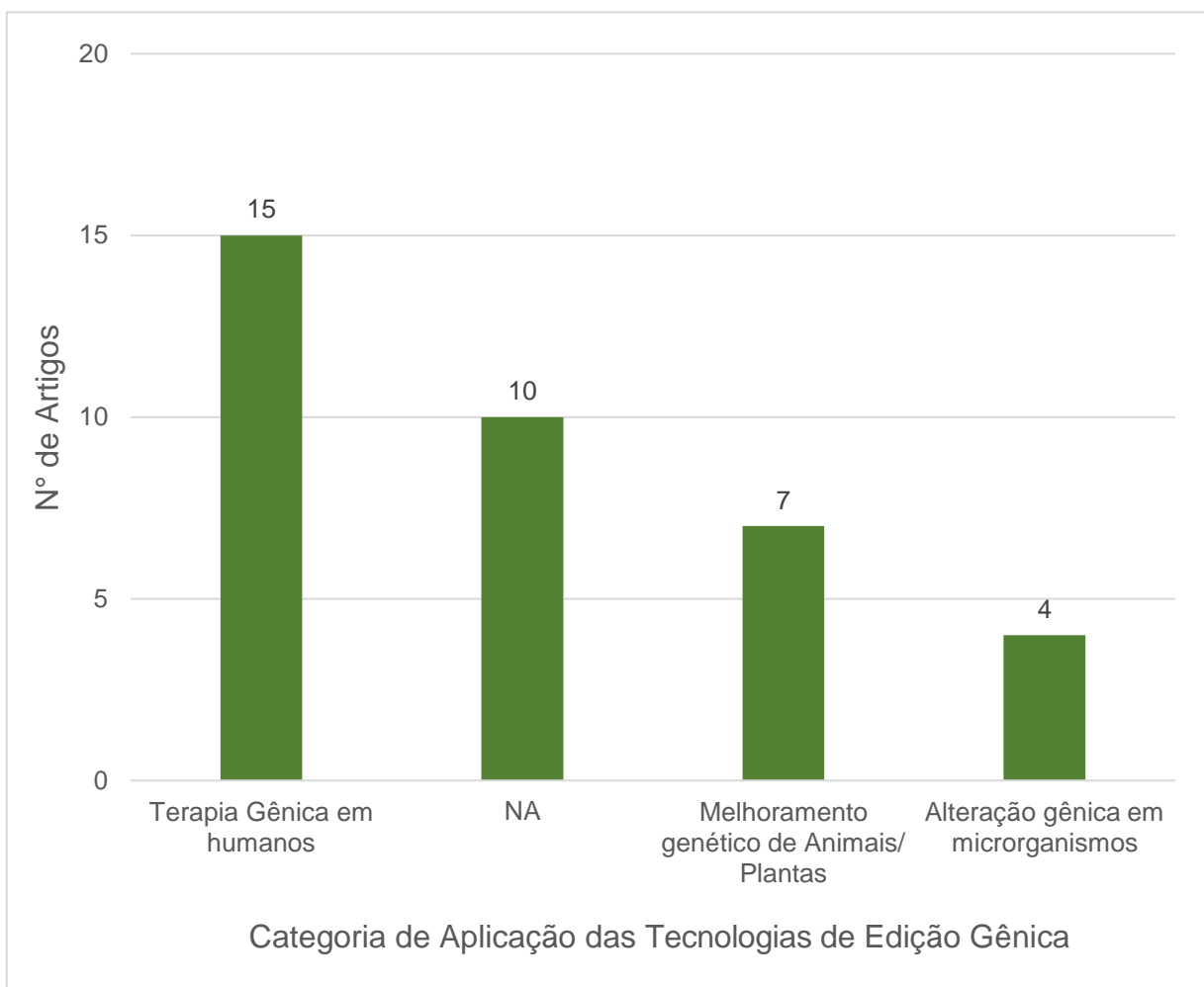
Considerando ainda, todas as tecnologias de edição do DNA investigadas nas publicações, foi possível categorizá-las de acordo com os diferentes enfoques para a aplicação das mesmas. As categorias foram:

- Terapia gênica em humanos

- Melhoramento genético de animais/ plantas
- Alteração gênica em microrganismos

Entretanto, 10 publicações não foram inseridas nas referidas categorias (“Não aplicável”), por tratarem o tema de modo genérico, ou seja, não tiveram como foco uma aplicação da tecnologia utilizada especificamente em uma dada pesquisa ou a aplicação não se encaixou em nenhuma das categorias estabelecidas. A representação das referidas categorias pode ser observada no Gráfico 3.

Gráfico 3- Relação entre o número de artigos pesquisados e as categorias de aplicação das tecnologias de Edição Gênica



Fonte: os autores Notas:

NA – Não Aplicável. Se refere às publicações que não tratam especificamente nenhuma aplicação das tecnologias referidas nesse estudo ou que não se encaixou em nenhuma das categorias estabelecidas

Os dados apresentados mostram o predomínio das categorias: “Terapia gênica em humanos” e “Melhoramento genético de animais/ plantas”. Esse resultado está coerente com a constante expansão de pesquisas relacionadas às categorias

em questão, uma vez que as tecnologias de edição são ferramentas promissoras para as referidas aplicações, devido ao potencial que apresentam para a correção de genes alterados (mutados) ou modificações sítio-específicas no DNA (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

O uso das ferramentas de edição gênica ao alcance do ser humano, fornece a possibilidade de reescrever o código genético em células doentes, o que representa um horizonte potencial para a cura de doenças genéticas, de acordo com Sganzerla e Pessini (2020). Outros estudos têm se apoiado na possibilidade de que as nucleases direcionadas possam ser projetadas para reconhecer diretamente o material genético viral, e inativar genes virais essenciais, ou para o flanqueamento de regiões gênicas que controlam a transcrição e a replicação viral (LINS, *et al.*, 2018).

De modo paralelo, o número de publicações relacionadas à categoria “Melhoramento genético de Animais/ Plantas” vai ao encontro da busca de produtores e pesquisadores, por alternativas mais eficazes para o melhoramento de plantas e animais. (KOLTUN *et al.*, 2018).

A análise do perfil dos artigos investigados nesse estudo mostrou predominância da ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9, em relação às demais, de modo que foi possível observar que essa é uma tecnologia de interesse para investigação em diferentes organismos.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou uma revisão bibliográfica sobre as tecnologias de edição: ZFN, TALEN e CRISPR-Cas9. Além de apresentar a definição de tais tecnologias, foi realizado um levantamento de publicações científicas nacionais, dos últimos 10 anos. As publicações analisadas mostraram predominância das categorias “Terapia gênica em humanos” e “Melhoramento genético de animais/ plantas” e a análise do perfil das publicações sobre o tema mostrou que a tecnologia CRISPR- Cas9, foi a mais utilizada para o desenvolvimento dos estudos recentes relacionados às referidas publicações. Ainda que as tecnologias apresentadas nesse estudo representem um potencial para a resolução de desafios na área da saúde e no melhoramento de animais e vegetais, entre outros, é fundamental que as questões éticas sejam consideradas, bem como as normas que regulamentam a aplicação de quaisquer ferramentas que possam ser utilizadas para alterações no genoma dos seres vivos.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, R. L. *et al.* A tecnologia do CRISPR-Cas9 na terapia gênica do câncer de pulmão. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, [s.l.], v. 5, n. 13, p. 27-33. 2019. Disponível em: <https://rbmc.emnuvens.com.br/rbmc/article/view/25/17>. Acesso em: 23 out. 2020.
- AREND, M. C; PEREIRA, J. O; MAROSKI, M. M. O Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s.l.], v. 108, n. 1, p. 81-83, jan. 2017. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/abc/v108n1/pt_0066-782X-abc-108-01-0081.pdf. Acesso em: 23 set. 2020.
- BAKER, M. Gene-editing nucleases. **Nature Methods**, [s.l.], v. 9, p. 23-26, jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1807>. Acesso em: 7 jun. 2020.
- BARBOSA, K. L.; CAVALCANTE, G. S. S. A biotecnologia envolvida no sistema CRISPR. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [s.l.], v. 18, n.1, p. 123-127, jan/abr. 2019. Disponível em: <https://portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/25090/19158>. Acesso em: 15 de out. 2020.
- BARROSO, A. M. A. **Expressão heteróloga e deleção da outbaína de Trypanosoma cruzi (outc) por intermédio do sistema CRISPR/ Cas9**. 2019. 132 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/132557?show=full> Acesso em: 27 out. 2020.
- BASSETT, A. R.; LIU, J.-L. CRISPR/Cas9 and genome editing in Drosophila. **Journal of Genetics and Genomics**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 7-9, jan. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24480743/>. Acesso em: 30 set. 2020.
- BATISTA, F. C. C; NUNES, C. P. CRISPR CAS9: atuais aplicações no tratamento do HIV. **Revista de Medicina de Família e Saúde Mental**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 89-94. 2019. Disponível em: <http://www.revista.unifeso.edu.br/index.php/medicinafamiliasaudemental/article/view/1609/646#>. Acesso em: 27 out. 2020.
- BOGDANOVE, A. J; SCHORNACK, S; LAHAYE, T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 394 – 401, Aug. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369526610000531>. Acesso em: 12 out. 2020.
- CAETANO, G. C. G. *et al.* Técnica CRISPR- CAS9 e sua utilização na área laboratorial. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Reserach. Res**, [s.l.], v. 25, n. 2, p. 96-99, dez. 2018. Disponível:https://www.mastereditora.com.br/periodico/20190103_214255.pdf. Acesso em: 27 out. 2020.

CARLSON, D. F. *et al.* Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. **PNAS**, [s.l.], v. 109, n. 43, p. 17382-17387, out. 2012. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/109/43/17382>. Acesso em: 30 set. 2020.

CASTRO, N. A. **Caracterização de mutantes de Trypanosoma cruzi deficientes em dipeptidil peptidase 8 e produção de anticorpos contra proteínas ligadoras de RNA (UBP1 Tc e UBP2Tc)**. 2019. 104 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, Universidade de Brasília, Brasília, 2019. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/35370/1/2019_Nat%c3%a1liaAlvesdeCastro.pdf. Acesso em: 27 out. 2020.

CHANDRAKASAN, S.; MALIK, P. Gene therapy for hemoglobinopathies: the state of the field and the future. **Hematology Oncology Clinics**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 199-216, Apr. 2014. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889858813002013?via%3Dihub>. Acesso em: 27 out. 2020.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v. 58, n. 5, p.235-263, jun. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28485537/>. Acesso em: 12 dez. 2020.

DOUDNA, J. A; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **SCIENCE**, [s.l.], v. 346, p. 1077- 1086, nov. 2014. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/346/6213/1258096>. Acesso em: 12 out. 2020.

DUARTE, M. J. D. **O gene Aire pode controlar mRNAs bem como os lncRNAs em células tímicas epiteliais medulares como evidenciado pela edição do genoma CRISPR-Cas9**. 2018. 119 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-27052019-151117/pt-br.php>. Acesso em: 01 nov. 2020.

DUPUY, A. *et al.* Targeted gene therapy of xeroderma pigmentosum cells using meganuclease and TALEN. **PLOS ONE**, [s.l.], v. 8, n. 11, p. 1-8, 2013, nov. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3827243/>. Acesso em: 1 out. 2020.

FURTADO, R. N. Edição genética; riscos e benefícios da modificação do DNA humano. **Revista Bioética**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 223-233, abr./jun. 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-80422019000200223. Acesso em: 23 abr. 2020.

FURTADO, R. N. Fundamentos ontológicos do debate sobre a seleção e edição do genoma. **Revista de Psicologia**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 111-119, maio/ago. 2020. Disponível: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-02922020000200111. Acesso em: 22 out. 2020.

GERALDO, G. R.; SILVA, S. C. C. Sistema CRISPR-Cas como ferramenta para pesquisas em diabetes: uma revisão. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2017, Maringá. **Anais [...]**, Maringá: Universidade Cesumar, 2017. p. 1-3. Disponível em: <http://rdu.unicesumar.edu.br/handle/123456789/1695>. Acesso em: 22 out. 2020.

GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. M. A. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. **Einstein**, São Paulo, v.15, n. 3, p. 369-375, jul./set. 2017. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082017000300369. Acesso em: 4 set. 2020.

GRISOLIA, C. K. Bioterrorismo e a facilidade de acesso à biotecnologia e seus insumos. **Revista Bioética**, [s.l.], v. 21, n. 2, p. 359-364, 2013. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-80422013000200020. Acesso em: 22 out. 2020.

HANSEN, P. J. Genetic variation in resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock. **Fertility and Development**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 22-30, Dec. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD14311>. Acesso em: 12 out. 2020.

HSU, P. D; LANDER, E. S; ZHANG, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, [s.l.], v. 157, n. 6, p. 1262-1278, jun. 2014. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2814%2900604-7>. Acesso em: 12 out. 2020.

JOUNG, J. K.; SANDER, J. D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 49-55, jan. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3547402/>. Acesso em: 12 out. 2020.

KIM, Y. G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, [s.l.], v. 93, n. 3, p. 1156-1160, Feb. 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC40048/pdf/pnas01507-0203.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2020.

KOLTUN, A. *et al.* Genetic improvement of horticultural crops mediated by CRISPR/Cas: a new horizon of possibilities. **Horticultura Brasileira**, [s.l.], v. 36, n. 3, p. 290-298, set. 2018. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362018000300290&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 01 out. 2020.

LANINGAN, T. M; KOPERA, H. C; SAUNDERS, T. Principles of Genetic Engineering. **Genes**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 1-21, mar. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/11/3/291>. Acesso em: 23 set. 2020.

LAUXEN, E. C. U; GOLDIM, J. R. Intervenções genéticas em seres humanos: aspectos éticos e jurídicos. **Barbarói**, Santa Cruz do Sul, n. 45, p. 203-226, jul./dez. 2015. Disponível em: <https://online.unisc.br/seer/index.php/barbaroi/article/view/6861>. Acesso em: 28 out.

2020.

LINDEN, R. Terapia Gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, [s.l.], v. 24, n. 70, p. 32-68, 2010. Disponível: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300004&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 27 out. 2020.

LINS, A. A.; GONÇALVES, F. B. Edição genética associada ao uso da nova técnica CRISPR/Cas9, ferramenta de defesa utilizada pelas bactérias contra DNA invasor. **Revista Eletrônica Científica UERGS**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 358-367, jan. 2018. Disponível: <http://revista.uergs.edu.br/index.php/revuergs/article/view/1048/324>. Acesso em: 10 nov. 2020.

LISTIK, E.; CARMO, A. C. V. As características dos mecanismos e sistemas de edição gênica. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, [s.l.], n. 10, p. 1-14, abr/jun. 2016. Disponível em: http://revista.oswaldocruz.br/Edicao_10/Artigos. Acesso em: 7 nov. 2020.

LUSTOSA, A. L. P. **Potencial do uso de terapia genética no tratamento de doenças**. 2019. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade de Ciência da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília. Disponível em: <https://repositorio.uniceub.br/jspui/bitstream/prefix/13650/1/21550143.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2020.

MENCK, C. F. M.; VENTURA, A. M. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. **Revista USP**, [s.l.], n. 75, p. 50-61, set./nov. 2007. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revusp/article/view/13620/15438>. Acesso em: 10 nov. 2020.

MICHELS, L. F. N. **A revolução da edição genômica com o sistema CRISPR-CAS**. 2017. 72 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. Disponível em: <http://repositorio.unesc.net/bitstream/1/5315/1/LUIZ%20FERNANDO%20NASCIMENTO%20MICHELS.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020.

MORAIS, C. C. P. R. **Eficácia do sistema CRISPR/Cas na edição genômica do gene de síndrome de WISKOTT-ALDRICH**. 2017. 106 p. Dissertação (Mestrado em pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher) – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, Fundação Oswaldo Cruz, 2017. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/25230/2/carla_morais_iff_mest_2017.pdf. Acesso em: 01 nov. 2020.

MOTA, C. M. **Manipulação gênica do protozoário Neospora caninum como ferramenta para o estudo das interações parasito-hospedeiro**. 2016. 116 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Uberlândia, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17784/1/ManipulacaoGenicaProtozoario.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020.

NEMUDRYI, A. A. *et al.* TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: tools of discovery. **Acta Naturae**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 19-40, Jul./Sep. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4207558/>. Acesso em: 12 jun. 2020.

NICHOLSON, S. A.; PEPPER, M. S. CRISPR-Cas: revolutionising genome engineering. **South African Medical Journal**, [s.l.], v. 106, n. 9, p. 870- 871, Sep. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27601107/>. Acesso em: 27 set. 2020.

NINIS, A. B. **Complexidade, manipulação genética e biocapitalismo: compreensão das interações de engenharia genética na sociedade de risco.** 2011. 245 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável) - Centro de Desenvolvimento Sustentável, Brasília, 2011. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/9445/1/2011_AlessandraBortoniNinis.pdf. Acesso em: 27 out. 2020.

NUNES, F. B. Novas estratégias de reparação gênica. 2014. 24 p. Tese (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014. Disponível em: <https://eg.uc.pt/handle/10316/89144>. Acesso em: 27 out. 2020.

OLIVEIRA, F. F. *et al.* Edição Gênica de cafeeiro via CRISPR-Cas9: clonagem de sgRNAs de genes da biossíntese de cafeína. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 10., 2019, Vitória. **Anais [...]**, Vitória: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2019. Disponível em: <http://www.consorcioquesquisacafe.com.br/ojs/index.php/SimposioCafe2019/article/view/110/61#>. Acesso em: 8 nov. 2020.

OLIVEIRA, T. C. **Metodologias para a geração de mutantes funcionais em *Metarhizium anisopliae*: CRISPR/Cas9 e RNAi.** 2016. 196 p. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/150695/001008111.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 01 nov. 2020.

OLIVEIRA, V. C. **Edição do gene TFAM pela engenharia CRISPR Cas9 em modelo bovino.** 2016. 81 p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-20032017-162120/publico/VANESSA_CRISTINA_DE_OLIVEIRA_corrigena.pdf. Acesso em: 1 nov. 2020.

ONGARATTO, F. L. **Estratégias para o aumento na eficiência de produção de suínos geneticamente modificados.** 2019. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias na área de concentração em Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/196387>. Acesso em: 30 set. 2020.

OSBORN, M. J. *et al.* TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 1151-1159, Jun. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3677309/> Acesso em: 1 out. 2020.

OTERO-ARROYO, R.; HERNANDEZ- HERREIRA, D.; P´REZ, J. Produccion de embriones transgênicos bovinos por microinyencion de um vector lentiviral pre y pos fertilización. **Rev. Bio. Agro.**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 64-73, Ene/Jun. 2020. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612020000100064&lng=es&nrm=iso&tlng=es. Acesso em: 14 nov. 2020.

PAIXÃO, L. E. **Terapia Gênica no tratamento de doenças**. 2019. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. Disponível em: <https://www.monografias.ufop.br/handle/35400000/1836>. Acesso em: 14 nov. 2020.

PINHO, R. M. **Uso do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência e de TAL effector nucleases para aumento de eventos gene targeting em células de cão**. 2014. 77 p. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-13012015-102643/publico/RAQUEL_MELLO_PINHO_Original.pdf. Acesso em: 1 nov. 2020.

PINHO, T. F. **Desafios para a regulamentação das novas tecnologias no Brasil: uma abordagem a partir das Cripr-cas9 para edição de genes**. 2018. 68 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Direito) - Faculdade de Direito, Centro Universitário de Brasília, 2019. Disponível: <https://repositorio.uniceub.br/jspui/handle/235/12554>. Acesso em: 27 out. 2020.

QUADROS, O. F. *et al.* Edição dirigida do genoma CRISPR/Cas9: uma nova tecnologia para o melhoramento de plantas. **Incaper em Revista**, [s.l.], v.9, p. 6-15, jan/dez. 2018. Disponível em: <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/123456789/3369/1/edicaodigerid adogenomaporcrispr-ventura.pdf>. Acesso em: 23 set. 2020.

ROHREGGER, R; SGANZERLA, A; SIMÃO-SILVA, D. P. Biologia sintética e manipulação genética: riscos, promessas e responsabilidades. **Ambiente e Sociedade**, [s.l.], v. 23, p. 1- 17, ago. 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1414-753X2020000100324&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 27 out. 2020.

SÁNCHEZ-LEÓN, S. *et al.* Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. **Plant Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 902-910, Apr. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5867031/>. Acesso em: 23 set. 2020.

SGANZERLA, A; PESSINI, L. Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas. **Saúde Debate**, [s.l.], v. 44, n. 125, p. 527-540, abr./jun. 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-

11042020000200527&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 27 set. 2020.

SOKOLOWSKEI, D. **Mecanismos e aplicações de nucleases na edição de genomas**. 2019. 26 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina) - Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília.

SUN, N.; ZHAO, H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], v. 110, n. 7, p.1811-1821, Jul. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23508559/>. Acesso em: 22 de out. 2020.

TOBITA, T; GUZMAN-LEPE, J; L'HORTET, A. C. From hacking the human genome to editing organs. **Organogenesis**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 173-182, Oct/Dec. 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476278.2015.1120047?scroll=top&needAccess=true>. Acesso em: 1 set. 2020.

URNOV, F. D. *et al.* Genome editing with engineered zinc finger nucleases. **NATURE**, [s.l.], v. 11, p. 636-646, Sep. 2010. Disponível em: nature.com/articles/nrg2842. Acesso em: 12 out. 2020.

VASCONCELOS, M. J. V; FIGUEIREDO, J. E. F. Edição de Genoma com Nuclease "Zinc Finger". **Documentos**, Sete Lagoas, n. 201, p. 1-36, out. 2016. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1059977/1/doc201.pdf> Acesso em: 27 out. 2020.

VASCONCELOS, M. J. V; FIGUEIREDO, J. E. F. TALEN uma ferramenta na Edição de Genomas. **Documentos**, Sete Lagoas, n. 180, p 1-22, dez. 2015. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1037915>. Acesso em: 27 out. 2020.

VASCONCELOS, M. J. V; FIGUEIREDO, J. E. F. Tecnologia CRISPR-Cas para edição genômica. **Documentos**, Sete Lagoas, n. 197, p 1-39, dez. 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/149707/1/doc-197.pdf> Acesso em: 27 out. 2020.

VIVANCO, C. R. *et al.* CRISPR- CAS9: aspectos bioéticos e normativos do método. **Revista Brasileira de Bioética**, [s.l.], v. 14, p. 76-77, 2018. Disponível em: <https://periodicos.unb.br/index.php/rbb/article/view/24733/21911>. Acesso em: 27 de out. 2020.

VOLOBUEVA, A. S.; OREKHOV, A. N.; DEYKIN, A. V. An update on the tools for creating transgenic animal models of human diseases – focus on atherosclerosis. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, [s.l.], v. 52, n. 5, Apr. 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2019000500301&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 29 de set. 2020.