



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Willian Bonner Lopes de Almeida

CRISPR/Cas9: atualizações, limitações e expectativas

Florianópolis

2024

Willian Bonner Lopes de Almeida

CRISPR/Cas9: atualizações, limitações e expectativas

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Hernan Francisco Terenzi

Florianópolis

2024

Lopes de Almeida, Willian Bonner
CRISPR/Cas9: atualizações, limitações e expectativas /
Willian Bonner Lopes de Almeida ; orientador, Hernan
Francisco Terenzi, 2024.
52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. CRISPR/Cas9. 3. Edição genética. I.
Terenzi, Hernan Francisco. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Willian Bonner Lopes de Almeida

CRISPR/Cas9: atualizações, limitações e expectativas

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutico e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 05 de julho de 2024.

Prof.^a Dr^a Christiane Meyre Silva Bittencour
Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof.^a Dr^a. Ziliani da Silva Buss
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Luciano Soares
Universidade Federal de Santa Catarina

Orientador

Prof. Dr. Hernán Francisco Terénzi, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar meu sincero agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram para minha construção de vida. Agradeço imensamente à minha família, aos amigos que sempre me apoiaram e aos professores que compartilharam seus conhecimentos ao longo dessa jornada acadêmica.

Aos meus pais, Washington e Rosanira, por todo amor incondicional, apoio e incentivo desde o início de minha existência, sou imensamente grato.

A meu irmão e minha cunhada, Hudsson e Manuelle, mesmo nos momentos de implicância, obrigado por estarem sempre presente e ser parte importante da minha vida.

A minha supervisora de estágio da décima fase, Mariane Rotta, que me demonstrou empiricamente o conceito de ser um profissional farmacêutico.

Em especial, gostaria de agradecer ao meu orientador, Hernan Francisco Terenzi, por ter me apresentado o tema e ter me aceitado como orientador, pela sua paciência e incentivo durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Seu apoio foi fundamental para que eu pudesse concluir esta etapa com sucesso.

À minha banca examinadora, composta por Ziliani da Silva Buss e Luciano Soares, agradeço pela avaliação cuidadosa e pelos comentários construtivos que contribuíram significativamente para a qualidade deste trabalho.

À Professora Lílian Sibelle Campos Bernardes, mesmo não podendo estar presente, agradeço pelo interesse em participar da minha banca.

Ao meu melhor amigo, Nilo Douglas Bezerra da Silva Xavier, pela companhia e pelo suporte incondicional ao longo de todos esses anos, muito obrigado.

E, por fim, um agradecimento especial ao magnânimo técnico de laboratório, Christopher Nedel Christofolletti, cuja amizade e ensinamentos nos meus momentos de monitoria foi essencial para o desenvolvimento do meu ser.

A todos vocês, meu profundo agradecimento por fazerem parte desta conquista. Suas contribuições foram fundamentais para o meu sucesso e para esse momento indescritível da minha vida.

Não consigo contemplar a todos, mas todos que conheço são extremamente especiais para mim.

*"A realidade desigual é a única coisa que
todos recebem por igual"*
(Megumi Fushiguro)

RESUMO

A tecnologia de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR)/ e sua proteína 9 associada a CRISPR (Cas9) é uma ferramenta de engenharia genética que permite editar o DNA de células vivas a partir da indução do mecanismo de reparo genético. Atualmente desenvolveram, e está sendo desenvolvido, diversas metodologias de tratamento, de diagnóstico terapêutico e de pesquisas clínicas baseados em CRISPR/Cas9 que vem revolucionando a terapêutica de inúmeras doenças. Todavia, essa metodologia ainda apresenta uma pluralidade de empecilhos como efeitos fora do alvo, limitação de alvo e discussões éticas que dificultam o seu processo de implementação em tratamentos, identificação de patologias como também suas caracterizações fisiológicas. Sendo assim, este artigo busca revisar as principais atualizações referente a CRISPR/Cas9 como suas implicações e seus propósitos, da mesma forma, introduz-se resumidamente um contexto histórico referente a progressão das tecnologias de engenharia genética e de suas circunstâncias de desenvolvimento, assim, discute-se suas limitações e expectativas essenciais para o aperfeiçoamento e avanço científico como também proporciona um propósito de evidenciar a necessidade de uma maior atenção referente às terapias moleculares para conceber um contexto brasileiro efetivo.

Palavras-chave: Edição genética; Terapêutica; Tratamento; Terapia gênica.

ABSTRACT

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) technology and its CRISPR-associated protein 9 (Cas9) is a genetic engineering tool that allows the editing of the DNA of living cells by inducing the genetic repair mechanism. Currently, various treatment methodologies, therapeutic diagnostics and clinical research based on CRISPR/Cas9 have been developed and are being developed, revolutionizing the treatment of countless diseases. However, this methodology still has a number of obstacles such as off-target effects, target limitation and ethical discussions that hinder its implementation in treatments, identification of pathologies as well as their physiological characterization. Therefore, this article reviews the main updates regarding CRISPR/Cas9 as well as its implications and purposes. Likewise, it briefly introduces a historical context regarding the progression of genetic engineering technologies and their development circumstances, thus discussing their limitations and essential expectations for scientific improvement and advancement as well as providing a purpose to highlight the need for greater attention regarding molecular therapies to conceive an effective Brazilian context.

Keywords: Gene editing; Therapeutics; Treatment; Gene therapy;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – História Logística de CRISPR/Cas9	15
Figura 2 – Número de publicações referentes a CRISPR na Pubmed.....	16
Figura 3 - Conquistas clínicas de CRISPR-Cas9	18
Figura 4 – Preço de mercado da empresa CRISPR Therapeutics	22
Figura 5 – Classificação dos Sistemas CRISPR	24
Figura 6 – Ilustração das funções de CRISPR formando DSBs e SSB.....	30
Figura 7 – Representação da atividade da CBE e da ABE	32
Figura 8 – Representação da atividade dos editores de primers	34
Figura 9 – Representação esquemática das tecnologias de edição epigenômicas. .	35
Figura 10 – Atualização de ensaios clínicos no ano de 2024.....	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comparação das 3 principais tecnologias de edição genética	17
Quadro 2 – Comparação dos tipos de tecnologias CRISPR	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cas-9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	<i>CRISPR RNA</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	<i>Double-stranded break</i>
HDR	<i>Homology-directed repair</i>
INDE	<i>Insertion-deletion</i>
MegNs	Meganucleases
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
PAMs	<i>Protospacer adjacent motifs</i>
SpCas9	Proteína Cas de <i>Streptococcus pyogenes</i>
TALE	<i>Transcription activator-like effector</i>
TALENs	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
ZFNs	<i>Zinc finger nucleases</i>
ZFP	<i>Zinc-Finger Protein</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Idealização das tecnologias de engenharia genética	7
1.2	progressão histórica da descoberta do dna	7
1.3	Progressão histórica das tecnologias de edição genética	9
1.3.1	Descoberta das meganucleases	9
1.3.2	Surgimento das nucleases dedo de zinco	9
1.3.3	Surgimento das Transcription activator-like effector nuclease	11
1.3.4	Surgimento de CRISPR/Cas9	11
2	OBJETIVO GERAL	19
2.1	Objetivos específicos	19
3	MÉTODO	20
4	DESENVOLVIMENTO	21
4.1	ATUALIDADEs	21
4.2	Classificação dos Sistemas CRISPR	23
4.3	TECNOLOGIAS CRISPR	26
4.3.1	Edição de genes de nucleases padrão	26
4.3.2	Edição de base	30
4.3.3	Edição de Prime	33
4.3.4	Edição do epigenoma	34
5	Conclusões, Perspectivas, Expectativa e prospectiva	36
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 IDEALIZAÇÃO DAS TECNOLOGIAS DE ENGENHARIA GENÉTICA

A princípio, acredita-se que a tecnologia de edição genética desempenhará um papel crucial no controle e prevenção de doenças a nível genético no futuro (LI et al., 2023). Numerosas doenças como talassemia, anemia falciforme e entre outras, especialmente as genéticas resultantes de mutações em genes específicos, estão associadas a modificações na expressão gênica no organismo (MANGHWAR et al., 2019). Ademais, as técnicas de edição genética que foram sendo modificadas e substituídas ao longo do tempo em decorrência de suas limitações, principalmente em relação a questões de eficiência e de economia, são as ferramentas ideais para o tratamento de doenças hereditárias, sendo a CRISPR/Cas9 a última geração (LI; ZHENG, 2023). Dessa forma, entende-se que a tecnologia terapêutica do futuro será aquela capaz de corrigir mutações genéticas prejudiciais de forma permanente, ou inativar com grande precisão e eficácia os genes responsáveis por essas doenças. Entretanto, ainda é necessário superar diversas barreiras das técnicas de edição genômica, a exemplo dos efeitos fora do alvo, biocompatibilidade em relação a entrega direcionada e inúmeras outras incongruências. Nesse contexto, vale mencionar a evolução histórica e o desenvolvimento até a ascensão da CRISPR (LI et al., 2023).

1.2 PROGRESSÃO HISTÓRICA DA DESCOBERTA DO DNA

Em 1869, Friedrich Miescher realizou o isolamento do Ácido desoxirribonucleico (DNA) pela primeira vez, inicialmente denominado de nucleína. Empregando seus procedimentos e buscando aprimorar as condições de isolamento, Miescher observou que, embora compartilhasse características similares às proteínas, a nova substância não se classificava como uma proteína. Isso também evidenciou a distinção dessa substância em relação aos lipídios e carboidratos, além de sua localização específica nos núcleos de células. Importante destacar que, em 1889, Richard Altmann rebatizou a "nucleína" como "ácido nucleico" (DAHM, 2005; HALL; SANKARAN, 2021).

Em 1928, Frederick Griffith realizou experimentos com ratos nos quais ele posteriormente identificou o fenômeno que seria chamado de "princípio da transformação". Nesse experimento, Griffith combinou bactérias vivas não patogênicas com uma variante virulenta que havia sido inativada pelo calor. Subsequentemente, inoculou a mistura, levando os camundongos a desenvolver pneumonia e perecerem. Além disso, ele conseguiu isolar colônias da linhagem virulenta a partir desses ratos, levando à conclusão de que a cepa não patogênica havia se convertido na forma virulenta devido à inativação pelo calor da cepa virulenta original (GRIFFITH, 1928; RANDHAWA; SENGAR, 2021).

Em relação ao experimento dos cientistas Griffith, Dawson e Sai, estes realizaram a confirmação *in vitro*, e posteriormente James L. Alloway continuou as investigações (SIA; DAWSON, 1931). James conseguiu lisar a cepa virulenta de bactérias por meio da filtração da substância intracelular, resultando em um extrato isento de células. Esse lisado levantou a suposição de que algo presente no extrato livre das células desencadeava a conversão da cepa para uma forma virulenta. Sendo assim, Alloway denominou esse fenômeno de "princípio transformador" (ALLOWAY, 1932; RANDHAWA; SENGAR, 2021).

Através disso, Avery, MacLeod e McCarty demonstram que o "princípio transformador" de Griffith, no qual passava essa informação genética, não era uma proteína, mas sim DNA, dessa forma, propôs-se que o DNA pode funcionar como o material hereditário (AVERY; MACLEOD; MCCARTY, 1944; RANDHAWA; SENGAR, 2021).

Em 1953, os pesquisadores Rosalind Franklin e Maurice Wilkins empregaram análises de raios-X para evidenciar que o DNA possui uma estrutura helicoidal que se repete de forma regular (DAHM, 2005).

Neste mesmo ano, com o auxílio das informações fornecidas por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins, James Watson e Francis Crick conseguiram desvendar a estrutura molecular do DNA, que se apresenta como uma dupla hélice. Posto isso, eles detalharam como as bases nitrogenadas adenina formam pares com a timina, e a citosina se associa com a guanina por meio de ligações de hidrogênio (COBB; COMFORT, 2023; DAHM, 2005).

Salienta-se que, em 1962, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi concedido apenas a James Watson, Francis Crick e Maurice Wilkins pelas contribuições para a descoberta da estrutura do DNA. Rosalind Franklin, que

desempenhou um papel crucial nessa conquista, não foi devidamente homenageada devido ao seu falecimento antes da cerimônia de premiação (COBB; COMFORT, 2023; DAHM, 2005).

1.3 PROGRESSÃO HISTÓRICA DAS TECNOLOGIAS DE EDIÇÃO GENÉTICA

1.3.1 Descoberta das meganucleases

As meganucleases (MegNs) representam uma categoria de endonucleases que ocorrem de forma natural e são encontradas em todas as formas de vida microbiana (SILVA et al., 2011). Foram identificadas primeiramente em leveduras no ano de 1985 (TRÖDER; ZEVNIK, 2022) sendo responsável por cortar o DNA de fita dupla em locais de reconhecimento específicos que consistem em 14 a 40 pares de bases, dessa forma podendo ativar o mecanismo de reparo endógeno genético (KHALIL, 2020; TRÖDER; ZEVNIK, 2022). Sendo assim, a primeira tecnologia de edição de genes baseadas em nucleases a ser desenvolvida utilizou a MegN I-SceI da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (GALETTO; DUCHATEAU; PÂQUES, 2009; RANDHAWA; SENGAR, 2021). Embora haja uma grande quantidade de MegNs de ocorrência natural, a principal restrição está relacionada a sua sequência de reconhecimento predefinida, o que limitou significativamente a seleção de locais alvo e sua aplicação terapêutica (TRÖDER; ZEVNIK, 2022).

1.3.2 Surgimento das nucleases dedo de zinco

A tecnologia de nucleases dedo de zinco (ZFNs) se originou após a descoberta da interação entre proteínas e DNA, bem como o conceito de DNA recombinante. No final dos anos 1960, Werner Arber, Hamilton Smith e Daniel Nathans identificaram e utilizaram as enzimas de restrição para realizar cortes específicos no DNA, abrindo caminho para a manipulação genética (DAHM, 2005; KHALIL, 2020). Além disso, em 1972, Paul Berg empregou as enzimas de restrição para criar o primeiro DNA recombinante (DAHM, 2005). Esses eventos, portanto, marcaram o início da capacidade direta de manipulação do material genético, permitindo que os cientistas cortassem e recombinassem segmentos específicos de

DNA, dando origem à primeira nuclease programável para fins de edição genética (TRÖDER; ZEVNIK, 2022).

Destaca-se que a ZFN consiste em uma enzima de restrição, inicialmente identificada, em 1985, como parte de um fator de transcrição encontrado nos ovócitos de rã e na endonuclease FokI (TRÖDER; ZEVNIK, 2022). Somente em 1996, os cientistas fusionaram o domínio de endonuclease da enzima de restrição bacteriana FokI com os domínios de ligação ao DNA com a proteína dedo de zinco (ZFP). Como resultado dessa fusão, eles conseguiram criar uma proteína que é capaz de se unir ao DNA em um local específico por meio da ZFP, e efetuar cortes no DNA por meio da FokI (TRÖDER; ZEVNIK, 2022), originando assim a nuclease programável conhecida como ZFNs (KHALIL, 2020; RANDHAWA; SENGAR, 2021; TRÖDER; ZEVNIK, 2022).

Mediante a programação dessas nucleases, foi viável induzir quebras de fita dupla (DSBs) no DNA para estimular o reparo genético endógeno, tanto através da via de Junção final não homóloga (NHEJ), quanto da via de reparo dirigido por homologia (HDR) (LI et al., 2023). É importante observar que, se um modelo de reparo for disponibilizado durante a ocorrência da DSB, torna-se possível efetuar o reparo por meio da HDR. Portanto, as ZFNs são as responsáveis por originar os primeiros ratos knockout (RANDHAWA; SENGAR, 2021).

Além disso, é importante compreender que o reconhecimento da sequência alvo e a precisão das ZFNs dependem dos elementos da sequência de aminoácidos de cada dedo, do número de dedos presentes e da interação com o domínio da nuclease (LI et al., 2023). Salienta-se que ZFNs que consistem em 3 a 6 dedos têm a capacidade de especificar entre 18 e 36 pares de bases de DNA em cada ponto de clivagem, melhorando assim a orientação de sequências específicas no genoma humano (LI et al., 2023). No entanto, é relevante notar que a afinidade das ZFNs pela sequência alvo não é absoluta, e a ZFP pode se ligar a outros locais no genoma que possuam sequências semelhantes à sequência alvo (KHALIL, 2020). Também é observado que as vias de reparo por junções homólogas propiciam erros, resultando, de forma frequente, em inserções ou deleções (INDELS), em vez de reparo por recombinação homóloga direta (HDR) (TRÖDER; ZEVNIK, 2022).

Assim, as ZFNs representam enzimas de restrição criadas sob medida para efetuar edições precisas no genoma em locais específicos (RANDHAWA; SENGAR, 2021). No entanto, devido ao seu custo elevado e ao processo demorado, a tecnologia

ZFN não estava ao alcance da maioria dos laboratórios de biologia molecular convencionais naquela época (KHALIL, 2020).

1.3.3 Surgimento das Transcription activator-like effector nuclease

Em 2010, foi descoberto uma proteína capaz de ligar-se ao DNA de forma mais fácil e flexível do que os ZFP. Através dos estudos em bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*, identificadas como *campestris pv. Vesicatoria*, se evidenciou as proteínas Transcription Activator Like Effectors (TALE), as quais possuíam a capacidade de ligação ao DNA, dessa forma, manipulando a expressão gênica da célula vegetal a seu favor (CHRISTIAN et al., 2010; LI et al., 2023; MILLER et al., 2011; RANDHAWA; SENGAR, 2021; TRÖDER; ZEVNIK, 2022).

Da mesma forma como as ZFP, as TALEs (Transcription Activator-Like Effectors) também são ligadas a um domínio da enzima de restrição FokI, formando a transcription activator-like effector nucleases (TALENs), ou seja, conseguindo ocasionar quebras de fita dupla (DSBs) (CHRISTIAN et al., 2010; KHALIL, 2020; WANG; LA RUSSA; QI, 2016; ZHENG et al., 2023). Todavia, observa-se uma notória diferença de especificidade entre as ZFNs e as TALENs, pois cada repetição TALE é composta por 33-35 aminoácidos para distinguir um único par de bases de DNA, em contrapartida as ZFNs reconhecem 3 (KHALIL, 2020; ZHENG et al., 2023). Sendo assim, as TALENs tornaram-se uma tecnologia mais acessível devido ao seu tempo de otimização, custo e especificidade. Entretanto, por possuírem um tamanho maior que as ZFNs, em torno de 3kb, a sua aplicação é limitada pela problemática da entrega e vetorização (TRÖDER; ZEVNIK, 2022; ZHENG et al., 2023).

1.3.4 Surgimento de CRISPR/Cas9

Entende-se que essas ferramentas supracitadas funcionam por meio de interações proteína-DNA, ou seja, é necessário um arcabouço de engenharia para clonar novas proteínas e possibilitar um novo local alvo (WANG; LA RUSSA; QI, 2016). Sendo assim, CRISPR é uma família de sequências de DNA pertencentes a certos tipos de bactérias, na qual os cientistas utilizam um RNA sintético e uma

proteína Cas como componente de reconhecimento de DNA alvo (RANDHAWA; SENGAR, 2021; YANG; CHEN, 2020).

As repetições CRISPR, abreviadas como "CRISPR" (do inglês, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), foram primeiramente identificadas em sequências de DNA da bactéria *Escherichia coli*, em 1987, por Ishino e colaboradores da Universidade de Osaka, Japão, durante a pesquisa para sequenciar o gene *iap* (isoenzima da fosfatase alcalina) da mesma bactéria (ISHINO et al., 1987). A descoberta dessas repetições ocorreu de maneira acidental, quando uma sequência de repetição peculiar foi observada em sequência do gene que codifica a isoenzima fosfatase alcalina, responsável pela conversão da aminopeptidase nas *Escherichia coli* (HAN; SHE, 2017; LAU; DAVIE, 2017).

A sequência de repetição consiste em cinco repetições de 29 nucleotídeos idênticas, intercaladas por sequências únicas de 32 nucleotídeos, fazendo parte do locus com 12 repetições agrupadas no sistema CRISPR-Cas da *E. coli* (LAU; DAVIE, 2017). Essas sequências repetitivas semelhantes foram identificadas em outras cepas de *E. coli* e bactérias intimamente relacionadas, como *Shigella dysenteriae* e *Salmonella enterica* (HAN; SHE, 2017). Essa diversidade nos loci CRISPR sugeriu uma prevalência desse elemento em bactérias, juntamente com uma extrema diversidade nas unidades espaçadoras de repetição, mesmo em cepas muito próximas (GOSTIMSKAYA, 2022). Na época da descoberta, o sequenciamento desses fragmentos de DNA era um processo demorado, e seus descobridores não compreendiam sua origem e significado na célula bacteriana (GOSTIMSKAYA, 2022). Dessa forma, a natureza exata dessas repetições permaneceu desconhecida por mais de uma década, até que avanços nas tecnologias de sequenciamento possibilitaram a decodificação de muitos outros genomas, revelando a peculiaridade das sequências repetitivas (GOSTIMSKAYA, 2022; HAN; SHE, 2017; TRÖDER; ZEVNIK, 2022).

A descoberta dos loci CRISPR começou com Francisco Mojica, da Universidade de Alicante (Espanha), que, em 1993, encontrou repetições nas sequências de DNA da *Haloflex mediterranei* que é uma espécie do gênero *Archea* (GOSTIMSKAYA, 2022; MOJICA; JUEZ; RODRIGUEZ-VALERA, 1993). Sabe-se que esses pesquisadores identificaram uma longa sequência de DNA, contendo repetições regularmente espaçadas neste genoma das *Archea*, observando que essas repetições não apresentavam semelhança de sequência com aquelas em *E. coli* (LAU; DAVIE, 2017).

Sendo assim, Mojica e colaboradores observaram que essas repetições eram amplamente presentes em diversas bactérias e quase todas as arqueias, sugerindo um papel crucial para esses elementos (HAN; SHE, 2017; LAU; DAVIE, 2017; MOJICA et al., 2005; RANDHAWA; SENGAR, 2021). Além disso, foi descoberto que os DNAs invasores são identificados pela presença de um pequeno filamento de DNA, por meio do qual ocorre o reconhecimento de elementos exógenos. Portanto, as sequências de DNA são reconhecidas por motivos adjacentes ao protoespaçador (PAM), que se averiguou, posteriormente, serem responsável pela diferenciação entre o sistema CRISPR, reconhecendo o "próprio" (self) e o "não próprio" (non-self) (RANDHAWA; SENGAR, 2021; TRÖDER; ZEVNIK, 2022).

Outras pesquisas realizadas por Bolotin, Pourcel e colaboradores, evidenciaram que as sequências de espaçadores são iguais às encontradas nos genomas de fagos e outros elementos genéticos exógenos (BOLOTIN et al., 2005; HAN; SHE, 2017; MOJICA et al., 2005; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005). Dessa forma, essas descobertas preconizaram que CRISPR fazia parte do sistema imunológico de bactérias *archaea* (MOJICA et al., 2005). Essa descoberta indicou a importância funcional dos loci CRISPR e impulsionou pesquisas subsequentes sobre esses elementos.

O termo "Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Interespaçadas Agrupadas (CRISPR)" foi cunhado por Jansen e colaboradores, em 2002, e logo adotado pela comunidade científica, por refletir melhor as características estruturais dessas sequências (JANSEN et al., 2002; MOJICA et al., 2005; TRÖDER; ZEVNIK, 2022). Jansen e sua equipe também observaram que os loci CRISPR estavam intimamente ligados a um conjunto de genes conservados, subsequentemente chamados de genes associados a CRISPR ou Cas, que codificam proteínas do tipo endonucleases naturais (TRÖDER; ZEVNIK, 2022). A Cas estão ausentes em bactérias que não possuíam quaisquer elementos CRISPR (HAN; SHE, 2017; JANSEN et al., 2002).

Em 2006, foram reconhecidas mais de 50 famílias de proteínas Cas, que compõem diversos subtipos de sistemas CRISPR-Cas, aumentando o escopo de oportunidades (HAN; SHE, 2017).

Destaca-se que apenas em 2007 estas previsões imunológicas foram então testadas experimentalmente, revelando características sem precedentes para um sistema procariótico (GOSTIMSKAYA, 2022; TRÖDER; ZEVNIK, 2022). Rodolphe

Barrangou e colaboradores trabalharam com culturas de iogurte da bactéria *Streptococcus thermophilus* e demonstraram que o sistema CRISPR-Cas fornece uma imunidade antiviral guiada por RNA (BARRANGOU et al., 2007; GOSTIMSKAYA, 2022; TRÖDER; ZEVNIK, 2022).

Os clones bacterianos selecionados para resistir a fagos demonstraram aquisição de sequências CRISPR, em contraste com aqueles não infectados, ou seja, as bactérias infectadas incorporaram espaçadores derivados de fagos que, por sua vez, direcionam a proteína Cas para o genoma dos invasores, onde cortam com precisão o DNA do fago, demonstrando empiricamente o modelo de interferência de DNA guiado por RNA (BARRANGOU et al., 2007; BOLOTIN et al., 2005; GOSTIMSKAYA, 2022; HAN; SHE, 2017; MOJICA et al., 2005; POURCEL; SALVIGNOL; VERGNAUD, 2005; TRÖDER; ZEVNIK, 2022).

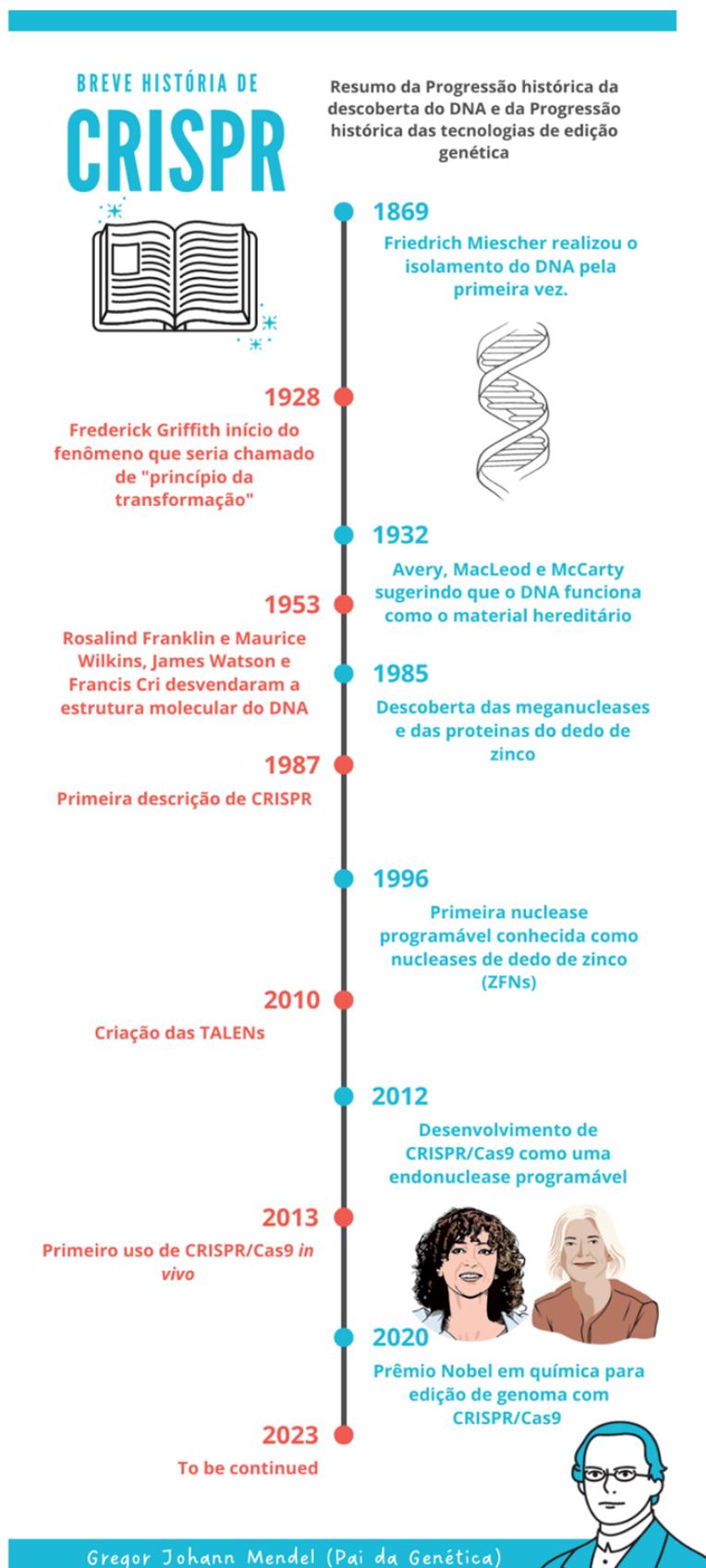
O número de sequências CRISPR presentes está fortemente associado ao nível de resistência observado na cepa microbiana, e a imunidade é obtida após a exposição a elementos genéticos invasores (HAN; SHE, 2017). Portanto, o CRISPR-Cas codifica um sistema imunológico adaptativo semelhante à resposta imune adaptativa dos mamíferos (BARRANGOU et al., 2007; RANDHAWA; SENGAR, 2021; TRÖDER; ZEVNIK, 2022).

A investigação deste sistema CRISPR-Cas “simplista” abriu o caminho para o desenvolvimento da tecnologia CRISPR/Cas9. Dessa forma, foi revelado que somente uma proteína Cas, nesse caso a Cas9, é necessária para a interferência no DNA (HAN; SHE, 2017).

Portanto, devido ao seu mecanismo de ação, entende-se que os DNAs invasores são detectados por meio de PAMs correspondentes. Consequentemente, interpreta-se que qualquer sequência diretamente adjacente a esse PAM pode ser reprogramada como um local alvo para direcionamento específico do DNA pelo sistema CRISPR-Cas9.

Através da figura 1 é possível observar os principais eventos históricos em ordem cronológica que impactaram para o desenvolvimento e evolução científica nessa área.

Figura 1 – História Logística de CRISPR/Cas9

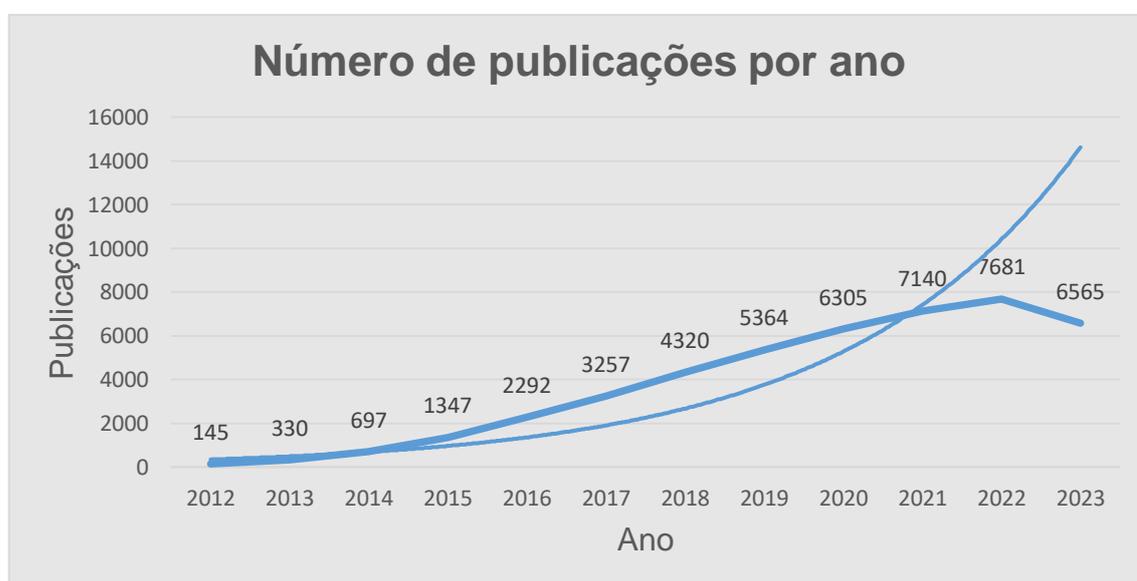


Legenda: No ano de 2020, no lado esquerdo está a microbiologista francesa Emmanuelle Charpentier e na direita a bioquímica e bióloga molecular Jennifer Doudna.

Fonte: elaborado pelo autor

Diversos grupos de pesquisa demonstraram a aplicabilidade do sistema CRISPR-Cas9, posteriormente classificado como Tipo II por Makarova et al. devido a sua grande quantidade de variáveis na edição do genoma de linhas celulares humanas e modelos de camundongos, sendo Cas9 advindo da bactéria *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) (HAN; SHE, 2017; MAKAROVA et al., 2011). Isso resultou em uma explosão de aplicações do sistema CRISPR-Cas9 para a edição genética em diversos organismos. Ao mesmo tempo, houve progressos significativos na pesquisa dos mecanismos moleculares de diferentes sistemas CRISPR-Cas, visto que é possível utilizar diferentes mecanismos de reparo através de DSBs ou fundir diferentes domínios funcionais a diferentes nucleases Cas. A exemplo desse contexto, é possível averiguar na figura 2, o crescimento referente ao número de publicações na *Pubmed* a partir da data 28 de junho de 2012, visto que essa é a data de publicação do artigo referente a CRISPR/Cas9 (JINEK et al., 2012), até a data de 24 de outubro de 2023 utilizando apenas a palavra chave “CRISPR”.

Figura 2 – Número de publicações referentes a CRISPR na plataforma Pubmed



Fonte: elaborado pelo autor

O quadro 1 compara as 3 principais tecnologias de edição genética e apresenta suas principais diferenças, assim como suas vantagens e desvantagens. Na figura 3 é possível observar as principais conquistas clínicas referente à medicina translacional de CRISPR-Cas9, como pesquisas de tratamento para vários cânceres e melhorias para técnicas de ensaios clínicos.

Quadro 1 – Comparação das 3 principais tecnologias de edição genética

(continua)

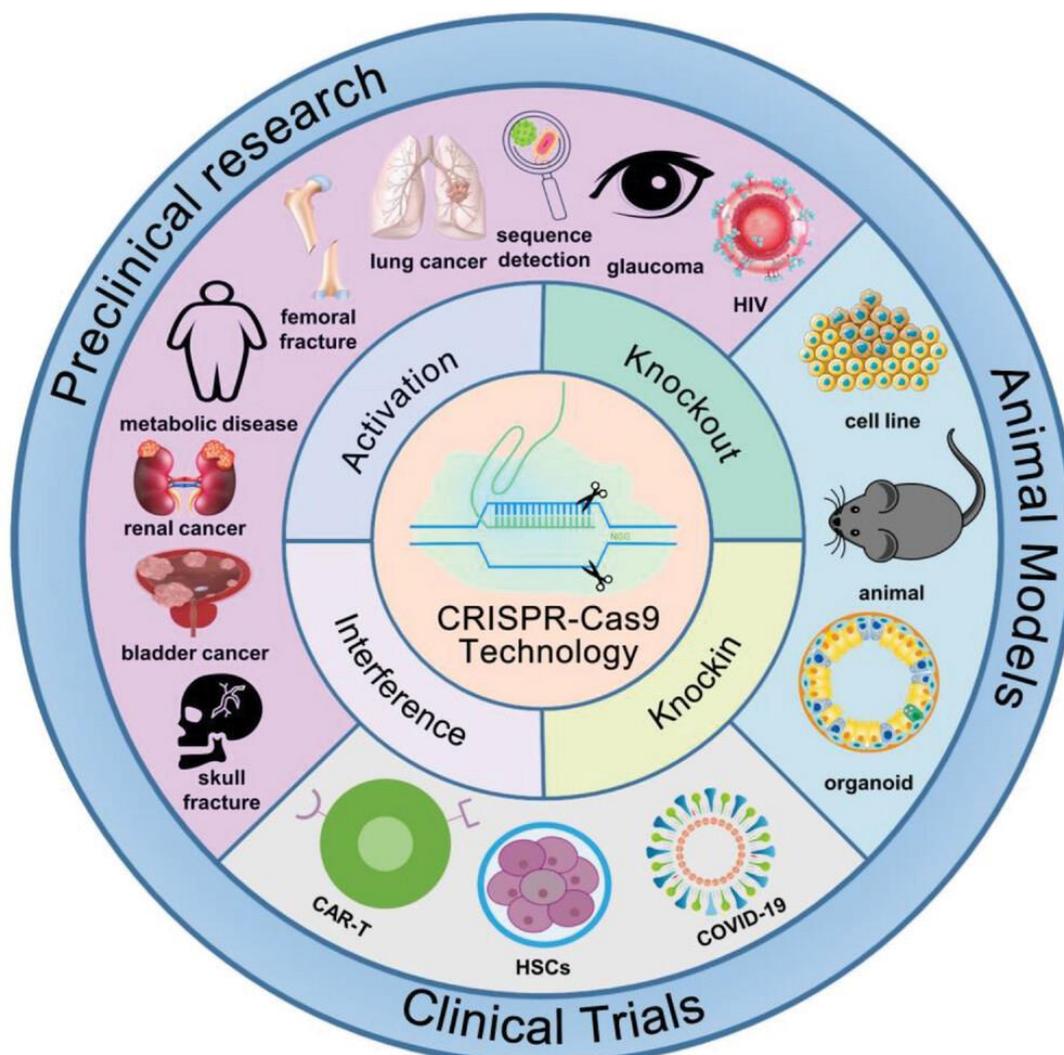
	ZFNs	TALENs	CRISPR-Cas9
Nuclease	FokI	FokI	Cas9
Componente de reconhecimento de DNA	Proteína	Proteína	crRNA (sgRNA)
Mecanismo de Clivagem	Quebra de dupla-fita por FokI	Quebra de dupla-fita por FokI	Quebra de fita simples/dupla pela proteína Cas
Tamanho do Domínio de Ligação	30 aminoácidos	30 aminoácidos	100 pb de RNA simples
Comprimento de Reconhecimento	9 ou 18 pb por monômero	18 pb por monômero	18–24 pb (sequência guia + sequência PAM)
Tamanho Total	1 kb	3 kb	4,2 kb
Especificidade de Identificação	Baixa	Média	Alta
Dificuldade de Projeto	Alta	Média	Baixa
Regulação de Múltiplos Genes	Incapaz	Incapaz	Capaz
Preço para cada Gene	\$15.000 USD	\$3.000 USD	\$500 USD
Limitações de Direcionamento	Difícil de direcionar locais que não sejam ricos em guanina	A base direcionada 5' deve ser uma timina para cada monômero de TALEN	O local direcionado deve preceder uma sequência PAM
Dificuldades de Engenharia	Requer engenharia significativa de proteínas	Requer métodos complexos de clonagem molecular	Usa-se procedimentos de clonagem celular padrão como plasmídeo e etc

Quadro 1 – Comparação das 3 principais tecnologias de edição genética (conclusão)

	ZFNs	TALENs	CRISPR-Cas9
Dificuldades de Entrega	Relativamente fácil devido ao tamanho pequeno dos elementos de expressão de ZFN adequados para uma variedade de vetores virais	Difícil devido ao grande tamanho dos componentes funcionais	Moderado, já que o SpCas9 comumente usados é grande e pode causar problemas de embalagem para vetores virais, mas existem ortólogos menores

Fonte: adaptado de LI et al. (2020), RANDHAWA; SENGAR (2021) e ZHENG et al. (2023)

Figura 3 - Conquistas clínicas de CRISPR-Cas9



Fonte: ZHENG et al. (2023)

2 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão narrativa da bibliografia sobre as abordagens das tecnologias de edição genética, destacando a ferramenta específica CRISPR/Cas9 e suas vertentes, como também promover ações integrativas para o desenvolvimento e o entendimento dessa tecnologia como sua história evolutiva, logo, estendendo suas diversas aplicações em inúmeros âmbitos, principalmente voltado para a área da saúde.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Revisar as principais publicações atualizadas referente a CRISPR-Cas9 até o primeiro semestre de 2024.
- b) Avaliar por análise crítica a prospectiva das tecnologias de terapia molecular, focando em CRISPR-Cas9 e suas atualizações e perspectivas.
- c) Descrever as possíveis aplicações para área da saúde.

3 MÉTODO

Foi executada uma pesquisa bibliográfica, realizada via acesso aos buscadores *PubMed*, *Scopus*, *Nature*, *Scencedirect*, *Scielo*, *Frontiers*, *Springerlink*, *Google Acadêmico* e *Google*. As seguintes palavras-chave, em inglês e português, bem como seus derivados, foram inseridas em combinações variadas, sempre fixando a palavra CRISPR-Cas9 ou somente CRISPR como chave de busca: CRISPR-Cas9, edição gênica, terapia gênica, ensaios em humanos, modelos animais, talassemia β , doença falciforme, câncer, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), doenças raras, hipercolesterolemia, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, fibrose cística, erros inatos do metabolismo. Dessa forma, foram incluídos estudos que:

- a) foram datados no período estudado entre 2013 a 2024;
- b) apresentavam dados primários que alavancaram coleta de informações qualitativas.

O critério de exclusão utilizados foi data de publicação maior que 10 anos, exceto artigos de fonte bibliográfica primária.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 ATUALIDADES

Atualmente observa-se um constante avanço na tecnologia CRISPR, entretanto seu aspecto evolucionar não remete apenas o seu mecanismo de ação, mas também envolve aspectos socioeconômicos, geopolíticos e éticos. Sabe-se que o foco deste artigo é resumir e entrelaçar os conhecimentos por volta dessa engenharia, todavia, abordar temas sociais foge do entendimento mecânico dessa ciência e sua funcionalidade, porém, é indiscutível a discussão referente a esses temas visto que a tecnologia está inerentemente associada a elevados custos e a doenças hereditárias que, conseqüentemente, envolve aspectos políticos e raciais.

Em 16 de novembro de 2023, a Agência Reguladora de Medicamentos e Produtos de Saúde (MHRA) aprovou o uso de CRISPR, tornando o Reino Unido o primeiro país a dar aprovação regulatória a um tratamento médico envolvendo a revolucionária ferramenta de edição genética CRISPR (HUNT, 2023). Também foi o primeiro país a aprovar a terapia genética para tratar anemia falciforme (GARCIA, 2023). Assim como o Reino Unido, a FDA, em 08 de dezembro de 2023, também aprovou o uso de CRISPR para os Estados Unidos (FDA, 2023).

A tecnologia aprovada é a Exagamglogene Autotemcel (Exa—cel), registrada como Casgevy®, tem como foco terapêutico o tratamento da doença falciforme e da talassemia β (HUNT, 2023). A doença falciforme é mais comum em pessoas com origem familiar africana, já a talassemia beta afeta principalmente pessoas de origem mediterrânea, do sul da Ásia, do sudeste asiático e do Oriente Médio (GOV.UK, 2023). Estima-se que o Casgevy possa custar até 2 milhões de dólares por paciente, configurando um fator limitante para quem poderá ser beneficiado por esse recurso terapêutico (BIOPHARMA DIVE, 2023).

As empresas CRISPR Therapeutics e Vertex Pharmaceuticals Incorporated foram as que desenvolveram essa tecnologia sob os termos de um acordo de participação nos lucros 60/40. As ações da CRISPR Therapeutics, durante a aprovação do Casgevy®, saltaram de valor, mesmo sendo a empresa Vertex o fabricante e detentor da licença exclusiva do CASGEVY, sendo assim, esse aspecto econômico é observado na figura 4 (CRISPR THERAPEUTICS, 2023).

Figura 4 – Preço de mercado da empresa CRISPR Therapeutics



Fonte: CIMINO; JAGIELSKI (2024)

Essa informação é imprescindível visto que ela pode atrair maior interesse de grandes nomes do setor de saúde, conseqüentemente quanto mais atrativo esse ecossistema se torna, mais investimento e desenvolvimento tecnológico surge, incluindo também formas de disponibilidade de acesso.

Em se tratando de terapias genéticas, efeitos fora do alvo possam ocorrer, sendo assim isso se torna uma barreira e preocupações. Infelizmente os efeitos biológicos em cascata são mais difíceis de antecipar, porém tratando-se de uma doença onde não tem cura, os benefícios da terapia superam os riscos (HASELTINE, 2023). Além do mais, Casgevy não corrige a mutação na doença falciforme, ela compensa a perda de hemoglobina, induzindo a produção de hemoglobina fetal (HbF), logo não é realmente uma cura, mas sim um tratamento (SHERIDAN, 2023).

Continuando, Casgevy é projetado para trabalhar editando precisamente os genes nas células-tronco da medula óssea de um paciente para permitir a produção de uma hemoglobina funcional, no caso a HbF (IMPERIAL NHS, 2023). Especificamente, para fazer isso, as células-tronco produtoras de hemoglobina são retiradas da medula óssea de um paciente e Casgevy é direcionado para as células-tronco hematopoéticas CD34, logo o gene BCL11A é editado em laboratório por

eletroporação, compreendendo um RNA guia sintético e uma endonuclease *Cas9* de *Streptococcus pyogenes* (SHERIDAN, 2023).

Observa-se então que ao interromper-se esse gene, o paciente não carrega mais as mesmas anormalidades que a hemoglobina adulta em pessoas com doença falciforme ou talassemia β . As células recém-modificadas com hemoglobina funcional são colocadas de volta no corpo do paciente, que de forma previa precisam se submeter ao pré-condicionamento mieloablativo à base de bussulfano, que é altamente tóxico, portanto, mesmo sendo uma extrema inovação no tratamento dessa doença, ainda é necessário passar por diversas etapas difíceis para que o paciente possa ter menores crises vaso-oclusivas (SHERIDAN, 2023).

4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS SISTEMAS CRISPR

Devido a sua complexidade, CRISPR foi classificado para melhor obtenção de seus aspectos característicos e suas distinções de papéis. Salieta-se que CRISPR se divide em duas classes, onde possui seis tipos e 33 subtipos (HRYHOROWICZ; LIPÍŃSKI; ZEYLAND, 2023). Essa informação é importante pois cada sistema CRISPR pode possuir diferentes substratos alvos, diferentes tipos de efetores, assim como diferentes proteínas acopladas a si. De maneira geral, é possível observar suas distinções de características na figura 5.

Figura 5 – Classificação dos Sistemas CRISPR

Table 1
Characteristics of different types of CRISPR/Cas systems.

Class	Type	Subtypes	Effector Complex	tracrRNA	Signature Protein	Target Substrate
1	I	A, B, C, D, E, F, G	multiple subunits	no	Cas3	DNA
	III	A, B, C, D, E, F	multiple subunits	no	Cas10	DNA/RNA
	IV	A, B, C	multiple subunits	no	unknown	unknown
2	II	A, B, C	single unit	yes	Cas9	DNA
	V	A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, U	single unit	yes ¹	Cas12	DNA/RNA ²
	VI	A, B, C, D	single unit	no	Cas13	RNA

[Open in a separate window](#)

¹ For subtypes: B, E, F, G, K. ² For subtype V-G.

Fonte: HRYHOROWICZ; LIPÍŃSKI; ZEYLAND (2023)

Portanto, a complexidade de CRISPR e sua utilidade não se resume apenas a CRISPR acoplado a cas9, e sim a inúmeros sistemas derivados que possuem distintas funções e atividades, assim como especificidade e seletividade. Salienta-se que os principais avanços na ciência são referentes a CRISPR-Cas9, entretanto esses avanços não se limitam apenas a Cas9, mas também é decorrente de estudos relacionados a cas12 e a Cas13 (HRYHOROWICZ; LIPÍŃSKI; ZEYLAND, 2023).

De maneira geral, as tecnologias resumem-se em NHEJ, HDR, edição de base, edição de primers e edição de epigênoma. As tecnologias mais modernas sendo desenvolvidas para um panorama atual estão relacionadas com a edição de base, edição de primers e edição de epigênoma. No Quadro 2, são descritos os principais pontos de diferenciação entre as tecnologias CRISPR.

Quadro 2 – Comparação dos tipos de tecnologias CRISPR

(continua)

Tecnologia	Tipos de edições pretendidas	Tipos de edições não pretendidas	Eficiência	Tamanho do gene que codifica a proteína de edição
Edição de genes com nucleases	Mutações semi-aleatórias	Mutações pequenas ou	Pode ser muito alta,	Médio, podendo caber em um único

padrão - junção não homóloga	de pequenos indels; deleções precisas se forem usados dois RNAs-guia	grandes de indels; perda de segmentos cromossômicos; rearranjos cromossômicos; cromotripsia (fragmentação cromossômica)	próxima de 100% de eficiência	vírus adenoassociado (AAV)
Edição de genes com nucleases padrão - reparo direcionado por homologia	Mudanças precisas de um único nucleotídeo, inserções, deleções e qualquer combinação destas.	Mutações pequenas ou grandes de inserções/deleções; perda de segmentos cromossômicos; rearranjos cromossômicos; cromotripsia	Tipicamente baixa	Médio, podendo caber em um único AAV
Edição de base	Mudanças de um único nucleotídeo (tipicamente restritas a mutações de transição)	Mutações pequenas de inserções/deleções; mudanças de nucleotídeos únicos no local-alvo; desaminação de DNA fora do alvo; desaminação de RNA fora do alvo	Pode ser muito alta, próxima de 100% de eficiência.	Grande, ou seja, necessita de divisão em múltiplos vetores AAV.
Edição de Primer	Mudanças precisas de um único nucleotídeo, inserções, deleções e qualquer combinação destas	Mutações pequenas de inserções/deleções; edições primárias fora do alvo; consequências desconhecidas da atividade de transcriptase reversa.	Tipicamente baixa.	Grande, ou seja, necessita de divisão em múltiplos vetores AAV.

Quadro 2 – Comparação dos tipos de tecnologias CRISPR

(conclusão)

Tecnologia	Tipos de edições pretendidas	Tipos de edições não pretendidas	Eficiência	Tamanho do gene que codifica a proteína de edição
Edição do epigenoma	Sem mudanças de sequência; mudanças no status de metilação e/ou modificações da cromatina	Metilação fora do alvo e/ou mudanças na cromatina; as edições podem não ser duráveis	Pode ser alta	Médio a grande

Fonte: Adaptado de MUSUNURU (2023).

4.3 TECNOLOGIAS CRISPR

4.3.1 Edição de genes de nucleases padrão

A técnica pioneira de edição genômica envolveu o emprego de nucleases para induzir DSBs em locais específicos do genoma. Essas quebras ativam vias de reparo do DNA, predominantemente o mecanismo de junção final não homóloga. No contexto do NHEJ, as extremidades de DNA resultantes das DSBs são religadas, frequentemente resultando em mutações indel, as quais podem causar alterações na sequência codificante de proteínas ou influenciar elementos regulatórios que modulam a expressão gênica.

Embora o NHEJ seja eficaz para induzir mutagênese, as mutações indel resultantes são de natureza essencialmente aleatória, dificultando a previsão precisa das alterações nas células editadas. Consequentemente, o NHEJ é frequentemente empregado para a inativação de genes ou elementos regulatórios.

O segundo mecanismo principal de reparo de DSBs é o reparo dirigido por homologia, que é restrito a células em proliferação na fase S ou G2, onde ocorre a replicação do DNA. O HDR utiliza uma sequência de DNA homóloga como modelo para reparar precisamente a DSB, possibilitando correções ou inserções de mutações de forma controlada. Entretanto, o HDR geralmente apresenta menor eficiência que o NHEJ e pode ser complicado pela coexistência simultânea de ambos os mecanismos em células editadas.

Dentre as várias nucleases programáveis disponíveis, os sistemas CRISPR-Cas são os mais amplamente utilizados devido à sua versatilidade e eficiência para aplicação de DSBs. O sistema CRISPR-Cas9, derivado de *Streptococcus pyogenes*, destaca-se por sua facilidade de uso e altas taxas de eficiência de edição. Além do Cas9, outras variantes de Cas, como o Cas12 e Cas13, são empregadas, cada uma com suas próprias preferências de sequência e mecanismos de ação.

Apesar dos benefícios potenciais, a edição genômica usando nucleases padrão apresenta riscos consideráveis de genotoxicidade. Dessa forma, DSBs não intencionais podem resultar em alterações genéticas indesejadas, como inserções, deleções ou rearranjos cromossômicos, os quais podem ter implicações adversas para a saúde. A mutagênese fora do alvo também é uma preocupação, pois pode levar à inativação de genes supressores de tumores ou à ativação de oncogenes, aumentando o risco de carcinogênese. Sendo assim, métodos para avaliar a propensão à mutagênese fora do alvo e técnicas de mitigação, como a engenharia de proteínas Cas e a modificação de RNA-guia, estão sendo ativamente investigados visando garantir a segurança e eficácia da edição genômica, consequentemente, evoluindo a metodologia de CRISPR/Cas (MUSUNURU, 2023).

4.3.1.1 *CRISPR/Cas9*

Dentro da variedade de sistemas CRISPR/Cas, o tipo II, pertencente à classe 2, destaca-se como o mais amplamente adotado em engenharia genética, graças à sua simplicidade, versatilidade e eficiência. Em um ambiente laboratorial, a tecnologia CRISPR/Cas9 é composta por dois elementos principais: um RNA guia único (sgRNA) e a proteína Cas9. O sgRNA é um RNA sintético curto formado pela fusão do Transactivating CRISPR RNA (tracrRNA) e crispr RNA (crRNA), geralmente com 20 nucleotídeos complementares à sequência alvo. É crucial que o DNA alvo seja exclusivo em relação ao restante do genoma e esteja imediatamente adjacente ao sítio PAM (para *Streptococcus pyogenes*, SpCas9: 5'-NGG-3', onde N representa A, C, T ou G). A enzima Cas9, orientada pelo RNA, que contém dois domínios ativos de nucleases HNH e RuvC, induz a clivagem da sequência de DNA alvo, gerando DSB no gene de interesse. Além disso, ao utilizar uma única proteína Cas9 e dois ou mais sgRNAs, a tecnologia CRISPR/Cas9 também permite a edição multiplex do genoma.

A multiplexação CRISPR pode ser aplicada para modificar vários genes simultaneamente ou deletar grandes regiões genômicas. No entanto, observou-se que a SpCas9 pode tolerar algumas incompatibilidades entre o RNA-guia e o DNA-alvo, resultando em edições fora do alvo, o que ainda representa um dos problemas significativos nas aplicações clínicas desse sistema. Portanto, a otimização da proteína Cas9 tem se concentrado na melhoria da especificidade do alvo e no aumento da segurança clínica da Cas9.

Atualmente, numerosas variantes de Cas9 de alta-fidelidade foram projetadas ou desenvolvidas Cas9 com compatibilidade PAM alterada, ou seja, versões otimizadas por códon das variantes, como SpCas9-HF1, HiFiCas9, evoCas9, eSpCas9, HypaCas9, Sniper-Cas9 e xCas9. No entanto, o aumento da fidelidade dessas variantes geralmente está associado à diminuição da eficiência de edição. Também é importante destacar que o número de sítios de edição dos genomas disponíveis para a proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, a mais utilizada, é limitado pela dependência da proteína da sequência PAM. Por essa razão, foram descobertos ortólogos adicionais de Cas9 em vários microrganismos que reconhecem diferentes sequências PAM. Isso inclui a proteína SaCas9 derivada de *Staphylococcus aureus*, CjCas9 de *Campylobacter jejuni*, FnCas9 de *Francisella novicida*, StCas9 de *Streptococcus thermophiles* e NmCas9 de *Neisseria meningitidis* (ASANO et al., 2021).

4.3.1.2 CRISPR/Cas12a

O sistema CRISPR/Cas tipo V, representado pela nuclease Cas12a, figura como um destacado componente da classe 2, aplicado amplamente na manipulação genética. Ao contrário da Cas9, a Cas12a emprega exclusivamente o domínio catalítico RuvC para promover a clivagem de ambas as cadeias do DNA de fita dupla alva. Notavelmente, a Cas12a possui uma preferência por sequências PAM ricas em T, ampliando significativamente a diversidade de espécies e o número de locais-alvo possíveis quando comparada com a Cas9, que exibe uma preferência por PAMs ricos em G. A Cas12a, projetada para ligação e clivagem do DNA, requer apenas a presença da molécula de crRNA contendo uma sequência guia de 23 nt. Como resultado, o RNA guia do sistema CRISPR/Cas12a apresenta uma menor extensão, aproximadamente 43 nt, em contraste com o sgRNA do CRISPR/Cas9, que possui

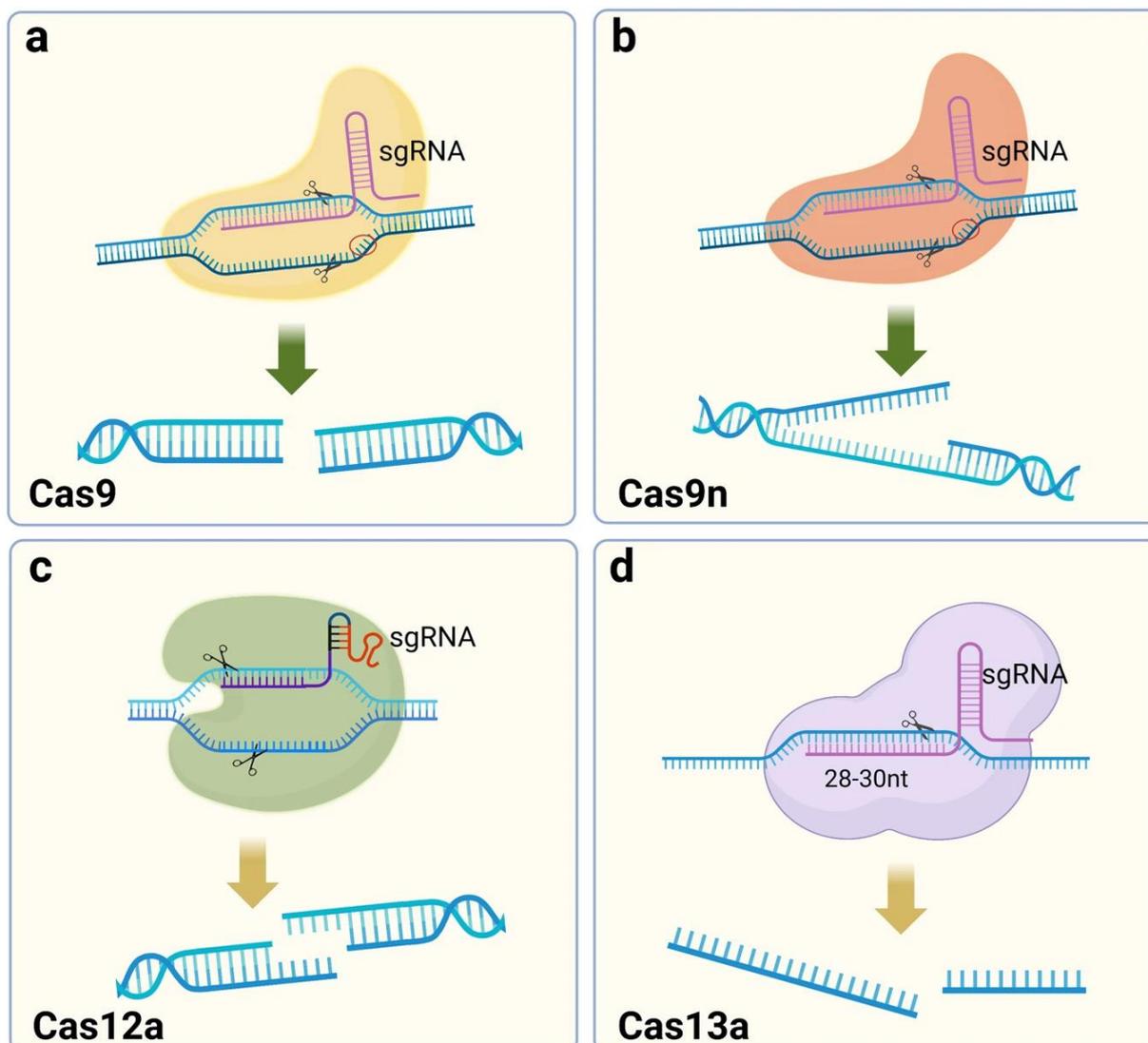
cerca de 101 nt de comprimento, facilitando sua síntese. Assim como a Cas9, a Cas12a também possui potencial de multiplexação, desse modo permitindo a expressão de múltiplos RNAs guia a partir de um único transcrito referente ao processamento do pré-crRNA. Além disso, o DSB com extremidades coesas gerado pela Cas12a pode representar uma abordagem eficaz para aumentar a eficiência da inserção mediada por HDR devido à complementariedade de bases. Embora a Cas12a pareça exibir uma sensibilidade reduzida a incompatibilidades não relacionadas à "semente" do RNA guia em comparação com a Cas9, conferindo potencialmente maior segurança para aplicações clínicas, é importante notar que alguns estudos relatam uma eficiência de edição relativamente baixa.

4.3.1.3 *CRISPR/Cas13a*

O sistema CRISPR/Cas13, parte do tipo VI, é uma ferramenta importante para a manipulação genética, especialmente no quesito de edição do RNA. Um exemplar notável desse sistema é o Cas13a, pertencente ao subtipo VI-A. Ele é capaz de clivar de forma específica e eficiente o RNA de fita simples (ssRNA) quando guiado por um crRNA contendo uma sequência espaçadora de 28 nt. Diferentemente das nucleases Cas9 e Cas12a, que requerem uma sequência PAM, o Cas13a reconhece os nucleotídeos adjacentes à sequência alvo do protoespaçador na extremidade 3', conhecida como sítio de flanco do protoespaçador (PFS), sendo composta por um único A, U ou C. A ativação do sítio catalítico, localizado entre os domínios HEPN1 e HEPN2 da proteína Cas13a, ocorre mediante o emparelhamento da sequência alvo do RNA com o crRNA, resultando na clivagem do ssRNA.

Salienta-se a importância de destacar que o Cas13a também possui tolerância a incompatibilidades de nucleotídeo entre o crRNA e a sequência alvo, sendo assim, múltiplas incompatibilidades diminuem sua eficiência de clivagem. Essas características evidenciam a versatilidade e precisão dos sistemas CRISPR/Cas na edição do DNA e RNA em um contexto geral, podendo ser visualizada de forma sucinta na figura 6 (HRYHOROWICZ; LIPÍŃSKI; ZEYLAND, 2023).

Figura 6 – Ilustração das funções de CRISPR formando DSBs e SSB



Legenda: **a** Cas9 cliva cadeias duplas de DNA formando extremidades planas. **b** Cas9 nickase (Cas9n) cliva uma única cadeia de DNA. **c** Cas12a corta as cadeias duplas de DNA formando extremidades complementares. **d** Cas13a reconhece e cliva RNAs.

Fonte: LI et al. (2023)

4.3.2 Edição de base

O desenvolvimento contínuo das enzimas Cas tem contribuído significativamente para a evolução dessas ferramentas de edição genômica, entretanto, a busca por estratégias precisas de edição genética para corrigir mutações específicas é fundamental no contexto do tratamento de doenças genéticas.

O tratamento de doenças genéticas muitas vezes demanda a correção de mutações em bases específicas do genoma. Posto isso, uma estratégia promissora para essa correção é a edição de base, que visa substituir uma base nucleotídica por

outra sem a necessidade de quebras na dupla hélice do DNA. No entanto, essa abordagem enfrenta desafios técnicos, especialmente em relação à eficiência da edição.

Em 2017, Liu et al. conduziram um estudo visando substituir pares de bases A-T por pares C-G, surgindo então essa tecnologia de edição nomeada de editores de bases.

A abordagem de edição de base envolve a fusão de desaminases com a Cas9 nickase (nCas9), responsável por realizar quebras de fita simples (SSB), ou com a Cas9 inativa cataliticamente (dCas9) para realizar mutações pontuais em sequências específicas de nucleotídeos do DNA alvo, assim, não havendo a necessidade de quebra da dupla hélice do DNA.

Os editores de base de citosina (CBEs) e os editores de base de adenina (ABEs) são duas categorias principais de editores de base atualmente em destaque, representados na figura 7. Os editores de base de citosina exploram domínios de citidina desaminase adaptados de diversas proteínas naturais que atuam sobre bases de citosina em moléculas de DNA de fita simples, enquanto os editores de base de adenina são derivados de domínios de adenosina desaminase, desenvolvidos a partir da proteína desaminase específica nomeada de TadA, que atua sobre bases de adenina em moléculas de RNA de fita simples.

Durante a edição de base, o complexo nCas9/sgRNA forma uma estrutura chamada R-loop no local alvo do genoma, permitindo o acesso do domínio desaminase à fita de DNA não alvo do acoplamento. Os CBEs, por exemplo, convertem citosinas em timinas. Esses editores consistem em dCas9 guiado por sgRNA, fundido a uma enzima citidina desaminase. A ação da citidina desaminase resulta na remoção de um grupo amino da citosina, convertendo-a em uracila. Durante a replicação do DNA, o uracilo é reconhecido como timina pela DNA polimerase, formando um par de bases de T-A.

Já os ABEs realizam a conversão de adeninas em guaninas. Esses editores consistem em uma nickase Cas9 guiada por sgRNA, com deficiência catalítica, fundida a uma forma projetada da adenosina desaminase. A inosina resultante da desaminação da adenina é interpretada pela célula como guanina (G) e pareada com citosina (C) durante a replicação do DNA.

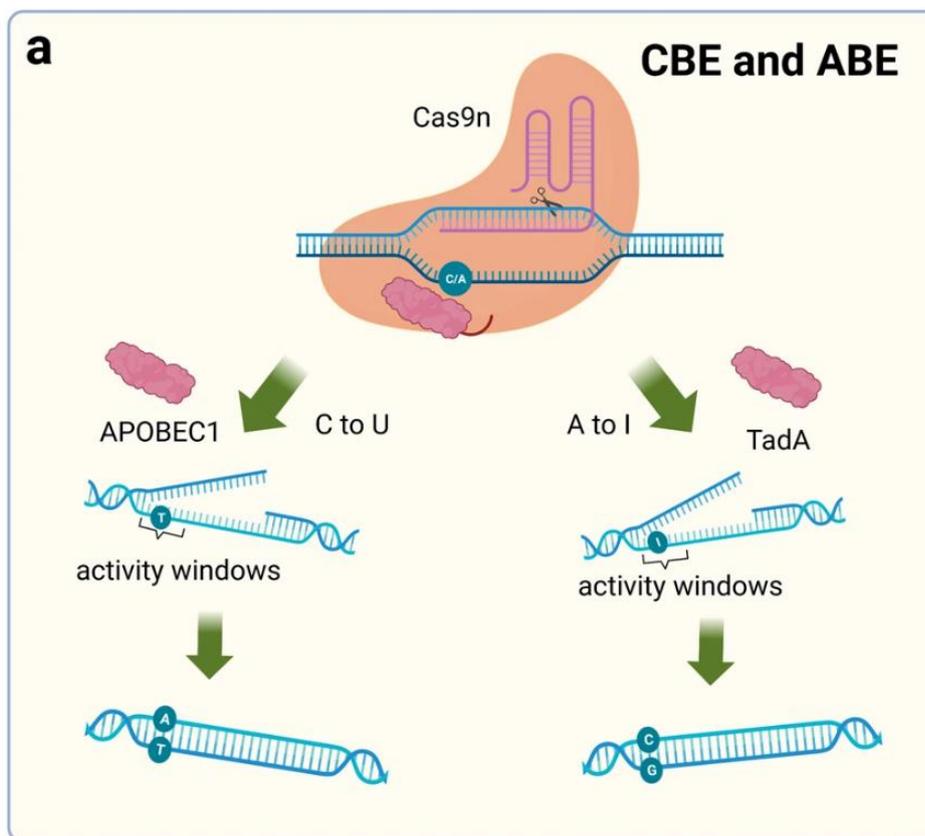
Apesar de sua precisão, os editores de base apresentam limitações, incluindo sua preferência por mutações de transição e a possibilidade de edições fora do alvo.

No entanto, quando aplicados corretamente, eles oferecem uma abordagem promissora para a edição genética, combinando eficiência e precisão para manipular sequências nucleotídicas específicas.

Sendo assim, os editores de base catalisam mudanças específicas de nucleotídeos, convertendo citosina (C) em uracila (U) ou adenina (A) em inosina (I). Todavia, é crucial controlar a possível reversão dessas alterações, especialmente a conversão de U de volta para C (HRYHOROWICZ; LIPÍŃSKI; ZEYLAND, 2023a; LI et al., 2023; MUSUNURU, 2023a).

A exemplo do item anterior, um dos desafios de CBEs é referente ao mecanismo de reparo celular por excisão de base, que pode reverter bases para a forma original devido à natureza não usual da uracila no DNA, que é prontamente reparada para G, diminuindo a eficiência da edição. Para contornar esse problema, foram desenvolvidos os CBEs de segunda geração, que incluem um inibidor adicional da uracilglicosilase, impedindo a remoção do uracilo e aumentando a eficácia da edição (KAVLI et al., 2002).

Figura 7 – Representação da atividade da CBE e da ABE



Fonte: LI et al. (2023)

4.3.3 Edição de Prime

A edição de base, pode ser comparada a uma ferramenta de edição de texto, e a edição de prime uma ferramenta de edição de texto “avançada”, pois a edição prime oferece uma abordagem altamente eficaz e precisa para a modificação genética, assim, superando as limitações da edição de base referente a edições complexas e mais variável. Em 2019, Liu et al. propuseram um avanço significativo com o desenvolvimento do sistema de edição primer (PE), que integra a Cas9 nickase com uma transcriptase reversa (RT) do vírus M-MLV e um RNA guia de edição de primer (pegRNA).

Esta técnica, representada na figura 8 baseada na fusão de uma versão modificada do nCas9 com uma enzima RT, permite realizar uma ampla gama de modificações nucleotídicas, desde pequenas mutações até deleções extensas.

O guia de RNA utilizado na edição de prime possui uma extensão 3' que desempenha um papel crucial. A porção distal (PBS) se emparelha com a fita de DNA não alvo, enquanto a porção intermediária (RTT) serve como substrato para a RT, possibilitando a construção direta de uma sequência de DNA na fita de DNA não alvo.

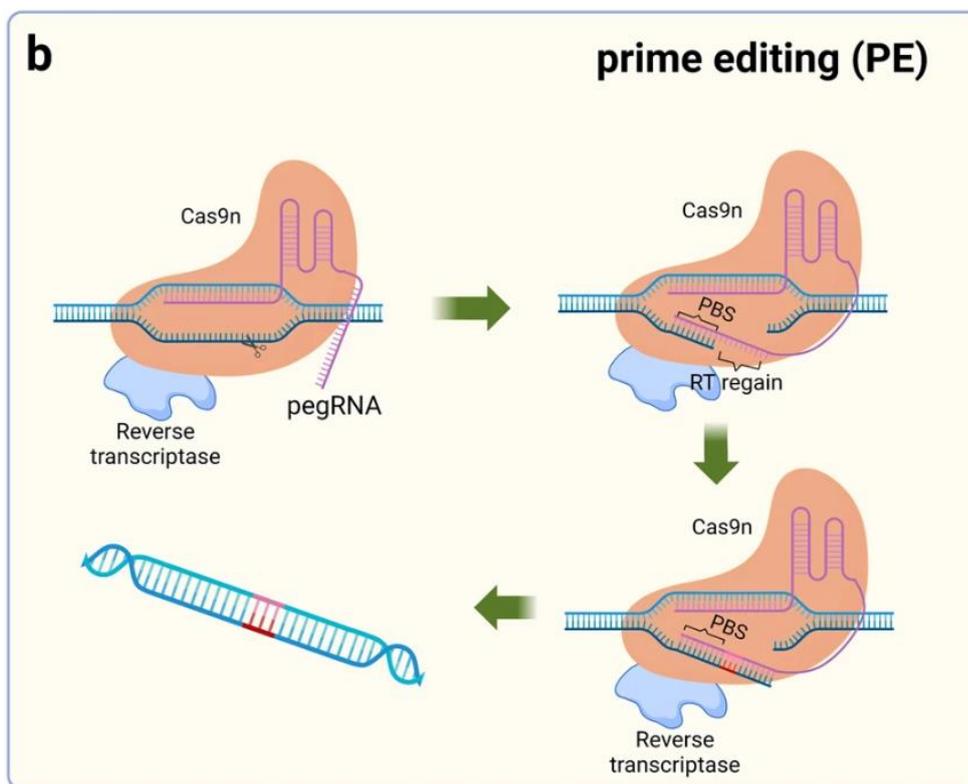
Essa técnica oferece flexibilidade em relação ao comprimento e às mutações incorporadas ao RTT, ampliando consideravelmente o escopo de alvos em comparação com outras técnicas de edição genética.

O pegRNA direciona a nCas9 para o local alvo no genoma e contém sequências que iniciam a transcrição reversa pela RT, na qual reproduz uma cópia do trecho de DNA específico no alvo. Esse processo gera duas estruturas de ssDNA: uma com a edição desejada e outra com a sequência original. As duas cópias competem entre si, sendo a não editada degradada por endonucleases celulares. O DNA resultante, contendo segmentos editados e não editados, é corrigido através de mecanismos de reparo de DNA, resultando na introdução da modificação desejada em ambas as fitas de DNA.

Embora a mutagênese fora do alvo com a edição de primer tenha sido fundamentada com êxito, a extensão total de sua complexidade ainda precisa ser totalmente esclarecida. Se sua segurança for confirmada em relação aos outros tipos de edição, a edição de prime tem o potencial de se tornar a preferida para a maioria das aplicações, devido à sua notável versatilidade (MUSUNURU, 2023).

Vale ressaltar que o sistema de edição de primer demonstrou ser superior ao HDR mediado por CRISPR/Cas9 e exibiu significativamente menos efeitos fora do alvo em comparação com o Cas9. Embora os editores de primer sejam capazes de realizar todas as conversões de base possíveis, eles não são adequados para inserções ou deleções extensas de DNA em comparação com CRISPR/Cas9, sendo essa uma área em que os sistemas CRISPR/Cas9 se destacam (HRYHOROWICZ; LIPIŃSKI; ZEYLAND, 2023)

Figura 9 – Representação da atividade dos editores de primers



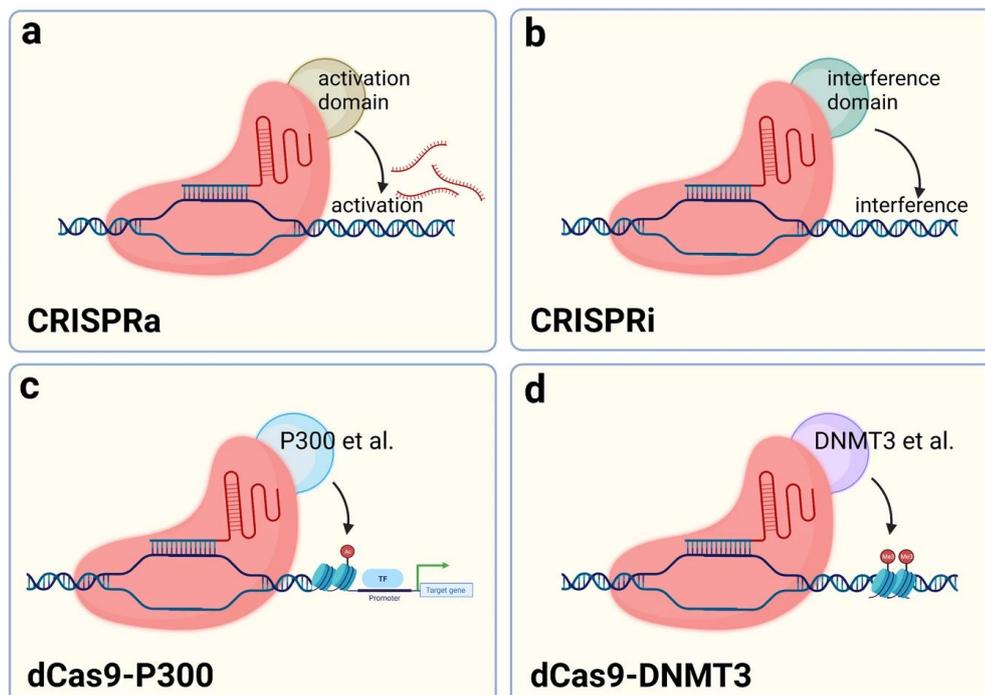
Fonte: LI et al. (2023)

4.3.4 Edição do epigenoma

A edição epigenômica é uma estratégia que não acarreta alterações na sequência de DNA, mas sim na regulação da expressão gênica, posto isso, especialmente remetendo a contextos patológicos, a modulação da expressão gênica é terapeuticamente relevante no contexto de saúde. Sabe-se que o dCas9 mantém a habilidade de se ligar a locais específicos na fita de DNA sob a orientação do RNA guia sem ocasionar DSBs, dessa forma, podendo modular a transcrição gênica de forma mais moderada e com menor incidência de efeitos fora do alvo através da

utilização de fatores de transcrição. Utiliza-se um complexo dCas9/gRNA para direcionar sequências em promotores de genes ou intensificadores transcricionais, interferindo estericamente com fatores que interagem com essas sequências, afetando assim a expressão gênica, desse modo, perpetuando o surgimento de CRISPR de interferência (CRISPRi) e o CRISPR de ativação (CRISPRa). Para suprimir a expressão gênica, ou seja, realizar a interferência, o dCas9 é combinado com um domínio supressor, como KRAB, que modifica a estrutura local da cromatina. Para aumentar a expressão gênica e conseqüentemente ativar o gene, o dCas9 é fundido a um domínio ativador, como VP16 ou p65, ou outros ativadores específicos, que são ligados ao gRNA. Tais modificações na expressão gênica são transitórias e dependem da presença do dCas9 no local, portanto, auxiliando no controle de ação de ativação ou interferência. Para efeitos epigenômicos mais duradouros, o dCas9 pode ser combinado com domínios de enzimas de modificação epigenética, ou seja, metiltransferase ou desmetilase, como no caso da DNMT3A e P300, que atribuem modulações epigenéticas alterando assim a metilação do DNA e sua transcrição. Essas mudanças na metilação podem ser herdadas e revertidas posteriormente por direcionamento de uma proteína de fusão dCas9 com efeito oposto para o mesmo sítio alvo. (MUSUNURU, 2023).

Figura 10 – Representação esquemática das tecnologias de edição epigenômicas.



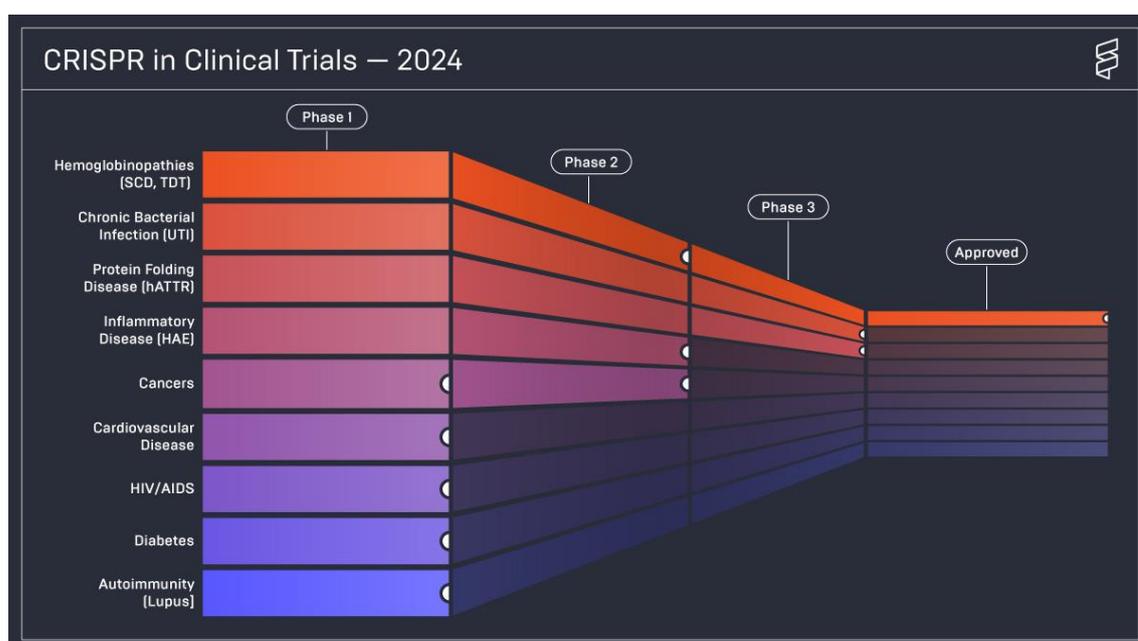
Fonte: LI et al. (2023)

Embora o risco de efeitos fora do alvo seja reduzido em comparação com o Cas9 convencional, a complexidade da regulação gênica pode resultar em expressão alterada de múltiplos genes-alvo, o que requer investigações adicionais para avaliar a segurança e a eficácia dessas abordagens (LI et al., 2023).

5 CONCLUSÕES, PERSPECTIVAS, EXPECTATIVA E PROSPECTIVA

A tecnologia de edição genômica CRISPR representou um avanço significativo na pesquisa, com potencial para impactar profundamente a área da saúde, oferecendo uma nova abordagem terapêutica. Desde suas primeiras aplicações em mamíferos em 2012, a disseminação da tecnologia CRISPR tem sido notável, prometendo avanços adicionais significativos no futuro próximo. Com pesquisas contínuas e avanços tecnológicos, é possível imaginar um futuro onde terapias altamente personalizadas e eficazes baseadas em CRISPR se tornem parte integrante do tratamento de pacientes, sendo algumas dessas novas terapias já em desenvolvimento e em diferentes fases de ensaios clínicos, podendo constatar essa informação na figura 10.

Figura 11 – Atualização de ensaios clínicos no ano de 2024



Fonte: INNOVATIVE GENOMICS INSTITUTE (2024)

A pesquisa contínua em edição genômica, com ênfase na tecnologia CRISPR, não só possibilita a correção de mutações causadoras de doenças, mas

também oferece a capacidade de modular a expressão gênica para influenciar processos fisiológicos específicos. Essas abordagens terapêuticas, uma vez desenvolvidas, têm o potencial de fornecer soluções duradouras, eliminando a necessidade de tratamentos contínuos e melhorando significativamente a qualidade de vida dos pacientes.

No entanto, persistem desafios significativos em termos de eficácia, segurança e considerações éticas e regulatórias, que requerem abordagens cuidadosas e responsáveis para a aplicação clínica dessas inovações tecnológicas (MUSUNURU, 2023).

Dentro deste escopo, a utilização dos sistemas CRISPR/Cas9 pode ser categorizada em duas modalidades principais: ex vivo e in vivo. No contexto ex vivo, células somáticas do paciente são isoladas, editadas geneticamente em laboratório e então reintroduzidas no mesmo indivíduo. Essa abordagem tem sido explorada em diferentes áreas clínicas, como a imunoterapia do câncer, o tratamento de doenças genéticas hereditárias e a intervenção contra infecções virais.

Referente a edição do gene BCL11A em células-tronco hematopoéticas, que foi utilizada como estratégia terapêutica para pacientes com anemia falciforme e talassemia β , mostra-se resultados promissores observados em ensaios clínicos.

Sabe-se também que a aplicação de CRISPR in vivo possui diversos desafios, sendo um desses aspectos das preocupações associadas à aplicação do sistema CRISPR a imunogenicidade, ou seja, a administração de CRISPR pode ocasionar em reações imunológicas tanto pela presença da proteína CRISPR, como do gRNA.

Seguindo a mesma lógica a SpCas9 é amplamente utilizada devido à sua facilidade de integração em vetores, entretanto, os vetores virais comumente empregados para entrega, como os AVV, apresentam um sério risco à saúde devido as respostas imunes adaptativas e pré-existentes, tema a qual excedem o escopo deste artigo.

Além de suas aplicações em terapia genética, o sistema CRISPR/Cas9 também tem sido investigado como uma estratégia promissora para o tratamento de doenças infecciosas, incluindo aquelas causadas por microrganismos e vírus, como o HIV. A utilização da técnica para ablação do gene CCR5 resultou em resistência à infecção pelo HIV-1 em modelos animais. Em um caso clínico notável, um paciente com infecção por HIV-1 e leucemia linfoblástica aguda foi submetido a um transplante

de células-tronco hematopoéticas com o gene CCR5 ablatado, resultando em remissão completa da infecção por um período de 19 meses (MOHAMED et al., 2022).

Além dos desafios técnicos, as considerações éticas também ocupam uma posição de destaque na área de desafios da aplicação de CRISPR/Cas9. Preocupações relativas à segurança, acessibilidade, questões eugênicas, regulamentação e propriedade intelectual devem ser minuciosamente ponderadas. Tema não muito distante e bastante repercutido, é incontestável a necessidade de discussão e de maior visibilidade a respeito do cientista He Jiankui que utilizou CRISPR/Cas9 para remover o gene CCR5, responsável por produzir o receptor do HIV, de suas duas filhas e criar os dos primeiros bebês geneticamente editados do mundo. Apesar da controvérsia sobre a ética a respeito da reescrita artificial de genes de embrião humano, este é um fato no qual não pode deixar de ser citado (RYDER, 2018).

Embora a utilização clínica do CRISPR em células somáticas seja geralmente mais tolerável do que a edição de células germinativas humanas, as implicações éticas inerentes à manipulação do genoma humano devem ser cuidadosamente analisadas antes de qualquer aplicação terapêutica, estabelecer políticas sensatas e socialmente responsáveis é crucial para garantir que o CRISPR seja utilizado de forma ética e eficaz, tema a qual também excedem o escopo deste artigo (RYDER, 2018).

Já referente as plataformas CRISPR/Cas12 e CRISPR/Cas13, elas têm se destacado como ferramentas fundamentais no campo do diagnóstico molecular, especialmente para a detecção específica de sequências de RNA ou DNA associadas a microrganismos patogênicos. A utilização de técnicas como a pré-amplificação de DNA ou RNA, seguida pela detecção mediada por Cas13 ou Cas12 através de leituras fluorescentes e colorimétricas, tem contribuído para aprimorar a sensibilidade e a especificidade dos métodos de detecção, ao mesmo tempo em que reduz o tempo e os recursos necessários para análise. Ademais, o sistema CRISPR/Cas13 direcionado a RNA também apresenta potencial como estratégia antiviral contra vírus de RNA de fita simples.

Ainda por cima, o uso do CRISPR/Cas9 na agricultura representa uma evolução significativa na criação de variedades de plantas e animais com características selecionadas. Essa tecnologia permite a introdução precisa de alterações genéticas sem a necessidade de métodos convencionais de melhoramento genético, como uso de irradiação de raios-X ou gama, *agrobacterium tumefaciens*,

eletroporação, biobalística e etc. Como resultado, é possível observar avanços notáveis na criação de cultivos mais resilientes, alimentos mais nutritivos e animais com características desejáveis (HRYHOROWICZ; LIPIŃSKI; ZEYLAND, 2023).

Os avanços significativos no desenvolvimento de nucleases projetadas, especialmente ZFNs, TALENs e CRISPR/Cas9, têm concretizado a edição do genoma como uma prática clínica tangível, saindo do domínio teórico para a realidade clínica.

Concluindo, sabe-se que os fármacos modernos advindos de edição genética, como os anticorpos monoclonais, são direcionados e projetados para interagir com alvos específicos associados a diferentes doenças e têm como capacidade modular processos biológicos envolvidos na patogênese de condições específicas, a exemplo dos cânceres. No entanto, a eficácia desses tratamentos depende da presença de mutações ou alterações genéticas específicas nos pacientes, o que pode levar à resistência aos fármacos, nesse caso, a tecnologia CRISPR/Cas9 proporciona uma abordagem inovadora para identificar esses potenciais alvos terapêuticos para então compreender a fisiopatologia das doenças (LI et al., 2020).

Essas aplicações demonstram o potencial transformador das ferramentas CRISPR em diferentes campos científicos e tecnológicos. Sendo assim, é possível esperar que a edição genômica revele os mecanismos biológicos patológicos, outras doenças e genes não antes compreendidos, abrindo caminho para novas terapias e avanços nas ciências da vida.

REFERÊNCIAS

ALLOWAY, J. L. THE TRANSFORMATION IN VITRO OF R PNEUMOCOCCI INTO S FORMS OF DIFFERENT SPECIFIC TYPES BY THE USE OF FILTERED PNEUMOCOCCUS EXTRACTS. **Journal of Experimental Medicine**, v. 55, n. 1, p. 91–99, 1 jan. 1932.

AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. **Journal of Experimental Medicine**, v. 79, n. 2, p. 137–158, 1 fev. 1944.

ASANO, Y. et al. Knock-in and precise nucleotide substitution using near-PAMless engineered Cas9 variants in *Dictyostelium discoideum*. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 11163, 27 maio 2021.

BARRANGOU, R. et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 23 mar. 2007.

BIOPHARMA DIVE. CRISPR sickle cell treatment could cost millions, gene therapy executives say. Disponível em: <https://www.biopharmadive.com/news/crispr-sickle-cell-price-millions-gene-therapy-vertex-bluebird/702066/>. Acesso em: 26 mai. 2024.

BOLOTIN, A. et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551–2561, 1 ago. 2005.

CHRISTIAN, M. et al. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. **Genetics**, v. 186, n. 2, p. 757–761, 1 out. 2010.

COBB, M.; COMFORT, N. What Rosalind Franklin truly contributed to the discovery of DNA's structure. **Nature**, v. 616, n. 7958, p. 657–660, 27 abr. 2023.

CRISPR THERAPEUTICS. European Commission approves first CRISPR/Cas9 gene-edited therapy. Disponível em: <https://ir.crisprtx.com/news-releases/news-release-details/european-commission-approves-first-crisprcas9-gene-edited>. Acesso em: 26 mai. 2024.

DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. **Developmental Biology**, v. 278, n. 2, p. 274–288, fev. 2005.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA approves first gene therapies to treat patients with sickle cell disease. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease>. Acesso em: 26 mai. 2024.

GARCIA, Mariana. Estados Unidos aprovam primeiras terapias genéticas para tratar pacientes com anemia falciforme. G1, 08 dez. 2023. Disponível em: <https://g1.globo.com/saude/noticia/2023/12/08/estados-unidos-aprovam-primeiras-terapias-geneticas-para-tratar-pacientes-com-anemia-falciforme.ghtml>. Acesso em: 26 mai. 2024.

GALETTO, R.; DUCHATEAU, P.; PÂQUES, F. Targeted approaches for gene therapy and the emergence of engineered meganucleases. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 9, n. 10, p. 1289–1303, 18 out. 2009.

GOSTIMSKAYA, I. CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. **Biochemistry (Moscow)**, v. 87, n. 8, p. 777–788, 15 ago. 2022.

GOV.UK. MHRA authorises world-first gene therapy that aims to cure sickle cell disease and transfusion dependent thalassemia. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/news/mhra-authorises-world-first-gene-therapy-that-aims-to-cure-sickle-cell-disease-and-transfusion-dependent-thalassemia>. Acesso em: 26 mai. 2024.

GRIFFITH, F. The Significance of Pneumococcal Types. **Journal of Hygiene**, v. 27, n. 2, p. 113–159, 15 jan. 1928.

HALL, K.; SANKARAN, N. DNA translated: Friedrich Miescher's discovery of nuclein in its original context. **The British Journal for the History of Science**, v. 54, n. 1, p. 99–107, 19 mar. 2021.

HAN, W.; SHE, Q. CRISPR History: Discovery, Characterization, and Prosperity. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–21.

HASELTINE, William. UK approves groundbreaking CRISPR-based gene therapy for sickle cell disease and thalassemia. *Forbes*, 18 nov. 2023. Disponível em: <https://www.forbes.com/sites/williamhaseltine/2023/11/18/uk-approves-groundbreaking-crispr-based-gene-therapy-for-sickle-cell-disease-and-thalassemia/?sh=306b332e3ecc>. Acesso em: 26 mai. 2024.

HRYHOROWICZ, M.; LIPÍŃSKI, D.; ZEYLAND, J. Evolution of CRISPR/Cas Systems for Precise Genome Editing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14233, 18 set. 2023.

HUNT, Kaite. UK approves Casgevy for CRISPR gene editing in trial to treat sickle cell. 2023. *CNN*, 16 nov. 2023. Disponível em: <https://edition.cnn.com/2023/11/16/health/uk-casgevy-approval-crispr-gene-editing-sickle-cell-scnc/index.html>. Acesso em: 26 mai. 2024.

IMPERIAL NHS. UK medicines regulator approves world-first gene editing treatment for blood disorders. Disponível em: <https://www.imperial.nhs.uk/about-us/news/uk-medicines-regulator-approves-world-first-gene-editing-treatment-for-blood-disorders>. Acesso em: 26 mai. 2024.

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, dez. 1987.

JANSEN, RUUD. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565–1575, 25 mar. 2002.

JINEK, M. et al. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.

KAVLI, B. et al. hUNG2 Is the Major Repair Enzyme for Removal of Uracil from U:A Matches, U:G Mismatches, and U in Single-stranded DNA, with hSMUG1 as a Broad Specificity Backup. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39926–39936, out. 2002.

KHALIL, A. M. The genome editing revolution: review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 68, 29 dez. 2020.

LAU, V.; DAVIE, J. R. The discovery and development of the CRISPR system in applications in genome manipulation. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 95, n. 2, p. 203–210, abr. 2017.

LI, H. et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1, 3 jan. 2020.

LI, T. et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 36, 16 jan. 2023.

MAKAROVA, K. S. et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467–477, 9 jun. 2011.

MANGHWAR, H. et al. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 12, p. 1102–1125, dez. 2019.

MOHAMED, H. et al. Targeting CCR5 as a Component of an HIV-1 Therapeutic Strategy. *Frontiers in Immunology*, v. 12, 20 jan. 2022.

MILLER, J. C. et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 143–148, 22 fev. 2011.

MOJICA, F. J. M. et al. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 2, p. 174–182, fev. 2005.

MOJICA, F. J. M.; JUEZ, G.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 613–621, ago. 1993.

MUSUNURU, K. CRISPR and cardiovascular diseases. **Cardiovascular Research**, v. 119, n. 1, p. 79–93, 17 mar. 2023.

NATURE. Genome editing gets clinical. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/d41587-023-00016-6>. Acesso em: 26 mai. 2024.

POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 653–663, 1 mar. 2005.

RANDHAWA, S.; SENGAR, S. The evolution and history of gene editing technologies. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–62.

RYDER, S. P. #CRISPRbabies: Notes on a Scandal. *The CRISPR Journal*, v. 1, n. 6, p. 355–357, dez. 2018.

SIA, R. H. P.; DAWSON, M. H. IN VITRO TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. **Journal of Experimental Medicine**, v. 54, n. 5, p. 701–710, 1 nov. 1931.

SILVA, G. et al. Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy. **Current Gene Therapy**, v. 11, n. 1, p. 11–27, 1 fev. 2011.

THE MOTLEY FOOL. Here's Why 2024 Could Be a Big Year for CRISPR Therapeutics. Disponível em: <https://www.fool.com/investing/2024/01/04/heres-why-2024-could-be-a-big-year-for-crispr-ther/>. Acesso em: 17 mar. 2024

THE MOTLEY FOOL. Where Will CRISPR Therapeutics Be in 5 Years? Disponível em: <https://www.fool.com/investing/2023/12/15/where-will-crispr-therapeutics-be-in-5-years/>. Acesso em: 17 mar. 2024.

TRÖDER, S. E.; ZEVNIK, B. History of genome editing: From meganucleases to CRISPR. **Laboratory Animals**, v. 56, n. 1, p. 60–68, 23 fev. 2022.

WANG, H.; LA RUSSA, M.; QI, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 227–264, 2 jun. 2016.

YANG, L.; CHEN, J. A Tale of Two Moieties: Rapidly Evolving CRISPR/Cas-Based Genome Editing. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 45, n. 10, p. 874–888, out. 2020.

ZHENG, R. et al. Progress and Perspective of CRISPR-Cas9 Technology in Translational Medicine. **Advanced Science**, v. 10, n. 25, 25 set. 2023.