

O SISTEMA CRISPR/CAS COMO UMA NOVA FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA NA EDIÇÃO DE GENOMAS: APLICAÇÕES E IMPLICAÇÕES

Camila Almeida de Paula Dias¹

Janice Maria Ribeiro Dias²

RESUMO

Nas últimas décadas, os avanços da biologia molecular, baseados em bactérias, proporcionaram grandes saltos em tecnologias de engenharia genética. Recentemente, os sistemas de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) interagiram com a biotecnologia e diversas outras áreas da biologia. A descoberta desse sistema ampliou os horizontes da edição de genomas, devido a sua fácil manipulação e elevada precisão. A tecnologia CRISPR/Cas possibilita a manipulação genética com ferramentas simples, como por exemplo, uma tesoura, capaz de ser direcionada exatamente para o gene a ser excluído. Porém, esse sistema não corrobora com questões éticas, ao passo que suas aplicações podem ser direcionadas para aquisição de vantagens estéticas, como a produção de organismos perfeitos. Devido a sua recente descoberta, esse sistema ainda está sendo avaliado, com o objetivo de elucidar questões sobre sua função, utilização e consequências futuras de seu uso.

Palavras-Chave: CRISPR. Edição de genomas. Engenharia Genética.

ABSTRACT

In recent decades, advances in molecular biology, provided great leaps in genetic engineering technologies. Recently, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) have interacted with biotechnology and several other biology areas. The discovery of this system has broadened the horizons of genome editing due to its easy manipulation and high precision. CRISPR / Cas technology enables genetic manipulation with simple tools, such as scissors, which can be targeted to the gene to be excluded. However, this system does not corroborate ethical issues, whereas its

¹ Graduanda do curso de Biomedicina na Faculdade do Espírito Santo - Multivix - Cachoeiro de Itapemirim.

² Doutora em Genética e Melhoramento. Orientador e Docente do Curso de Biomedicina na Faculdade do Espírito Santo - Multivix - Cachoeiro de Itapemirim;

applications can be directed towards the acquisition of aesthetic advantages, such as the production of perfect organisms. Due to its recent discovery, this system is still being evaluated in order to elucidate questions about its function, use and future consequences of its use.

Keywords: CRISPR. Genomic Edition. Genetic engineering.

1 INTRODUÇÃO

Quando pensamos em engenharia genética imaginamos um mundo com super-humanos, pessoas perfeitas, mutantes, e talvez a criação de uma nova espécie, que causaria efeitos deletérios para o *Homo sapiens*. Mas, que tal imaginarmos uma edição genômica ao nosso favor? Um mundo sem câncer, com a cura para o vírus HIV e a ausência de doenças genéticas. Não é um futuro de filmes, é uma biotecnologia próxima e presente em nossas vidas e todas essas vantagens podem ser fornecidas através do sistema CRISPR/Cas.

O curioso dessa técnica é que foi descoberta ao acaso. O estudo das geneticistas Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier era baseado no mecanismo imunológico de bactérias. Tratava-se de uma pesquisa com a finalidade de descobrir como esses microrganismos lidavam com infecções virais. Em poucos segundos os vírus tinham a capacidade de destruir sua estrutura celular levando a morte da bactéria, por este motivo seu sistema imune deveria ser eficiente e rápido na defesa a estes bacteriófagos.

Para auxiliar nesse processo, muitas bactérias apresentam um mecanismo imunológico adaptativo, o CRISPR, que é capaz de detectar o DNA viral e destruí-lo rapidamente. Uma das ferramentas desse sistema é uma proteína, a Cas9, que tem a capacidade de localizar, clivar e degradar o DNA do vírus de forma específica. Baseadas nesse mecanismo as cientistas descobriram que há a possibilidade de usar a Cas9 como tecnologia da engenharia genética, para apagar ou inserir genes específicos do DNA humano. Dessa forma a técnica ficou conhecida como CRISPR/CAS9, e mostra-se capaz de revolucionar os parâmetros da edição do DNA. O CRISPR/Cas9 apresenta-se como uma ferramenta capaz de solucionar vários problemas antes impossíveis, e por ser de simples resolução e apresentar

características promissoras, vários cientistas estão realizando pesquisas acerca de sua utilização. Por este motivo, este trabalho tem como objetivo buscar respostas sobre esta técnica, apresentando uma projeção de sua utilização em meio a discussões éticas de seu uso.

2 O *locus* CRISPR “REPETIÇÕES PALINDRÔMICAS CURTAS AGRUPADAS E REGULARMENTE INTERESPAÇADAS”

A história da descoberta do sistema CRISPR começa no porto mediterrâneo de Santa Pola, em Costa Blanca, na Espanha, onde Francisco Mojica, que cresceu nas proximidades, iniciou os seus estudos de doutorado em 1989 na Universidade de Alicante. Em um de seus estudos, Mojica isolou cepas de *Archaea* que apresentavam tolerância à salinidade do local, e descobriu que essa concentração salina estaria afetando o mecanismo de ação de enzimas de restrição. Ao isolar fragmentos de DNA dessa espécie encontrou uma estrutura curiosa que apresentava múltiplas cópias de uma quase perfeita sequência palindrômica, repetindo 30 bases que não se assemelhavam a nenhuma sequência genômica de qualquer família de micróbios até então conhecidos (LANDER, 2016).

Anteriormente a Mojica, em 1987, Ishino, ao estudar cepas de *Escherichia coli*, descreveu o mesmo achado em um de seus estudos (RICHTER et al., 2012). As matrizes CRISPR foram identificadas em aproximadamente 40% das bactérias e 90% de *Archaea* (MANGERICO et al., 2016).

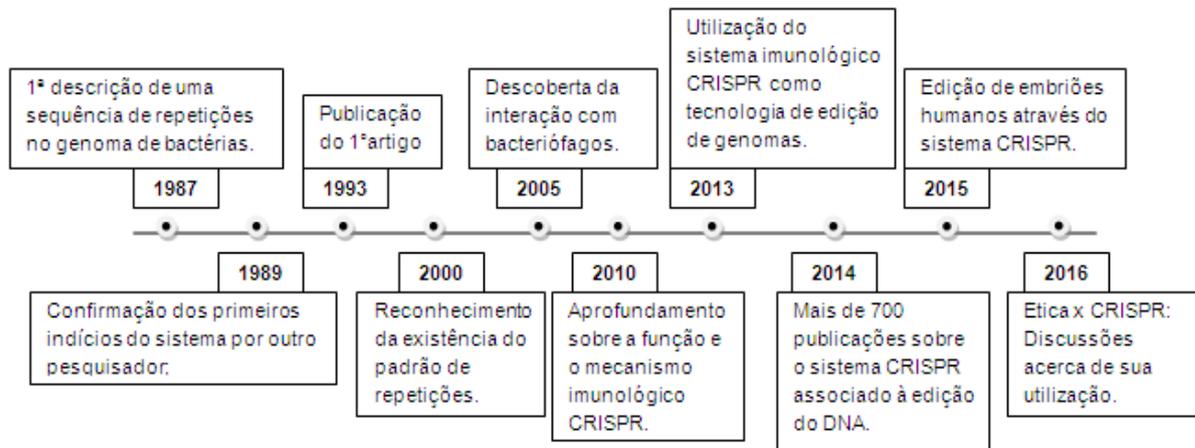
Francisco Mojica foi o primeiro pesquisador a caracterizar o que hoje é chamado de CRISPR, em artigo publicado no ano de 1993. Ele trabalhou com esse sistema durante toda a década de 1990, e em 2000, reconheceu que as sequências díspares de repetição, realmente compartilhavam um conjunto comum de recursos, hoje conhecidas por serem marcas de sequências CRISPR. Em 2005, Mojica relatou que estas sequências de fragmentos correspondem à parte dos genomas de bacteriófagos invasores. Esta descoberta levou-o a hipótese de que CRISPR é um sistema imunitário adaptativo (BROAD INSTITUTE, 2016).

Até 2010, apenas cinco anos após a primeira evidência experimental para CRISPR na imunidade bacteriana, a função e os mecanismos do sistema CRISPR foram tornando-se mais claros. Vários estudos começaram a explorar o sistema de CRISPR natural para várias aplicações biotecnológicas, incluindo a geração de culturas lácteas resistentes aos bacteriófagos e classificação filogenética de estirpes bacterianas. No entanto, a edição do genoma, utilizando o sistema, ainda não havia sido explorada (HSU et al., 2014).

Um passo importante para a compreensão do papel dos CRISPR foi a identificação de quatro genes estritamente localizados às matrizes CRISPR, que foram denominadas Cas, uma família gênica associada à CRISPR. Esses genes, que estão presentes apenas em genomas que contêm matrizes CRISPR, possuem funções preditas de helicases, polimerases, e nucleases, o que levou à hipótese de que o sistema CRISPR/Cas poderia estar envolvido na reparação do DNA. A literatura descreve outros tipos de enzimas Cas, com variadas funções no mecanismo imunológico. Para fins de manipulação genética, a proteína Cas9 é a mais utilizada. (RICHTER et al., 2012).

O poder do sistema CRISPR/Cas9 para a engenharia genética, em células eucarióticas, foi demonstrado a partir do ano de 2013. De acordo com os pioneiros da tecnologia CRISPR, a definição moderna de engenharia genômica refere-se à modificação alvejada do genoma, o seu contexto (marcadores epigenéticos) e seus resultados (transcrições). Este é um lembrete útil de que a tecnologia de edição de genoma, tais como CRISPR/Cas9 difere dos métodos clássicos de edição, em que a manipulação do genoma era restrita à utilização de recombinação homóloga (RH) à base de técnicas que se baseiam na homologia do modelo doador e região alvo (HEIDARI, 2015).

Figura 1: Evolução do sistema CRISPR/Cas.



Fonte: Arquivo pessoal.

Uma característica inovadora do sistema CRISPR/Cas9 se comparado a outras técnicas de terapia gênica é a capacidade de reconhecimento do sistema, que é ditada pelas interações de emparelhamento de bases de um RNA guia com o seu DNA alvo. A meta-especificidade de CRISPR/Cas9 e a relativa facilidade de utilização deste sistema abrem uma variedade de oportunidades experimentais para a investigação, medicina e biotecnologia. Desde a sua principal aplicação como uma ferramenta de edição de genoma em 2013, tem sido amplamente utilizada em várias linhas de células e organismos, incluindo ratos, ratazanas, moscas de fruta, nematóides, salamandras, sapos e macacos; bem como, plantas de cultura de arroz, trigo, soja e do tabaco; e em fungos, organóides, células estaminais embrionárias humanas e células-tronco pluripotentes induzidas (HEIDARI, 2015).

De acordo com um relatório publicado recentemente na revista Nature, publicações científicas sobre CRISPR superam qualquer outra tecnologia de edição de gene, atingindo mais de 700 estudos no início de 2014. Alocações de financiamento e pedidos de patentes para CRISPR indicam também uma mudança significativa para esta tecnologia. Seguindo a invenção precoce do sistema CRISPR, algumas empresas foram fundadas com um foco principal na aplicação terapêutica de CRISPR, incluindo Caribou Bioscience, CRISPR Therapeutics e Intellia Therapeutics, o que demonstra um futuro promissor para a técnica (LEDFOORD, 2015).

2.1 O Mecanismo Imunológico CRISPR-Cas

Bactérias e *Archaea* evoluíram seus mecanismos reguladores de defesa e transformaram a forma como respondem a vários fatores de estresse ambiental, especialmente ataques virais. O entendimento sobre este arsenal foi ampliado com a descoberta do sistema CRISPR. As bactérias podem se “lembrar” de seus invasores virais, por amostragem, sequências curtas de DNA, conhecidas como “protospacers” (protoespaçadores), a partir dos materiais genéticos de bacteriófagos. Estas sequências se integram ao próprio DNA da bactéria, especificamente em uma matriz de sequências repetidas, CRISPR. As sequências integradas são chamadas de espaçadores. Quando estas sequências são transcritas e transformadas em pequenos RNAs, eles guiam um complexo multifuncional de proteínas (proteínas Cas - proteínas associadas CRISPR) para reconhecer e clivar o material genético de entrada externa (MANGERICAO et al., 2016).

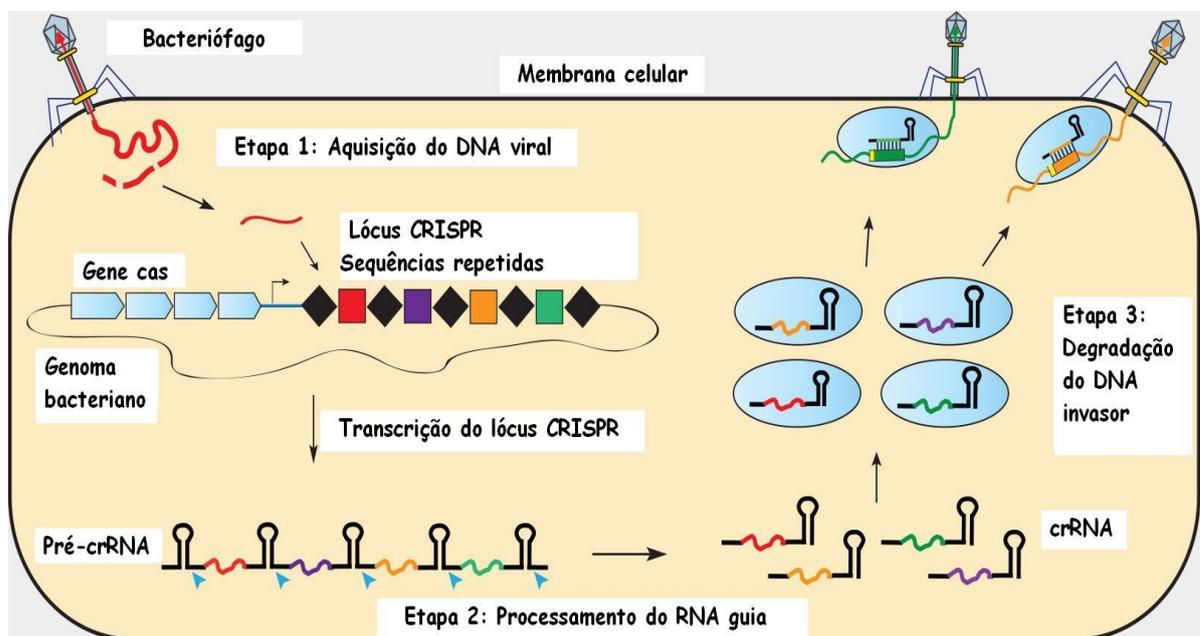
O sistema CRISPR é uma matriz de cópias repetidas conectadas por sequências de ligação de comprimento fixo. As sequências ligantes são chamadas de espaçadores e são normalmente obtidas a partir dos elementos genéticos que invadem as células microbianas, os bacteriófagos. Um CRISPR pode ser ativado pelos seus genes vizinhos CRISPR-associado (CAS), e os espaçadores serão processados em RNA molecular. A forma de RNA espaçadores vai reprimir as atividades de elementos estranhos com regiões complementares inversas que invadem as células hospedeiras (MAI, 2016).

A aquisição de sequências espaçadoras de um dado fago por uma célula confere sensibilidade diminuída a infecções posteriores por este vírus. Os protoespaçadores são encontrados próximos à sequência PAM (do inglês “*proto-spacer adjacent motif*” – motivo adjacente ao protoespaçador). Quando um novo espaçador é incorporado ao arranjo CRISPR, ele é introduzido à extremidade proximal, próximo à sequência líder, que geralmente apresenta-se rica em A-T e tem cerca de 500pb de comprimento (WATSON et al., 2015).

O promotor a partir do qual a expressão é iniciada está localizado na região líder e gera um único transcrito de RNA chamado pré-crRNA. A expressão do CRISPR de

E.coli foi intensamente estudada, e por isso é conhecido que, nesses microrganismos, CRISPR está associado a oito genes Cas, e os produtos de cinco deles formam um complexo, conhecido como Cascade. Este complexo inclui uma subunidade que está implicada no processamento do longo transcrito em crRNAs individuais curtos, cada um deles tendo o comprimento de um espaçador e uma sequência repetida. Estes pequenos RNAs permanecem ligados ao complexo Cascade e o direcionam para os genomas de DNA de moléculas invasoras (WATSON et al., 2015).

Figura 2: Mecanismo de progressão do sistema CRISPR/Cas.



Fonte: Adaptado de The Doudna Lab, 2012.

O sistema CRISPR/Cas progride em três passos: aquisição do DNA viral; processamento dos RNA guias; e degradação do DNA invasor. Durante o primeiro passo, a célula identifica um novo invasor e integra uma parte do seu DNA no locus CRISPR do hospedeiro, assim que o protoespaçador for integrado dentro do locus CRISPR, este será denominado espaçador (MAIER et al., 2015). No segundo passo, o RNA é sintetizado, obtendo-se um longo pré-crRNA que é processado em pequenos crRNAs maduros e funcionais. Estes RNAs curtos são essenciais para o último passo, a degradação do DNA invasor, onde eles detectam a sequência invasora e servem de gatilho para a degradação do invasor por proteínas Cas (MAIER et al., 2015).

3 BENEFÍCIOS DA APLICAÇÃO DO SISTEMA CRISPR

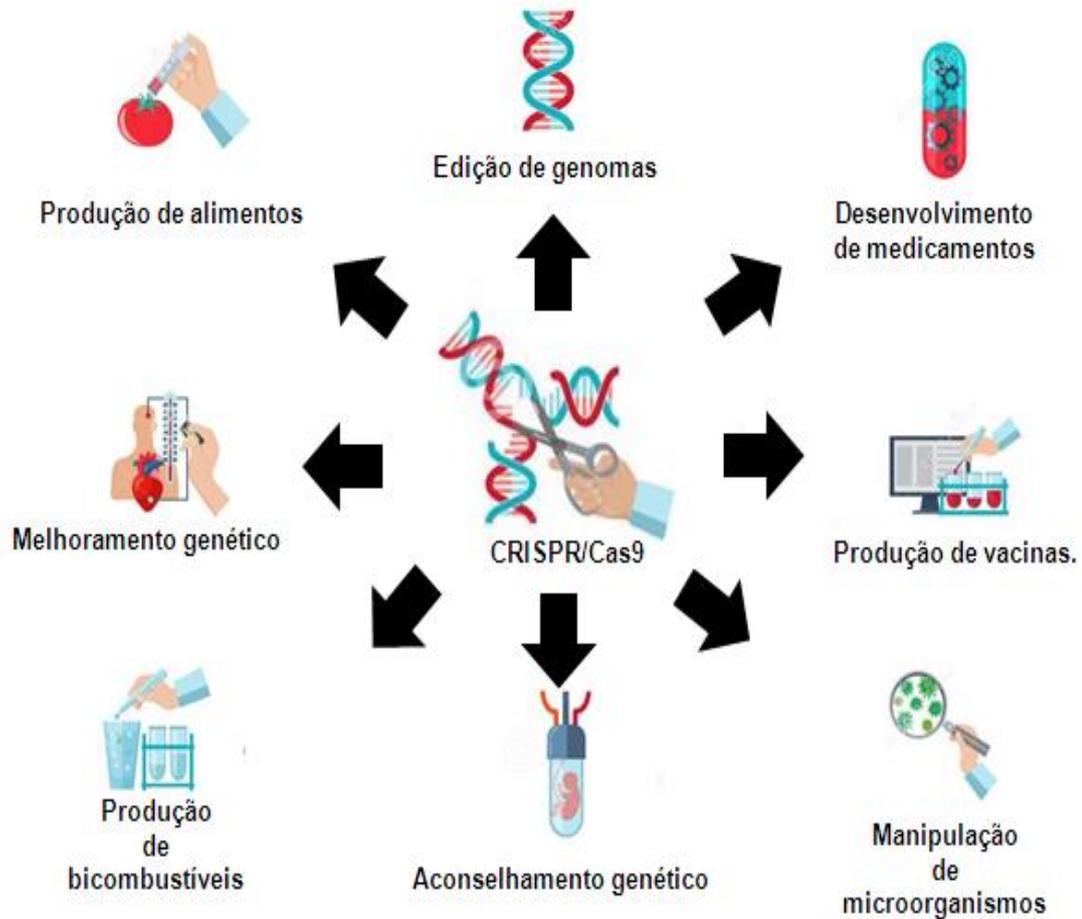
Algumas das principais aplicações do sistema CRISPR/Cas9 na pesquisa incluem a criação de mutações da linha germinal e geração de animais modelos transgênicos com eficiência e velocidade significativa, transplantes baseados em modelos “in vivo”, em que as células estaminais ou células progenitoras são modificadas por CRISPR e transplantados para receptores, e a adaptação mais popular onde uma técnica de administração “in vivo” direta é utilizada, tais como microinjeção de CRISPR através de vírus adeno-associado em tecido (DING et al., 2014).

Acerca deste tema, vários estudos têm sido propostos. Em estudos com ratos que apresentavam doença cardiovascular, foi sugerido que a terapia de genes por CRISPR/Cas9 foi capaz de alterar permanentemente o gene mutante e restaurar a função natural do produto do gene. Outro estudo recente em primatas demonstrou que a injeção de um sistema CRISPR/Cas9 em um embrião de uma célula é capaz de atingir simultaneamente dois genes em um passo, com elevada especificidade e fora do alvo de mutagênese (NIU et al., 2014).

Apesar de seu elevado potencial na engenharia genética, o sistema CRISPR, não vem sendo aplicado nessa área devido questões éticas. Aplicações emergentes incluem o desenvolvimento de vacinas, prevenção e tratamento de infecções, engenharia microbiana, terapia celular e medicina regenerativa, produção de biocombustíveis e engenharia de genomas (HEIDARI, 2015).

O sistema CRISPR/Cas9 surgiu com uma proposta inovadora que concilia praticidade, objetividade e especificidade. Suas aplicações não estão limitadas apenas a área médica, para manipulações genéticas ou desenvolvimento de novas drogas, estende-se a biotecnologia, onde pode ser manipulado a fim de produzir combustíveis e alimentos; além destas, na área biológica o sistema é capaz de manipular genes de animais e a variação genética de microrganismos (HSU et al., 2014).

Figura 3: Benefícios da utilização do sistema CRISPR/Cas9.



Fonte: Arquivo Pessoal.

4 LIMITAÇÕES DA TÉCNICA

A tecnologia de edição CRISPR oferece oportunidades inigualáveis no combate a doenças genéticas e modificação de genomas dos organismos vivos, humanos e outros. Os esforços dos cientistas na engenharia genética atingiram um pico quando CRISPR apareceu como uma tecnologia rápida, direta e de baixo custo, acessível quase em qualquer configuração básica de laboratório. Contudo, os riscos desconhecidos e os potenciais benefícios relativos a esta poderosa tecnologia de edição de gene precisam de uma investigação substancial e uma discussão aberta para permitir uma avaliação minuciosa de aspectos científicos, éticos e sociais desse problema (HEIDARI, 2015).

4.1 Discussões Éticas no Uso do Sistema CRISPR

A perspectiva de que CRISPR pode ser utilizada para modificar a linha genética humana tem estimulado debates internacionais (LANDER, 2016). Como uma tecnologia emergente, o sistema CRISPR/Cas9 está sujeito a um debate aquecido, apesar do seu elevado potencial de aplicação, e desenvolvimento de medicações terapêuticas, ferramentas de diagnóstico e melhoria de bioprodutos. A principal contribuição do sistema CRISPR à biomedicina está na engenharia genética e em reprogramação de células para modificar caminhos patológicos ou aumentar/reformar sua função biológica de várias formas, que anteriormente não existiam na natureza (HEIDARI, 2015).

Tentativas recentes por cientistas chineses para editar embriões humanos usando CRISPR (LIANG et al., 2015) causaram muita controvérsia ética e legal. Comitês de cientistas e bioeticistas manifestaram a sua preocupação sobre o estado imaturo de CRISPR em relação aos seus efeitos adversos, destacando a necessidade de uma investigação mais aprofundada de questões de segurança e eficácia antes de qualquer tentativa de engenharia do genoma humano (BALTIMORE et al., 2015).

Da mesma forma, o National Institutes of Health/EUA (NIH) reafirmou que não financiará qualquer uso de tecnologias de edição de gene em embriões humanos, de acordo com a emenda Dickey-Wicker (1996), que proíbe o uso de fundos federais para a criação, destruindo ou conscientemente ferindo embriões humanos. O Food and Drug Administration/EUA (FDA) funciona como árbitro final da aplicação clínica da terapia genética, mas tais decisões estão sujeitas a revisão pela Comissão de Recombinant DNA Advisory (RAC) do NIH. Em 2013, nas suas revisões sobre orientações para a investigação envolvendo moléculas recombinantes/sintéticos de ácidos nucleicos, NIH declarou que “não apoiará propostas de alteração da linha germinal, mas vai considerar propostas que envolvam a transferência de genes de células somáticas”.

A interferência com a composição genética da linha germinal tem sido um assunto socialmente sensível desde os primórdios da engenharia genética, uma vez que aumenta a intervenção biológica para uma perspectiva altamente ética. Por exemplo,

o artigo 1º da Declaração Universal sobre o Genoma Humano e os Direitos Humanos (1997) declara que "o genoma humano subordina a unidade fundamental de todos os membros da família humana, bem como o reconhecimento de sua inerente dignidade e diversidade", em um sentido simbólico, é o patrimônio da humanidade (UNESCO, 1997).

A declaração da UNESCO classifica o genoma humano como patrimônio mundial, que deverá ser inerentemente protegido e conservado para as gerações futuras. Embora a UNESCO considere a integridade do genoma humano que evolui, desenvolve mutações e expressa diferentes potencialidades de cada indivíduo, permanece vaga se as deficiências genéticas e deficiências que causam doenças graves são consideradas como variações do genoma humano com um propósito evolutivo e, portanto, sujeitos à proteção e conservação, ou se são erros biológicos que podem ser eticamente corrigidas por meio de tecnologia.

A visão da Comissão Europeia sobre a terapia genética é refletida na Diretiva 2009/120/CE, que se refere à terapia genética, terapia com células somáticas e engenharia de tecidos como terapia avançada. No entanto, devido às complicações técnicas dos dispositivos médicos e o aspecto interdisciplinar de terapia avançada, uma comissão especial foi formada para organizar uma investigação caso a caso para as tecnologias emergentes que possam cair sobre terapias avançadas (EUROPEAN COUNCIL, 2001).

O Comitê das Terapias Avançadas (COMMITTEE FOR ADVANCED THERAPIES, CAT) é o órgão autorizado para comercialização centralizada que é responsável pela avaliação de novos produtos de terapia avançada e regulamentação técnica das respectivas tecnologias. De acordo com a CAT, um medicamento de terapia genética "(A) contém uma substância ativa que contém ou é constituído por um ácido nucléico recombinante usado ou administrado em seres humanos visando à regulação, reparação, substituição, adição ou exclusão de uma sequência genética; (B) o seu efeito terapêutico, profilático ou de diagnóstico está diretamente relacionada com a sequência de ácido nucléico recombinante que contém, ou com o produto da expressão genética desta sequência" (EUROPEAN COUNCIL, 2001).

Embora a terapia genética em células somáticas parecesse ter a aprovação condicional da legislação da União Europeia, qualquer interferência no material genético da linha germinativa é proibida, tal como indicado na Convenção sobre Direitos Humanos e Biomedicina do Conselho Europeu, que permite engenharia genética só por razões preventivas, de diagnóstico ou terapêuticas, e apenas quando não tem por objetivo alterar a composição genética dos descendentes de uma pessoa (EUROPEAN COUNCIL, 1997).

O sistema CRISPR levanta questões através de um espectro dinâmico da ciência, ética e política. Embora reconheçamos o princípio de "não prejudicar", um diálogo coerente entre ciência e ética pode equilibrar a posição de tais tecnologias em decisões políticas e elaboração de legislação. No entanto, como um pré-requisito da legislação democrática, precisamos envolver efetivamente a voz pública neste procedimento. Um risco relativo à percepção pública das tecnologias de ponta, e em particular os relacionados com a saúde humana, e a validade das informações acessíveis ao público. Meios de comunicação, por vezes deturpam a ciência ao público, e a linha tênue entre ciência e ficção deve ser levada a sério quando se discute edição de genoma, para evitar equívocos em torno de suas implicações médicas e sobre os riscos potenciais. Por outro lado, pode-se argumentar que os cientistas não são eleitos pelo povo e não necessariamente representam os valores da sociedade. Uma política transparente onde a vantagem realista e desvantagem de tais tecnologias são comunicadas ao público, certamente, deve servir para alcançar o objetivo (SAREWITZ 2015).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sistemas CRISPR/Cas são mecanismos de defesa procariontes generalizados e versáteis que fornecem imunidade adaptativa e hereditária para bactérias. Sua descoberta inicial direcionou cientistas para a imunidade bacteriana, a fim de solucionar mecanismos com os quais as bactérias combatiam bacteriófagos, ou tornavam-se resistentes a estes. O aprofundamento desse mecanismo revolucionou a biologia molecular. Nos últimos anos, a investigação realizada nestes sistemas levou a uma compreensão mais profunda dos seus princípios subjacentes. Grande progresso tem sido feito em relação à estrutura, função e interações de algumas

proteínas Cas. Estas são fundamentais para o princípio da técnica, pois ao serem direcionadas pelos RNA guias são capazes de editar uma sequência genética. O sistema CRISPR/Cas9 atrai pesquisadores, devido a sua elevada eficiência, sua relativa facilidade de utilização e seu futuro promissor. No entanto, esbarra com questões éticas devido a sua ampla utilização na edição de genomas. No campo ético, frequentemente ocorrem diversas discussões acerca da utilização do sistema CRISPR, questões são levantadas e a disputa entre bioeticistas e pesquisadores de diversas áreas biotecnológicas torna-se cada vez mais intensa, ao passo que as pesquisas avançam em um ritmo acelerado. Essa técnica fornece vantagens e desvantagens, e devido a sua recente descoberta, esses benefícios e malefícios não são claramente conhecidos, o que gera uma incerteza no meio científico. Em meio a tantos pontos de discussão e avanços nas pesquisas, a clareza de seu mecanismo de utilização torna-se extremamente necessária para progressão de seu uso futuro.

6 REFERÊNCIAS

BALTIMORE, D.; BERG, P.; BOTCHAN, M.; CARROLL, D.; CHARO, R. A.; CHURCH, G., et al. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. **Science**, v. 348, p. 36-38, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4394183/>> Acesso em 22 junho 2016.

U.S DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. National institutes of health. **Statement on NIH funding of research using gene-editing technologies in human embryos**. Estados Unidos, 2015. Disponível em: <<http://www.nih.gov/about-nih/who-we-are/nih-director/statements/statement-nih-funding-research-using-gene-editing-technologies-human-embryos>> Acesso em: 22 junho 2016.

Disponível em: <https://www.broadinstitute.org/what-broad/areas-focus/project-spotlight/crispr-timeline> Acesso em: 17 junho 2016.

EUROPA. European Council. Council of the European Union. **Convention on human rights and biomedicine**: Convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine. Oviedo, 1997. Disponível em: <<https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?docuementId=090000168007cf98>> Acesso em: 22 junho 2016.

EUROPA. European Council. Council of the European Union. **Directive 2001/20/EC of the european parliament and of the council**: on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use. 2001. Disponível em: <

http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_20/dir_2001_20_en.pdf> Acesso em: 22 junho 2016.

HEIDARI, Raheleh; SHAW, David Martin; ELGER, Bernice Simone. CRISPR and the Rebirth of Synthetic Biology. **Science and Engineering Ethics**. p 1–13. Dezembro/2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11948-016-9768-z>> Acesso em: 22 junho 2016.

HSU, Patrick D.; LANDER, Eric S.; ZHANG, Feng. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, Alemanha, p.157, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4343198/> Acesso em: 18 junho 2016.

LANDER, Eric S. The Heroes of CRISPR. **Cell**, Alemanha, v. 164, p.18-28, jan/2016. Disponível em: <https://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=ptBR&prev=search&rurl=translate.google.com.br&sl=en&u=https://www.broadinstitute.org/files/news/pdfs/PIIS0092867415017055.pdf&usg=ALkJrh2xDZpyoy1hn36UxAulAE30RVv7w>. Acesso em: 17 junho 2016.

LEDFOURD, Heidi. CRISPR, the disruptor. **Nature**, v.522, p.20–24, junho/2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/news/crispr-the-disruptor-1.17673>> Acesso em: 22 junho 2016.

LIANG, P.; XU, Y.; ZHANG, X.; DING, C.; HUANG, R.; ZHANG, Z.; et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tri pro nuclear zygotes. **Protein and Cell**, v.6(5), p. 363–372. Maio/2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4417674/>> Acesso em: 22 junho 2016.

MAI, Guoqin; GE, Ruiquan; SUN, Guoquan; MENG; Qinghan, ZHOU, Fengfeng. A Comprehensive Curation Shows the Dynamic Evolutionary Patterns of Prokaryotic CRISPRs. **Bio Med Research International**, Estados Unidos, v.2016, abril/2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4852346/>> Acesso em: 17 junho 2016.

MAIER, Lisa-Katharina; STACHLER, ArisEdda; SAUNDERS, Sita J; BACKOFEN, Rolf; MARCHFELDER, Anita. An Active Immune Defense with a Minimal CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) RNA and without the Cas6 Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.290, Dezembro/2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4326828/>> Acesso em: 19 junho 2016.

MANGERICAO, Tatiana C.; PENG, Zhanhao; ZHANG, Xuegong. Computational prediction of CRISPR cassettes in gutmeta genomes amples from Chinese type-2 diabetic patients and healthy controls, **BMC Systems Biology**, Estados Unidos, v. 2016, janeiro/2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4895601/>> Acesso em: 17 junho 2016.

NIU, Y.; SHEN, B.; CUI, Y.; CHEN, Y.; WANG, J.; WANG, L., et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. **Cell**, Alemanha, v. 156, p. 836–843, fevereiro/2014. Disponível em: <[http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(14\)00079-8](http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(14)00079-8)> Acesso em: 22 junho 2016.

RICHTER, Corinna; CHANG James T.; FINERAN, Peter C. Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems. **Viruses**, Estados Unidos, outubro/2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3497052/>> Acesso em: 19 junho 2016.

SAREWITZ, D. CRISPR: Science can't solve it. **Nature Comments**, v. 522, p. 413–414. Junho/2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/news/crispr-science-can-t-solve-it-1.17806>> Acesso em: 22 junho 2016.

The Doudna Lab. Exploring molecular mechanisms of RNA-mediated gene regulation, 2012. Internal. Lab Safety. Disponível em: <http://rna.berkeley.edu/index.html> Acesso em: 08 novembro 2016.

UNESCO. (1997). Universal declaration on the human genome and human rights. Disponível em: <http://portal.unesco.org/en/ev.php-URL_ID=13177&URL_DO=DO_TOPIC&URL_SECTION=201.html> Acesso em: 22 junho 2016.

WATSON, James D., et al. **Biologia Molecular do Gene**. In: RNAs Reguladores. Porto Alegre: Artmed, 2015. 7ed. Cap.20, p.701-732.

