

CLAUDIANE AYRES
(ORGANIZADORA)

Collection:

APPLIED BIOMEDICAL ENGINEERING

Atena
Editora
Ano 2022

CLAUDIANE AYRES
(ORGANIZADORA)

Collection:

APPLIED BIOMEDICAL ENGINEERING

Atena
Editora
Ano 2022

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremo

Daphynny Pamplona

Gabriel Motomu Teshima

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-Não-Derivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto

Profª Drª Alana Maria Cerqueira de Oliveira – Instituto Federal do Acre

Profª Drª Ana Grasielle Dionísio Corrêa – Universidade Presbiteriana Mackenzie

Profª Drª Ana Paula Florêncio Aires – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná



Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Bitencourt Campos – Universidade do Extremo Sul Catarinense
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora
Prof. Dr. Miguel Adriano Inácio – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista



Diagramação: Bruno Oliveira
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Claudiane Ayres

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C697 Collection: applied biomedical engineering / Organizadora
Claudiane Ayres. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5983-989-6

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.896220604>

1. Biomedical engineering. I. Ayres, Claudiane
(Organizadora). II. Título.

CDD 610.28

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br



DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



APRESENTAÇÃO

Considerada uma área de atuação do campo da saúde em grande expansão, capaz de atuar em várias modalidades (seja na avaliação, diagnóstico, prevenção ou tratamento de doenças, entre outras), visando sempre contribuir para melhora da qualidade de vida e saúde da população em geral, a área da **Engenharia Biomédica** vem se fundamentando cada vez mais como uma carreira profissional de grande valorização e importância para a sociedade, contribuindo nos avanços tecnológicos e melhorias na saúde de forma geral. Estimulados a compartilhar informações sobre as mais variadas formas de atuação dessa área com todos os interessados, a editora Atena lança o e-book “Collection: Applied biomedical engineering” (Coleção: Engenharia biomédica aplicada), que traz 4 artigos capazes de demonstrar parte da atuação inter e multidisciplinar que envolve a área da engenharia biomédica, e dessa forma, evidenciar algumas das contribuições dessa ciência que desenvolve abordagens inovadoras, capazes de intervir nas diferentes vertentes que envolvem a saúde e valorização da vida.

Convido- te a conhecer as diversas possibilidades que envolvem essa área tão inovadora e abrangente.

Aproveite a leitura!


Claudiane Ayres

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

ASPECTOS GERAIS SOBRE A TÉCNICA CRISPR/CAS9 - UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE PATOLOGIAS

Brenno Willians Hertel de Sousa
Lustarllone Bento de Oliveira
Pedro Henrique Veloso Chaves
Felipe Monteiro Lima
Grasiely Santos Silva
Ikaro Alves de Andrade
José Vanderli da Silva
Nara Rubia Souza
Bruno Henrique Dias Gomes
Joselita Brandão de Sant'Anna
Marcela Gomes Rola
Krain Santos de Melo
Raphael da Silva Affonso

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.8962206041>

CAPÍTULO 2..... 17

EFEITOS DO CORTISOL E SEU USO COMO BIOMARCADOR DE ESTRESSE EM ATLETAS


Conceição de Maria Aguiar Carvalho
Amanda de Castro Amorim Serpa Brandão
Janyerson Dannys Pereira da Silva
Luana Mota Martins
Samuel Guerra Torres

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.8962206042>

CAPÍTULO 3..... 25

MODELAGEM E ANÁLISE DE TENSÕES DE UMA PRÓTESE PARA MEMBROS INFERIORES DO TIPO *FLEX*


Elias Dagostini
Fábio Rodrigo Mandello Rodrigues

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.8962206043>

CAPÍTULO 4..... 37

MONITORAÇÃO NÃO INVASIVA DA PRESSÃO INTRACRANIANA EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Claudiane Ayres
José Carlos Rebuglio Velloso
Gustavo Henrique Frigieri Vilela
Danielle Cristyne Kalva Borato
Cristiane Rickli Barbosa

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.8962206044>

SOBRE A ORGANIZADORA.....	46
ÍNDICE REMISSIVO.....	47

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GERAIS SOBRE A TÉCNICA CRISPR/ CAS9 - UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE PATOLOGIAS

Data de aceite: 01/04/2022

Brenno Willians Hertel de Sousa

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade
Taguatinga, Taguatinga, DF.
<http://lattes.cnpq.br/6850574524150132>

Lustarllone Bento de Oliveira

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade
Taguatinga, Taguatinga, DF.
<http://lattes.cnpq.br/8523196791970508>

Pedro Henrique Veloso Chaves

Faculdade LS – Unidade Taguatinga,
Taguatinga, DF.
<http://lattes.cnpq.br/7111417304584305>

Felipe Monteiro Lima

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade
Taguatinga Sul, Taguatinga, DF.
<http://lattes.cnpq.br/1716595016675287>

Grasiely Santos Silva

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade
Asa Norte, Brasília, DF.
<http://lattes.cnpq.br/7162473361438597>

Ikaro Alves de Andrade

Universidade de Brasília – Darci Ribeiro,
Brasília, DF.
<http://lattes.cnpq.br/9506665216259271>

José Vanderli da Silva

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade
Taguatinga, Taguatinga, DF.
<http://lattes.cnpq.br/9684793696420465>

Nara Rubia Souza

Faculdade LS/Escola Técnica, Unidade
Taguatinga, Taguatinga, DF.
<http://lattes.cnpq.br/5393031755510188>

Bruno Henrique Dias Gomes

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade
Taguatinga, Taguatinga, DF.
<http://lattes.cnpq.br/1433679199177049>

Joselita Brandão de Sant'Anna

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade
Taguatinga, Taguatinga, DF.
<http://lattes.cnpq.br/7307926945059462>

Marcela Gomes Rola

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade
Taguatinga, Taguatinga, DF.
<http://lattes.cnpq.br/5551200316101130>

Krain Santos de Melo

Centro Universitário do Distrito Federal –
Unidade Brasília, Brasília, DF.
<http://lattes.cnpq.br/6309826248449032>

Raphael da Silva Affonso

Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade
Taguatinga, Taguatinga, DF.
<http://lattes.cnpq.br/4169630189569014>

RESUMO: Com a evolução das técnicas de edição gênica, a ferramenta CRISPR/Cas9 tem ganhado grande destaque nos últimos anos, demonstrando-se como um sistema de fácil manipulação e com o potencial promissor de ser utilizado futuramente como um instrumento no tratamento de diversas doenças. Fundamentado nisso, a técnica CRISPR/Cas9 surgiu a partir da

observação de determinados loci genômicos em microrganismos. Com isso, descobriu-se que o sistema CRISPR era um complexo de defesa responsável pela clivagem de material genético de organismos invasores, diferenciando-se pela utilização de segmentos de RNA que serviam como direcionadores das nucleases responsáveis pela clivagem, constituindo assim um sistema com grande especificidade. Baseado nesse complexo, surgiu a técnica CRISPR/Cas9, que utiliza uma endonuclease associada a um RNA guia para a realização de cortes em matérias genéticas de interesse, proporcionando a possibilidade de modificação genéticas controladas. Resultando assim, em uma ascensão de novas possibilidades de edições gênicas, sendo possivelmente uma excelente ferramenta para o tratamento de diversas patologias, apresentando resultados promissores. Além disso, devido a possibilidade de edição de material genético em embriões, a técnica CRISPR, tem sido contestada sobre os limites de aplicação que devem ser estabelecidos para esta ferramenta, gerando diversas discussões éticas. Portanto, apesar da capacidade promissora da ferramenta CRISPR/Cas9, os seus mecanismos de atuação ainda não são totalmente compreendidos, causando em diversos casos modificações genéticas em locais não planejados. Evidenciando assim, a necessidade de mais estudos nessa área, sendo uma ferramenta que talvez revolucione as formas de tratamentos utilizados pela medicina tradicional.

PALAVRAS-CHAVE: Crispr/cas9. Crispr/cas9 e patologias. Crispr e ética. Edição gênica.

GENERAL ASPECTS ABOUT THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE - USE IN THE TREATMENT OF PATHOLOGIES

ABSTRACT: With the evolution of gene editing techniques, the CRISPR/Cas9 tool has gained great prominence in recent years, proving to be an easy-to-handle system with promising potential to be used in the future as an instrument in the treatment of various diseases. Based on this, the CRISPR/Cas9 technique emerged from the observation of certain genomic loci in microorganisms. With that, it was discovered that the CRISPR system was a defense complex responsible for the cleavage of genetic material from invading organisms, differentiating itself by the use of RNA segments that served as directors of the nucleases responsible for the cleavage, thus constituting a system with great specificity. Based on this complex, the CRISPR/Cas9 technique emerged, which uses an endonuclease associated with a guide RNA to perform cuts in genetic material of interest, providing the possibility of controlled genetic modification. Thus resulting in a rise of new possibilities for gene editing, possibly being an excellent tool for the treatment of various pathologies, showing promising results. In addition, due to the possibility of editing genetic material in embryos, the CRISPR technique has been contested about the application limits that must be established for this tool, generating several ethical discussions. Therefore, despite the promising capability of the CRISPR/Cas9 tool, its mechanisms of action are still not fully understood, causing in many cases genetic modifications in unplanned locations. Thus, demonstrating the need for more studies in this area, being a tool that may revolutionize the forms of treatment used by traditional medicine.

KEYWORDS: Crispr/cas9. Crispr/cas9 and pathologies. Crisp and ethics. Gene editing.

1 | INTRODUÇÃO

O sistema CRISPR/Cas9 foi descoberto como um mecanismo de defesa pertencente à alguns grupos de bactérias. Descobriu-se que endonucleases específicas, denominadas de Cas9, atuavam na clivagem de material genético invasor, transformando-os em fragmentos de pequenas sequências de nucleotídeos que posteriormente eram inseridos em determinados sítios do próprio genoma bacteriano, esses locais foram designados como *locus* CRISPR. Baseado nesse sistema, foi possível realizar adaptações para que essa mecânica fosse aplicada em outros organismos. Com isso, desenvolveu-se a técnica CRISPR/Cas9, que consiste na utilização de um RNA guia, que atuará no direcionamento até a sequência de DNA alvo, e uma nucleasse (Cas9), que ao se combinarem formam um complexo com capacidade de clivar filamentos de material genético específico, permitindo a inserção ou deleção de genes de interesse, facilitando assim, modificações genéticas em determinados sítios alvos. Fundamentado nisso, a técnica CRISPR/Cas9 tem sido nos últimos anos a tecnologia de maior importância no âmbito da edição gênica, sendo um dos recursos mais explorados dentro das terapias gênicas, demonstrando-se como uma ferramenta promissora e com grande capacidade de ser utilizada no tratamento de variadas patologias. Assim, podemos inferir o seguinte questionamento: quais são as noções básicas sobre a técnica CRISPR/Cas9 e em quais tratamentos sua tecnologia tem o potencial de ser aplicada? Afinal, é imprescindível uma abordagem que explore a complexidade de uma tecnologia tão nova e passível de investimentos. Possibilitando uma visão inovadora sobre o potencial que a técnica apresenta sobre os tratamentos convencionais, mostrando que é possível novas abordagens terapêuticas em doenças que desafiam a ciência.

2 | FUNDAMENTOS GERAIS SOBRE O SISTEMA CRISPR/CAS9

CRISPR sigla do inglês para *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, pode ser traduzida como: Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas (BARBOSA; CAVALCANTE, 2019). É um sistema que foi identificado inicialmente em organismos procariotos, sendo caracterizado por apresentar uma organização inédita em determinados lócus do genoma desses microrganismos. O padrão de conformação encontrado destacava-se por conter pequenas sequências de nucleotídeos que se ordenavam na forma de palíndromos, sendo regularmente intercaladas por certos segmentos singulares de nucleotídeos (DIAS; DIAS, 2018; GONÇALVES; PAIVA, 2017). Dessa maneira, pesquisadores conseguiram determinar que as sequências singulares que intercalavam os arranjos palindrômicos eram de procedência extracromossômica, sendo derivadas de segmentos de material genético invasor, esses segmentos possibilitariam uma espécie de memória em relação a invasões anteriores (EMBRAPA, 2020), sendo estabelecido que esse sistema servia como um mecanismo de defesa de bactérias e Arqueas contra elementos genéticos com capacidade invasiva (JINEK *et al.*, 2014). Desse modo, entendeu-se que através de alguns processos de clivagem, pequenos segmentos do

material genético do invasor eram integrados no genoma das próprias bactérias e Arqueas, sendo os fragmentos exógenos incorporados entre sequências curtas de nucleotídeos de conformação palindrômica e que sempre repetiam-se, fomentando na estruturação geral do locus CRISPR. Assim, ao serem inseridos no genoma, os fragmentos exógenos passam a ser denominados de espaçadores (ALVES, 2019; JINEK et al., 2012). À vista disso, mediante necessidade, o locus CRISPR pode passar por processos de transcrição, transformando-se em uma sequência de RNA direcionadora encarregada pelo reconhecimento de alvos genômicos através do pareamento de bases nitrogenadas, que em associação com as proteínas Cas (*CRISPR associated proteins*), forma-se um complexo responsável pela clivagem e degradação de material genético invasor (VIEIRA et al., 2016). Fundamentado nisso, é elucidado por Jiang e Marraffini (2015) que existem três tipos de sistema CRISPR-Cas utilizados como sistema de defesa dos organismos procariontes, sendo que cada um é agrupado de acordo com características de conservação dos genes Cas e da organização dos promotores de transcrição. Com base nisso, a partir do sistema de defesa CRISPR-Cas do tipo II, que é caracterizado pela participação da endonuclease Cas9 associada à um RNA guia, foi possível realizar adaptações que permitiram a aplicação em outros organismos vivos, tendo como consequência o desenvolvimento da técnica CRISPR/Cas9, que tem sido explorada para a edição e manipulação gênica (SANTOS et al., 2016; JIANG; MARRAFINI, 2015).

Desse modo, o sistema CRISPR/Cas9 do *Streptococcus pyogenes*, foi o primeiro sistema modificado para a realização de edições genômicas em organismos eucariotos. Assim, o complexo CRISPR/Cas9 em sua totalidade divide-se em três etapas gerais (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015; BALBINO et al., 2016): A primeira etapa, denominada de adaptação, é marcada pela integração de um novo espaçador ao locus CRISPR, ocorrendo mediante a um primeiro contato do organismo hospedeiro contra elementos genéticos móveis, como bacteriófagos e plasmídeos. Assim, ao ser reconhecido, o DNA exógeno promove a ativação do complexo proteico Cas, resultando em uma clivagem do material genético invasor em segmentos com 20-40 pares de bases, essas sequências de nucleotídeos são incorporadas como novos espaçadores no locus CRISPR. Em consequência disso, as bactérias ou Arqueas adquirem imunidade, possibilitando uma resposta mais dinâmica contra invasões futuras do mesmo patógeno (ALVES, 2019; CAETANO et al., 2018). A segunda etapa, denominada de expressão ou biogênese do crRNA, tem como princípio a formação de crRNAs (*CRISPR derived RNA*) maduros, que são porções de RNA derivados do locus CRISPR que reconhecem o DNA-alvo. Essa etapa começa com a transcrição inicial do locus CRISPR em uma longa fita precursora de RNA, sendo necessário a maturação dessa fita através da associação com uma molécula denominada de RNA transativador (tracrRNA), resultando em uma molécula de RNA de cadeia dupla. Com a formação do duplex de RNA, ativa-se o recrutamento de uma enzima específica, que atuará na maturação final da fita, formando um híbrido crRNA-tracrRNA,

que assumirá a função de um RNA guia (gRNA). (RAMOS, 2016; VIEIRA et al., 2016). A terceira etapa, denominada de interferência, é caracterizada pela ação efetiva contra o DNA invasor. Assim, a partir do duplex de crRNA-tracrRNA, tem-se a associação com a endonuclease Cas9, formando um complexo de ribonucleoproteína que efetivamente atuará no reconhecimento e clivagem do DNA exógeno, onde o gRNA será responsável pelo direcionamento da nuclease até o sítio apropriado, ocorrendo o pareamento de bases específicas (MAKAROVA et al., 2011; BALBINO et al., 2016). Como consequência disso, visando um aprimoramento de todo o processo, cientistas sofisticaram o híbrido crRNA-tracrRNA para uma molécula única quimérica, sendo designada como RNA-guia único (sgRNA) (SYNTHEGO, 2021). Com isso, a aplicação da técnica CRISPR tornou-se mais abrangente, sendo possível projetar teoricamente sgRNA para qualquer sequência específica de interesse. Assim, a utilização de sgRNA resultou em um processo mais dinâmico para a técnica CRISPR/CAS9. Dessa forma, com o direcionamento do sgRNA, a endonuclease Cas9, será a enzima que atuará efetivamente na quebra da fita dupla de DNA (JINEK et al., 2014; GONÇALVES; PAIVA, 2017). A enzima cas9 possui dois sítios ativos que desempenham atividades catalíticas, o domínio HNH, que é responsável pela clivagem da fita complementar, ou seja, a fita no qual o RNA guia realiza a complementariedade de bases nitrogenadas com o DNA alvo, e o domínio RuvC, que atua clivando a cadeia não complementar (CAETANO et al., 2018). Para que esse processo ocorra, é necessário a presença de uma sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) no DNA alvo. As PAMs são pequenas sequências de nucleotídeos que ficam localizadas em uma região adjacente ao início da sequência alvo, ou seja, estão presentes no DNA alvo, sendo essências para fixação da nucleasse Cas9 ao sítio alvo (EMBRAPA, 2020). Dessa forma, através da identificação das sequências PAMs, torna-se possível realizar a abertura da dupla fita do DNA alvo, com interação do RNA guia e subsequente clivagem pelos domínios catalíticos da Cas9. Sem a presença de PAMS, não há reconhecimento pela Cas9, mesmo que o sgRNA seja complementar ao sítio alvo (BARBOSA; CAVALCANTE, 2019). Um outro ponto de importância dos motivos PAMs é sua relação com os efeitos *off-target*. No qual, descobriu-se que determinadas sequências PAMs podem ser responsáveis por um reconhecimento imprevisível pela nuclease Cas9, gerando clivagens fora do sítio alvo, independentemente da complementariedade de bases do RNA guia (SYNTHEGO, 2021; VIEIRA et al., 2016). Todo esse processo pode acarretar problemas para execução da técnica CRISPR. Com base nisso, outras versões da Cas9 têm sido utilizadas pela técnica CRISPR/Cas9 visando diferentes possibilidades. As *nickases* são nucleases Cas9 que possuem apenas um domínio catalítico ativo, ou seja, através da inativação de um dos domínios catalíticos RuvC ou HNH, a Cas9 passa a realizar apenas um corte em uma das cadeias do DNA-alvo, possibilitando alterações mais específicas nos nucleotídeos. Outra variante da Cas9 são as denominadas *dead Cas9* (*dCas9*), no qual ambos os sítios catalíticos são inativados, resultando em uma endonuclease Cas9 com capacidade catalítica morta, sendo explorada

como mecanismo para regulação de genes, sem a fragmentação do material genético. (RAMOS, 2016; EMBRAPA, 2020). Assim sendo, as aplicações do sistema CRISPR/Cas9 tem proporcionado sua exploração nos mais variados campos de estudos, com grande destaque para o seu iminente aproveitamento no tratamento de doenças, demonstrando-se como uma ferramenta com grande potencial (CAETANO *et al.*, 2018).

3 | TÉCNICA CRISPR/CAS9 E SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

A principal utilização da tecnologia CRISPR/Cas9 tem sido com o propósito de aplicação nos processos de edições gênicas, tendo como destaque atual a sua facilidade em ser ajustada e empregada em diferentes linhagens celulares e em variados organismos. Com isso, como uma alternativa aos tratamentos convencionais, a técnica CRISPR/Cas9 passou a ser testada como uma ferramenta promissora dentro das pesquisas com terapia gênica em humanos. Assim, as principais abordagens dentro das edições genômicas, referem-se aos processos básicos de introdução, substituição ou deleção de genes alvos, resultando em possibilidades de induzir a expressão ou supressão de genes, além das chances de reparar mutações genéticas (BARBOZA *et al.*, 2019). Dessa maneira, a circunstância de maior exploração da técnica CRISPR/Cas9 para se alcançar as alterações das sequências gênicas tem sido a partir das extremidades formadas após o duplo corte das cadeias de DNA (DSB), realizadas pelas Cas9. Sendo que, após a separação das fitas, mecanismos de reparação celular são utilizados para que as modificações nos genes alvos sejam efetivamente concretizadas. Assim, existem duas principais vias de reparo celular quando há o DSB, sendo: União de extremidades não homólogas (NHEJ) e o Reparo direcionado por homologia (HDR) (VIEIRA *et al.*, 2016).

O NHEJ é a via de reparo que ocorre com maior frequência nas células eucarióticas, consistindo essencialmente na ligação das extremidades do DNA após a DSB, reunindo as duas pontas de maneira direta, independente da homologia das duas extremidades das fitas. Apesar de reestabelecer o DNA, esse mecanismo apresenta maior possibilidade de gerar mutações. Assim, os processos de NHEJ, em conjunto com a Cas9, tem sido explorados para a indução de mutações controladas, ou deleção de pequenas sequências de nucleotídeos indesejadas, resultando em um “*knock-out*” (inativação) dos genes alvos. Ou seja, com o nocaute dos genes, não haverá a produção de proteínas que normalmente seriam reguladas pela expressão desses sítios. Permitindo assim, estudos sobre a atuação de diversos genes no organismo, e de suas consequências, através de sua anulação básica.

A segunda via de reparação após a quebra, o HDR, explora a capacidade de reestabelecer as fitas de DNA através da homologia entre as extremidades geradas durante o DSB, utilizando um DNA molde que servirá como doador, apresentando extremidades

homólogas com as da fita alvo clivada. Esse processo permite diversas modificações em genes alvos, como a incorporação de novas sequências de DNA no genoma, correção de genes não codificantes, e substituição de sequências nucleotídicas, possibilitando a correção de mutações, ou seja, reestabelecendo a função normal dos genes. Esses processos de introdução de novos segmentos de material genético no genoma são denominados de *knock-ins*. Dessa maneira, as vantagens de se utilizar os mecanismos de HDR é que a aplicação de DNA moldes tornam o processo mais preciso, diminuindo as chances de ocorrência de mutações. Em contrapartida, a eficiência dos mecanismos de HDR depende diretamente do tamanho do DNA doador, onde, à medida que as sequências moldes são amplificadas, diminui-se as chances de êxito do processo. Impactando assim, na correta introdução de genes funcionais ou do reestabelecimento das fitas clivadas. (VIEIRA *et al.*, 2016; SYNTHOGO, 2021). Assim, a técnica CRISPR/Cas9 tem sido testada como uma ferramenta com capacidade favorável no tratamento de diversas patologias. Por se tratar de uma tecnologia relativamente nova, e que constantemente é limitada devido a fatores bioéticos, as aplicações da técnica CRISPR tem sido em grande parte experimentada em modelos animais que simulem condições patológicas semelhantes com as da espécie humana, ou em culturas de células somáticas humanas, tendo o seu uso em células embrionárias delimitada de acordo com as legislações de cada país (GONÇALVES; PAIVA, 2017; MONTEIRO; SILVA, 2020).

Fundamentado nisso, alguns estudos vêm revelando resultados promissores quanto a aplicação do sistema CRISPR/Cas9 no âmbito da cardiologia, explorando a possibilidade de supressão de genes associados diretamente com a incidência de doenças cardiovasculares. Referente a isso, pesquisas realizadas por Ding *et al.* (2014), demonstraram êxito no silenciamento de genes PCSK9 através de mecanismos NHJE. Os genes PCSK9 são responsáveis por codificar a pró-proteína de nome homólogo, que atua diretamente na degradação de receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL), prejudicando sua remoção do plasma com subsequente acúmulo, podendo levar a hipercolesterolemia e consequente desenvolvimento da doença arterial coronariana. Os resultados da pesquisa, após o silenciamento dos genes, certificaram uma diminuição por volta de 40% dos níveis de colesterol dos modelos animais testados. Apresentando-se como um potencial alternativo para pacientes que necessitam de intervenção farmacológica para redução dos níveis de LDL, mas que são intolerantes ou resistentes às estatinas (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2017, FERREIRA; FONSECA; MANGUEIRA, 2012).

Uma outra fonte de estudos da aplicabilidade do sistema CRISPR/Cas9 tem sido no tratamento das hemoglobinopatias (RAMOS, 2016). Esse grupo de patologias caracteriza-se por desordens na produção da hemoglobina, sendo causada por mutações nos genes responsáveis pela codificação das cadeias de globina (BATISTA *et al.*, 2020). Com isso, estudos iniciais realizados por Xie *et al.*, (2014) demonstraram a possibilidade de correção de mutações do gene HBB, associadas diretamente com o desenvolvimento da Talassemia

beta. O experimento utilizou uma cultura de células-tronco pluripotente induzidas (IPSCs). Aplicando o sistema CRISPR/Cas9, os pesquisadores induziram a clivagem dos nucleotídeos contendo os gene HBB, e através de mecanismo de recombinação homóloga, obteve-se diferentes IPSCs com mutações corrigidas. Além disso, as células corrigidas não foram acometidas de efeitos *off-target*, mantendo suas características de pluripotência. Assim, é sugerido pelos pesquisadores, que a partir das células IPSCs corrigidas do próprio paciente, torna-se possível diferencia-las em linhagens hematopoiéticas, facilitando os processos de transplante de medula óssea, reduzindo assim as chances de rejeição (XIE et al., 2014). Além disso, estudos mais recentes obtiveram resultados promissores na edição gênica pela técnica CRISPR/Cas9 utilizando seres humanos. A pesquisa utilizou dois pacientes, sendo um portador da Talassemia beta dependente de transfusão (TDT), e o outro portador da Anemia Falciforme (SCD). Levando em consideração a premissa que os indivíduos portadores TDT e SCD que possuem níveis de hemoglobina fetal persistentes até a fase adulta apresentam redução considerável, ou até mesmo não desenvolvem a doença. Com isso, pesquisadores utilizaram o complexo CRISPR/Cas9 para modificar o DNA de células tronco hematopoiéticas visando a redução da capacidade de expressão do gene BCL11A. Tal gene está associado com a supressão da expressão da hemoglobina fetal em eritrócitos. Dessa maneira, após a edição pela tecnologia CRISPR, a paciente portadora de TDT foi acompanhada pelo período de 18 meses, onde, sua hemoglobina fetal aumentou gradativamente de 0,3 g/dL para 13.1 g/dL ao longo do período. Além disso, as necessidades de transfusões sanguíneas diminuíram notadamente, passando de 34 bolsas de sangue por ano, para apenas uma, após o transplante. Já a paciente portadora da SCD apresentava quadros constantes de vaso-oclusão severa, além da necessidade de receber cerca de 5 transfusões sanguíneas por ano. Após aplicação do sistema CRISPR, a paciente foi acompanhada pelo período de 15 meses, demonstrando um aumento dos níveis de hemoglobina de 7.2 g/dL para 12,0 g/dL. Além disso, os níveis de hemoglobina fetais aumentaram de 9.1% para 43,2%. A paciente não apresentou mais episódios de vaso-oclusão durante o período de acompanhamento, nem a necessidade do recebimento de transfusões sanguíneas (FRANGOUL et al., 2020).

Já em relação as patologias causadas por infecções virais, diferentes pesquisas têm buscado utilizar o sistema CRISPR/Cas9 como uma possibilidade de cura em um futuro promissor, assim, estudos realizados em modelos animais e em cultura de células humanas, demonstraram resultados relevantes em infecções causados por vírus como o da Hepatite B, HIV, HPV e mononucleose. Sendo a maior parte dos esforços direcionados ao combate do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (ROSA; ROVERSI; FEITOSA, 2019). Como consequência disso, as atuais estratégias para inibição e eliminação do vírus do HIV através do complexo CRISPR/Cas9, concentram-se na inativação nos genes dos receptores CCR5 ou CXCR4, ou através da clivagem direta do DNA viral presente no genoma hospedeiro (conhecido como: pro-vírus). O raciocínio envolvendo a deleção

dos genes CCR5 relaciona-se com os mecanismos de fisiopatologia da infecção pelo HIV (SILVA; SILVA; VILELA, 2021). Dessa maneira, pesquisas iniciais aplicando o complexo CRISPR/Cas em células tronco iPSCs, obtiveram culturas celulares com os genes CCR5 silenciados. Após processos de diferenciação em macrófagos, as células passaram a apresentar resistência a infecção pelo vírus do HIV-1 em testes *in vitro*. Posteriormente, pesquisadores tiveram êxito em conseguir retirar totalmente o material genético do HIV-1 em culturas de linfócitos T CD4. A estratégia utilizada, empregou uma endonuclease Cas9, guiada por uma sgRNA, direcionada para áreas do genoma viral conhecidas como *Long Terminal Repeats* (LTR). A clivagem de tais regiões resultou em redução da carga viral e eliminação de vírus latente, além da resistência contra novas infecções (RAMOS, 2016; PASSOS *et al.*, 2016).

Um outro campo que tem sido explorado é da possível capacidade da técnica CRISPR-Cas9 na terapia dos mais variados tipos de cânceres. Por se tratar de uma doença envolvida diretamente com desordens genéticas, o câncer, tem sido alvo de estudos com a ferramenta CRISPR. Dessa maneira, pesquisas realizadas por Rosenblum *et al.* (2020) divulgaram resultados promissores na terapia dos cânceres de ovário metastático e cerebral (Glioblastoma), onde, modelos animais testados, obtiveram aumento em 80% das chances de sobrevivência ao câncer de ovário metastático. Já em relação ao Glioblastoma, considerado um dos cânceres com menor chance de sobrevivência, os testes conseguiram inibir as chances do crescimento tumoral em 50%, e aumento das chances de sobrevivência em 30%. Para isso, em relação ao tratamento do Glioblastoma, os pesquisadores utilizaram o sistema CRISPR-Cas9 direcionado contra o locus PLK1, sendo conhecidos por sua alta expressividade em cânceres cerebrais. Com isso, a inibição do PLK1 possibilita o processo de apoptose pelas células tumorais, levando a uma limitação do crescimento tumoral. Já em relação ao câncer de ovário, os pesquisadores direcionaram o complexo CRISPR contra os genes EGFR, que estão diretamente relacionados com a recepção do fator de crescimento do meio extracelular, permitindo o crescimento e divisão celular. Esses genes estão associados com uma expressão desregulada em diversos cânceres. Assim, a inibição do EGFR concebeu resultados auspiciosos (ROSENBLUM *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). Outros estudos promissores sobre a utilização da técnica CRISPR/Cas9 no tratamento de patologias e alterações gênicas são evidenciados em distúrbios como a Acondroplasia, Distrofia de Duchenne, Osteoartrite, Amaurosis congênita de Leber, Fibrose Cística, entre outras (BARBOZA *et al.*, 2019).

Além de sua aplicação direta no tratamento de patologias, o sistema CRISPR-Cas9 pode ser utilizado de outras maneiras, por exemplo, através da interferência em vetores transmissíveis de doenças, tal como , a utilização da técnica na alteração de genes que levam a esterilidade de fêmeas de mosquitos transmissores de doenças, essa realização permite um controle de reprodução desses mosquitos, o que consequentemente reflete nas taxas de transmissão de patógenos repassadas pelo vetor, permitindo a possibilidade

de controlar endemias e epidemias causadas por vírus ou parasitas presentes no mosquito (HAMMOND *et al.*, 2016; ROSA; ROVERSI; FEITOSA, 2019). Devido aos diferentes campos de atuação do sistema CRISPR e das possibilidades de alteração gênica, inúmeros debates têm sido promovidos para discutir questões éticas e dos possíveis impactos que essa tecnologia pode gerar.

4 | CRISPR/CAS9 E OS SEUS ASPECTOS ÉTICOS

Em novembro de 2018, o cientista He Jiankui, entrou para história ao anunciar a realização da primeira edição gênica em embriões humanos que foram fertilizados *in vitro* e efetivamente implantados em um útero. Segundo He Jiankui, a edição proposital dos embriões resultou no nascimento de dois seres humanos resistentes ao HIV. No caso, as gêmeas apelidadas de Lulu e Nana, tiveram seu material genético embrionário editados pela técnica CRISPR/Cas9. He Jiankui, informou ter realizado mutações nos genes CCR5 nos cromossomos dos embriões, tornando-as supostamente resistentes à infecção pelo HIV. Apesar de abrir esperanças para a utilização da técnica no tratamento de diversas doenças, a repercussão do anúncio do biofísico He, resultou em uma ascensão dos debates acerca dos limites éticos da utilização de ferramentas de edição gênica. Além disso, o cientista, não submeteu os seus resultados para avaliações por outros pesquisadores, e para publicação em revistas científicas, gerando suspeitas sobre a veracidade de seu procedimento, ou em caso de autenticidade do processo, questiona-se sobre os efeitos da deleção do gene CCR5 e de possíveis alterações fora do alvo, ocasionado debilidades à saúde das gêmeas.

Nesse contexto, a técnica CRISPR/Cas9 por ser a ferramenta com maior capacidade de evolução referente à modificação de genes nos mais variados organismos, tornou-se o principal alvo de discussões éticas e bioéticas, gerando inquietações sobre os limites de aplicabilidade da técnica como ferramenta de edição genômica, afinal, além dos aspectos técnicos do sistema CRISPR/Cas9, é importante entender os seus impactos em âmbitos sociais, políticos, ecológicos e econômicos. (GREELY, 2019; SPIRA, 2019; PESQUISA FAPESP, 2018). Com isso, apesar de diversos resultados promissores, é necessário um melhor entendimento sobre todas as variações que a tecnologia CRISPR pode exercer sobre os genes. A primeira indagação sobre a ampla utilização do complexo CRISPR em edições gênicas refere-se aos possíveis efeitos “fora do alvo” gerados pelo processo. Tais eventos, resultam em uma dificuldade de controlar totalmente a especificidade da técnica, interferindo na realização de uma modificação gênica precisa. Os efeitos *off target* ainda não são inteiramente compreendidos, sabe-se que a complementariedade da bases realizadas entre o RNA guia e o alvo, não são os únicos fatores que irão determinar a especificidade de clivagem pela Cas9, condições como: estado da cromatina, estruturação do RNA guia e os mecanismos de reparação celular, são requisitos que influenciam diretamente na

precisão da edição. Desse modo, alguns grupos, argumentam que os genes possuem múltiplas funções, e que determinadas alterações não planejadas, poderiam causar danos irreversíveis ao organismo editado, existindo a possibilidade de que as mutações geradas sejam perpetuadas no genoma, sendo eventualmente transmitidas para as próximas gerações. Para que tal evento aconteça, as células alteradas, devem ser de linhagem germinativa (GONÇALVES; PAIVA, 2017; RAMOS, 2016).

Baseado nisso, alguns grupos de cientistas defendem que a edição genética em células germinativas são eticamente inaceitáveis, e intercedem a favor do desencorajamento de alterações em linhagens germinativas humanas, e ainda, argumentam que mutações indesejadas prejudicariam o patrimônio genético da espécie humana (FURTADO, 2019; FURTADO, 2020). Com isso, grande parte dos indivíduos que são contra a edição de células germinativas, exigem uma moratória sobre os experimentos com esses grupos celulares, ou seja, um pedido para que todas as nações não autorize as aplicações de ferramentas de edição em linhagens germinativas por alguns anos, requisitando novas discussões éticas e bioéticas durante esse período de tempo. Sendo também alegado, que em uma outra perspectiva, as técnicas de edição gênica poderiam resultar em injustiças e desigualdades sociais, despertando atitudes discriminativas, como a repressão de indivíduos com algum tipo de deficiência física, no qual, à medida que ocorrer a normalização das alterações gênicas, seria possível que indivíduos portadores de necessidades especiais sejam menos valorizados em uma escala social, prevalecendo uma relação de exclusão. Em contraponto, outros pesquisadores, alegam que a edição de células de linha germinativas seriam a solução para diversos distúrbios genéticos que causam sofrimento em milhares de indivíduos, apresentando grande potencial terapêutico. Além disso, determinadas críticas afirmam a necessidade de estudos de edição em embriões, sendo colocadas como extremamente necessárias, e que se abdicar do envolvimento em investigações que protegem a vida é ser moralmente culpado por mortes previsíveis e evitáveis. Sugerindo então, que em oposição à implementação de moratórias, a elaboração de regulações seriam procederem mais convenientes, possibilitando e garantindo um uso seguro de intervenções promissoras à saúde e o bem estar da população. Desse modo, levando em consideração as hesitações sobre a utilização da técnica CRISPR, é possível indagar, que o progresso da medicina muitas vezes não é acompanhada de uma precisão imediata, evoluindo e se aperfeiçoando com o decorrer dos anos. Dessa maneira, apesar dos debates e das contradições da utilização da técnica CRISPR/Cas9 em linhagens germinativas, boa parte dos pesquisadores demonstram-se flexíveis quanto a aplicação da técnica em células somáticas, ou seja, em células totalmente diferenciadas, desde que destinadas a fins terapêuticos (FURTADO, 2019; BELO; PAIVA; FILHO, 2020; SGANZERLA; PESSINI, 2020; FURTADO, 2020).

Já em uma outra perspectiva, caso as aplicações do sistema CRISPR/Cas9 sejam totalmente viáveis, e os pesquisadores tenham domínio absoluto sobre a tecnologia,

uma outra questão que causa apreensão da comunidade científica é em relação a possibilidade dos impactos sociais futuros pertinentes a técnica, onde, a modificação de genes, poderia acarretar em uma seletividade de um padrão genômico, com propensão ao risco do surgimento de uma nova eugenia ou eugenia liberal, viabilizando a decisão de escolhas de características de maneira artificial, possibilitando a preferência por fenótipos específicos considerados como “ exemplo”, além das chances de se tornar aceitável a instrumentalização da vida humana, como os “bebês projetados”, sendo produzidos e moldados de acordo com as preferências dos pais. Além do mais, como toda tecnologia, é possível que as aplicações da ferramenta CRISPR prevaleça sobre as populações mais ricas, imortalizando uma sociedade desigual, com indivíduos indubitavelmente privilegiado pelas modificações genéticas (HUPFFER; BERWING, 2020; PANETTO; ZAGANELLI; OLIVEIRA, 2020).

Além das questões éticas envolvendo a manipulação de células humanas, outras questões que envolvem o sistema CRISPR/Cas9 referem-se aos seus impactos ambientais, sejam positivas ou negativas. No qual, a modificação genética de determinados organismos, poderia causar alterações em espécies inteiras. Como exemplo atual dessa aplicação, tem-se a utilização de ferramenta de edição gênica para modificação de vetores transmissores da Malária, sendo um problema endêmico em diversas regiões. Desse modo, a esterilização do vetor, poderia reduzir consideravelmente os índices de contaminação. Além de linhas de pesquisas que argumentam que a edição gênica poderia ser utilizada para a conservação de espécies em risco. Porém, em contrapartida, argumenta-se que as edições artificiais em populações poderiam impactar a biodiversidade e os ecossistemas de maneira irreversível (NEVES; DRUML, 2017; DINIZ *et al.*,2016).

Dessa maneira, evidencia-se a importância da prudência dos pesquisadores na conduta de experimentos que envolvam alterações no genoma, independente da espécie. Ainda que rodeada de contrariedades, a técnica CRISPR-Cas9 demonstra-se como uma alternativa esperançosa para indivíduos portadores de doenças genéticas. Sendo uma tecnologia que dependendo de seu contexto, pode trazer uma gama de benefícios ou de efeitos nocivos para a sociedade, abrindo oportunidade para diferentes perspectivas éticas de sua aplicação (GOLÇALVES; PAIVA, 2017).

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica CRISPR utiliza uma endonuclease para a clivagem de material genético, sendo o grande diferencial dessa ferramenta a utilização de um RNA previamente sintetizado que servirá como um guia para a endonuclease, definindo os pontos exatos de clivagem, onde, a complementariedade de bases nitrogenadas entre o RNA guia e o material genético alvo, proporciona uma especificidade e facilidade de modificação do DNA como nunca antes visto. Tornando a técnica CRISPR/Cas9 como uma das ferramentas

mais revolucionárias dentro do âmbito da edição gênica.

A técnica CRISPR tem sido testada principalmente no campo da terapia gênica, onde, após a clivagem da dupla fita de DNA, mecanismos de reparo celular tem sido explorados para modificação de sequências de nucleotídeos, possibilitando a introdução, exclusão, ativação ou silenciamento de determinados genes. Com isso, a ferramenta CRISPR/Cas9 passou a ser uma fonte de expectativas para patologias que possuem como causa principal alterações gênicas, demonstrando-se como uma tecnologia que futuramente tenha a capacidade de ser aplicada como um método efetivo de cura para inúmeras doenças. Devido a simplicidade do complexo CRISPR/Cas9 a sua utilização passou a ser empregada em todo o mundo, onde, de acordo com as leis de cada país, os limites de aplicabilidade da técnica diferenciam-se, gerando apreensões entre as pessoas sobre as consequências que a utilização descontrolada da técnica podem provocar dentro da sociedade. Em razão das modificações do DNA proporcionadas pela ferramenta CRISPR/Cas, as preocupações acerca de sua utilização em linhagens germinativas são a fonte dos principais debates do limiar de aplicação da técnica CRISPR/Cas9, sendo apontado por alguns, como uma eminente possibilidade de surgimento de novas eugenias em um futuro não tão distante. Já outros indivíduos, acreditam que a edição em linhas germinativas talvez seja a melhor forma de erradicar distúrbios e doenças que afetam a humanidade.

Portanto, apesar da capacidade promissora da ferramenta CRISPR/Cas9, os seus mecanismos de atuação ainda não são totalmente compreendidos, existindo a chance de ocorrência de clivagens de outros segmentos de nucleotídeos fora do material genético alvo, resultando em alterações não planejadas, limitando assim as aplicações atuais da técnica CRISPR/Cas9 em seres humanos. Porém, é evidente a necessidade de mais investimento e estudos acerca do complexo CRISPR/Cas9, além da análise dos possíveis impactos que a utilização da técnica CRISPR/Cas podem acarretar, sendo uma ferramenta que talvez revolucione as formas de tratamentos utilizados pela medicina tradicional, proporcionando uma chance de cura para alterações que afetam negativamente a humanidade, libertando milhares de indivíduos de uma vida de sofrimento.

REFERÊNCIAS

ALVES, Hirisleide Bezerra. **Investigação estrutural e epidemiológica do sistema CRISPR/Cas em genomas de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii***. 2019. 88 f. Dissertação (Mestrado em genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

AREND, Marcela Corso, PEREIRA, Jessica Olivaes, MARKOSKI, Melissa Medeiro. O sistema CRISPR/CAS9 e a possibilidade de edição genômica para a cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. vol.108. n.1. pp. 81-83. Ano. 2017.

BALBINO, Tereza Cristina Leal, BARROS, Maria Paloma Silva de, OLIVEIRA, Arthur Casulli de, PINHAL, Danillo, GARCIA, Bruno Henrique, PEREIRA, Tiago Campos. Capítulo 1, Introdução. In: PEREIRA, Tiago Campos (org.). **Introdução à técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Cubo, 2016. pp. 29-38.

BARBOSA, Kledson Lopes, CAVALCANTE, Glensimon Souza Silva. A biotecnologia envolvida no sistema CRISPR, **Revista de Ciência médicas e biológicas**, Salvador, vol.18, n.1. pp. 123-127. Janeiro/abril.2019.

BARBOZA, Caroline Mota Souza, TERRA, Marcella Martins, RIBEIRO, Maria Luísa Candido, SILVA, Jacksiane Brandão. A técnica de CRISPR/Cas9 na terapia gênica: uma revisão da literatura. **Revista Transformar**, vol.13. n.1. pp. 652-671. Ano. 2019.

BATISTA, Gabriela SILVA, SANTOS, Nayhan Andrade, MARQUETI, Váleria Bastos, MOTA, Wesley Blanco, SILVÉRIO, Alessandra dos Santos Danziger. Hemoglobinopatias: investigação em sangue periférico de acadêmicos de uma universidade de Alfenas-MG. **Revista de Medicina**, Vol.99.n.03. pp.246-250. Ano.2020.

BELO, Thiago Caetano Andrade, PAIVA, Priscila Henrique Moraes, FILHO, Nelson Delú-. A aplicação da técnica de edição de genomas CRISPR-CAS9 na engenharia genética: benefícios à ciência e sociedade e impasses éticos frente ao desconhecido, em especial na edição embrionária humana. Centro Universitário do Sul de Minas. 2020.

CAETANO, Gisdenilton Carlos Gonzaga, MATOS, Higor de Oliveira Santos, SIMÃO, Caroline Ramos, Rayanne Vindilino Duarte, BARRETO, Sabrina Antunes, HENRIQUE, Ivan Sales. Técnica CRISPR-Cas9 e sua utilização na área laboratorial. **Brazilian journal of surgery and clinical research**. vol. 25. n.2. pp. 96-99. 2019.

DIAS, Camila Almeida de Paula, DIAS, Janice Maria Ribeiro. Sistema CRISPR/CAS como uma nova ferramenta biotecnológica na edição de genomas: aplicações e implicações. **Revista ambiente acadêmico**. vol.4. n.1. pp.07-22. 2018.

DINIZ, Nilza Maria, CARNEIRO, Andréa Almeida, CARNEIRO, Newton Portilho, FRANÇA, Camila Tenorio, OLIVEIRA, Maria Betânia Melo, GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel. Capítulo 11- Questões éticas, legais, ambientais e de pioneirismo. *In*: PEREIRA, Tiago Campos (org.). **Introdução à técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Cubo, 2016. Pág. 215-236.

DING, Qiurong, STRONG, Alanna, PATEL, Kevin M. NG, Sze-Ling GOSIS, Bridget S REGAN, Stephanie N, RADER, Daniel J, MUSURUNU, Kiran. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. **Circulation Reserach**. Vol.115. n.5. pp.488-492. Ano. 2014. DOUDNA LAB. CRISPR System. 2021.

EMBRAPA. **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas**. Brasília, DF. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2020. Pág. 210.

FERREIRA, Carlos Eduardo dos Santos, FONSECA, Francisco Antônio Helfenstein, MANGUEIRA, Cristóvão Luís Pitanguera. A PCSK9 e sua relevância clínica com os novos alvos terapêuticos contra dislipidemia. **Hospital Israelita Albert Einstein**. Vol. 10. n.04. pág. 526-527. Ano.2012

FURTADO, Rafael Nogueira. Edição genética: riscos e benefícios da modificação do DNA humano. **Revista Bioética**. Vol.24.N.02.pág.223-233. Brasília,2019.

FURTADO, Rafael Nogueira. Fundamentos ontológicos do debate sobre seleção e edição do genoma. **Revista de Psicologia**. Vol.32.N.02.p.111-119. 2020.

FRANGOUL, H. *et al*. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and B-Thalassemia. **The New England Journal of medicine**. 2020

GREELY, Henry T. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. **Journal of Law and the Biosciences**. Vol.6.n.01. pág.111-183. Ano.2019.

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel, PAIVA, Raquel de Melo Alves. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. **Hospital Israelita Albert Einstein**. Vol. 15. n .3. pp.369-375.

HUPFFER, Haide Maria, BERWING, Juliane Altmann. A tecnologia CRISPR/CAS9: da sua compreensão aos desafios éticos, jurídicos e de governança. **Revista Pensar**. N.25. Pág.1-16. Ano. 2020

JIANG, Wenyan, MARRAFFINI, Luciano. CRISPR-CAS: New tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems. **Annual review of microbiology**. Vol.69. p.209-228. Ano.2015.

JINEK, Martin, CHYLINSKI, Krzysztof, FONFARA, Ines, HAUER, Michael, DOUDNA, Jennifer A., CHARPETIER, Emmanuelle. A programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**. Vol. 337. Ano.2012.

JINEK, Martin, JIANG, Fuguo, TAYLOR, David W., STERNBERG, Samuel H, KAYA, Emine, MA, Enbo, ANDERS, Carolin, HAUER, Michael, ZHOU, Kaihong, LIN,

Steven, KAPLAN, Matias, LAVARONE, Anthony T., CHARPENTIER, Emmanuelle, NOGALES, Eva, DOUDNA, Jennifer A. Structure of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. **Science**. Vol. 343. Ano.2014.

MAKAROVA, Kira S, ARAVIND L, WOLF, Yuri, KOONIN, Eugene. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. **Biol Direct**. Vol. 06. n.38. Ano.2011.

MONTEIRO, Lyni Cóe, SILVA, Marcos Vicente da. Limites da Pesquisa genética com Células-Tronco Embrionárias frente aos direitos à vida e à saúde. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. Ano 05, Ed. 11, Vol.23, pp. 117-136. Ano. 2020.

NEVES, Maria Patrão, DRUML, Christiane. Ethical implications of fighting malária with CRISPR/Cas9. **BMJ global health**. 2017.

PANETO, Greiciane Gaburro, ZAGANELLI, Margareth Vetis, OLIVEIRA Mateus

Miguel. Edição genética: as implicações na sociedade contemporânea da técnica *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*(CRISPR-CAS9) - Uma análise ética, jurídica e social. **Derecho y Cambio social**. N°.61. Ano. 2020.

PASSOS, Geraldo Aleixo, HERNANDEZ, Cesar Augusto Speck, SOUSA, Larissa Cotrim, FELÍCIO, Rafaela de Freitas Martins, SOUZA, Tiago Alves Jorge. Capítulo 4, Aplicações da Técnica. *In*: PEREIRA, Tiago Campos (org.). **Introdução à técnica de CRISPR, Ribeirão Preto, 2016**. Cubo, 2016. Pág. 71-95.

PESQUISA FAPESP: Chinês é suspenso por ter criado bebês com gene alterado. **Revista pesquisa Fapesp**. Edição. 274. Dezembro. 2018. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/chines-e-suspenso-por-ter-criado-bebes-com-genealterado/>. Acesso em: 01/11/2021.

RAMOS, António David Rufino. **CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias**. Trabalho monográfico (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

ROSA, Jonas Ribeiro, ROVERSI, Fernanda Marconi, FEITOSA, Lucas de Souza Ramalhaes. Capítulo 11, Edição Genética Através do CRISPR para Tratamento de Doenças. In: FREITAS, Renata Mendes de (org.). **Ciências Biológicas Campo Promissor em Pesquisa**. Ponta Grossa-PR. Atena Editora, 2019. Pág.98-116.

ROSENBLUM, Daniel, GUTKIN, Anna, KEDMI, Ranit, RAMISHETTI, Srinivas VEIGA, Nuphar, JACOBI Ashley M, SCHUBERT, Mollie S, FRIEDMANN-MORVINSKI, Dinorah, COHEN, Zvi R, BEHLKE, Mark A, LIEBERMAN, Judy, PEER, Dan. CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy. **Science advances**. Vol.6.n.47. Ano.2020.

SANTOS, Sadna Larissa Freitas dos, ALVES, Hérick Hébert da Silva, PRADO, Regilane Matos da Silva, BARROS, Karla Bruna Nogueira Torres. CRISPR: uma nova era na biologia molecular, **Revista Biotecnologia e Ciência**. Vol.05. n.2. pp.4048, 2016.

SILVA, Lúcia Helena Martins, SILVA, Nathalia Félix, VILELA, Leonardo de Figueiredo. Aplicação da Tecnologia do Sistema CRISPR cas-9 no Tratamento do Vírus da Imunodeficiência Humana. **Revista Episteme Transversalis**. Vol.12. n.2, pág.289-317. Ano.2021

SPIRA, Beny. Edição genética em humanos: técnica e ética. **Revista Questão de ciência**. Publicado em 3 de janeiro de 2019. SYNTHEGO. CRISPR 101 your guide to understanding CRISPR. 2021. Disponível em: <https://www.synthego.com/resources/crispr-101-ebook>. Acesso em: 12/04/2021. VASCONCELOS, Maria José Vilaça de, FIGUEIREDO, José Edson Fontes. **Tecnologia CRISPR-Cas para a edição genômica**. Sete Lagoas, MG. Publicado por Embrapa Milho e Sorgo, 2015-. ISSN 1518-4277.

VIEIRA, Gabriel Viliod, CECÍLIO, Nerry Tatiana, ARRUDA, Letícia Magalhães, SALES, Katiuchia Uzzun. Capítulo 2, Visão geral do mecanismo básico de ação. In: PEREIRA, Tiago Campos (org.). **Introdução à técnica de CRISPR, Ribeirão Preto, 2016**. Cubo, 2016. pp.39-49

XIE, Fei, YE, Lin, CHANG, Judy C, BEYER, Asheley I, WANG, Jiaming, MUENCH, Marcus O, KAN, Yuet Wai. Seamless gene correction of B-thalassemia mutation in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and *piggyBac*. **Genome Research**. Vol.24.pp.1526-1533. Ano. 2014.

WANG, Hao, TAO, Zhennan, FENG, Ming, LI, Xuetao, DENG, Zhitong, ZHAO, Guozheng, YIN, Haoran, PAN, Tingzheng, CHEN, Guangliang, ZIBIN, Feng, LI, Yanyan, ZHOU, Youxin, MD, PhD. Dual PLK1 and STAT3 inhibition promotes glioblastoma cells apoptosis through MYC. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2020

ÍNDICE REMISSIVO

A

- Amputação 26
- Atividade metabólica 18
- Atividades catalíticas 5
- Atividades físicas 25, 26
- Atletas 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26
- Atletas paraolímpicos 26

B

- Bactérias 3, 4
- Biomecânica 25

C

- Cirurgia torácica 38
- Compósitos 25, 27, 28
- Cortisol 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
- Crânio 38, 39, 41
- Crispr/cas9 1, 2, 3, 5, 6, 10, 13, 15
- Crispr/cas9 e patologias 2
- Crispr e ética 2

D

- DNA 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 15
- Doença cardiovascular 38, 39
- Doenças 1, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 16, 25, 37, 39, 43, 44

E

- Edição gênica 1, 2, 3, 8, 10, 11, 12, 13
- Enzima 4, 5
- Estresse 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24

H

- Hemorragias 39

L

- Linhagens 6, 8, 11, 13

M

Material Genético 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13

Membros inferiores 25, 26

Método dos Elementos Finitos 25, 26

O

Organismos 2, 3, 4, 6, 10, 12

P

Pacientes 7, 8, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45

prática esportiva 18

Pressão intracraniana 37, 38, 41, 44, 45

Prótese 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 35

R

Reabilitação de amputados 25

Reparação celular 6, 11

RNA 2, 3, 4, 5, 10, 12, 15

S

Saliva 18, 21, 22, 23, 24

Saúde 10, 11, 15, 18, 19, 25, 26, 45, 46

T

Tratamento psicológico 25

 www.atenaeditora.com.br

 contato@atenaeditora.com.br

 @atenaeditora

 www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Collection:

APPLIED BIOMEDICAL ENGINEERING

 www.atenaeditora.com.br
 contato@atenaeditora.com.br
 @atenaeditora
 www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Collection:

APPLIED BIOMEDICAL ENGINEERING


Ano 2022