

PERSPECTIVAS DA UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA CRISPR/CAS9 NA TERAPIA GÊNICA

Data de aceite: 26/01/2024

Hingridh Leal Rodrigues

Aluna da Especialização em Genética Médica e Biologia Molecular do Instituto de Ensino em Saúde e Especialização, Goiânia (GO).

Benedito R. da Silva Neto

Professor Doutor Orientador do trabalho. Especialista em Aconselhamento Genético, Mestre em Biologia Molecular, Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública

RESUMO: Introdução: A descoberta de um RNA guia associado a uma proteína Cas, tornou-se uma ferramenta inovadora na edição de genes, e a tecnologia de CRISPR/Cas9 utilizada na terapia gênica pode proporcionar não só a correção de DNA como também introduzir uma nova característica, evitando que doenças de cunho hereditário sejam transmitidas a descendentes. **Objetivo** – O objetivo é identificar o uso da técnica CRISPR/Cas9 com a terapia gênica no tratamento de diferentes patologias. **Materiais e Métodos:** Trabalho foi elaborado por meio de uma revisão narrativa. Para o levantamento dos artigos na literatura foram

utilizadas as bases de dados: SCIELO, PubMed, MEDLINE e Google Acadêmico.

Resultados e Discussão: Descrição do mecanismo de ação da técnica de CRISPR/Cas9 e suas aplicações realizadas na medicina para o tratamento de doenças.

Conclusão: CRISPR/Cas9 obteve bons resultados perante a algumas doenças genéticas, é promissora sua utilização no tratamento de doenças oriundas de alteração no DNA, presando que as probabilidades de benefícios sejam maiores que as dos malefícios.

PALAVRAS-CHAVE: CRISPR/Cas9, Engenharia Genética e Terapia Gênica

PERSPECTIVES ON THE USE OF THE CRISPR/CAS9 TECHNIQUE IN GENE THERAPY

ABSTRACT: Introduction: The discovery of a guide RNA associated with a Cas protein has become an innovative tool in gene editing, and the CRISPR/Cas9 technology used in gene therapy can provide not only DNA correction but also introduce a new feature, preventing hereditary diseases from being transmitted to descendants.

Objective: The objective is to identify the use of the CRISPR/Cas9 technique with gene therapy in the treatment of different pathologies.

Materials and Methods: Work was developed through a narrative review. For the survey of articles in the literature, the following databases were used: SCIELO, PubMed, MEDLINE and Google Scholar. With exclusion and exclusion criteria. **Results and Discussion:** Description of the mechanism of action of CRISPR / Cas9 and its application in medicine. Conclusion - In gene therapy, drug treatment has a very high cost, and since CRISPR / Cas9 obtained good results in the face of some genetic diseases, its use in the treatment of diseases arising from alterations in DNA is promising, assuming that the probabilities of benefits greater than those of harm.

KEYWORDS: CRISPR/ Cas9, Genetic Engineering and Gene Therapy

INTRODUÇÃO

Edição Genômica

A complexidade do ácido desoxirribonucleico (DNA) incentiva o desenvolvimento de alguns sistemas que podem facilitar sua edição assegurando a precisão e eficiência. A descoberta de um ácido ribonucleico guia (gRNA) associado a uma proteína Cas, tornou-se uma ferramenta inovadora na edição de genes. Por meio de análises, estima-se que seu papel principal seja promover a defesa adaptativa de procariotos contra ácidos nucléicos estranhos ¹.

A tecnologia de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) é considerada a tecnologia mais promissora para a engenharia do genoma em células de mamíferos, e as pesquisas comprovaram isso em experimentos de verificação. São conhecidos três sistemas CRISPR / Cas I, II e III. No entanto, apenas o sistema CRISPR/ Cas II é o membro de nuclease mais adequado para a engenharia do genoma².

CRISPR foi descoberto em 1987, através do pesquisador Yoshizumi Ishino, no qual identificou sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas no genoma da bactéria *Escherichia coli*, com função desconhecida ^{3 4} (Figura 1).

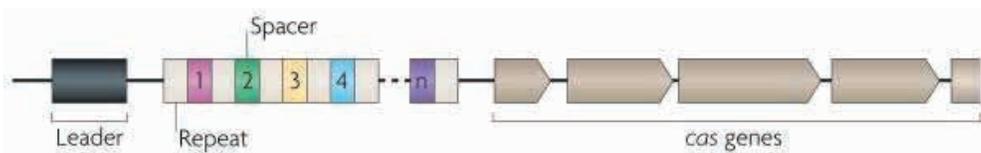


Figura 1: Locus CRISPR; fonte: (MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010)³

Apenas em 2005, foi considerado que as sequências vistas na década de 80 na bactéria *Escherichia coli* é um sistema que atua como memória imunológica para proteção de bactérias perante a ácidos nucléicos estranhos, como plasmídeos ou fagos, que ao infectarem a bactéria pela primeira vez deixam uma parte de seu material genético que é clivado em fragmentos pequenos e integrado como memória pela bactéria que fora

infectada ⁵ ⁶. Em uma posterior invasão haverá uma resposta específica já que em sua “biblioteca” CRISPR obtém-se de sequências correspondentes a trechos do genoma do agente invasor que será reconhecido, e destruído pela endonuclease Cas9, acontecendo assim, a ação do Sistema CRISPR/Cas9 ⁷.

O Sistema CRISPR/Cas9 é uma ferramenta que tem alta especificidade e precisão, uso acessível, e fácil manipulação *in vitro* e *in vivo*, bem como a possibilidade da edição de múltiplos alvos simultaneamente ⁸. Essa técnica tem sido visada em amplas aplicações, como na área de agronegócio para realização de transgênicos gerando plantas resistentes, alimentos mais nutritivos e saborosos ⁷. Existe também pretensão em modificar insetos geneticamente para que deixem de serem vetores de doenças. E há um enorme potencial da utilização na terapia gênica, como esperança para doenças de cunho genético, ressaltando assim o quão promissor CRISPR/Cas9 é, visto que sua técnica foi ganhadora de premio Nobel em 2020 ⁹.

Terapia gênica

A medicina moderna ainda enfrenta muitas doenças, deste modo, resta apenas tratamentos paliativos para tais patologias ¹⁰. Em alguns casos há possibilidade de acontecer intervenção por meio da terapia gênica, em virtude de reduzir ou evitar a progressão da doença ¹¹.

A terapia gênica tem como princípio introduzir genes terapêuticos em um organismo, através das técnicas de DNA recombinante, a fim de manipular, substituir ou suplementar gene inativos ou disfuncionais ¹⁰. A tecnologia de CRISPR/Ca9 utilizada na terapia gênica pode proporcionar não só a correção de DNA como também introduzir uma nova característica, evitando que doenças de cunho hereditário sejam transmitidas a descendentes ¹¹.

A utilização de medicamentos na terapia gênica é existente, entretanto, seu custo é bem alto ocasionando uma impossibilidade de compra a grande parte da população mundial, que não tem condições financeiras para custear o tratamento com esses medicamentos ¹².

São exemplos de medicamentos para doenças de origem genéticas : Zolgensma que é utilizado para tratamento de atrofia muscular espinhal (AME), Luxturn para corrigir cegueira ¹³, Ravicti usado para pacientes que tem as doenças do ciclo da ureia (DCU) ¹⁴, Brineura é um medicamento para o tratamento da doença ceroidlipofuscinose neuronal tipo 2 (CLN2)¹⁵ e Carbaglu com indicação para doença de hiperargininemia ¹⁶ .

A terapia gênica é uma excelente perspectiva e esperança em relação ao tratamento para os diversos tipos de doenças, do qual é visado a melhor forma para se alcançar uma cura sem grandes efeitos colaterais ⁸.

Em perfaze, o objetivo deste trabalho é descrever o funcionamento da técnica CRISPR/Cas9 e sua aplicação na terapia gênica em patologias diferentes. Sendo o

principal intuito dessa revisão bibliográfica possibilitar o acesso à informação, através da constatação dos estudos realizados na literatura sobre o atuação, utilização e riscos da técnica CRISPR/Cas9

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi elaborado por meio de uma revisão bibliográfica. Para o levantamento dos artigos na literatura foram utilizadas as bases de dados: SCIELO, PubMed, MEDLINE e Google Acadêmico. Com os seguintes descritores e suas combinações nas línguas portuguesa, espanhola e inglesa: CRISPR/Cas9, Engenharia Genética e Terapia Gênica. Os critérios de inclusão foram artigos publicados em português e inglês; artigos na íntegra que retratem a técnica CRISPR/Cas9 e terapia gênica explanados nos bancos de dados nos últimos dez anos (2010-2020). Já como critério de exclusão, Foram excluídas teses, relatórios, artigos de opinião, anais de congresso, artigos e textos que não atenderem ao objetivo do projeto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mecanismo de ação de CRISPR/Cas9

Essa tecnologia permite manipular com precisão praticamente qualquer sequência genômica especificada por um curto trecho de RNA guia, permitindo a elucidação da função gênica envolvida no desenvolvimento e progressão de doença e correção de mutações.

Existem muitas informações na literatura sobre a função desse sistema que é baseado em Cas9 e sgRNA (RNA sintético). A partir da determinação cristalográfica de Cas9 (Figura 2), foi observada a existência de dois domínios de endonucleases funcionais: HNH (semelhante a McrA) corta a fita complementar de crRNA (RNA CRISPR), e RuvC que corta a cadeia oposta não complementar.¹⁷

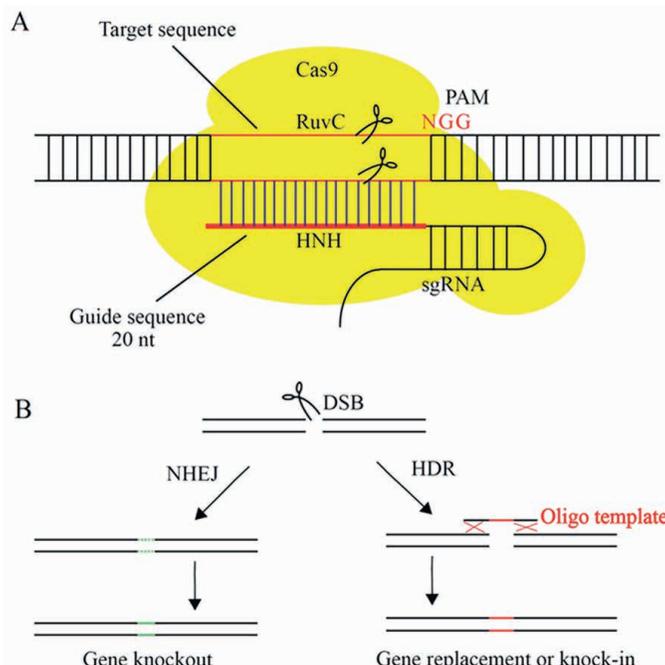


Figura 2: Mecanismo de ação; fonte: (Liu et al., 2012) ¹⁷

Como observado na figura 2, o papel do sgRNA é identificar a sequência alvo acompanhada por uma região adjacente, que é chamada de proto-spacer adjacente motive (PAM), que dispõe de uma sequência consenso NGG, onde N é qualquer nucleotídeo e G é nucleotídeo guanina. A presença da região PAM é essencial para Cas9 para cortar o DNA. A ligação complementar de sgRNA e a presença de PAM adjacente ao DNA alvo permitem a dupla clivagem da fita de DNA alvo (double strand break – DSB) ^{17 18}.

Depois de formado o DSB pode ser reparado por NHEJ, o que normalmente resulta desajustes e inserção/ deleção. Entretanto, quando existe um modelo Oligo, o HDR leva a substituição genética específica ¹⁹.

Aplicações

Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

HIV é o vírus que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). O vírus pertence à família retroviral e ao gênero *Lentivirus* e em seu ciclo há integração do seu material genético no genoma da célula hospedeira, ocasionando um período maior de incubação ²⁰.

Devido a terapia de medicamentos antirretrovirais, muitos pacientes conseguem

viver bem com a presença do vírus HIV sem o desenvolvimento da AIDS, todavia, é importante ressaltar que ainda não existe uma cura comprovada.²¹

Pesquisadores da Universidade de Temple na Filadélfia, realizaram um estudo aonde CRISPR foi carregado através de um *Lentivírus*, onde conseguiu diminuir a replicação do vírus em culturas primárias de células T CD4+ infectadas, células essas que abrigam o vírus do HIV. Como resultado houve uma redução considerável da carga viral das células dos pacientes infectados.²²

Anemia falciforme

Pacientes portadores de anemia falciforme tiveram suas células CD34+ isoladas, e sua sequência genética alterada foi editada por CRISPR Cas/9, nesse estudo realizado por pesquisadores da Universidade da Califórnia foi verificado que os níveis de expressão do gene mutado obtiveram uma redução, aumentando assim a produção de hemoglobina normal^{23 24}.

Edição de genes em humanos

Foram utilizados zigotos tripronucleares (3PN) para investigar a edição de genes mediada por CRISPR / Cas9 em células humanas, o estudo obteve como resultado que CRISPR/Cas 9 pode clivar o gene β -globina endógeno (*HBB*). Porém, a eficiência de reparo conduzido por recombinação homóloga foi baixa, sendo a edição dos embriões em mosaico.

Houve clivagem fora do alvo nos zigotos 3PN (tripronucleares), e o gene homólogo ao *HBB* que é o endógeno delta-globina (*HBD*), competia com oligos doadores exógenos para agir como molde de reparo, levando a mutações indesejáveis.²⁵

Câncer Refratário

As células T efetoras específicas do tumor afetadas contribuem para a progressão do tumor, então utilizaram CRISPR Cas9 nas células T específicas para o tratamento de pacientes com câncer refratário, um primeiro ensaio clínico de fase 1 em humanos publicou recentemente a segurança e a viabilidade de excluir os genes TRAC, TRBC e PDCD1 que é o gene que codifica PD-1.

Surpreendentemente, foi visto que, e, em um paciente, a porcentagem de células T específicas do tumor com mutações no locus PD-1 diminuiu de 25% no produto de infusão para 5% 4 meses após a infusão.²⁶

Cardiomiopatia Hipertrófica

A causa de uma parte da doença se dá por conta de uma mutação que acontece no gene MYBPC3, mas por intermédio de CRISPR/Cas9 os pesquisadores foram capazes

de corrigir essa mutação em células germinativas humanas ao inserir a enzima Cas 9 juntamente com o RNA guia e oligonucleotídeos de zigotos produzidos através da fertilização de oócitos doadores saudáveis com esperma de um doador heterozigoto para a mutação do gene ²⁷.

Na Tabela 1 estão resumidas algumas aplicações realizadas a partir da técnica de CRISPR e na Tabela 2 aplicações na Terapia Gênica.

DOENÇAS	ESTRATÉGIA TERAPÊUTICAS
Sars-cov-2 (BROUGHTON et al., 2020)	Detecção de ácidos nucleicos e agentes infecciosos
Prevenção de toxicidade sistêmica fatal (KEMNA et al., 2023)	Foi analisado a função do domínio de ligação ao ECM (EBD) utilizando CRISPR-Cas9
Câncer colorretal (XU; ZHU, 2020)	Aumentando a indução do apoptose e reduzindo o tamanho do tumor
Câncer de ovário (NOROUZI-BAROUGH et al., 2018)	Aumento da quimiossensibilidade
Osteossarcoma (XIAO et al., 2018)	Reduzindo a expressão de ABCB1
Leucemia mieloide crônica (BARGHOUT et al., 2021)	Reduzindo a proliferação celular e aumentando a apoptose em células resistentes
HCT8/T e KBV200 (WANG et al., 2019)	Reduzindo a Cl_{50} e atenuar a resistência aos medicamentos
Nanopartículas aumentam a eficácia de imunoterapia contra o câncer baseada em CRISPR/Cas9 (LIU et al., 2020b)	resposta ao <u>microambiente</u> redutor, resultando na regulação sinérgica de múltiplas vias associadas ao câncer
Câncer renal (LIU et al., 2020a)	Reduzindo a proliferação de células cancerosas
Glioma (YU et al., 2018)	Aumento dos danos no DNA e marcadores apoptóticos
Câncer de mama (HA; BYUN; AHN, 2016)	Aumentando a sensibilidade das células cancerosas à droga anticancerígena e reduzindo a sobrevivência das células cancerígenas
Cancro do pulmão (KRÓL et al., 2020)	Atenuando a resposta a danos no DNA dependente de p53
Leucemia de células mieloides 1 (MCL-1) (AUBREY et al., 2015)	Foi usado para excluir MCL-1 em células BL humanas e induzir apoptose nas células BL
Quinase 11 dependente de ciclina (CDK11) (FENG et al., 2015)	Silenciou o CDK11 em osteossarcoma
Receptor do fator de crescimento epidérmico (TANG; SHRAGER, 2016)	Utilizado para possível correção de mutações adquiridas resistentes a medicamentos no EGFR
Gene HPVE6 (YOSHIBA et al., 2019)	CRISPR-Cas9 foi usado para direcionar o HPVE6 para o tratamento do câncer
Catarata (YUAN et al., 2017)	Foi utilizado para estudar a relação das mutações α A-cristalinas e catarata congênita humana

Tirosinemia hereditária (SHAO et al., 2018)	Corrigiu a mutação Fah em modelos de camundongos
Doença hepática metabólica (VILLIGER et al., 2018)	Corrigiu o Pah ^{enu2} gene na doença hepática metabólica
Doenças cardiovasculares (SEIDAH, 2013)	Corrigir o gene PCSK9 em um modelo de rato com aterosclerose
Leucemia Linfoblástica Aguda (GHAFFARI; KHALILI; REZAEI, 2021)	Cria células T CAR alogênicas convenientes, baratas e rápidas
Carcinoma Hepatocelular (GHAFFARI; KHALILI; REZAEI, 2021)	Cria células T CAR mais ativas e robustas
Carcinoma do cólon (GHAFFARI; KHALILI; REZAEI, 2021)	Cria células T TCR mais ativas e robustas
Carcinoma de Células Renais Metastático (GHAFFARI; KHALILI; REZAEI, 2021)	Gene alvo do CRISPR: <i>PDCD1-KO</i>
Linfoma de células B/Leucemia (GHAFFARI; KHALILI; REZAEI, 2021)	Genes alvo do CRISPR: <i>TRAC, TRBC, B2M-KO</i>
HIV-1 proviral (estudos in vitro) (BHOWMIK; CHAUBEY, 2022)	Diminuição do número de cDNA viral; Redução de partículas virais e expressão de proteínas p24 e Gag
Gene: PHGDH (WEI et al., 2019)	Indução da morte de células tumorais melhorando o nível de EROs
Gene: MUC5AC (POTHURAJU et al., 2020)	Reduzindo a tumorigênese e a quimiorresistência visando a sinalização CD44/ β -catenina/p53/p21
Gene: GPVI (MAMMADOVA-BACH et al., 2020)	Inibição da metástase tumoral
Gene: MUC16 (MUNIYAN et al., 2016)	Reduzindo antígenos de carboidratos associados ao tumor
HPV-16 (JUBAIR et al., 2021)	Eliminação de tumores estabelecidos em camundongos imunocompetentes
HBV (JIANG et al., 2017)	Inibição da expressão gênica viral
HIV-1 (WANG et al., 2014)	As células CCR5 KO mostraram notável resistência ao HIV-5 R1-trópico

Tabela 1 - Exemplos de aplicações de CRISPR

Fonte: próprio autor, 2022.

TÍTULO	OBJETO DE PESQUISA	METODOLOGIA DESCRIÇÃO	ANO	PRINCIPAL RESULTADO
Terapia Gênica para Doenças Neurodegenerativas (SUDHAKAR; RICHARDSON, 2019)	Doenças Neurodegenerativas	Envolveram na transferência gênica <i>in vivo</i> , seja 1) fator neurotrópico derivado glial (GDNF) ou 2) neurturina.	2018	Segurança e tolerabilidade de 4 títulos diferentes de AAV2-GDNF
Efeitos terapêuticos da telomerase em camundongos com fibrose pulmonar (MANUEL POVEDANO et al., [s.d.])	Fibrose pulmonar	A injeção intravenosa de AAV9 - <i>Tert</i> tem como alvo preferencial as células alveolares regenerativas do tipo II (ATII)	2018	Diminuição de células caspase 3-positivas em pulmões fibróticos; proliferação de células ATII; alterações na expressão gênica
A superexpressão de Klotho melhora a depuração e cognição β amiloide no modelo de camundongo APP/PS1 da doença de Alzheimer (ZHANG, 2019)	Doença de Alzheimer	Injetar lentivírus que transportou cDNA Klotho de camundongo de comprimento total no ventrículo lateral do cérebro	2020	Injetar lentivírus que transportou cDNA Klotho de camundongo de comprimento total no ventrículo lateral do cérebro
A terapia gênica Sirt7 direcionada ao endotélio vascular prolonga a vida útil em Hutchinson-Gilford (SUN et al., 2020)	Hutchinson-Gilford	Injeção no local de de AAV1 com expressão gênica <i>Sirt7</i> impulsorada por um promotor sintético ICAM2	2020	Os índices de neovascularização, características do envelhecimento e tempo de vida.
Desenvolvimento farmacêutico de produtos de terapia genética à base de AAV para o olho .E., (RODRIGUES et al., 2019)	DMRI (Degeneração Macular relacionada à Idade)	Estudos de fase I/II de vetores AAV expressando sFlt-1, que atua como uma armadilha VEGF.	2019	Demonstrou segurança do AAV2-sFlt administrado por via intravítrea ou sub-retiniana;
Efeitos do Exercício Aeróbico Tardio na Remodelação Cardíaca de Ratos com Infarto do Miocárdio Pequeno (SOUZA et al., 2021)	Infarto do Miocárdio Pequeno	Indução do IM, ratos Wistar foram divididos em três grupos: Sham; IM sedentário (IM-SED); e IM exercício aeróbico (IM-EA).	2020	Exercício aeróbico tardio pode melhorar a capacidade funcional cardíaca por meio da preservação da geometria ventricular esquerda

Tabela 2 - Exemplos de aplicações de Terapia Gênica

Riscos da técnica da CRISPR/Cas9

A fim de encontrar novas descobertas para diagnosticar doenças e tratamento, os

experimentos científicos se tornaram parte da história humana. Contudo, a ciência está atrelada a sociedade e, portanto, sofre influências políticas, econômicas, ideológicas e étnicas³⁴. Portanto, mesmo diante de tantas oportunidades de potencializar o bem-estar do paciente através da possibilidade da técnica eliminar enfermidades, é um dever ético debater sobre a utilização de CRISPR⁵⁸.

Pesquisadores da Universidade de Stanford e da Universidade de Iowa relataram que após o teste, conseguiram corrigir o gene que causa cegueira em ratos, contudo, nucleotídeos únicos sofreram exclusões ou inserções de maior porte, envolvendo trechos com mais de uma letra. Outro risco é a mutação, na sua maioria ocorrem em regiões não codificantes, ou seja, fora do alvo desejado⁵⁹.

Na Declaração sobre Genoma Humano e Direitos Humanos, determina, no artigo 11º, que não devem ser permitidas quaisquer práticas que sejam contrárias à dignidade humana; e, no artigo 12º, letra “a” assevera que toda pessoa deve ter acesso aos progressos da biologia, da genética e da medicina em matéria de genoma humano, respeitando sua dignidade e seus direitos. E na letra “b” do artigo 12 é assegurada a “liberdade de pesquisa necessária ao avanço do conhecimento” indicando ainda que “as aplicações da pesquisa, incluindo aquelas realizadas nos campos da biologia, da genética e da medicina, envolvendo o genoma humano, devem buscar o alívio do sofrimento e a melhoria da saúde de indivíduos e da humanidade como um todo”⁵⁸.

Apesar de suas vantagens e grande promessa, existem alguns obstáculos entre CRISPR-Cas9 e seu pleno potencial terapêutico. Reduzir ou evitar quaisquer mutações indesejadas fora do alvo em locais com homologia de sequência para locais no alvo é fundamental para o uso efetivo da engenharia genômica mediada por CRISPR em aplicações clínicas⁵⁹.

Com a existência da possibilidade de riscos e danos potenciais, é necessário que haja um cenário de mais prudência, precaução e de um consenso de uma moratória internacional. Sendo a edição gênica uma questão de saúde e política pública⁶⁰

CONCLUSÃO

A possibilidade do uso do sistema CRISPR tem despertado grande interesse entre pesquisadores e cientistas. Devido ao seu fácil manuseio e baixo custo, a tecnologia tornou-se muito promissora em todos os campos incluindo a ciência, seja no campo laboratorial ou agrícola. Por ser uma técnica mais simples e prática, mais pesquisas são necessárias para avaliação de forma rigorosa sua precisão e seus riscos em relação à produção de mutações genéticas fora do alvo requerido.

Na terapia gênica o tratamento com fármacos possui um custo muito alto, e visto que CRISPR/Cas9 obteve bons resultados perante a algumas doenças genéticas, é promissora sua utilização no tratamento de doenças oriundas de alteração no DNA, entretanto, há

sempre a necessidade de pesar que as probabilidades de benefícios sejam maiores que as dos malefícios.

REFERÊNCIAS

1. LaFontaine JS, Fathe K, Smyth HDC. Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. *Int J Pharm* [Internet]. 2015;494(1):180–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.029>
2. Sontheimer EJ, Barrangou R. The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution. *Hum Gene Ther*. 2015;26(7):413–24.
3. Sontheimer EJ, Marraffini LA. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*. 2010;11(3):181–90.
4. Terns MP, Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14(3):321–7.
5. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* [Internet]. 2014;157(6):1262–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
6. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. *Science* (80-). 2010;327(5962):167–70.
7. Pereira TC. Introdução à técnica de Crispr. *Ribeirao Preto: Sociedade Brasileira de Genetica*; 2016.
8. Arend MC, Pereira JO, Markoski MM. The CRISPR/Cas9 system and the possibility of genomic edition for cardiology. *Arq Bras Cardiol*. 2017;108(1):81–3.
9. Pluinage J-F, Fonseca O, Velho R. Tecnologia inova na edição de genes e desafia limites éticos. *Cienc Cult*. 2018;70(1):20–2.
10. Linden R. Gene therapy: what it is, what it is not and what it will be. *Estud Avançados*. 2010;24(70):31–69.
11. Bermudez NL, Lizarazo-Cortes O. Technique Edition of Genes Crispr/Cas9. Legal Challenges for Regulation and Use in Colombia. *Rev La Prop Inmater* [Internet]. 2016;(21):79–110. Available from: <http://revistas.uexternado.edu.co/index.php/propin/article/download/4603/5291>
12. de Souza MV, Krug BC, Picon PD, Schwartz IVD. High cost drugs for rare diseases in brazil: The case of lysosomal storage disorders. *Cienc e Saude Coletiva*. 2010;15(SUPPL. 3):3443–54.
13. Keeler AM, Flotte TR. Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? *Annu Rev Virol*. 2019;6:601–21.
14. Lee B, Diaz GA, Rhead W, Lichter-Konecki U, Feigenbaum A, Berry SA, et al. Glutamine and hyperammonemic crises in patients with urea cycle disorders. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2016;117(1):27–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.11.005>

15. Below S, Services P, Allen LM, Secretary D, Program A. MEDICAL ASSISTANCE. 2018;(31).
16. Abacan M, Boneh A. Use of carginic acid in the treatment of hyperammonaemia during metabolic decompensation of patients with propionic acidaemia. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2013;109(4):397–401. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.05.018>
17. Liu X, Wu S, Xu J, Sui C, Wei J. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2017;7(3):292–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2017.01.002>
18. Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, Parrott WA. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol*. 2015;15(1):1–10.
19. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. *Nat Biotechnol*. 2014;32(4):347–55.
20. Costa R, Ferreira S, Ciências I De, Alagoas UF De, Jorge PA, Al M, et al. Revisão. 2013;33(8):1743–55.
21. Dantas M de S, Abrão FM da S, Costa SFG da, Oliveira DC de. HIV/AIDS: meanings given by male health professionals. *Esc Anna Nery - Rev Enferm*. 2015;19(2):323–30.
22. Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Y, et al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(December 2015):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep22555>
23. Hoban MD, Lumaquin D, Kuo CY, Romero Z, Long J, Ho M, et al. CRISPR/Cas9-mediated correction of the sickle mutation in human CD34+ cells. *Mol Ther*. 2016;24(9):1561–9.
24. DeWitt MA, Magis W, Bray NL, Wang T, Berman JR, Urbinati F, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med*. 2016;8(360).
25. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015;6(5):363–72.
26. Rodriguez-garcia A, Palazon A, Noguera-ortega E, Jr DJP, Martin F. CAR-T Cells Hit the Tumor Microenvironment : Strategies to Overcome Tumor Escape. 2020;11(June):1–17.
27. Fernandes FV, Bello JHSM, Shiozaki AA, Cury RC. Current Role of Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol - Imagem Cardiovasc*. 2018;31(4):250–6.
28. BROUGHTON, J. P. et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 870–874, 1 jul. 2020.
29. KEMNA, J. et al. IFN γ binding to extracellular matrix prevents fatal systemic toxicity. **Nature Immunology**, v. 24, n. 3, p. 414–422, 1 mar. 2023.
30. XU, Y.; ZHU, M. Novel exosomal miR-46146 transfer oxaliplatin chemoresistance in colorectal cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 22, n. 7, p. 1105–1116, 1 jul.

31. NOROUZI-BAROUGH, L. et al. CRISPR/Cas9, a new approach to successful knockdown of ABCB1/P-glycoprotein and reversal of chemosensitivity in human epithelial ovarian cancer cell line. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 2, p. 181–187, 1 fev. 2018.
32. XIAO, Z. et al. Targeting CD44 by CRISPR-Cas9 in multi-drug resistant osteosarcoma cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 1879–1893, 1 dez. 2018.
33. BARGHOUT, S. H. et al. A genome-wide CRISPR/Cas9 screen in acute myeloid leukemia cells identifies regulators of TAK-243 sensitivity. 2021.
34. WANG, K. et al. Targeting uPAR by CRISPR/Cas9 System Attenuates Cancer Malignancy and Multidrug Resistance. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. FEB, 2019.
35. LIU, Q. et al. Virus-like nanoparticle as a co-delivery system to enhance efficacy of CRISPR/Cas9-based cancer immunotherapy. **Biomaterials**, v. 258, 1 nov. 2020b.
36. LIU, B. et al. CRISPR-mediated ablation of overexpressed EGFR in combination with sunitinib significantly suppresses renal cell carcinoma proliferation. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, 1 maio 2020a
37. YU, J. J. et al. High expression of aurora-B is correlated with poor prognosis and drug resistance in non-small cell lung cancer. **International Journal of Biological Markers**, v. 33, n. 2, p. 215–221, 1 maio 2018.
38. HA, J. S.; BYUN, J.; AHN, D. R. Overcoming doxorubicin resistance of cancer cells by Cas9-mediated gene disruption. **Scientific Reports**, v. 6, 10 mar. 2016.
39. KRÓL, S. K. et al. Aberrantly expressed recq14 helicase supports proliferation and drug resistance of human glioma cells and glioma stem cells. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 1–19, 2 out. 2020
40. AUBREY, B. J. et al. An Inducible Lentiviral Guide RNA Platform Enables the Identification of Tumor-Essential Genes and Tumor-Promoting Mutations InVivo. **Cell Reports**, v. 10, n. 8, p. 1422–1432, 3 mar. 2015
41. FENG, Y. et al. Targeting Cdk11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-cas9 system. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 33, n. 2, p. 199–207, 1 fev. 2015.
42. TANG, H.; SHRAGER, J. B. CRISPR /Cas-mediated genome editing to treat EGFR -mutant lung cancer: a personalized molecular surgical therapy . **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 2, p. 83–85, fev. 2016.
43. YOSHIBA, T. et al. CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6. **Oncology Letters**, v. 17, n. 2, p. 2197–2206, 1 fev. 2019.
44. YUAN, L. et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of α A-crystallin gene induces congenital cataracts in rabbits. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 58, n. 6, p. BIO34–BIO41, 1 maio 2017.
45. SHAO, Y. et al. Cas9-nickase-mediated genome editing corrects hereditary tyrosinemia in rats. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 18, p. 6883–6892, 4 maio 2018.

46. VILLIGER, L. et al. Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice. **Nature Medicine**, v. 24, n. 10, p. 1519–1525, 1 out. 2018.
47. SEIDAH, N. G. **Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.net Current Pharmaceutical Design**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.ucl.ac.uk/ldlr/LOVDv.1.1.0/index.php?select_db=PCSK9>.
48. GHAFFARI, S.; KHALILI, N.; REZAEI, N. **CRISPR/Cas9 revitalizes adoptive T-cell therapy for cancer immunotherapy**. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021.
49. GHAFFARI, S.; KHALILI, N.; REZAEI, N. **CRISPR/Cas9 revitalizes adoptive T-cell therapy for cancer immunotherapy**. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021.
50. GHAFFARI, S.; KHALILI, N.; REZAEI, N. **CRISPR/Cas9 revitalizes adoptive T-cell therapy for cancer immunotherapy**. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021.
51. GHAFFARI, S.; KHALILI, N.; REZAEI, N. **CRISPR/Cas9 revitalizes adoptive T-cell therapy for cancer immunotherapy**. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**BioMed Central Ltd, 1 dez. 2021.
52. GHAFFARI, S.; KHALILI, N.; REZAEI, N. **CRISPR/Cas9 revitalizes adoptive T-cell therapy for cancer immunotherapy**. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021.
53. BHOWMIK, R.; CHAUBEY, B. **CRISPR/Cas9: a tool to eradicate HIV-1**. **AIDS Research and Therapy**BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2022.
54. WEI, L. et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.
55. POTHURAJU, R. et al. Molecular implications of MUC5AC-CD44 axis in colorectal cancer progression and chemoresistance. **Molecular Cancer**, v. 19, n. 1, 25 fev. 2020.
56. MAMMADOVA-BACH, E. et al. **Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction with cancer cell-derived galectin-3****Blood**. [s.l.: s.n.].
57. MUNIYAN, S. et al. **MUC16 contributes to the metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma through focal adhesion mediated signaling mechanism****www.impactjournals.com/Genes&Cancer Genes & Cancer**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.impactjournals.com/Genes&Cancer>.
58. Maria Hupfer H, Altmann Berwig J. A tecnologia CRISPR-CAS 9: da sua compreensão aos desafios éticos, jurídicos e de governança. **Rev Pensar**. 2020;25(3):1–16.
59. Carlos G, Caetano G, De Oliveira H, Matos¹ S, Caroline P, Simão R, et al. Técnica CRISPR-CAS9 e sua utilização na área laboratorial CRISPR-CAS9's Technical and use in the laboratory area. **Brazilian J Surg Clin Res [Internet]**. 2018;25(2):96–9. Available from: <http://www.mastereditora.com.br/bjscr>

60. SGANZERLA, A.; PESSINI, L. Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas. **Saúde em Debate**, v. 44, n. 125, p. 527–540, jun. 2020.