



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

MARIANA SANTANA DA MOTA

**UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA CRISPR-Cas na
EDIÇÃO GENÔMICA HUMANA SOBRE PRECEITO
BIOÉTICO E LEGISLATIVO**

Araraquara, SP

2022

MARIANA SANTANA DA MOTA

**UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA CRISPR-Cas na
EDIÇÃO GENÔMICA HUMANA SOBRE PRECEITO
BIOÉTICO E LEGISLATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Borba Marchetto

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana Maria de Souza Moreira

Araraquara, SP

2022

M917u Mota, Mariana Santana da.
Utilização da ferramenta CRISPR-Cas na edição genômica humana
sobre preceito bioético e legislativo / Mariana Santana da Mota. –
Araraquara: [S.n.], 2022.
87 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Patricia Borba Marchetto.
Coorientadora: Tatiana Maria de Souza Moreira.

1. CRISPR-Cas. 2. Biotecnologia. 3. Edição Genômica. 4. Legislação.
5. Bioética. I. Marchetto, Patricia Borba, orient. II. Moreira, Tatiana Maria
de Souza, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar essa dissertação para minha família, que sempre esteve ao meu lado, guiando e apoiando durante toda minha caminhada. Sem ela eu não seria nada, e não estaria aqui.

Às minhas orientadoras, Prof.^a Dr.^a. Patrícia Borba Marchetto e Prof.^a Dr.^a. Tatiana Maria de Souza Moreira pelo seu conhecimento, incentivo, inspiração, paciência e empenho no desenvolvimento desta dissertação e no meu desenvolvimento profissional nessa longa jornada.

Às minhas professoras e professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara, por terem compartilhado mais do que seus conhecimentos, me instigaram, incentivaram e ensinaram o valor, poder e importância da faculdade e ensino público no Brasil.

Aos profissionais administrativos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara que ao longo desses quase 7 anos forneceram não só todas as orientações e esclarecimentos sobre minha jornada, mas também sempre foram bons amigos, confidentes e ponto de acolhimento dentro do ambiente universitário.

Às entidades acadêmicas, que me desenvolveram em aspectos que eu nem sabia que precisava e se mostraram muito mais do que um grupo de atividades, mas uma comunidade que ensinou, fortaleceu, guiou e me formou para o que eu considero ser uma pessoa melhor e consciente. Em especial, agradeço ao PET, CAOS e Bacteria, pelas inúmeras vezes que foram o sol dos meus dias.

E aos meus bons amigos, por todos os dias de luta e glória, pelo companheirismo cheio de bravura e afeto, pelo apoio e principalmente por alegrarem meus dias.

Levarei todos aqui para sempre comigo, com muito carinho.

“Ser jovem e não ser revolucionário é
uma contradição genética.”
Che Guevara (1928-1967)

RESUMO

A CRISPR-Cas é uma poderosa ferramenta que permite realizar modificações genéticas precisas e específicas nas cadeias de DNA. Por conta de sua ampla gama de aplicações, eficiência e baixo custo, a ferramenta tornou-se uma das mais divulgadas e utilizadas dentro do âmbito acadêmico, principalmente a partir de estudos mostrando a sua programabilidade. Seu uso então começou a ser explorado principalmente na área de pesquisa em diversos contextos e áreas, como por exemplo, na área da saúde, na medicina e na agricultura. Mas, foi em 2018, que a ferramenta ganhou notoriedade fora do âmbito acadêmico, pelo seu uso indevido na medicina, pelo médico chinês, que editou o DNA de embriões em seu país. A repercussão da notícia evidenciou justamente não só o impacto social, mas também político da CRISPR-Cas, e como é indistinguível o avanço da ciência, a necessidade de atualização da legislação e a avaliação das consequências sócio-ambientais-humanas. Dessa forma, o presente trabalho buscou analisar e discutir o uso da técnica de CRISPR- Cas, apresentando-a junto a outras técnicas de edição genética, e trazendo conceitos e princípios bioéticos e a legislação vigente em diferentes países para embasamento de uma discussão e análise frente ao cenário atual de emprego prático da técnica em possível benefício da sociedade. Por meio dos conceitos historicamente elaborados da Bioética, devemos nos atentar ao fato de que nenhuma tecnologia pode ser empregada para o malefício de qualquer que seja o grupo social e, aliado a isso, a legislação de todos os países deve ter como princípio o acesso de todos ao desenvolvimento de técnicas que beneficie a população como um todo. Por outro lado, os dados encontrados demonstraram que em muitos lugares existe uma preferência pelo controle em detrimento de um estudo amplo com a sociedade civil e legislativa, retardando o desenvolvimento e a implementação dessa e de outras técnicas de edição gênica que possam favorecer a população. Com quase seis mil artigos em 10 anos em uma base de dados como o Pubmed, tem-se a contradição do fácil acesso a metodologias do uso e descrição de CRISPR enquanto que a legislação acerca da empregabilidade da mesma mostra-se rasa, na maioria dos países, que focam apenas na proibição, medida que não impede seu uso. Portanto, para a evolução saudável da ferramenta, é necessário compreender seu funcionamento, saber seu *status* do ponto de vista legislativo, e

discutir seu impacto sobre o bem-estar de todos os seres humanos e todas as formas de vida.

Palavras-chave: CRISPR-Cas; Biotecnologia; Edição Genômica; Legislação; Bioética.

ABSTRACT

CRISPR-Cas is a powerful tool that allows precise and specific genetic modifications on DNA strands. Due to its wide range of applications, efficiency and low cost, the tool has become one of the most publicized and used within the academic field, mainly from studies showing its programmability. Its use then began to be explored mainly for research in different contexts and areas, such as in health, medicine and agriculture. But it was only in 2018 when the tool gained notoriety outside the academic realm, for its misuse in medicine, by the Chinese doctor, who edited the DNA of embryos in his country. The news repercussion showed precisely not only the social impact, but also the political impact of CRISPR-Cas, and how science advancement, the need of legislation update and the evaluation of socio-environmental-human consequences are indistinguishable. Therefore, the present work sought to analyze and discuss the use of the CRISPR-Cas technique, presenting it together with other genetic editing techniques, bringing bioethical concepts and principles and, the legislation in force in different countries to support discussion and analysis, given the current scenario of practical use of the technique for the possible benefit of society. Through the historically elaborated concepts of Bioethics, we must pay attention to the fact that no technology can be used to harm any social group and, allied to this, the legislation of all countries must have as a principle to assure access for all citizens to the techniques or technologies that benefits the population. On the other hand, the data found showed that in many places there is a preference for control over a broad study with civil and legislative society, delaying the development and implementation of this and other gene editing techniques that may favor the population. With almost six thousand articles in 10 years in a database like Pubmed, there is a contradiction between easy access to methodologies for the use and description of CRISPR, and shallow legislation employability. In most cases, countries focus only on prohibition, which does not prevent its use or misuse. Therefore, for the healthy evolution of the CRISPR- Cas, it is necessary to understand its functioning, know its status from a legislative point of view, and discuss its impact on the well-being of all human beings and all forms of life.

Key words: CRISPR-Cas; Biotechnology; Genomic Editing; Legislation; Bioethics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático da fita dupla de DNA, mostrando a composição da sua base nucleotídica.....	20
Figura 2 – Estrutura e mecanismo de indução de quebras de fita dupla. Cada ZFN está ligada a um domínio de nuclease da enzima de restrição FokI, assim, a clivagem do DNA ocorre entre os dois sítios de reconhecimento ZFP.....	22
Figura 3 – A via NHEJ na ilustração, inativou o gene. A via HDR usando sequências de DNA doadoras homólogas, cria inserções ou substituições das bases, gerando correção do gene ou uma adição orientada.....	23
Figura 4 – Diagrama esquemático da estrutura da TALEN, e ligação dos dímeros de TALEN com a região alvo do DNA.....	24
Figura 5 – Os princípios do direcionamento de genes mediado por ZFN ou TALEN.....	25
Figura 6 – Ilustração do mecanismo de RNAi.....	27
Figura 7 – A ação do sistema CRISPR-Cas é geralmente dividida em três estágios, sendo elas: adaptação ou integração do espaçador, produção do RNA CRISPR, e pôr fim a interferência do DNA ou RNA.....	29
Figura 8 – Representação das três etapas da ação da CRISPR-Cas: adaptação, produção do RNA CRISPR e interferência no DNA.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Regiões do mundo e quantidade de países que possuem políticas sobre edição genômica da linha germinativa humana, não voltada para reprodução.....62

Tabela 2 – Regiões do mundo e quantidade de países que possuem políticas sobre edição genômica da linha germinativa humana, voltadas para reprodução.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART	Terapia antirretroviral
BI	Bioética de Intervenção
Cas	Proteína associada a CRISPR
CDB	Convenção da Diversidade Biológica
CIBio	Comissão Interna de Biossegurança
CNBS	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COVID-19	Doença por coronavírus 2019
CQB	Certificados de Qualidade de Biossegurança
CVO	Crise vaso-oclusiva
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Quebra da fita dupla de DNA
dsRNA	RNA de fita dupla
DUBDH	Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos
EIA	Estudo de Impacto Ambiental
FDA	Estudo de Impacto Ambiental
gRNA	RNA guia
HDR	Reparo dirigido por homologia
HIV-1	vírus da imunodeficiência humana 1
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
miRNA	Micro-RNA
MMA	Ministério do Meio Ambiente
mRNA	RNA mensageiro
NBTs	<i>New Breeding Technologies</i>
NHEJ	União de extremidade não-homóloga

NIH	Institutos Nacionais de Saúde
NRPs	Peptídeo não ribossomal
OGM	<i>Organismos geneticamente modificados</i>
ORFs	<i>Open Reading frames</i>
OVMs	Organismos vivos modificados
PAM	Motivo adjacente do proto espaçado
PCB	Protocolo de Cartagena
pré-crRNA	Pre- CRISPR RNA
Pro-AG	Técnica genética pró-Ativa
RISC	<i>RNA complexo efetor</i>
RN	Resoluções Normativas
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
siRNA	RNA de interferência curto
TALEN	Nucleases com Efetores do tipo Ativador Transcricional
TCH	Teoria da Herança Cromossômica
TIMP	Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão
tracRNA	RNA CRISPR transativador
VIGS	Silenciamento gênico induzido por vírus
ZFN	Nucleases Dedo de Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 1 Levantamento histórico e estudo das principais técnicas de edição genômica...	17
1.1. O início da genética.....	17
1.2. Técnicas de modificação genética	19
1.2.1. Edição: ZFN, TALEN e RNAi	20
1.2.1.1. Zinc Finger Nuclease (ZNF)	21
1.2.1.2. TALEN	23
1.2.1.3. RNAi de Interferência (RNAi)	26
1.3. Origem e Definição do Sistema CRISPR	27
1.4. Funcionamento do sistema CRISPR-Cas9	32
1.5. Aplicações da CRISPR.....	34
1.6. Desafios e Perspectivas.....	37
1.7. Considerações finais do capítulo 1	38
CAPÍTULO 2 Análise da Bioética principialista e de intervenção, e seu aprimoramento no campo da edição genética.....	40
2.1. Da origem à sua evolução.....	40
2.1. A Bioética Principialista	46
2.2. Bioética de Intervenção	48
2.4. Declaração dos Direitos Universais pela Unesco - Pressupostos Legais.....	51
2.5. Considerações finais do capítulo 2.....	54
CAPÍTULO 3 Legislação nacional e internacional vigente relacionadas à edição gênica	56
3.1. Modificação do DNA Humano	56
3.2. Legislação Internacional.....	58
3.2.1. Moratória da edição do genoma hereditário	58
3.2.2. Legislação internacional unificada	61
3.3. Protocolo de Cartagena e Legislação Nacional	65
3.4. Considerações finais do capítulo 3	70
CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	74

INTRODUÇÃO

Em 2012, Jennifer Doudna e seus colegas publicaram os resultados de um experimento sobre genes bacterianos. A descoberta, apontava para um novo método de edição de DNA que poderia até possibilitar a mudança de genes humanos. Em apenas uma década, combinando os aprendizados de outros sistemas de edição com as propriedades do Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR) este se tornou uma das descobertas mais célebres da biologia moderna e está mudando rapidamente a forma como as doenças podem ser estudadas, como por exemplo para descobrir as vulnerabilidades ocultas das células tumorais, ou como editar genes que causam doenças hereditárias. Por seu rápido impacto, Doudna e sua colaboradora, Emmanuelle Charpentier, ganharam o Prêmio Nobel de Química de 2020 (BARRANGOU;DOUDNA, 2016).

Apesar da existência de outras técnicas de edição como Nucleases Dedo de Zinco (ZFNs) e Nucleases com Efetores do tipo Ativador Transcricional (TALENs), sistemas que empregam enzimas programáveis que realizam ligação proteína-DNA, o sistema CRISPR-Cas destaca-se por apresentar uma nuclease guiada por pequenos RNAs que hibridizam com o DNA para fazer sua quebra, representando um sistema que é marcadamente mais fácil de projetar, altamente específico, eficiente e adequado para edição de genes, além de poder ser empregado em variados tipos de células e organismos (RAN *et al.*, 2013).

O uso potencial da ferramenta nas mais diversas áreas, é inquestionável, porém para além de questionamentos técnicos como as limitações da CRISPR que podem causar edição incompleta levando ao mosaicism¹, ou até mesmo sua ação *off-target*², há também questões éticas vinculadas ao seu uso, sendo uma delas, as consequências e impactos para as gerações futuras. Esse questionamento dava-se apenas como exercício de reflexão até 2018, quando He Jiankui, médico chinês, editou geneticamente embriões humanos para conferir resistência ao HIV, sendo que três dos embriões modificados foram implantados

¹ **Mosaicism** é uma condição genética na qual o indivíduo apresenta dois materiais genéticos distintos, e pode ser entendido como uma falha no processo de formação do embrião.

² **Off target**, significa fora do alvo. São mutações genéticas não planejadas, fora do alvo previamente escolhido.

em mulheres na cidade chinesa de Shenzhen, mas pouco se sabe sobre a saúde das três crianças (PRESSE, 2022).

Em 2019, o Dr. He foi condenado à prisão por “práticas médicas ilegais”, mas as consequências de suas ações levaram à realização de diversas conferências, e discussões sobre o uso da edição CRISPR, principalmente seus impactos quando usados no genoma humano. Isso porque, a edição da linha germinativa apresenta muitas questões importantes, incluindo os riscos de edição imprecisa, como mutações fora do alvo e edição incompleta das células de embriões em estágio inicial; A dificuldade de prever os efeitos nocivos que as alterações genéticas podem ter sob a ampla gama de circunstâncias vivenciadas pela população humana, possibilitando interações com outras variantes genéticas e com o meio ambiente. Mas há também, a obrigação de considerar as implicações tanto para o indivíduo quanto para as gerações futuras que serão portadoras das alterações genéticas, e o fato de que, uma vez introduzidas na população humana, as modificações seriam difíceis de ser “removidas” e não permaneceriam em uma única comunidade ou país. Além disso, a possibilidade do uso da técnica para "melhorias" genéticas permanentes em subconjuntos da população podendo exacerbar desigualdades sociais ou serem usadas de forma coercitiva, e por fim as considerações morais e éticas ao alterar propositalmente a evolução humana usando esta tecnologia (BROKOWSK;ADLI, 2019).

Para uma discussão ampla dessa temática é necessário um modelo expansivo, com visão acerca do tema, de forma a esclarecer confusões que atualmente distorcem o entendimento público sobre a edição genética, seu funcionamento, potenciais usos e riscos. As discussões também precisam colocar em primeiro plano o contexto e as consequências sociais, de forma a reconhecer mais do que questões técnicas e científicas, mas também considerar as consequências baseadas no reconhecimento de padrões sistêmicos de discriminação e estratificação social, dinâmicas comerciais poderosas e contextos históricos, incluindo abusos eugênicos generalizados (UDDIN;RUDIN, 2020).

Por último, mesmo que ainda não haja consenso mundial em relação a como legislar sobre CRISPR, e que seja amplamente reconhecido que a evolução legislativa se dá de maneira muito mais lenta do que o avanço tecnológico, simplesmente proibir o uso da ferramenta como medida de governança, mesmo

que seja adotado por vários países não é o melhor caminho, e foi justamente a falta de legislação vigente na China em 2018 que foi um dos impeditivos para o julgamento do caso dos embriões editados. A ausência legislativa enfraquece a governança e dificulta o desenvolvimento do potencial da ferramenta, que fosse simplesmente banida, não poderia ter sido usada durante a pandemia do COVID-19 para realização de diagnóstico rápido da doença (ALMEIDA; RANISCH, 2022).

A governança da edição de genes humanos pode se basear em uma ampla variedade de instituições, políticas e práticas, envolvendo não apenas os governos, mas também a indústria privada, instituições de pesquisa e educação, organizações de advocacia e sociedades profissionais, e para isso uma compreensão clara e precisa do cenário de política global para edição do genoma humano hereditário é especialmente importante para essas discussões. Nesse caminho, aqui discutiremos a edição genômica do ponto de vista técnico, bioético e legislativo.

CAPÍTULO 1 Levantamento histórico e estudo das principais técnicas de edição genômica

1.1. O início da genética

Em 1905 o biólogo inglês William Bateson (1861-1926), usou o termo “genética” para descrever a ciência da hereditariedade e variação. Bateson foi considerado “pai da genética”, por ter criado e proposto o termo em 1906 durante a III Conferência Internacional de Plantas Híbridizadas. Entretanto, anos antes da oficialização do termo, em 1856 Gregor Johann Mendel (1822-1884), meteorologista, matemático e biólogo austríaco já apresentava estudos no campo da genética, mais especificamente no efeito da hibridização em plantas, tendo seu conhecimento e leis somente reapresentadas à comunidade científica em 1900 em memória (OHKURA, 2015).

Mendel iniciou sua análise nos princípios da hereditariedade em meados da década de 1856, empregando ervilhas (*Pisum sativum*), e explicou pela primeira vez a maneira como as características genéticas são passadas de uma geração para a próxima, e às vezes também pulando gerações, isso antes que alguém soubesse da existência dos genes (MIKO, 2008). Nossa atual compreensão de como as características podem ser herdadas vem dos princípios propostos pelo cientista, que observou as formas das plantas progenitoras e seus descendentes enquanto se autofecundam, não apenas cruzando pais reprodutores puros, as quais geração após geração de autofecundação as características fenotípicas das plantas rastreadas se mantiveram consistentes, mas também através do cruzamento de gerações híbridas e delas com suas linhagens parentais (KEYNES; COX, 2008).

Durante as últimas duas décadas do século XIX começaram a ser bem conhecidos pela comunidade científica a morfologia do cromossomo, e o processo de divisão celular mitose e meiose. A primeira, responsável pela geração de células-filhas com a mesma ploidia das células-mãe, e a segunda responsável por gerar células haplóides a partir de uma célula diplóide (OHKURA, 2015). Ploidia se refere ao número de cromossomos que há no núcleo de uma célula, portanto em células somáticas os cromossomos estão em pares, durante a produção de gametas, as células germinativas apresentam metade do número de

cromossomos de uma célula somática, e quando duas células germinativas se unem a diploidia é restaurada (STEWART, 2010).

Ainda no início do século XIX, diversas hipóteses referentes à base física e localização dos fatores mendelianos, chamados de genes ou alelos, ainda permaneciam desconhecidas, sendo a mais relevante a teoria de Sutton-Boveri, também conhecida como a Teoria da Herança Cromossômica (TCH), que propõe considerar os cromossomos como portadores dos fatores mendelianos (AA, Aa e aa), fator que possibilitou o embasamento da descoberta e desenvolvimento do campo da citogenética, área de estudos dos cromossomos, que levou às primeiras observações e relatos de anormalidades cromossômicas como duplicações, deleções, translocações, inversões, como também observações do efeito e ligação direta entre o cromossomo-estrutura e fenótipo resultante da expressão do gene (SANTOS *et al.*, 2015).

Do meio para o final do século XIX, muitas descobertas marcaram sua importância e potencial para alavancar novos olhares e horizontes para a genética. Em 1870 o bioquímico suíço Friedrich Miescher isolou, do núcleo de células, um ácido que continha fósforo e nitrogênio, e assim o material no núcleo foi determinado como um ácido nucléico (GAYON, 2016). A confirmação de que o DNA de fato era o material genético das células, a determinação do RNA, e então em 1953 a determinação da estrutura do DNA em dupla hélice, por Watson e Crick, proporcionando aos cientistas o Nobel de medicina de 1962 juntamente com Maurice Wilkins, são considerados momentos chave da ciência moderna, ressaltando que somente após a descoberta da estrutura do DNA, por possibilitar o desenvolvimento de diversas técnicas e um novo caminho para o desvendamento do código genético, o novo capítulo da genética teve seu início (ARIAS, 2004; GAYON, 2016).

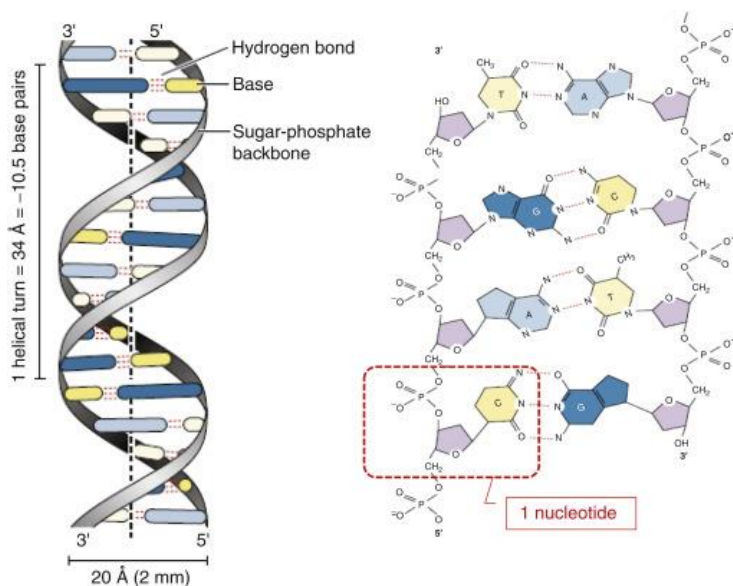
A descoberta de dupla hélice do DNA, e elucidação do processo de replicação do mesmo, descreveu os componentes necessários para o surgimento de uma das etapas essenciais para todos os projetos de sequenciamento do genoma, o desenvolvimento em 1977 do Método de Sanger, técnica de sequenciamento desenvolvida por Fred Sanger e colaboradores. A técnica foi amplamente popularizada e empregada, o que possibilitou o entendimento da replicação do DNA, e foi precursora de diversas outras ferramentas e técnicas de

sequenciamento, como a radiomarcção, fator fundamental que futuramente possibilitou as hibridizações Southern, e o mapeamento molecular em experimento (OHKURA, 2015). Entre 1989 até 2003, ocorreu a “Era Genômica” termo adotado para o período do início e fim do Projeto Genoma Humano, proposto e liderado por meio de um consórcio público internacional, o qual possuía como objetivo principal determinar a sequência exata dos 3,1 bilhões de bases nitrogenadas em uma molécula de DNA, para assim promover, impulsionar e financiar pesquisas no ramo da genética, construindo uma base informacional (GÓES;OLIVEIRA, 2014).

1.2. Técnicas de modificação genética

As técnicas de edição do genoma permitem a manipulação direta de qualquer sequência de DNA numa gama diversificada de tipos de células e organismos, e para entendê-las a fundo é necessário compreender o fundamento comum e principal a todas elas, o processo de replicação do DNA (GAJ *et al.*, 2013). O DNA é uma molécula helicoidal de cadeia dupla composta por nucleotídeos, cada um dos quais contém um grupo fosfato, uma molécula de açúcar e uma base nitrogenada. Existem quatro bases nitrogenadas naturais, ou seja, quatro tipos diferentes de nucleotídeos que compõem o DNA: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C), como ilustrado na Figura 1 (CONDON, 2006).

Figura 1. Modelo esquemático da fita dupla de DNA, mostrando a composição da sua base nucleotídica.



Fonte: BANO *et al.*, p.290, 2016

No DNA, as bases nitrogenadas formam pares entre si ao longo de toda cadeia, sendo que adenina e timina são bases complementares, assim como guanina está para a citosina.

Durante a replicação do DNA, as duas cadeias na dupla hélice se separam, permitindo que a enzima DNA polimerase acesse cada fita individualmente, e a medida que a enzima passa pela fita única, ela usa a sequência de nucleotídeos nesta fita molde como modelo para a replicação, adicionando assim os nucleotídeos para formação da fita complementar. Este processo acontece ao longo de ambas as cadeias e simultaneamente, resultando na eventual produção de duas moléculas de dupla hélice, cada uma contendo como molde, a antiga cadeia de DNA (KLUG *et al.*, 2020).

1.2.1. Edição: ZFN, TALEN e RNAi

As três principais técnicas de edição genômica induzindo quebras na cadeia dupla de DNA são: as Nucleases Dedo de Zinco (ZNF do inglês *Zinc Finger Nuclease*), Nucleases com Efetores do tipo Ativador Transcricional (TALEN do inglês "*Transcription activator-like effector nucleases*") e Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas (CRISPR-Cas do

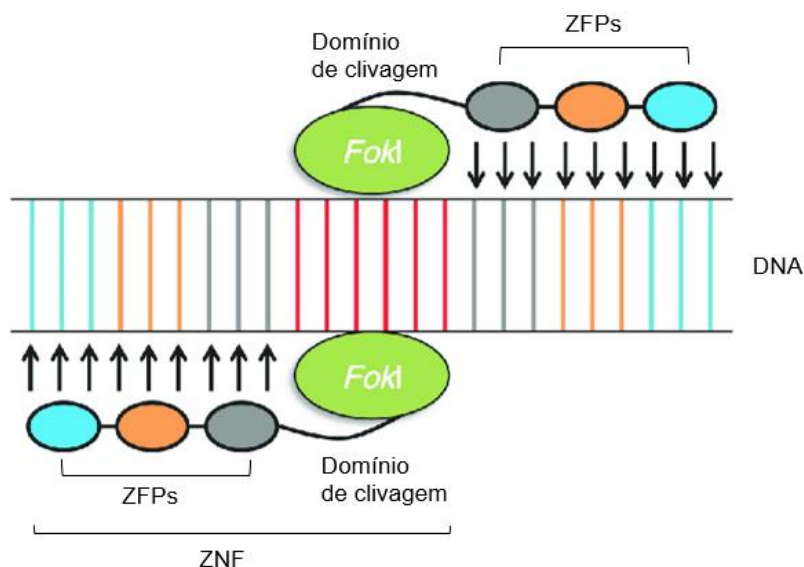
inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), além do controle da expressão pela técnica de RNA de interferência (RNAi), que permite uma ampla gama de modificações genéticas (FURTADO, 2020). Trataremos sobre a CRISPR-Cas no próximo capítulo.

Essas técnicas permitem a manipulação direta de praticamente qualquer sequência de DNA, e sua versatilidade surge da capacidade de personalizar o domínio de ligação de DNA para reconhecer qualquer sequência. Empregando nucleases artificiais, é possível realizar modificações genéticas eficientes e precisas ao induzir quebras direcionadas na cadeia dupla de DNA, que estimulam os mecanismos de reparo da mesma, incluindo junção não-homóloga propensa a erros (NHEJ, sigla em inglês para *non-homologous end joining*) e reparo dirigido por homologia (HDR, sigla em inglês para *homologous recombination*) (GAJ *et al.*, 2013).

1.2.1.1. Nucleases dedo de zinco (ZNF)

As ZFN, são compostas por duas partes, a primeira composta por um ou mais módulos *zinc finger* (ZF), que são arranjos de proteínas dedos de zinco (ZFPs), proteínas com funções variadas em procariontes e eucariontes, como proliferação celular, sinalização, tradução, transcrição, replicação e reparo de DNA. A primeira parte composta por ZFPs é então combinada com a endonuclease do tipo FokI, responsável pela clivagem da dupla fita. Assim, ZFNs são proteínas quiméricas que possuem propriedades catalíticas melhoradas quando comparadas com as de suas enzimas individuais (MILLER *et al.*, 2019). Cada ZFN contém o domínio de clivagem de FokI ligado a uma matriz ou monômeros, de três a seis dedos de zinco, que são projetados para reconhecer especificamente sequências que compõem o local de clivagem, tornando a técnica facilmente empregada, editável e adaptável (URNOV *et al.*, 2010). Na Figura 2, abaixo, está ilustrada a estrutura e arranjo da ZFN, com seus monômeros e endonuclease do tipo FokI.

Figura 2. Estrutura e mecanismo de indução de quebras de fita dupla. Cada ZFN está ligada a um domínio de nuclease da enzima de restrição FokI, assim, a clivagem do DNA ocorre entre os dois sítios de reconhecimento ZFP.

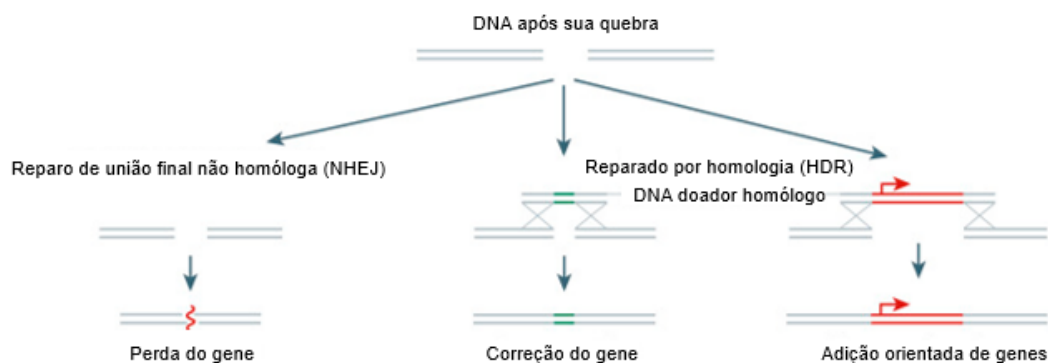


Fonte: LIMEIRA, *et al.*, 2017.

A quebra do DNA só ocorre por meio da ação de duas endonucleases do tipo FokI, assim a clivagem só é possível por meio do par de ZFNs, cada uma em uma fita do DNA. A primeira ação necessária para o processo se dá através da ligação das ZFs às bases do DNA, e cada domínio ZF tem capacidade de se ligar a três bases nitrogenadas diferentes, assim um par de ZFN com três módulos tem capacidade de reconhecer uma sequência de dezoito pares bases de nucleotídeos específicos, o que estatisticamente é suficiente para direcionar os dedos de zinco a um único locus do DNA, e que apenas esse alvo seja clivado.

Todas as células eucarióticas reparam de forma eficiente duplas quebras em locais específicos da molécula de DNA, também chamado de DSB (double strain break) através das vias de reparo direcionado por homologia (HDR) ou de união final não homóloga (NHEJ) (KIM *et al.*, 2014). A reparação NHEJ ativa a via sinalizadora de respostas por danos, assim liga rápida e eficientemente as duas extremidades clivadas, com o ganho ocasional ou perda de informação genética e assim, pode ser usado para introduzir pequenas inserções e/ou deleções no local da ruptura, resultado que tem potencial de ser explorado para modificar um gene-alvo. Na Figura 3, está ilustrado o reparo de união final não homóloga (NHEJ) e reparado por homologia (HDR).

Figura 3. A via NHEJ na ilustração, inativou o gene. A via HDR usando sequências de DNA doadoras homólogas, cria inserções ou substituições das bases, gerando correção do gene ou uma adição orientada.



Fonte: ADHIKARI; POUDEL, p. 10, 2020.

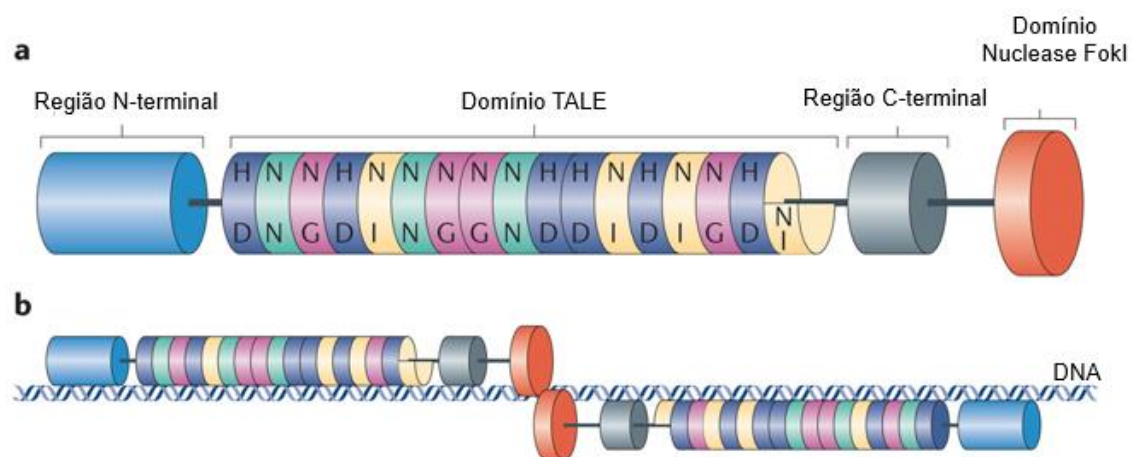
No entanto, se a ruptura passar pelo reparo homólogo (HDR) pode resultar em correção do gene ou, adição orientada de genes, isso porque se um DNA doador homólogo projetado é fornecido em combinação com os ZFNs, informações codificadas neste modelo podem ser usadas para reparar a fita clivada, resultando em uma correção gênica com alguns nucleotídeos alterado no sítio endógeno, ou a adição de um novo gene no local da ruptura (CARROLL, 2011). A edição de genoma baseada em homologia requer a provisão simultânea de uma molécula de DNA doadora adequadamente projetada, contendo homologia, juntamente com os ZFNs específicos do locus. Isto permite dois modos relacionados de edição do genoma que são uma função do projeto do DNA do doador e distinguidos pelo tipo de alelo que está sendo gerado (MILLER *et al.*, 2019).

1.2.1.2. Nucleases com Efetores do tipo Ativador Transcricional (TALEN)

TALEN, do inglês *transcription activator-like effector nuclease* ou nuclease com efetores do tipo ativador transcricional, é uma ferramenta utilizada para a realizar modificações sítio dirigidas, e é muito semelhante aos dedos de zinco. Essa técnica assim como a ZFN é também, muito valiosa podendo ser empregada para a realização de inserções, rearranjos e substituições no DNA (JOUNG; SANDER, 2013).

As TALENs compreendem um domínio de nuclease FokI não específico fundido a um domínio de ligação de DNA personalizável. Esse domínio de ligação ao DNA é composto de repetições altamente conservadas derivadas de efetores semelhantes a ativadores de transcrição, chamados TALE, que são proteínas secretadas por bactérias *Xanthomonas sp.* para alterar a transcrição de genes em células vegetais hospedeiras. O domínio TALE é formado pela proteína TAL ligada em uma nuclease de clivagem de DNA inespecífica fundida do tipo FokI, com o objetivo de reconhecer locus específicos no DNA (LI *et al.*, 2020). Na Figura 4, abaixo, está ilustrada a estrutura da TALEN de forma esquemática.

Figura 4. a) Diagrama esquemático da estrutura da TALEN. b) Ligação dos dímeros de TALEN com a região alvo do DNA.



Fonte: JOUNG; SANDER, p. 51, 2013.

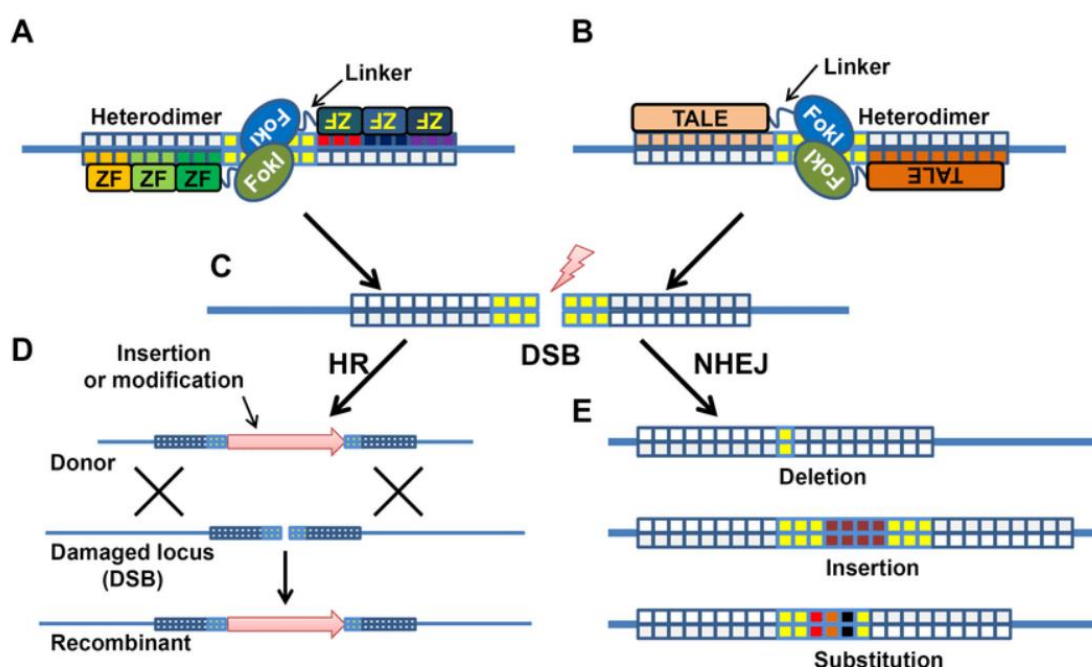
A região C-terminal de TALEs contém um sinal de localização nuclear, que funciona como ativador da transcrição do DNA do hospedeiro. A região central da TALE constitui o domínio de ligação ao DNA, sendo responsável pela precisão da ligação ao DNA alvo e pela especificidade do hospedeiro, e por último a região aminoterminal, N-Terminal, é caracterizada pelo sinal de translocação.

O estilo modular das TALENs projetadas é semelhante aos ZFNs, porque enquanto as TALENs utilizam as proteínas TALEs como módulos de reconhecimento de DNA, as ZFNs usam o domínio ZF para realizar a ligação ao DNA, e ambos usam as mesmas enzimas de restrição, a FokI. Comparando as duas técnicas, a TALEN oferece maior flexibilidade de design, porque o

reconhecimento de base única de repetições, facilita a ligação da TALE ao DNA alvo.

Comparada com a ZFN, a técnica TALEN é considerada mais simples de ser empregada por precisar apenas de uma proteína a ser projetada, mesmo que a clonagem de matrizes TALE seja complexa. Isso porque, para uso da ZFN é necessário a clonagem de diferentes módulos (ENGLER *et al.*, 2014; JOUNG; SANDER, 2013).

Figura 5. Os princípios do direcionamento de genes mediado por ZFN ou TALEN. (A) Dedo de zinco (ZF) e (B) módulos TALE são projetados para detectar sequências específicas em uma direção oposta. (C) Indução da quebra da fita dupla, pela ZFs e TALEs. (D) Reparo dirigido por homologia, HR. (E) Reparo não-homólogo, NHEJ.



Fonte: SUNG *et al.*, p. 686, 2012

Na Figura 5, pode-se comparar a ação das duas técnicas de edição de genoma usando nucleases projetadas, ilustrando a necessidade de um par de ZFNs, composto por subdomínios, cada um reconhecendo três nucleotídeos distintos, para então introduzir a quebra na fita dupla do DNA, através da endonuclease FokI. O macrodomínio de ligação ao DNA de TALEN é composto de subdomínios, cada um reconhecendo um único nucleotídeo, e assim da mesma forma que o ZFN, um par de TALENs é necessário para introduzir a quebra da fita dupla do DNA, mediada pela FokI (ILARDI;TAVAZZA, 2015).

1.2.1.3. RNAi de Interferência (RNAi)

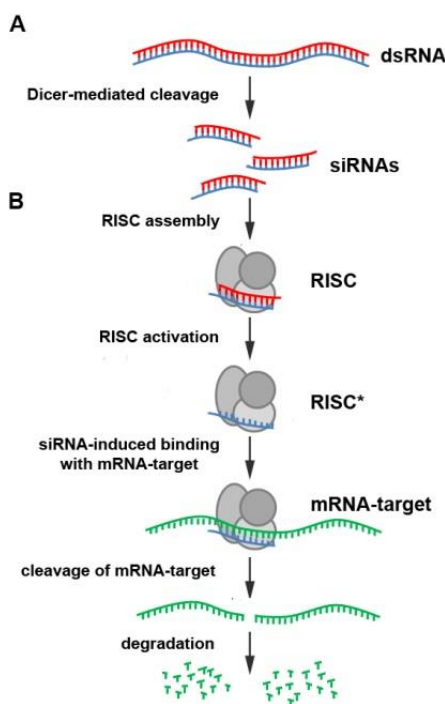
O silenciamento por interferência de RNA (RNAi) é um mecanismo que inibe ou ativa a expressão gênica na fase de tradução, suprimindo esse processo por meio do silenciamento de gene transcricional ou pela ativação de um processo de degradação de RNA específico de sequência, o silenciamento de gene. O RNAi atua como uma forma de resposta imune e também desempenha papel na regulação do desenvolvimento e manutenção do genoma. Sendo assim, os gatilhos endógenos da via de RNAi incluem DNA estranho ou RNA de fita dupla (dsRNA) de origem viral, transcritos epigenéticos de sequências repetitivas no genoma, pré-microRNA (miRNA), e transposons os genes “saltadores”, que se inserem de forma aleatória no genoma o que pode acarretar perda do gene ou geração de uma nova mutação, quando sua inserção é realizada em uma área regulatória ou codificante (KIM; ROSSI, 2008).

Nas plantas, o RNAi forma a base do silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), mostrando um papel importante na resistência a patógenos (GELEY; MÜLLER, 2004). Pequenas fitas de RNA interferentes (siRNA) são fundamentais para o processo de RNAi, que possuem sequências de nucleotídeos complementares à fita de RNA alvo. As proteínas específicas da via de RNAi são guiadas pelo siRNA para o RNA mensageiro direcionado (mRNA), onde “clivam” o alvo, quebrando-o em porções menores que não podem mais ser traduzidas em proteínas. Um tipo de RNA transcrito do próprio genoma, o microRNA (miRNA), funciona da mesma forma. Primeiramente, a RNAi foi relatado em plantas, mas mais tarde eventos relacionados ao RNAi foram descritos em quase todos os organismos eucarióticos, incluindo protozoários, moscas, nematóides, insetos, parasitas e linhagens celulares de camundongos e humanos (SETTEN *et al.*, 2019).

Um modelo simplificado para a via de RNAi é baseado em duas etapas, cada uma envolvendo a enzima ribonuclease. Na primeira, o RNA gatilho que é transcrito primário de dsRNA ou miRNA, é processado em um RNA de interferência curto (siRNA) pelas enzimas RNase II Dicer e Drosha. Na segunda etapa, os siRNAs são carregados no complexo de silenciamento induzido por RNA complexo efetor (RISC). O siRNA é desenrolado durante a montagem do

RISC e o RNA de fita simples hibridiza com o mRNA alvo. O silenciamento gênico é resultado da degradação nucleolítica do mRNA alvo pela enzima RNase H Argonauta (Slicer). Se o duplex de siRNA/mRNA contiver incompatibilidades, o mRNA não será clivado. Em vez disso, o silenciamento de genes é resultado da inibição da tradução, como é mostrado na Figura 6 (LÓPEZ-DOLZ *et al.*, 2020).

Figura 6. Ilustração do mecanismo de RNAi. A) Fase de iniciação. B) Fase efetora.



Fonte: PETROVA; ZENKOVA, 2013.

Os RNAs desempenham regulação da expressão gênica, mas com a descoberta do RNA de interferência em 1998, que apresenta mecanismos envolvendo pequenos RNAs (menos de 30 bases de comprimento) reguladores da expressão de genes em uma variedade de organismos eucarióticos. Isso levou a aplicações deste poderoso processo em estudos da função do gene, bem como em aplicações terapêuticas para o tratamento de doenças. Estudos funcionais à escala do genoma requerem a capacidade de visar e desativar especificamente um grande número de genes de uma forma sistemática, e o RNAi tem sido uma técnica amplamente utilizada para reprimir genes (SYNTHEGO, 2019).

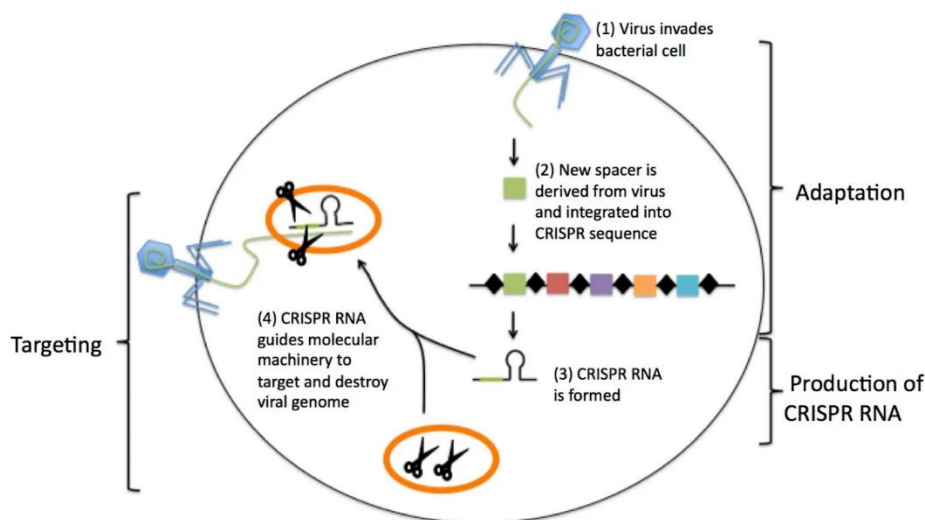
1.3. Origem e definição do Sistema CRISPR

As técnicas de ZFN e TALEN apresentadas previamente, e o sistema CRISPR-Cas9 (foco de nosso estudo a partir daqui) mostram formas de edição do

genoma humano que apresentam semelhanças entre si como por exemplo, serem baseadas no uso de nucleases altamente específicas e programáveis, que produzem alterações nas regiões de interesse no genoma, introduzindo quebras de cadeia dupla (DSBs) as quais são mais tarde reparadas por mecanismos celulares. Estes mecanismos de reparação incluem a união final não homóloga (NHEJ) propensa a erros, e a reparação homóloga dirigida (HDR) que é livre de erros (COOPER; OVERSTREET, 2014). O reparo permite a geração de inserções, exclusões ou substituições na área-alvo, e estas mutações podem interromper, eliminar ou corrigir os defeitos nos genes (ISHINO *et al.*, 2018).

Na última década, o sistema CRISPR-Cas ganhou ampla aceitação e utilização, sobrepondo-se a outros devido a sua simplicidade, velocidade e eficiência para modificar genes endógenos em qualquer célula ou tecido alvo (RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). CRISPR é uma sigla para Conjunto de Repetições Palindrômicas Regularmente Espaçadas, e o sistema CRISPR-Cas é o sistema formado entre essas regiões e as proteínas *cas*, denominadas em inglês *CRISPR-associated* ou proteínas associadas à CRISPR. Essas são as principais partes constituintes do sistema que provê aos procariotos um tipo de imunidade, além de contribuir com outras funções fundamentais celulares como regulação de genes baseada em RNA. Assim, a CRISPR é um sistema imunológico adaptativo, dessa forma uma vez estimulado, ele ativa uma série de reações em cadeia, sendo necessário o primeiro contato com o DNA invasor para que o sistema armazene parte do mesmo, agindo de forma adaptativa, rápida e eficiente caso haja um segundo contato. Na Figura 7, está ilustrado o modelo de funcionamento do sistema CRISPR-Cas (NASSER; SAWICKI, 2009).

Figura 7. A ação do sistema CRISPR-Cas é geralmente dividida em três estágios, sendo elas: adaptação ou integração do espaçador, produção do RNA CRISPR, e pôr fim a interferência do DNA ou RNA.



Fonte: SYNTHIGO, 2022.

Como comentado, as regiões CRISPRs são compostas por pequenas repetições de DNA e espaçadores, que funcionam como uma memória genética de infecções anteriores, e quando um vírus novo infecta uma bactéria, um novo espaçador derivado do mesmo é incorporado entre os espaçadores já existentes, dessa forma a sequência CRISPR é transcrita e processada para gerar moléculas curtas de RNA CRISPR que associa e orienta a maquinaria molecular bacteriana para uma sequência alvo no vírus invasor, cortando e destruindo o seu material genético(COOPER; OVERSTREET, 2014;MOJICA; RODRIGUEZ-VALERA, 2016).

A primeira vez na qual o CRISPR foi detectado foi em 1987, pelo biólogo molecular japonês Yoshimizu Ishino (1959-) de forma acidental, durante um estudo e análise dos genes responsáveis pela conversão de isoenzima em fosfato alcalino na bactéria *Escherichia coli* (ISHINO, 2018). Na época, pela indisponibilidade de ferramentas de análise e sequenciamento de genoma, essa sequência permaneceu como um enigma até próximo dos anos 2000, época da “Era Genômica”.

Em 1989, foi-se registrado novamente, regiões não caracterizadas em arquea que apresentavam padrões de sequências repetidas regularmente espaçadas, dessa vez por Juan Martínez Mojica, durante sua pesquisa em mecanismos regulatórios que possibilitaram a adaptação às mudanças de

salinidade de arqueias. Cada repetição incluía também pequenas repetições invertidas, assim sendo parcialmente palindrômicas, além de estarem localizadas aparentemente em regiões não codificadoras perto da área de Open Reading frames (ORFs). E em 1991, por Hermans foi reportado que havia o mesmo sistema em *Mycobacterium spp*, bactérias Gram positivas (HARVARD, 2014).

E apesar das conclusões não terem atendido às expectativas iniciais, com benefícios imediatos que proporcionaram então a cura de doenças congênitas, houve um avanço monumental na área:

Na última década, muitas das aplicações biológicas das informações genéticas e genômicas aos problemas de desenvolvimento e distribuição de medicamentos não foram possíveis. Essas aplicações exigiam as ferramentas fornecidas pelo Projeto Genoma Humano. A próxima década verá três novas aplicações da genética na medicina: (i) identificação de genes associados a doenças em classes-alvo que são passíveis de triagem de drogas de alto rendimento; (ii) tecnologias baratas de genotipagem de alto rendimento e novos algoritmos estatísticos para definir rapidamente múltiplas variantes de genes associadas a um fenótipo definido; e (iii) um sistema farmacogenético aprovado pelas autoridades regulatórias que facilita a entrega de medicamentos seguros e eficazes (ROSES, p. 217, 2003).³

As descobertas perante o sistema CRISPR-Cas e sua funcionalidade acompanharam o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento e por meio deste, Mojica conseguiu demonstrar a vasta distribuição das CRISPR por toda diversidade microbiana, indicando sua origem, característica ancestral e relevância dentro da célula (AREND *et al.*, 2017). Em 2002, quatro genes codificadores da proteína CRISPR-associada (Cas) foram encontrados perto do locus de repetição, e em 2005 juntamente com outros grupos de pesquisa, Mojica e seus colaboradores propuseram que as sequências espaçadoras são compostas de material genético derivado de plasmídeos ou DNA de fagos, e que a CRISPR funciona como uma forma de imunidade contra esses invasores.

Barrangou e colegas (2007) confirmaram esse conceito, comprovando que o sistema CRISPR-Cas protege as células de serem destruídas por fagos, e que

³ No original: *In the past decade, many of the biological applications of genetic and genomic information to the problems of medicine development and delivery were not possible. These applications required the tools provided by the Human Genome Project. The next decade will see three new applications of genetics to medicine: (i) identification of disease-associated genes in target classes that are amenable to high-throughput drug screening; (ii) inexpensive high-throughput genotyping technologies and new statistical algorithms for rapidly defining multiple gene variants associated with a defined phenotype; and (iii) a pharmacogenetic system approved by regulatory authorities that facilitates delivery of safe and effective medicines. There are no reviews discussing these topics in this issue.*

modificações na sequência da CRISPR mudam também sua resistência aos mesmos. Foi observado que após a célula ser exposta ao material viral, a bactéria (*Streptococcus thermophilus*) integrou novos espaçadores derivados da sequência genômica do fago e a remoção ou adição de partes específicas modificou o fenótipo de resistência contra o fago. Além disso, foi provado que a especificidade de resistir a genomas externos está diretamente ligada com a sequência presente no espaçador, que é derivado de cadeias de DNA de fagos (BARRANGOU *et al.*, 2007; MOJICA; RODRIGUEZ-VALERA, 2016).

Assim, a partir da década de 2000, a descoberta de sequências similares às regiões de sequência CRISPR em bacteriófagos, vírus e plasmídeos possibilitou o entendimento do funcionamento do sistema como um sistema imune, considerando também que em paralelo diversos estudos de análises genômicas comparativas sugeriam que as proteínas CRISPR e Cas (produto do gene *cas*), atuam conjuntamente e constituem um sistema adquirido em células procarióticas contra infecções de vírus ou plasmídeos, analogamente como o sistema RNA Interferase em células eucarióticas (ISHINO, 2018).

Há matrizes órfãs em genomas procarióticos e vírus, bem como trechos semelhantes a CRISPR em vírus eucarióticos e mitocôndrias, a maioria são enigmáticos quanto à sua atividade ou função. A descoberta do CRISPR foi canônica e abriu um caminho com muitas alternativas e caminhos paralelos, assim como o papel na edição do genoma que trouxe Cas9 à notoriedade pode ser usado por outras proteínas não relacionadas também (MOJICA, 2016; MAKAROVA *et al.*, 2015).

Um marco importante para a história e consolidação da CRISPR como uma técnica consagrada para edição genética foi feita por Jennifer Doudna e Emanuelle Charpentier, as ganhadoras do Nobel da Química em 2020, pela descoberta de uma funcionalidade da CRISPR, em 2012. Previamente, demais trabalhos já haviam reportado o sistema CRISPR-Cas e sua capacidade de promover às células procarióticas a habilidade de reconhecer de forma precisa sequências genéticas invasoras e marcá-las para sua quebra/destruição por meio do uso de enzimas especializadas, mas Charpentier identificou em células de bactérias (*Streptococcus pyogenes*) (AREND *et al.*, 2017) outro componente chave para o funcionamento do sistema CRISPR: a molécula de RNA que está

envolvida no reconhecimento das sequências dos fagos, e por meio de uma parceria com Doudna, a dupla isolou os componentes do sistema CRISPR-Cas9, adaptaram para funcionar em tubos de ensaio e comprovaram que o sistema poderia ser programado para clivar sítios específicos em DNA isolado, criando assim um edição de gene programável que inspirou múltiplas utilizações da técnica na área da medicina, agricultura e na própria ciência básica (LEDFORD; CALLAWAY, 2020).

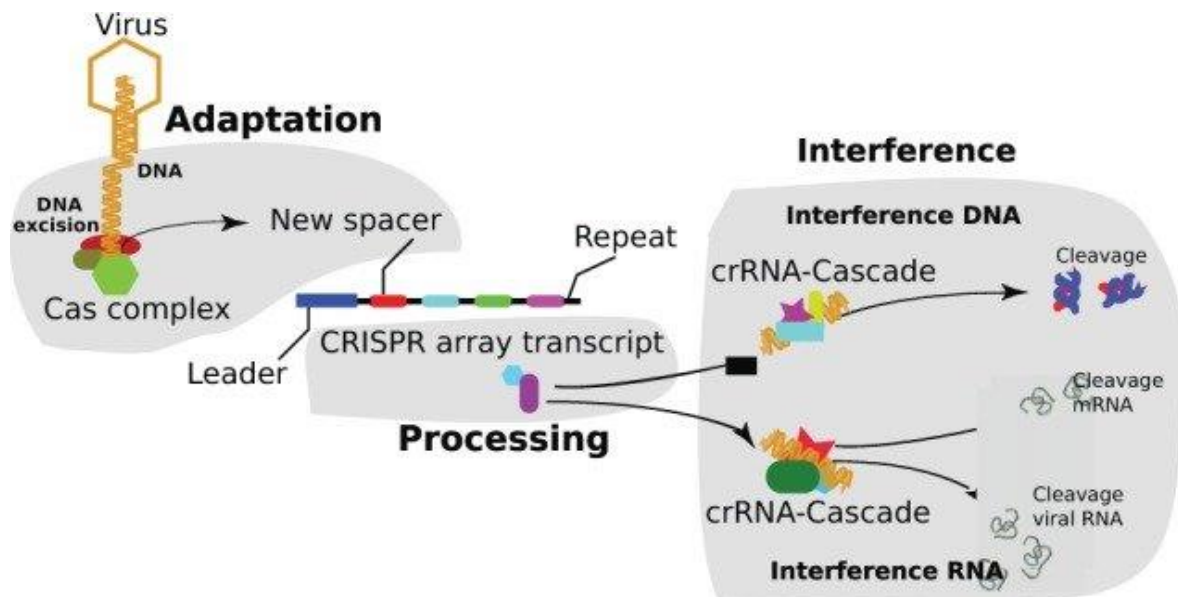
1.4. Funcionamento do sistema CRISPR-Cas9

O sistema CRISPR é a base da imunidade adaptativa em bactérias, empregando as nucleases do tipo cas, enzimas capazes de criar quebras na fita duplas no DNA. Quando uma bactéria é infectada por um vírus, ela usa uma nuclease Cas para cortar um pedaço do DNA viral, que se tornará um proto espaçador. Este fragmento é armazenado no genoma bacteriano com fragmentos de outros vírus que já infectaram a célula, que por sua vez são colocados entre sequências palindrômicas repetidas, formando um arranjo de espaçadores em repetições palindrômicas (GONZAGA; RAMOS, 2018).

A ação do sistema CRISPR-Cas costuma ser dividida em três etapas: (1) adaptação ou integração do espaçador quando um DNA exógeno invade, proteínas do tipo Cas1 e Cas2 formam um complexo, clivam parte desse material genético que é então introduzido no DNA da bactéria, tornando-se um espaçador viral, (2) produção do RNA CRISPR, onde há o processamento da transcrição primária do locus CRISPR (pré-crRNA) e maturação do crRNA, processo que corresponde a transcrição do material clivado, e a produção de um RNA mensageiro a partir dele, no qual diversas moléculas de RNA transativador (tracRNA) se ligam. A partir da ligação e quebra do RNA mensageiro pela tracRNA, é gerado o CRISPR RNA (crRNA), um complexo de proteínas ribonucleicas (STONE *et al.*, 2016). O complexo, também chamado de RNA guia (gRNA) é responsável por guiar a Cas9 ao DNA invasor, e assim chega-se à etapa (3) quebra/interferência no DNA alvo, por meio da ligação da nuclease ao DNA invasor. Tal ligação, ocorre quando a Cas9 reconhece a presença de um sítio PAM (motivo adjacente do proto espaçado, do inglês *proto spacer adjacent motif*), que ao ser reconhecido será quebrado, incapacitando o vírus porque o

mesmo não tem seus próprios mecanismos de reparo de DNA (RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

Figura 8. Representação das três etapas da ação da CRISPR-Cas: adaptação, produção do RNA CRISPR e por fim, interferência no DNA.



Fonte: ALKHNABASHI, *et al.*, 2014.

A parte crRNA do gRNA, é o componente que permite a especificidade da ligação da nuclease ao DNA alvo. Em sua forma natural, o gRNA pode ser formado por mais de uma parte como no funcionamento da CRISPR-Cas9 onde há a formação do complexo crRNA-tracrRNA. Entretanto, em sistemas sintéticos há uma alternativa mais simples, com a criação de um RNA de guia único (sgRNA), que combina crRNA e tracrRNA em uma única molécula de RNA, oferecendo um método simples, econômico e modular de manipulação genética (NIDHI *et al.*, 2021). O processo descrito, está ilustrado na Figura 8.

Em relação à classificação, existem os sistemas CRISPR/Cas I, II, III, e o menos comum tipo IV, que se diferenciam em virtude da presença de três genes únicos de assinatura, a Cas3 no sistemas do tipo I, Cas9 no tipo II e Cas10 no tipo III. As sequências da maioria das proteínas Cas são altamente divergentes, devido à rápida evolução do sistema de defesa. O sistema CRISPR/Cas tipo II é o mais comum usado para edição de genoma, usando a bem caracterizada Cas9 endonuclease de *Streptococcus pyogenes*. Como comentado, no sistema endógeno, o crRNA maduro junta-se com um tracrRNA formando o complexo tracrRNA:crRNA, que guia a Cas9 até um alvo, e assim, CRISPR/Cas9 realiza

clivagem de sequência específica através da interação simples do crRNA pelo anelamento de bases no local de destino (YANG *et al.*, 2021).

A edição genética empregando o sistema CRISPR-Cas9 funciona através da criação de quebras na cadeia dupla no DNA e depois tirando partido das vias de reparação do DNA celular, isso porque a Cas9, apresenta dois domínios: o domínio HNH é responsável por quebrar a fita complementar à sequência do RNA guia, enquanto o domínio RuvC, cliva a sequência não complementar, e assim a nuclease é capaz de se ligar na fita dupla do DNA e clivá-la. Como já mencionado, as vias de reparação do DNA então clivado são a união final não homóloga (NHEJ), explorada para tornar os genes não funcionais, e a reparação dirigida por homólogos (HDR), explorada para inserir novos genes ou fragmentos de material genético (MARAKOVA, 2015).

1.5. Aplicações da CRISPR

Há diversas aplicações para a CRISPR tanto na indústria, na pesquisa de bancada em laboratórios, quanto na medicina. A ideia de utilizar a edição genética para tratar doenças ou alterar características, data pelo menos do início de 1950, a partir da descoberta da estrutura de dupla hélice do DNA (XU; LI, 2020). O reconhecimento da hereditariedade levou à inescapável conjuntura de que com a identificação de "erros moleculares" que causam doenças genéticas viriam os meios para corrigir esses erros e assim permitir a prevenção ou reversão da doença. Esta é a ideia fundamental da terapia gênica, tratamento fundamentado na inserção, por meio de técnicas de DNA recombinante, de genes sadios ou genes terapêuticos, com intuito de corrigir o genoma e curar as doenças causadas por suas mutações, por meio da substituição ou suplementação da expressão do gene disfuncional (FRIDOVICH-KEIL, 2019).

A terapia gênica apresenta como objetivo também reduzir ou evitar o avanço de doenças, por meio da alteração de mecanismos fundamentais de determinantes genéticos, ou das partes afetadas pela doença. Ela pode também, atuar na modulação de genes não estritamente ligados à doença, trabalhando para aumentar a resistência celular e estimular a regeneração dos tecidos. Essa modalidade de tratamento, refere-se à introdução de genes exógenos em células-

alvo para tratar doenças específicas causadas por mutações ou genes defeituosos (SAHEL, 2019). Nessa terapia, as células-alvo são principalmente divididas em duas categorias: células somáticas e células germinativas, porém por questões éticas e de segurança, hoje a terapia gênica é realizada apenas em células somáticas. Sendo assim, a terapia genética tradicional geralmente é realizada por recombinação homóloga ou lentiviral, que emprega vírus associados a doenças neurológicas e imunossupressoras que apresentam períodos de incubação muito longos (STEFFIN *et al.*, 2019). No entanto, a eficiência da recombinação por homologia é baixa, e os vetores lentivirais são inseridos aleatoriamente no genoma do destinatário, o que pode trazer potenciais riscos de segurança para as aplicações clínicas. Atualmente, com o rápido desenvolvimento dos sistemas CRISPR-Cas, eles têm sido amplamente estudados para serem aplicados em terapia genética para o tratamento de várias doenças humanas, as doenças monogênicas, termo que se refere a doenças causadas por mutações de um único alelo ou um par de alelos em um par de cromossomos homólogos, doenças infecciosas e até mesmo o câncer (MARTINEZ-LAGE *et al.*, 2018).

Uma variedade de fatores genéticos como mutações ou mecanismos epigenéticos são acumuladas na geração do câncer, o que pode ativar proto-oncogenes, inativar tumores supressores e gerar resistência a medicamentos. Os sistemas CRISPR-Cas têm sido pesquisados para corrigir doenças oncogênicas e mutações do genoma/epigenoma em modelos de células tumorais e modelos animais, resultando na inibição do crescimento de células tumorais e promoção de apoptose celular, inibindo assim o crescimento tumoral (SAHEL *et al.*, 2019).

Na área da saúde também, uma outra forma de aplicação é a vacina de DNA, que também apresenta a indução da resposta imune adaptativa, porém através do uso de um plasmídeo de DNA codificante de uma proteína originada no patógeno em questão, gerando uma vacina mais eficiente, e que pode ter seu processo desenvolvimento e produção mais rápido e eficiente, possibilitando também maior flexibilidade na eficiência das vacinas, como por exemplo a do COVID-19, e até mesmo criação de novas, como para aplicação contra a infecção DO HIV-1 (HOU; CHEN, 2022) que tem como objetivo estimular o sistema imune, porém através da aplicação do gene codificador da proteína exógena. Assim, de

forma semelhante às vacinas convencionais, atua de forma preventiva, atacando os agentes agressores instalados no sistema (LINDEN, 2010).

Um estudo que ganhou bastante notoriedade foi a aplicação de Terapia antirretroviral combinada com edição de genes CRISPR, para eliminar a infecção por HIV em camundongos. O HIV-1 pode ser eliminado em camundongos usando uma combinação de duas tecnologias antivirais, terapia antirretroviral direcionada ao reservatório viral de ação prolongada e edição de genes CRISPR/Cas-9. Atualmente, o tratamento com uma combinação de medicamentos antirretrovirais permite que as pessoas com HIV tenham uma vida relativamente normal. No entanto, esses medicamentos devem ser tomados regularmente e por toda a vida, porque não podem erradicar totalmente o vírus. Assim, caso a terapia antirretroviral (ART) for interrompida, os sintomas do HIV geralmente retornam em questão de semanas (STONE, 2016).

A técnica de CRISPR pode ser utilizada no domínio das doenças infecciosas, possibilitando quebras direcionadas, novos domínios e subdomínios para as NRPs, ou peptídeos não ribossomais. Os NRPs, são naturalmente produzidos por bactérias e fungos filamentosos, e apresentam ampla atividade farmacológica como a ação antibiótica, e são um dos principais agentes para enfrentar a multirresistência bacteriana aos medicamentos atualmente. Eles atuam na produção de antibióticos específicos, assim tendo potencial para poupar ao mesmo tempo as bactérias benéficas da microbiota, por exemplo. Esses peptídeos atualmente já são estudados, com objetivo de obter diversidade na estrutura dos compostos formados, esclarecendo assim dúvidas em relação à atividade da mesma durante o desenvolvimento de fármacos, portanto o uso da CRISPR nesse contexto, possibilita a produção de ainda mais variedades dos NRPs, além de facilitar esse procedimento (GONZALEZ; SIGRIST, p. 2022; 2016; THONG *et al.*, p. 9 2021).

Por outro lado, a CRISPR também está sendo estudada para combater a resistência a antibióticos. A prescrição de antibióticos e seu uso na produção de alimentos de origem animal, elevaram a resistência de bactérias a antibióticos e há evidências que essa propriedade também pode ser transmitida aos seres humanos, contribuindo para a atual crise de micro-organismos resistentes. Nesse contexto, por meio da técnica Pro-AG (Genética Pró-Ativa) que está ganhando

visibilidade e que apresenta seu funcionamento baseado na CRISPR-Cas9, tem-se um método que interrompe o funcionamento do gene bacteriano causador de resistência a antibióticos (VALDERRAMA *et al.*, 2019).

As funções inerentes ao sistema CRISPR são vantajosas para os processos industriais que utilizam culturas bacterianas. A imunidade baseada no CRISPR pode ser empregada para tornar estas culturas mais resistentes ao ataque viral, o que de outra forma impediria a produtividade. Um exemplo, é o uso da CRISPR para tornar algas duas vezes mais eficientes na produção de lipídeos, e assim duplicar seu material para produção de biocombustível. Uma vez identificados os fatores que regulam a produção de lipídios pode-se eliminá-los, aumentando a produção de lipídios em comparação com as algas não modificadas. Além disso, foi possível fazer tal alteração sem prejudicar a taxa de crescimento da alga, que cresce na mesma proporção que o tipo não modificado e também foi possível manter a conversão total de carbono em lipídios, métrica indicadora da eficiência da conversão de gás carbônico em lipídios. Na alga selvagem, não modificada, a taxa de conversão é geralmente de cerca de 20%, mas na alga engenheirada, foi de 40 a 55% (LUTHRA *et al.*, 2021).

1.6. Desafios e Perspectivas

Embora o CRISPR-Cas possibilite uma forma tecnológica e eficiente de edição de genoma e tenha sido amplamente avaliada em uma variedade de espécies e diferentes tipos de células, ainda há algumas questões importantes que precisam ser abordados durante seu processo de aplicação, como efeitos fora do alvo, métodos de entrega, imunogenicidade e risco potencial de câncer (KIM *et al.*, 2014).

Descobriu-se que os sgRNAs projetados combinam com sequências não-alvo de DNA, ou seja, sequências para as quais eles não foram projetados, e dessa forma, podem introduzir mutações genéticas inesperadas, chamados efeitos fora do alvo, do inglês *off-target effects*. Efeitos fora do alvo restringem seriamente a aplicação generalizada de edição de genoma mediada por CRISPR-Cas em terapias gênicas, pois pode levar à instabilidade genômica e aumentar o risco de certas doenças, introduzindo mutações. Atualmente, várias estratégias

têm sido usadas para prever e detectar efeitos fora do alvo como softwares de predição online, sequenciamento de genoma completo, entre outras (REY *et al.*, 2019; LEE, 2019).

Um dos principais desafios relacionados ao emprego da CRISPR é garantir de forma eficaz e direcionada a ação da mesma em células, tecidos, órgãos específicos ou qualquer outro alvo. Uma “entrega” ideal deve ser não tóxica e biocompatível, bem direcionada, apresentar alta eficiência, baixo custo e ser biodegradável (RYAN *et al.*, 2018).

Eletroporação, microinjeção e deformação mecânica das células são alguns métodos físicos mais utilizados. Em linhas gerais, eles são mais simples e eficientes que os demais, também podem melhorar a expressão de genes, e estão sendo amplamente aplicados em experimentos *in vitro*. Na categoria do método empregando vetores virais, como adenovírus, vírus adeno-associado (AAV) e vetores virais lentivírus, estão sendo amplamente utilizados tanto para entrega *in vitro/ex vivo* e *in vivo* devido à sua alta eficiência de entrega (KIM *et al.*, 2014). No entanto, a questão da segurança dos vetores virais ainda é um grande problema pois os próprios vírus apresentam papel patogênico e podem oferecer risco de infecção, genotoxicidade, além de possível instabilidade a longo prazo (REY *et al.*, 2019).

Apesar das inúmeras possibilidades de aplicação e desafios que o sistema CRISPR-Cas possa gerar, sendo uma ferramenta ainda pouco explorada e que gera grandes estigmas, principalmente por apresentar uso na edição genética de células germinativas e somáticas, pode-se ampliar ainda mais o espaço para debate saudável entre a comunidade científica e não científica. Sendo uma das grandes apostas da catálise não só na área da genética, muitos estigmas, vinculados a histeria, falta de informação e fundamentalismo estão fortemente atrelados à CRISPR.

1.7. Considerações finais do capítulo 1

A genética é uma área do conhecimento que há mais de 150 anos vem se desenvolvendo, fascinando a humanidade e instigando pesquisadores. Nossa atual compreensão de como a hereditariedade funciona, vem de estudos de 1900,

mas por estar fortemente atrelada ao desenvolvimento tecnológico, a genética caminha a passos largos, entrando no século XX com a descoberta da dupla hélice, métodos de sequenciamento e quantificação, que aceleraram ainda mais a pesquisa e entendimento do comportamento do material genético.

O campo da engenharia genética consiste em um conjunto de técnicas de edição do genoma, que é fundamentada na ruptura do alvo no DNA, por meio da ação de nucleases, e seu reparo com adição dos genes de interesse no local. Dentre as técnicas há a ZNF, enzimas ligadas de três a seis dedos de zinco com capacidade de reconhecer sequências no DNA, e também a TALEN que apresenta moduladores, como a ZNF, porém é mais precisa por poder ser desenhada especificamente para o reconhecimento de um sítio no DNA. Outra forma de edição do genoma é silenciar ou ativar a expressão de um gene durante a fase de tradução, durante a síntese protéica, e isso pode ser feito através do RNAi, que é engatilhado dentro do sistema a levar RNA interferentes a ler e clivar parte do DNA alvo, assim impedindo que ele seja traduzido.

Detectado em 1987, apenas em 2012 foi documentada a propriedade que diferencia a CRISPR das demais técnicas de edição genética: sua programabilidade e especificidade. O sistema CRISPR Cas, também se baseia no uso de nucleases para realização da quebra da dupla fita de DNA, entretanto a possibilidade de gerar quebras sítio dirigidas com alto grau de especificidade, de forma simples e barata, são atributos que tornaram o sistema famoso e amplamente utilizado. Assim, a aplicabilidade da ferramenta vai do uso industrial quanto estudos de bancada, assim como na medicina, onde pode ser usada para estudo de doenças, desenvolvimento de vacinas, antibióticos e até mesmo terapias gênicas. Um grande desafio, entretanto, é garantir que não ocorram edições “fora do alvo” e principalmente, um seguimento legislação vigente unificado acerca da mesma.

CAPÍTULO 2 Análise da Bioética principialista e de intervenção, e seu aprimoramento no campo da edição genética

2.1. Da origem à sua evolução

Sendo um campo de aprendizagem relativamente jovem, baseado em múltiplas disciplinas acadêmicas estabelecidas como Filosofia, Direito, Sociologia, Ciências da vida e outras, a Bioética é uma ciência que está em constante renovação e ao mesmo tempo em que essa expansão agrega novos olhares perante novos e velhos dilemas, o campo também está em busca de si, de retomar às suas raízes. Para poder acompanhar sua trajetória de surgimento e amadurecimento, precisamos entender que os principais estímulos que incentivaram o interesse da pesquisa em bioética na era moderna surgiram por volta dos anos 1970 como consequência do progresso e desenvolvimento técnico na medicina, das mudanças sociais no mundo ocidental e de um interesse revitalizado pela disciplina da ética filosófica. Além disso, um fator de grande impacto foi os movimentos de direitos civis nos Estados Unidos e em outros lugares do mundo, bem como a transformação de instituições tradicionais, como família e a igreja, que levantaram grandes questões morais sobre os direitos e deveres individuais na sociedade. Para além da bioética, outras áreas do conhecimento também ganharam maior notoriedade, justamente pela preocupação crescente sobre o impacto da humanidade no mundo e nas futuras gerações, levando ao desenvolvimento de novas especialidades como ética animal e ética ambiental, por exemplo (GARRAFA, 2001).

A bioética é um campo de estudo derivado da ética, apresenta sentido etimológico amplo, é sustentada pelos princípios de ser uma estrutura multi, inter e transdisciplinar, respaldada no respeito ao pluralismo moral constatado nas democracias secularizadas pós-modernas, assim como na compreensão da impossibilidade da existência de paradigmas bioéticos universais, que leva a necessidade de reestruturação do discurso bioético, usando ferramentas dinâmicas e factuais como a comunicação, linguagem, coerência, argumentação e outras. Assim, a bioética influencia mutuamente a dinâmica e evolução da sociedade sendo um instrumento a mais para contribuir no complexo processo de discussão, aprimoramento e consolidação das democracias, da cidadania, dos direitos humanos e da justiça social (GARRAFA, 2005a).

Frente a isso, a ética e a bioética devem portanto, se afastar do conceito da moralidade, referente a convenções sociais sobre o certo e o errado humano, conduta amplamente compartilhada que fornece espaço geralmente incompleto, de consenso comum (BEAUCHAMP; CHILDRESS, 2001, p. 142). E deve então, se aproximar cada vez mais de vieses que a repensem constantemente, atitude exigida especialmente frente ao surgimento de novos dilemas morais que se apresentam como combustível do aprimoramento da mesma. Dilemas esses, relacionados às práticas humanas de modo geral, como os resultados e consequências do desenvolvimento tecnológico, a humanidade em si e seu desenvolvimento (DINIZ; GUILHEM, 2008, p. 15).

Antes de um maior detalhe e aprofundamento sobre a bioética principialista e a de intervenção, deve-se entender primeiramente a origem da nomeada “bioética profunda”, termo em inglês *deep bioethics*. A bioética em seu cerne, tem sua origem construída a partir da contribuição de dois pensadores, Van Potter e Fritz Jahr, cada um deles tendo seu papel exercido em momentos diferentes da história (GARRAFA, 2005a).

Durante muitos anos se teve como conhecimento comum a criação ou surgimento da bioética em 1970, nos Estados Unidos pelo bioquímico Van Rensselaer Potter, que primeiramente nomeou o que é conhecido hoje por “bioética” como uma “ciência da sobrevivência humana”, um campo de estudo que une o saber científico com a sabedoria moral, juntando dessa forma “fatos” e “valores”, mostrando-se extremamente ampla e conectada com uma “bioética global”, atravessando questões como ecologia, conservação, política, meio ambiente e problemas sociais. Assim, Potter enfatiza que esse campo de estudo seria de grande impacto e importância para garantir não só uma vida decente e sustentável para o meio ambiente, mas também à geração atual e futura. Deve-se ressaltar a abrangência, pluralidade e visão moderna referente a visão e cobertura da bioética criada e divulgada por Potter (SCHRAMM *et al.*, 2011, p. 368).

Na década de 1970 Potter lança duas obras, sendo elas “Bioethics, science of survival” (1970) e “Bioethics: bridge to the future” (1971) que são marcos para a estruturação e fundamentalização da “bioética profunda” ramo de estudo que dá origem à bioética principialista e de intervenção. Nas duas obras, Potter

argumenta a necessidade da existência de uma área de estudo que seja ponte entre dois campos que aparentemente não se conversavam. Assim, o termo bioética é derivado do grego bios (vida) e ethos (ética), mostrando a interconexão entre a ciência da vida e valores humanos (REICH, 1994, p. 330).

Por outro lado, artigos comprovam o uso do termo “Bio-ethik” em 1927 no periódico alemão Kosmos, pelo alemão, pastor, filósofo e historiador Paul Max Fritz Jahr. O mesmo, em seu “imperativo bioético” orienta que a bioética deve ser usada como guia para cultura, vida pessoal, profissional, política, assim como aplicada à ciência, tecnologia e seu desenvolvimento. Para Jahr, a bioética deveria ser um campo interativo e plural, que garanta a harmonia e integridade, respeitando e aprendendo com a pluralidade de perspectivas individuais e coletivas, tornando assim um campo aberto, fundamentado no diálogo. Assim como Potter, Jahr também acreditava que a comunicação traria luz às mais variadas questões, criando discussões e levando assim grandes e esclarecedoras contribuições para o campo da bioética. É notável a semelhança entre os conceitos dos dois autores, que mesmo estando em épocas e contextos tão diferentes, conversam e veem da mesma maneira o mesmo assunto (REICH, 1994, p.320).

Nos conceitos de Jahr, o imperativo moral de Kant, que se baseia na ideia de que sem a boa vontade as capacidades humanas são sem valor, é ampliado, ou seja, para Kant o ser humano quando não orientado pode ter suas capacidades voltadas para o mal. Por isso o filósofo, tem como objetivo fundamentar uma filosofia moral que considera o ser humano um ser sensível e racional que pode apresentar vontades que recaiam em escolhas maléficas. Da mesma forma, Jahr propõe o “imperativo bioético” incentivando que as pessoas agissem de tal modo que considerem a humanidade, tanto a si próprio como as demais pessoas, sempre como fim e nunca como simples meio (PESSINI, 2013, p. 11; HAMEL, 2011, p.167).

Assim, nos estudos de Jahr e Potter encontramos a origem da macrobioética, que mesmo construídos em tempos e contextos muito diferentes apresentam interconexão, sincronia de valores e pensamentos, criando a bioética como um campo amplo, diverso e plural. Mas além dos dois autores já mencionados, outro autor baseando-se nos mesmos estudos, se apossou e

deteve o registro do termo “bioética”. O holandês e obstetra André Hellegers foi fundamental para a fundação do Instituto Joseph and Rose Kennedy Institute from the Study of Human Reproduction and Bioethics, criado após o lançamento dos livros de Potter de 1970, sendo um centro de estudos de Ética da Universidade de Georgetown com o objetivo de gerar aprendizados e discussões sobre o termo que eles nomeavam como bioética, mas que abrangia apenas a temática médica (REICH, 1994, p. 325).

Esse campo da ética médica, que pode ser muito bem colocado atualmente como uma micro-bioética, é apenas um campo de estudo dentro do vasto campo que a área abrange. Na década de 1970 e durante os próximos 40 anos, restringiu-se o termo que antes era sinônimo de abrangência e interdisciplinaridade, principalmente voltando-o à relação médico-paciente. Isso se deu majoritariamente devido à grande influência, caracterizada como hegemônica dos Estados Unidos e sua grande preocupação interna com o progresso médico e tecnológico, seus desafios e consequências. A partir da forte influência norte-americana e dominação dos campos acadêmicos, o conhecimento da sociedade sobre a bioética criado por Fritz Jahr e Potter sofreu um abrupto processo de reducionismo, tornando a bioética médica sinônimo de bioética (SCHRAMM *et al.*, 2008, p.362).

Agora devidamente apresentada a origem etimológica e a paternidade da bioética, é importante trazer à baila alguns antecedentes históricos que possam contribuir para a compreensão do desenvolvimento desta ciência, pois eles foram fundamentais para o surgimento, formação e modelação da bioética principialista. Sendo assim, um dos fatores potencializadores do desenvolvimento de leis e diretrizes com objetivo de proteger e resguardar a dignidade humana foi o período pós II Guerra Mundial, no qual houve uma grande mobilização, principalmente alimentada pelos anseios das nações vencedoras, com objetivo de difundir seus ideais de dominação, mas também supostamente impedir que as mesmas monstruosidades realizadas pelos líderes nazistas retornassem a ocorrer. Com destaque, em 1947 foi criado o Código de Nuremberg, em decorrência do julgamento dos crimes praticados durante o período de guerra, e com ele foram também divulgadas as atrocidades cometidas por toda comunidade formada por médicos, pesquisadores e cientistas que compactuavam e engajavam-se com os experimentos de tortura, expondo e condenando a linha de conduta alemã. Este

importante documento trouxe a regulamentação das condutas para realização de experimentos em seres humanos em âmbito universal, com a recomendação de procedimentos e ações que deveriam ser seguidas pela comunidade científica (MORENO *et al.*, 2007, p.796).

O Código de Nuremberg é um conjunto de regras com dez pontos/diretrizes para a realização de experimentos em seres humanos apresentando dentre outros requisitos, a exigência do “consentimento voluntário” do participante da pesquisa, uma avaliação dos riscos e benefícios, assim como garantias de investigadores competentes. Esses conceitos tornaram-se um importante ponto de referência para a conduta ética da pesquisa médica, influenciando em 1948 a promulgação da Declaração dos Direitos Humanos pela Assembléia Geral das Nações Unidas, na qual estão contidos os fundamentos principais que asseguram a liberdade e a vida como inerentes a todos os seres. Em 1964 o Código de Nuremberg foi transformado na Declaração de Helsinki, documento que mesmo sem força de lei é considerado a primeira base e padrão para todas as pesquisas realizadas em seres humanos (GARRAFA, 2001; MORENO *et al.*, 2007, p.795).

Outro fator de grande impacto para o desenvolvimento e consolidação da bioética foi a criação do Relatório de Belmont, resposta institucional aos escândalos causados por experimentos médicos, como os ocorridos durante II Guerra Mundial, mas também de três casos em particular ocorridos nos EUA: o primeiro, a aplicação de vírus da hepatite em crianças com deficiência no Hospital Estadual Willowbrook no período de 1950 a 1970; a aplicação de células cancerosas vivas em pacientes idosos no Hospital Israelita de Doenças Crônicas em 1963, sendo os dois hospitais localizados na cidade de Nova Iorque (EUA); e o terceiro, conhecido como caso Tuskegee, realizado durante 40 anos no período de 1932 a 1972 em Tuskegee (EUA) na comunidade negra da cidade, no qual um suposto estudo era fundamento na manutenção intencional de que uma parcela da população masculina negra permanece infectada com o vírus da sífilis (MAYS, 2012, p. 168; TRINDADE, 2007).

Foi apenas em 1997 que o presidente dos EUA na época, Bill Clinton, pediu publicamente desculpas para as únicas seis (6) vítimas sobreviventes do crime de Tuskegee, mas o teor de seu discurso sugere ambiguidade em seu pedido, que mesmo reforçando a necessidade de se lembrar do passado

vergonhoso para que fosse possível construir um presente e futuro melhor, Bill Clinton apenas delegou nessa mesma fala, que o Secretário de Saúde e Serviços Humanos do seu mandato fizesse parceria com pesquisadores e médicos para construir, treinar e divulgar princípios éticos fundamentais de respeito, justiça e consentimento informado, principalmente focado em populações de minorias raciais e étnicas. É importante ressaltar o caráter superficial da ação, que apresentou pouca ou quase nenhuma preocupação demonstrada sobre as questões bioéticas contextuais mais amplas, como a vida das pessoas que foram roubadas, dos estigmas e consequências que ficaram para as gerações futuras daquelas vítimas e demais questões acerca das atrocidades feitas para pessoas na comunidade. Mostrando mais uma vez a real intenção do governo americano em suas intenções a respeito dos casos e da bioética em si (MAYS, 2012).

Os três casos geraram pressão no governo e congresso americanos, e assim como já comentado previamente, o Relatório Belmont foi promulgado em 1978 numa reação institucional aos escândalos causados pelos experimentos realizados em seres humanos. O relatório foi criado e escrito pelos membros da “Comissão Nacional para a Proteção de Seres Humanos em Pesquisa Biomédica e Comportamental”, com intuito de investigar quais deveriam ser os princípios a dar luz à pesquisa em seres humanos, sendo indicado no documento o respeito às pessoas (autonomia), beneficência e justiça, como os princípios escolhidos que deveriam conduzir a postura ética e científica (DEJEANNE, 2011, p. 40). O filósofo Tom L. Beauchamp, participou como membro da Comissão que elaborou o Relatório Belmont, e juntamente com o teólogo James F. Childress, ambos vinculados ao Kennedy Institute of Ethics, publicaram também em 1978, seu livro *Principles of Biomedical Ethics*, que fortaleceu e disseminou o uso dos princípios para sistematizar a abordagem de dilemas e problemas bioéticos (PIRES; TRINDADE, 2007).

O modelo principialista predominou por aproximadamente quarenta anos, sendo assim base para a maioria dos Códigos de Ética da área da saúde, contemplando ainda como critérios para o agir profissional, os princípios propostos por Beauchamp e Childress, mas de modo que das considerações feitas até o momento, se explicita um fundamento, um meta-princípio. O principialismo proposto por Beauchamp e Childress é intensamente atrelada à relação médico-paciente, e apresenta uma assimilação quase que organizadora

em listar ou não a presença dos princípios bioéticos em suas pautas. Assim apresenta falta de integralização, tratando com indiferença questionamentos sociais, aspectos políticos, consciência ambiental, e tantos outros que compõem a situação, ou seja, enfatizando apenas temas de forma mecânica e superficial (SANTOS *et al.*, 2014, p.275).

2.1. A Bioética Principlista

Na década de 1970, a ênfase da bioética, até então chamada de ética médica, tinha estado na relação médico-paciente com debates majoritariamente voltados em termos do ganho de autonomia do paciente perante a autoridade supostamente prevalecente, a do médico. Hoje, a ética, a bioética e a ética médica, se desvincularam, aprimoraram, desenvolveram, e apresentaram suas próprias áreas de estudo e subdivisões. Assim, a bioética ganha seu repertório particular, abrangendo temas mais amplos para debates práticos e conceituais, por exemplo, sobre o significado da dignidade humana, bem como análises completas de mudanças estruturais nas práticas médicas e de novas tecnologias para resolução dos problemas existentes e evitar conflitos futuros. Além disso, também levanta tópicos de debate contínuo como problemas morais que surgem no início e final da vida, mas também não deixa de se aprofundar no estudo e análise de práticas clínicas, a alocação de recursos no sistema de saúde, acesso a cuidados de saúde e meio ambiente (GARRAFA, 2001).

Conforme já mencionado, grande fundamentalista da aplicação e análise dos primórdios da bioética, foi Van Rensselaer Potter. O mesmo, enfatizava a importância da “ética geral”, preocupando-se com o bem estar humano, a relação ser humano e natureza, o impacto das ações da humanidade no ecossistema, visto que na época grandes desenvolvimentos tecnológicos fizeram surgir dilemas morais inesperados relacionados à prática biomédica, sua obra e conceitos passaram rapidamente a serem utilizados para estudo de caso, e acabaram tornando sinônimo do termo ética médica (DEJEANNE, 2011).

O Relatório de Belmont estabeleceu as bases da ética principlista, elencando três princípios fundamentais, sendo eles: justiça, beneficência e autonomia (MABTUM; MARCHETTO, 2015). Entretanto em 1979 com a

publicação do livro *Princípios da Ética Biomédica* (*Principles of Biomedical Ethics*), escrito por T. L. Beauchamp e J.F. Childress, presentes também na construção do Relatório, adiciona uma nova forma de abordar os fundamentos éticos. O livro, apresentou positivamente a bioética de uma forma racional e imparcial, na qual não mais o médico decide o melhor caminho para seu paciente, mas onde há diálogo e decisão em conjunto sobre o melhor a ser feito. Além disso, para Beauchamp e Childress, os princípios apresentam a mesma importância hierárquica entre si, dando o valor e importância de forma balanceada entre os mesmos, não mais apenas considerando a autonomia como um princípio supremo. Sendo assim, Beauchamp e Childress foram de grande importância para a consolidação acadêmica da ética biomédica, porque além de divulgar, sistematizaram os princípios básicos e por sua objetividade e clareza tomaram grandes proporções tornando a teoria praticamente hegemônica (PIRES, 2007). Desta forma, os princípios difundidos e que formam a base da bioética principialista são: Autonomia, Não-Maleficência, Beneficência como desdobramento da anterior, e Justiça.

O princípio do respeito à autonomia está intrinsecamente ligado à definição da pessoa autônoma, que possui capacidade de decidir e agir em direção a seus objetivos pessoais. Assim, o princípio da autonomia respeita e valoriza as decisões e considerações, evitando assim qualquer obstrução da mesma a menos que seja claramente prejudicial ao indivíduo, fornecendo todo tipo de informação necessária para que o indivíduo possa fazer o próprio julgamento, garantindo sua liberdade de agir. Deve-se existir três condições para a ação autônoma por aqueles com capacidade de escolha, sendo elas a intencionalidade, a compreensão e a ausência de influências controladoras que determinam sua ação. Assim, as regras morais e obrigações derivadas da aplicação desses princípios são sempre dizer a verdade, respeitar a privacidade dos outros, proteger informações confidenciais e obter consentimento para intervenções.

O princípio da beneficência é uma obrigação moral para agir em benefício dos outros, tendo como aspectos fundamentais o oferecimento dos benefícios e equilibrá-los aos benefícios os danos/riscos, apoiando assim a proteção e defesa dos direitos dos outros, impedindo ou removendo condições que possam ocasionar em danos/prejuízos aos outros. Agir para fazer o bem aos outros é o

cerne desse fundamento, de forma a minimizar os possíveis danos e maximizar os benefícios, o que representa no meio médico a intenção de agir em interesse do paciente.

O princípio da não maleficência afirma que existe obrigação de não infligir dano intencional, sendo derivado da máxima da ética “*primum non nocere*” (antes de tudo, não fazer mal), apoiando-se assim em obrigações como não matar, causar dor ou sofrimento, não ofender ou incapacitar. Muitos autores se referem a esse princípio dentro da definição da beneficência, porém há grande diferença e é preciso que ela seja ressaltada a obrigação de fazer o bem e não causar dano, sendo assim o limite da definição do primeiro não é o ponto de partida do outro.

O princípio da justiça é o princípio que obriga a distribuir equitativamente benefícios, riscos, custos e recursos, baseados nas regras que garantam para cada pessoa uma parte igual e assistência de acordo com suas necessidades. Esse fundamento tem seu princípio na filosofia aristotélica, vista como uma moral fundamental, sendo resultado da distribuição entre o comportamento justo e injusto. A justiça, pode ser analisada sobre duas óticas diferentes, sendo justiça comutativa, referente a relação entre dois indivíduos, dando a cada um o que lhe é devido, e a justiça distributiva, que põe a luz a relação entre autoridade e indivíduo, designando o dever da autoridade de repartir os custos e benefícios de forma justa na sociedade mas também garantir a todos acesso a tal.

2.2. Bioética de Intervenção

A Bioética Principlista, como descrito acima, se aproxima de um modelo normativo, apresentando-se produtiva e prática, assegurando respostas rápidas e técnicas para resolução de problemas éticos que envolvam a relação médico-paciente e seus desdobramentos. No entanto, na década 1990, na América Latina e nos demais países não centrais, uma nova perspectiva da bioética surgiu, instigando pesquisadores e estudiosos a repensarem a bioética perante seus próprios conflitos locais de forma ampla, dos maiores aos mais comuns e cotidianos em seus países, e se depararam com a escassez de recursos dentro da bioética frente aos dilemas vindos desses problemas persistentes (SANTOS, 2014, p. 277). Assim, buscando a resolução para questões que assolam gerações

certos locais do mundo, mas que até então não haviam sido sistematicamente estudadas e priorizadas pelo olhar da bioética, surgiu a necessidade de ampliação da mesma como intuito de fortalecê-la, na busca de repensar e resolver questões como concentração de poder, pobreza, miséria e delinquência, consequências da globalização econômica internacional gerando exclusão social, drástica evasão de intercâmbios dos países mais pobres para os centrais, falta de consolidação da cultura, falta de políticas efetivas em defesa dos direitos humanos universais e de cidadania, entre outros (GARRAFA, 2003).

Nesse contexto surge a Bioética de Intervenção, que garantindo oferecer mudanças radicais para os cenários citados, gera compromisso com a politização de seu discurso, construção de novos espaços coletivos, justos e pregadores da igualdade, garantindo assim a dignidade e qualidade de vida a todos, pautando-se em relações não discriminatórias. A Bioética de Intervenção busca a formação de uma sociedade igualitária, dando voz para população que se apresenta em situações de fragilidade e instabilidade social, assumindo assim que há diferença entre as pessoas e que seus contextos sejam então ouvidos e entendidos para que suas necessidades sejam atendidas (SANTOS *et al.*, 2014, p.272).

No Brasil, a bioética começa a surgir nos anos 1990, e ficou internacionalmente conhecida a partir de 2002, quando em Brasília ocorreu o Sexto Congresso Mundial de Bioética, sendo a Bioética de Intervenção (BI) a temática central abordada na abertura do evento. Em 2004, começou a ser intensivamente estudada pela Cátedra Unesco de Bioética da Universidade de Brasília (UnB), grupo multi-interdisciplinar pioneiro nessa área no Brasil, que além de desenvolver pesquisas, formação, aplicação teórica e aplicada em bioética, também organizou o Congresso mencionado acima (Silva *et al.*, 2011, p.363). A BI se difundiu fortemente pautada na necessidade de se olhar pelo viés dos mais fragilizados, baseando-se em referências apropriadas a cada contexto, alavancando um modelo de observação e análise ainda não levantado para a resolução dos dilemas então dos países do hemisfério sul, diferentemente da bioética principialista que concentra pressupostos e referências anglossaxônicas, protegendo e assegurando no âmbito público e pessoal que as decisões sejam as mais adequadas para o maior número de pessoas possíveis e pelo maior tempo, mesmo que causando prejuízo a alguns indivíduos, mas também procura por

soluções de conflitos mais práticas de acordo com o contexto da situação, sempre relacionada às questões médicas (GARRAFA, 2000).

O impacto da ligação entre a criação, disseminação, fortalecimento e influência da bioética principialista em países centrais, na qual foi fundamentada, levanta a essencialidade da contextualização para gerar a devida solução de seu problema, assim em países centrais onde problemas como alimentação, saúde e moradia já foram resolvidos e nos países periféricos, onde a maioria da população convive diariamente com o extremo oposto, como ausência, falta e/ou instabilidade em relação a alimentação, saúde e moradia. Além de grande disparidade em relação a concentração de renda, os problemas apresentados em cada localidade (país central e país não central) não cabem ser avaliados com os mesmos princípios, porque estão completamente em contextos diferentes (CRUZ, 2006).

O processo de não silenciamento, da compreensão e entendimento da diversidade moral da sociedade humana é um processo recente, isso porque o entendimento ocidental de moralidade está vinculado a desenvolvimento, e mais recentemente o desenvolvimento tecnológico de uma perspectiva que nivela todos os povos a partir de uma única medida, fortalecendo os ideais de dominação e superioridade de alguns, seguindo a lógica capitalista. A Bioética de Intervenção nega a existência de uma moralidade universal e comum a todos, assim como a simplificação em apenas quatro princípios para a deliberação moral, levantando novos fundamentos e incorporando novos conceitos em seu cerne como prudência, precaução, igualdade, tolerância, solidariedade, equidade e outros mais (COSTA *et al.*, 2000; GARRAFA *et al.*, 2020).

De acordo com Silva (2011), a bioética de intervenção traz uma parte de seus fundamentos baseados nas teorias do Utilitarismo, uma área dentro do Epicurismo, e assim a BI tem em sua base o conceito de que se deve haver prazer essencialmente em tudo o que fazemos e além disso, todos devem contar como apenas um e não mais que isso. Dentro do Utilitarismo, cinco características principais se destacam: visão igualitária dos agentes morais; consideração das consequências das ações; universalização dos bens, no sentido material e não moral; maximização do que é considerado valioso e concepção natural sobre o bem estar. De acordo com Oliveira (2018), desde que os

princípios éticos guiem o avanço e aplicação do conhecimento e tecnologia, garantindo alívio da dor e sofrimento assim como a dignidade humana, toda liberdade para pesquisa é necessária para seu desenvolvimento seja no campo do genoma humano, genética ou medicina.

Esse pensamento enfatiza a importância do atrelamento entre a ética e o desenvolvimento tecnológico, principalmente voltado ao da manipulação da vida. Tem como pressuposto primeiro a determinação de um fenômeno ou população e inter relações entre os mesmos, abordando o problema proposto buscando dar significados a partir do contexto e demais questões que perpassam a situação dada, buscando ir além da própria aparência do fenômeno mas também se debruçando para trazer a tona e entender a origem do problema, relação entre as classes sociais, os direitos humanos ligados ou falta deles na situação (AMORIM CINI *et al.*, 2019, p. 111).

2.4. Declaração dos Direitos Universais pela Unesco - Pressupostos Legais

A Declaração Universal dos Direitos Humanos, adotada pela Assembleia Geral das Nações Unidas em 1948, tornou-se, no período do pós-guerra, o único instrumento ético de controle social das condutas construídas em nome da humanidade. A Declaração dos Direitos Humanos reconhece a igualdade das mulheres/ homens, mesmo sendo abstrato, relativo a um “eu” generalizado. Esta Declaração introduziu pela primeira vez a ideia de uma identidade humana, que está além de todas as diferenças, e estipula um princípio comum: pertencer à mesma humanidade na qual se tem o direito inalienável à vida (CRUZ, 2006); (GARRAFA;PORTO, 2003).

Da necessidade de uma universalização dos fundamentos da bioética, a Declaração Internacional sobre os Dados Genéticos Humanos foi escrita em outubro de 2004 pela UNESCO, com o intuito de garantir a proteção dos direitos humanos, dignidade e liberdades fundamentais, considerando também a retirada de amostras contendo material genético humano, o tratamento dado a ela, onde e porquê seria empregada, assim como a conservação da amostra e de seus dados genéticos, seguindo os direitos de igualdade, justiça e solidariedade (UNESCO, 2004).

Essa declaração foi criada, considerando que até então os dilemas médicos-jurídicos não estavam munidos de ferramentas suficientes para lidar com novas questões éticas geradas pelas crescentes descobertas relacionadas ao gene, reconhecendo assim que o genoma humano e seus dados genéticos são sensíveis. Isso permitiu mapear pré-disposições que afetam não só o indivíduo mas também sua família e comunidade de forma significativa em várias gerações, e que esses dados podem ter informações que mesmo não reconhecidas no momento, podem ter grande importância cultural para um grupo de pessoas. Assim, era necessário garantir que todos os dados tivessem grau de confidencialidade para sua segurança (UNESCO, 2004).

A declaração também reforça a necessidade da cooperação internacional para compartilhamento do conhecimento sobre o domínio da genética humana, reconhecendo a sua importância para o desenvolvimento dessa área, mas sempre enfatizando que a manipulação do genoma apresenta também potenciais riscos, quando não bem manipulados, ao exercício dos direitos humanos, dignidade e à liberdade fundamental (UNESCO, 2004).

No documento há também diversas definições que modelam como deve ser feito todo o processo de retirada da amostra do gene, levantamento de dados, análise e conservação, mas também algumas expressões, termos e seus significados, como uma forma de garantir que seja assim criado um consenso sobre os mesmos e que esses possam ser de ciência de todos. São esses termos: dados genéticos humanos, dados proteômicos humanos, consentimento, amostra biológica, estudo genético de populações, estudo de genética do comportamento, método invasivo, método não invasivo, dados associados a uma pessoa identificável, entre outros (UNESCO, 2004).

Além disso, em outubro de 2005, surge a Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos (DUBDH), que adota o tratamento de questões éticas à medicina, ciências da vida e tecnologias aplicada à vida humana, incorporando em seus princípios de respeito à dignidade humana, liberdades fundamentais e direitos humanos, garantindo assim o direito e respeito pela vida, reconhecendo a interligação entre os dois temas por meio da bioética. A mesma apela a efetiva aplicação dos princípios por todos os Estados-membros, considerando que os seres humanos apresentam uma capacidade única de

refletir sobre si, sua existência e o meio que está inserido, os rápidos avanços da ciência e suas tecnologias, afirmando que as questões éticas devem ser analisadas considerando os direitos humanos e respeito universal, elucidando a necessidade de haver princípios universais base para responder dilemas que surgem entre a tecnologia, suas aplicações e implicações para a vida humana e meio ambiente (PIRES, 2007).

Dessa forma, a DUBDH, sumariza os princípios já levantados na Declaração Universal sobre o Genoma Humano e os Direitos Humanos e a Declaração Internacional sobre os Dados Genéticos humanos, assim considerando não só a conjuntura atual mas também perspectivas futuras, resguardando os interesses das gerações de agora e das que virão, reforçando assim o papel decisivo do ser humano em proteger todas as formas de vida, considerando que a diversidade e o intercâmbio permitem o enriquecimento cultural, potencial de inovação e criatividade e por isso devem ser considerados patrimônios comum da humanidade (UNESCO, 2005).

A Declaração, convoca todos os 191 Estados-membros que a assinaram a se comprometerem com a mesma, seguindo, contemplando e divulgando a mesma, que é composta vinte e oito artigos, divididos em três núcleos contextuais, sendo eles sobre a normatização da declaração, na qual os Estados/países são sujeitos da ação e devem garantir a execução da norma, questões biomédicas voltados questões clínicas, acadêmicas ou legais no qual os agentes bioéticos devem orientar o Estado nas mais amplas questões e por fim, um contexto reflexivo dos valores éticos e morais, no qual são levantados para a comunidade mundial (SALVADOR *et al.*, 2018). Aqui, elenco os artigos que serão de suma importância para as futuras discussões no texto referente a estudo de casos, legislação nacional e internacional. Sendo assim, de acordo com a UNESCO, (2005):

“Artigo 3º: Dignidade humana e direitos humanos

1. A dignidade humana, os direitos humanos e as liberdades fundamentais devem ser plenamente respeitados
2. Os interesses e o bem-estar do indivíduo devem prevalecer sobre o interesse da ciência ou da sociedade.

Artigo 4º: Efeitos benéficos e efeitos nocivos

Na aplicação e no avanço dos conhecimentos científicos, da prática médica e das tecnologias que lhes estão associados, devem ser maximizados os efeitos benéficos diretos e indiretos para os doentes, os participantes em investigações e os outros indivíduos envolvidos, e deve

ser minimizado qualquer efeito nocivo suscetível de afetar esses indivíduos.

Artigo 8º: Respeito pela vulnerabilidade humana e integridade pessoal

Na aplicação e no avanço dos conhecimentos científicos, da prática médica e das tecnologias que lhes estão associadas, deve ser tomada em consideração a vulnerabilidade humana. Os indivíduos e grupos particularmente vulneráveis devem ser protegidos, e deve ser respeitada a integridade pessoal dos indivíduos em causa

Artigo 11º Não discriminação e não estigmatização

Nenhum indivíduo ou grupo deve, em circunstância alguma, ser submetido, em violação da dignidade humana, dos direitos humanos e das liberdades fundamentais, a uma discriminação ou a uma estigmatização

Artigo 16º Proteção das gerações futuras

As repercussões das ciências da vida sobre as gerações futuras, nomeadamente sobre a sua constituição genética, devem ser adequadamente tomadas em consideração.”

Dos cinco artigos, o terceiro, quarto, oitavo e décimo sexto, são normas ou orientações normativas que orientam os agentes biológicos dos Estados nacionais perante as temáticas abordadas nos mesmos, assim colocando a norma sujeita da ação feita pelo Estado, enquanto o décimo primeiro artigo da DUBDH, possui como sujeito de ação a comunidade mundial, convocada a refletir sobre a não estigmatização e não discriminação, mostrando-se uma declaração preocupada em orientar a população como todo, mas também gerar espaço para debate e reflexão acerca de seus artigos (SALVADOR *et al.*, 2018). Não é coincidência a DUBDH justificar e embasar o surgimento da bioética de intervenção, pois as duas apresentam grande convergência em sua forma de abordar a bioética em si, sendo uma forma de politizar a mesma quando busca o olhar sobre o todo, além de divulgá-la como ferramenta de libertação, emancipação e empoderamento (GARRAFA, 2005b).

2.5. Considerações finais do capítulo 2

Ao longo deste capítulo, foi frisada a importância do amadurecimento da bioética para compreensão, debate e resolução de questões que abordam temáticas multidisciplinares, que necessitem de uma visão ampla e principalmente que se atualiza e avança justamente a partir do seu entrelaçamento com tais questões. Frente a novas problemáticas de países em desenvolvimento ou periféricos, a bioética principialista se mostra pouco munida para se posicionar e

discutir acerca dos temas, assim a mesma que com seus princípios fundamentais pôde consolidar a área como um campo do conhecimento, se depara com desafios inesperados que demandam sua expansão, e a bioética de intervenção surge a partir dessa necessidade. Um novo olhar, atitude e pensamento, quando se tornando voz da população, se envolvendo em causas que também envolvem cunho social.

A consolidação da bioética e seus fundamentos, fruto de suas discussões e estudos, ocorreu por meio da DUBDH, e na mesma lógica, foi criada a Declaração Internacional sobre os Dados Genéticos humanos. As duas, nomeiam, documentam conceitos, incentivam a cooperação internacional, e modelam a normas a fim de garantir os direitos à vida e a tecnologia.

A edição genômica, apesar de seu gigante potencial, deve apresentar seu uso e limite sempre revisitado e avaliado, pois apesar de sua aplicabilidade principalmente o mais visado na área da saúde, há usos como o aperfeiçoamento genético, que ferem direitos humanos, e diversas premissas bioéticas como o direito ao consentimento e põe em xeque a segurança das gerações futuras. Além disso, para que haja o desenvolvimento saudável da ciência e sociedade, o envolvimento do público e incentivo de discussões acerca do tema é de extrema importância, pois os impactos e consequências que essa tecnologia pode gerar na sociedade ainda são desconhecidos em termos de valores sociais, seu status econômico, individualidade, injustiças e acessibilidade, mas podem sim ser estudados, com intuito de trazer clareza para uma questão tão plural e complexa. Guiados pelos conceitos apresentados aqui é possível então entender e refletir através da bioética de intervenção acerca do uso da técnica de modificação genética CRISPR-Cas contexto internacional, no Brasil seus desdobramentos.

CAPÍTULO 3 Legislação nacional e internacional vigente relacionadas à edição gênica

3.1. Modificação do DNA Humano

Em novembro de 2018, a notícia que o médico e pesquisador chinês He Jiankui anunciou o nascimento de gêmeas com alterações em seu DNA, chocou a comunidade científica e o mundo. O feito foi parte de um experimento com intuito de impedir que as crianças nascessem com HIV, e a repercussão do caso foi estrondosa. Jiankui, ficou mundialmente conhecido pelo seu ato e foi condenado a 3 anos de prisão pelo tribunal de sua cidade Shenzhen, pela manipulação ilegal de células germinativas, realizando assim exercício ilegal da Medicina. Na época, por falta de legislação vigente acerca desse tipo de atividade na China, o país foi fervorosamente cobrado pela comunidade mundial. Jiankui, usou o sistema CRISPR-Cas9, que acabou sendo divulgado como uma possível fonte de geração de “bebês modificados”, gerando desinformação e sensacionalismo perante a ferramenta (PRESSE, 2022).

Alguns anos antes, em 2015 Junjiu Huang, pesquisador de células-tronco da Universidade de Sun Yat Senem Guangzhou na China, foi o primeiro a reportar o uso do sistema CRISPR-Cas9 para realizar modificações genética em embriões com intuito de realizar mutação específica no gene HBB, componente da hemoglobina que quando apresentam uma determinada modificação genética causa à doença talassemia beta. O artigo “Edição de genes mediada por CRISPR/Cas9 em zigotos tripronucleares humanos” do inglês “*CRISPR/Cas9-mediated Gene Editing in Human Triprounuclear Zygotes*”, foi rejeitado por grandes revistas científicas da época, como a Nature e Science, com a justificativa de ser inadmissível do ponto de vista ético (FURTADO, 2017).

No amplo campo da pesquisa em engenharia genética, o número de laboratórios com cientistas dedicados a pesquisar este sistema tem aumentado nos últimos anos, provavelmente cada um deles tem proposto resolver um problema através desta tecnologia que acabará por cair na luta de patentes. Fora do campo acadêmico, uma parcela da sociedade exige o lançamento desta técnica para salvar vidas em todo o mundo, como pessoas com doenças ou condições raras que poderiam ser tratadas com o emprego da CRISPR, alegando que esta descoberta não pode estar sob patente, uma vez que se tornaria quase

ou totalmente inatingível para muitos seres humanos, no entanto, os cientistas alertam sobre seu lançamento. O grande potencial de modificação genética por meio de CRISPR Cas, de células ou tecidos, mesmo de organismos inteiros, levanta dúvidas sobre sua viabilidade, uma vez que a modificação não permanece apenas no organismo modificado, mas também em sua prole (ARGUEDAS-RAMÍREZ, 2020; GONZALEZ-AVILA *et al.*, 2021).

O papel do governo nestas regulamentações e instâncias a serem abordadas, deve ser regular e garantir o atendimento às necessidades em benefício de toda a sociedade, não apenas a uma parcela da população “privilegiada”, garantindo o uso ético desses sistemas para tentar reduzir as lacunas e desigualdades sociais em vez de abrir novas, considerando as atuais questões sociopolíticas, econômicas e históricas, como os movimentos anti-científicos e a politização da ciência. Isso porque, a edição genética empregada em geral, se não bem regulamentada, abre porta para ser utilizada em nome de “potencializar capacidades humanas” ou para o “melhoramento genético”, surfando na ideiação de uma possível manipulação de traços cognitivos e físicos também (CAPELLA, 2016). Por isso, é altamente relevante que haja distinção entre tratamento e o melhoramento genético, muito vinculado também a ideia de eugenia. O primeiro procura devolver ou restaurar uma dada condição causada por uma doença que esteja prejudicando a saúde do indivíduo, o segundo se refere ao “aprimoramento” ou “melhoraria” de características que são consideradas “normais”, seguindo um padrão histórico e estrutural muitas vezes carregados de preconceitos com ideias separatista, racista e capacitista.

O movimento eugenista foi fruto de Darwinismo, um sistema bio-social de ideias que defendia o uso de práticas destinadas a melhorar a composição genética de uma população, desenvolvido na Europa no final do século 1800. Os eugenistas da época, afirmavam que muitos dos males do homem eram devidos a heranças inferiores de características. Assim, ladrões, prostitutas, pessoas com deficiência, pessoas pobres, imigrantes e minorias eram degenerados e considerados inaptos, e seus genes não deveriam se perpetuar. A nova eugenia liberal, fundamenta-se no princípio que de o aprimoramento humano flui de um desejo legítimo de melhorar a si mesmo e que existe uma obrigação moral de produzir o melhores filhos possíveis. Com isso, os novos eugenistas descrevem a velha eugenia como não científica e coercitiva, preocupada com o

aperfeiçoamento da raça, criando a falsa ilusão de que a “nova eugenia” propõe criar melhores oportunidades para crianças através do próprio ser humano, com o melhoramento e a eliminação de características indesejáveis (HARRIS, 2010; VIZCARRONDO, 2011).

Para além dos temas levantados anteriormente, entra em pauta também o quanto as consequências adversas dessas modificações são realmente plausíveis de serem mapeadas, o risco de produzir efeitos em escala macroambiental como por exemplo a hereditariedade dos genes modificados para gerações futuras, a existência, velocidade de criação e adaptação das legislações vigentes acerca do uso de modificações genéticas, e em um geral, a transparência e divulgação das pesquisas realizadas assim como seus próximos passos. Por último mas não menos importante, a existência de um diálogo com a população perante esse cenário de forma a compartilhar e gerar conhecimento baseado em fontes verdadeiras a respeito do uso da CRISPR, independente do intuito do estudo na qual será empregada, fugindo da comunicação em massa geradora de medo perante “o desconhecido”.

Independente de todos os questionamentos e discussões, não há consenso da real maneira de regular e legislar sobre o assunto no Brasil e no mundo. E esse é também um grande risco, pois simplesmente a proibição da edição de células somáticas ou embriões não impede de fato a inexistência dessas práticas, gerando um ambiente instável, aberto para práticas de um mercado pouco regulado e com potencial ilegal (FURTADO, 2017; BOGGIO *et al.*, 2019).

3.2. Legislação Internacional

3.2.1. Moratória da edição do genoma hereditário

O PubMed, plataforma que apoia a busca e recuperação de literatura biomédica e de ciências da vida com mais de 34 milhões de citações e resumos de literatura biomédica, no período de 2013 a 2022, apresentou 5.857 artigos com a temática da CRISPR presente em seu acervo. Desses, 29% possuem autores norte-americanos e 27% autores chineses, sendo que os dois países são justamente os que se apresentam mais avançados em testes clínicos com

pacientes usando a CRISPR, mesmo que ainda estejam sendo estabelecidos os potenciais riscos da ação fora do alvo ou imprevistos, também chamados do inglês de off-target, da ferramenta. Apesar disso, os estudos clínicos realizados e divulgados em células somáticas ex vivo, ou seja estudos realizados com amostras modificadas extraídas do próprio organismo, alteradas e depois reintroduzidas, mostram-se a priori seguros. Entretanto, não há um consenso mundial sobre a permissão para edição de células germinativas e embriões humanos, sendo expressamente proibida em muito países da europa, necessitando de aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA), para edição em embriões editados no EUA, assim como na china, que requer permissão do Ministério da Saúde Chinês para qualquer uso clínico da edição (GUIMARÃES; MORALES, 2017).

Em 2019 a empresa biofarmacêutica norte americana *Vertex Pharmaceuticals* em parceria com a empresa suíço-americana *CRISPR Therapeutics*, anunciaram sucesso inicial no tratamento de pacientes portadores de talassemia beta e anemia falciforme, doenças causadoras de deformações nos glóbulos vermelhos do sangue afetando sua produção e quantidade no corpo. No estudo, com 75 pacientes, 44 possuem talassemia beta e 31 anemia falciforme grave, receberam sua própria medula editada para combater suas respectivas doenças. Os pacientes foram acompanhados de 1,2 a 32 semanas após o procedimento e, quarenta e dois (42) dos 44 pacientes com talassemia beta não precisaram realizar transfusão durante o período de acompanhamento, e os dois pacientes restantes tiveram redução de 75% e 89% no volume de transfusão. Dos 31 pacientes com anemia falciforme grave, caracterizados por episódios de dor de crise vaso-oclusiva (CVO), todos estavam sem crises após a infusão. Em comunicado à imprensa, a presidente da *CRISPR Therapeutics*, Samarth Kulkarni, afirmou que os dados reforçam as crenças de que terapias gênicas apresentam fortes indícios de propiciar benefícios com uma única intervenção (DELLAIRE, 2020).

O aumento no número de estudos clínicos, mesmo que em sua maioria voltados para tratamentos, abre portas para uso ilegal da ferramenta em locais não amparados por legislações específicas sobre a forma correta da edição genética (GALVIN, 2018). Em dezembro de 2015, a I Conferência Internacional sobre a edição de genes, a primeira Cúpula sobre Edição Genética Humana, do

inglês / *Summit on Human Gene Editing*, ocorreu organizada pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos, Academia Nacional de Medicina dos Estados Unidos, a Royal Society que é um instituto promotor de conhecimento científico do Reino Unido, e a Academia Chinesa de Ciências. O comitê organizador emitiu uma declaração sobre usos apropriados da tecnologia que incluía o seguinte: seria irresponsável prosseguir com qualquer uso clínico de edição de linha germinativa a menos e até que (i) as questões relevantes de segurança e eficácia tenha sido resolvidas com base na compreensão e no equilíbrio apropriados de riscos, benefícios potenciais e alternativas, e (ii) que haja amplo consenso social sobre a adequação da proposta aplicação da tecnologia (BOTKIN, 2020, p.488).

Em novembro de 2018 aconteceu a II Conferência Internacional sobre a edição de genes ocorrida em Hong Kong. O evento, convocado pela Academia de Ciências de Hong Kong, Sociedade Real do Reino Unido, Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos e da Academia Nacional de Medicina dos Estados Unidos. O evento, deveria se concentrar nas perspectivas da edição do genoma humano, mas pouco antes do começo do mesmo, surgiram notícias de que He Jiankui, pesquisador e palestrante convidado da Conferência havia criado os primeiros bebês geneticamente editados, e diferentes reações foram desencadeadas a partir desse cenário (LEI, 2020).

Em março de 2019, foi publicado na revista *Nature* o documento da moratória da edição do genoma hereditário, apoiada pela liderança dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) e assinada por dezoito (18) proeminentes cientistas e bioeticistas envolvidos no campo de edição de genes, envolvidos na organização até de cúpulas internacionais e comitês consultivos nacionais. Projetada para ser temporária, carece de qualquer força ou autoridade significativa se for apoiada por tais conclusões cautelosas e contingentes, uma moratória significa que, embora a edição do genoma hereditário não seja apropriada no momento, essa avaliação pode ser revisada periodicamente, e permite que pesquisas, exceto a transferência uterina, desenvolvam as técnicas e avaliem a eficácia e a segurança da mesma (WOLINETZ; COLLINS, 2019).

Os relatórios apresentados para a formulação da moratória haviam sido alimentados por uma certa urgência na abordagem das questões éticas, sociais e

legais, e assim o argumento central do documento é que o valor da edição do genoma para o pequeno número de famílias potencialmente beneficiadas por essa tecnologia não garantem os riscos para as crianças editadas, os encargos para a sociedade pelo desenvolvimento e supervisão e os riscos para a sociedade por meio de seu uso indevido (XAFIS, 2021).

Uma posição clara e firme sobre essa questão nos estágios iniciais dessa tecnologia é essencial para estabelecer padrões internacionais, por isso na moratória, os Institutos Nacionais de Saúde dos EUA estão proibidos de apoiar o uso de tecnologias de edição de genes de linhagem germinativa em embriões humanos, mas permite a pesquisa sobre usos terapêuticos de edição de genes em células somáticas em doenças, por exemplo. E ainda, de acordo com o documento, qualquer nação que queira dar luz a edição da linha germinativa humana por seus cientistas, deve dar aviso público, envolver-se em uma avaliação internacional e transparente sobre justificativa da intervenção e garantir que o trabalho tenha amplo apoio em sua própria nação (LANDER, 2018).

O editorial da Nature que acompanha o documento, não endossa explicitamente o pedido de uma moratória, mas defende "um registro aberto" de estudos de pesquisa básica eticamente examinados e aprovados que envolvam edição genética de embriões, espermatozóides ou óvulos. Também sugere que seja criado um mecanismo que permita aos cientistas "sinalizar pesquisas potencialmente perigosas", isso porque alguns cientistas sabiam que He Jiankui planejava editar e implantar embriões humanos – ou de fato já havia feito – mas, a seu pedido, manteve as informações confidenciais (BOSLEY *et al.*, 2015).

Nos casos comentados acima é possível perceber, com todas as devidas proporções, que só após a divulgação da notícia da edição do genoma dos embriões na China, é que se promoveu de forma acentuada discussões em relação o tema.

3.2.2. Legislação internacional unificada

A existência de uma legislação mundial acerca da edição do genoma deve ser precedida de uma análise do cenário político e legislativo e, esta análise foi realizada por Baylis *et al.*, 2020, com intuito de organizar e esclarecer o panorama

da edição genética, principalmente voltada a edição de células germinativas no mundo. Em sua pesquisa, verificou que dos 106 países estudados, 96 possuem documentos políticos, sejam eles legislações, regulamentos, diretrizes, códigos ou tratados internacionais relevantes para o uso da edição do genoma a fim de modificar embriões humanos em estágio inicial, gametas ou suas células precursoras. Neste estudo também, os países são classificados em cinco categorias, sendo elas: 1) os que permitem a pesquisa desde que seja realizada de acordo com quaisquer requisitos estipulados; 2) os que proíbem, sendo assim o país declara explicitamente que esse tipo de atividade não é permitida; 3) os que proíbem com exceções, em que os países primeiramente proíbem a atividade em seus documentos, mas estipulam exceções; 4) indeterminado, países nos quais os documentos não é possível determinar com certeza se a pesquisa é permitida ou não, ou seja, que não claros em relação a sua permissibilidade; 5) e os países considerados sem informações, que apresentam documentos sem informações relevantes e/ou que não fazem referência explícita à temática de edição do genoma humano ou seu estudo.

Dos 96 países, 56 (58%) não possuem políticas que abordem especificamente o uso de embriões geneticamente modificados *in vitro* em pesquisas de laboratório. Dos 40 (42%) países restantes com informação relevante acerca do tema, 23 proíbem esta pesquisa, sendo que 19 proíbem completamente, 4 com possíveis exceções, 11 permitem explicitamente e 6 países são indeterminados, como ilustrado na tabela 1.

Tabela 1. Regiões do mundo e quantidade de países que possuem políticas sobre edição genômica da linha germinativa humana, não voltada para reprodução.

Região	Permitem	Proíbem	Proíbem com exceções	Indeterminado	Sem informações
África (13)	2	0	0	2	9
Americas (17)	1 (com financiamento privado no EUA)	4	2	0	10
Mediterrâneo (10)	1	4	2	1	4
Europa (46)	3	10	2	2	29
Sudeste Asiático (2)	2	0	0	0	0
Pacífico Ocidental (8)	2	1	0	1	4
Total (96)	11	19	4	6	56

Fonte: Elaborada pela autora com base em Baylis *et al.*, 2020.

Ainda 75 dos 96 países proíbem o uso de embriões geneticamente modificados *in vitro* para iniciar uma gravidez, edição do genoma hereditário, e por fim 5 desses 75 países oferecem exceções às suas proibições. O Brasil, juntamente com Albânia, Áustria, Bahrein, Bielorrússia, Canadá, Costa Rica,

Croácia, Alemanha, Grécia, Líbano, Malásia, Malta, Paquistão, Arábia Saudita, Suécia, Suíça, Uruguai e Vaticano, são os 19 países que possuem legislação que proíbe a edição genética em células germinativa. Os dados aqui apresentados, estão contidos na tabela 2.

Tabela 2. Regiões do mundo e quantidade de países que possuem políticas sobre edição genômica da linha germinativa humana, voltadas para reprodução.

Região (nº de países)	Permitem	Proíbem	Proíbem com exceções	Indeterminado	Sem informações
África (13)	0	5	0	1	7
Americas (17)	0	8	2	0	7
Mediterrâneo (10)	0	8	1	0	1
Europa (46)	0	41	2	1	2
Sudeste Asiático (2)	0	2	0	0	0
Pacífico Ocidental (8)	0	6	0	1	1
Total (96)	0	70	5	3	18

Fonte: Elaborada pela autora com base em Baylis *et al.*, 2020.

Em suma, nenhum país permite explicitamente a edição hereditária do genoma humano entretanto isso não impede que de fato a edição não ocorra, isso porque há um movimento, chamado de *dumping* ético, prática em que os pesquisadores transferem seu trabalho para um país sem proibições, sem capacidade ou capacidade limitada de aplicar essas proibições. Baylis *et al.* 2020, observa que isso foi visto em outros campos, como o da tecnologia de reprodução assistida e terapias com células-tronco não comprovadas (ALMEIDA; RANISCH, 2022).

Tem sido apontado que a característica mais saliente do cenário regulatório atual é a falta de sólidas estruturas abrangentes de governança global (BAYLIS *et al.*, 2020; SLOKENBERGA *et al.*, 2019). As legislações se concentram em proibições da modificação hereditária ou da linhagem germinativa, entretanto há uma falta de regulamentação clara e específica sobre a edição do genoma, permitindo assim a existência de uma margem de manobra considerável na criação de mecanismos de governança privada, liderada pelos principais donos da tecnologia e entidades que comercializam produtos patenteados de edição de genoma. Assim, na ausência de mecanismos reguladores públicos, a governança privada corre o risco de se tornar uma forma de tomada de decisão ética privatizada em uma base tecnológica, de forma a não ter debate público, envolvimento das partes interessadas e responsabilidade democrática (MATTHEWS *et al.*, 2021).

A regulamentação da edição do genoma tem seguido até agora uma abordagem vertical, ou seja a edição da linha germinativa foi proibida e/ou restritiva sob as regras pertinentes às técnicas de reprodução assistida, enquanto as intervenções somáticas são abordadas de forma horizontal, a partir de uma perspectiva de segurança sob o ponto de vista farmacêutico e médico, marco regulatório de dispositivos e legislação médica. No entanto, há aumentos de chamadas e iniciativas propondo um quadro horizontal integrado, colaborativo e inclusivo para ambos os casos. Mas para isso, é necessária a existência de uma estrutura multicamada de leis e regulamentos, operando em nível internacional, regional e nacional, criando assim uma rede de interseções legais e regulações, necessária em contextos como este, no qual múltiplos fatores e perspectivas devem ser envolvidos (WHO *et al.*, 2021).

A coerência entre as diferentes áreas do direito e a regulamentação sobre edição de genoma seria idealmente contribuir para uma maior realização material do princípio da legalidade e aumentar a segurança jurídica, e indiretamente, a coerência também promove a boa governança, conformidade e aplicação. É necessário também considerar que para um futuro acordo único regional ou global, deve ser considerado que por um lado teremos questões de regulação da edição do genoma onde há uma pluralidade de entendimentos éticos e sociais entre os Estados-membros, e por outro a necessidade em abordar também o pluralismo interno de cada Estado, pois diferentes usos de uma tecnologia podem justificar abordagens regulatórias diferenciadas (SLOKENBERGA *et al.*, 2019).

De toda forma, para futuras discussões e políticas acerca da temática, exige uma base sólida de evidências que refletem de forma transparente e acessível o cenário político global em relação a edição genômica em células germinativas. Além disso, dada a intensidade e riscos dos atuais debates sociais, éticos e políticos sobre heranças da edição do genoma humano, é importante estabelecer um entendimento comum dos esforços existentes na governança dos países do mundo (BAYLIS *et al.*, 2020).

3.3. Protocolo de Cartagena e Legislação Nacional

De acordo com Baylis *et al.*, o Brasil é um dos países que possui legislação que proíbe a edição genética em células germinativa, mas não só. A trajetória do que temos hoje consolidado teve início na década de 1990, com a causa ambiental entrando em pauta nas agendas de diversos países pelo mundo. Buscando propostas mais sustentáveis, impulsionadas pela divulgação dos relatórios alertando a degradação ambiental e os efeitos da poluição na saúde humana e no mundo, como o Relatório de Brundtland de 1987, diversos países promoveram encontros, comissões internacionais e nacionais foram criadas voltadas para a temática, como a Conferência de Estocolmo (1972) e a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, também chamada de “Cúpula da Terra”, realizada no Rio de Janeiro, Brasil (1992). As duas foram as precursoras da formação da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), comissão internacional responsável pelo controle de questões relacionadas à diversidade biológica, além de incentivarem em âmbito nacional, o surgimento de conselhos e comissões como a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) (AGÊNCIA SENADO, 2006; GUIMARÃES; MORALES, 2017).

Em 29 de janeiro de 2000, durante a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) em Montreal no Canadá, o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança (PCB) foi celebrado. Entrou em vigor em novembro de 2001, aderido pelo Brasil em setembro de 2003, sendo que atualmente é aderido por mais de 130 países. O Protocolo é um tratado ambiental com o objetivo de assegurar proteção adequada aos Organismos Vivos Modificados (OVMs) acerca de sua manipulação, empregando técnicas de edição genética, uso e transferência, considerando os potenciais riscos e efeitos à diversidade biológica e para a saúde humana. Dessa forma, estão sujeitos a regulamentação OVMs destinados a uso em laboratório, sementes no âmbito de liberação ambiental e alimentação humana e animal (AGÊNCIA SENADO, 2006).

No PCB, os organismos modificados são todos os que apresentam uma nova combinação genética, diferente da que teria naturalmente, gerada pelo uso da biotecnologia moderna. O PCB ainda define que os OVMs são organismos ou entidades biológicas com capacidade de transferência de seu material genético,

inclusive vírus e viróides. Já o termo Organismos Geneticamente Modificados (OGM), foi definido pela Lei de Biossegurança Nº 8.974, da qual falaremos com mais detalhes (SIMÕES; BURNQUIST, 2010).

A formulação do Protocolo está ancorada no Princípio da Precaução⁴, pois diversos países não possuíam legislação referente à biossegurança, e muitos apresentavam pouco conhecimento sobre potenciais riscos e efeitos do uso de OGMs ou OVMs na população e meio ambiente. Porém, por outro lado, os países mais desenvolvidos já possuíam interesse de amparo jurídico para realização de possíveis experimentos, como por exemplo a pesquisa realizada pelo Instituto Americano na Argentina em 1986 com vacinas geneticamente modificadas. Assim, para a formulação do documento este é dividido em duas temáticas principais, a primeira voltada para delimitação do que seria um OVMs e quais seriam tratados no protocolo, já a segunda sobre o controle das transferências de OVMs (GUIMARÃES; MORALES, 2017).

As análises e discussões realizadas no âmbito internacional, fez com que a adoção do protocolo no Brasil trouxesse também para esfera nacional tais necessidades, para que fossem de entendimento coletivo o posicionamento brasileiro e perante os mecanismos estabelecidos no Protocolo, como seria a regulamentação no país considerando questões sociais e econômicas locais. No Brasil, já havia legislação a respeito de OGM, isso porque em 1995 foi criada a Lei 8.974/95 que teve como objetivo a tentativa de desenvolvimento biotecnológico de forma segura assim como preservar a soberania nacional frente a sondagem ilegal de recursos nacionais, regulamentando técnicas de engenharia genética e liberação de OGM no meio ambiente (CASTRO, 2012).

A Lei 8.974/95 não separa, de forma clara o que seriam OGM e OVM, de maneira a se referir a todo e qualquer organismo geneticamente modificado, mas de toda forma propõe normas e mecanismos de segurança e fiscalização da manipulação, cultivo, transporte, comercialização, liberação, consumo e descarte de OGM no Brasil, função que foi atribuída ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente (MMA) que, a partir de então, deveriam realizar todo controle, registro, fiscalização e

⁴ **O Princípio da Precaução** é a garantia contra os riscos potenciais que, de acordo com o estado atual do conhecimento, não podem ser ainda identificados (MORAES, 2011).

autorização dos OGMs. Na lei, também é criada, como apoio técnico, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que para além de assessorar o governo federal, deveria também criar e avaliar normas técnicas e emissões de Certificados de Qualidade de Biossegurança (CQB). Ainda, anterior a implementação do Protocolo de Cartagena, outras normas brasileiras eram vigentes como o Artigo 225 da Constituição Federal de 1988⁵, que estabelece por lei a exigência do Estudo de Impacto Ambiental (EIA), que vinculava a precaução e análise de risco obrigatória para qualquer OGM, e também a resolução Nº 237 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que exigia licença ambiental para introdução de OGM no meio ambiente (BRASIL, 1997; GUIMARÃES; MORALES, 2017).

O cenário brasileiro perante discussões ambientais, riscos e potenciais de OGMs levou o país a se posicionar de duas formas durante as negociações da implementação do Protocolo, a primeira levando um forte contexto ambiental sustentado pelo MMA para proteção da biodiversidade nacional, e outra visão muito forte defendendo a visão comercial da implementação de OGMs por exemplo no plantio, com havia ocorrido aprovação da soja *Roundup Ready* no país, mostrando assim um profundo interesse do Brasil em expandir o poderio do agronegócio. O Brasil aderiu ao Protocolo em 2003, mas a polarização entre as visões comercial e ambiental dos membros das comissões e conselhos nacionais se mantém até hoje, dificultando o funcionamento pleno da CTNBio (BARBOSA, 2004; CASTRO, 2012).

Em março de 2005 a Lei de Biossegurança (Lei n. 11.105/2005), revogou a Lei 8.974/95, e renovou o regulamento que estabelece as normas de segurança e fiscalização acerca de OGMs e seus derivados, além de criar a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CNBS) e reestruturar a CTNBio. Em sua versão antiga, a Lei de Biossegurança conflitava com a da Lei do Ambiente Nº 9.605/88 o que acabava desestimulando assim a área, mas a nova lei gerou grande salto para a biotecnologia no país, promovendo proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal. Dessa forma, considera o uso de OGMs em atividade de pesquisa em laboratórios, uso comercial, atividades e projetos que envolvam

⁵ **Art. 225.** Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.

OGM como a pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico e até mesmo para a produção industrial, sendo que todos devem fazer requerimento de autorização da CTNBio para o mesmo (CASTRO, 2012).

Cumpramos ressaltar três aspectos relevantes da Lei de Biossegurança N. 11.105/2005, deles refere-se ao disposto o Art. 4^o, no qual está clara a necessidade de cumprimento da legislação vigente em casos de “formação e utilização de células somáticas de híbrido animal”. Diz respeito o Art. 6^o, no qual é explicitada a proibição de “engenharia genética em organismo vivo ou o manejo *in vitro* de DNA/RNA natural ou recombinante, realizado em desacordo com as normas previstas nesta Lei”, bem como também a engenharia genética em células humanas, sejam elas embriões ou zigotos, deixando declarada que a legislação veta o uso de ferramentas de edição genética em células germinativas até mesmo em âmbito científico, a menos que apenas seja usada de acordo com o Art 5^o, “células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento” (MORALES, 2017). Em suma, os três artigos revelam que é permitida a realização de edição em células somáticas, e ilegal a modificação em células germinativas, a menos que a aplicação seja voltada para fertilização *in vitro*.

⁶ **Art. 4º** Esta Lei não se aplica quando a modificação genética for obtida por meio das seguintes técnicas, desde que não impliquem a utilização de OGM como receptor ou doador:

- I – Mutagênese;
- II – Formação e utilização de células somáticas de híbrido animal;
- III – Fusão celular, inclusive a de protoplasma, de células vegetais, que possa ser produzida mediante métodos tradicionais de cultivo;
- IV – Autoclonagem de organismos não-patogênicos que se processe de maneira natural.

⁷ **Art. 6º Fica proibido:**

- I – Implementação de projeto relativo a OGM sem a manutenção de registro de seu acompanhamento individual;
- II – Engenharia genética em organismo vivo ou o manejo *in vitro* de ADN/ARN natural ou recombinante, realizado em desacordo com as normas previstas nesta Lei;
- III – engenharia genética em célula germinal humana, zigoto humano e embrião humano;
- IV – Clonagem humana;
- V – Destruição ou descarte no meio ambiente de OGM e seus derivados em desacordo com as normas estabelecidas pela CTNBio, pelos órgãos e entidades de registro e fiscalização, referidos no art. 16 desta Lei, e as constantes desta Lei e de sua regulamentação;

⁸ **Art. 5º** É permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento, atendidas as seguintes condições:

- I – Sejam embriões inviáveis; ou
- II – Sejam embriões congelados há 3 (três) anos ou mais, na data da publicação desta Lei, ou que, já congelados na data da publicação desta Lei, depois de completarem 3 (três) anos, contados a partir da data de congelamento.

A Lei de Biossegurança é mantida atualizada através da incorporação de Resoluções Normativas (RN), conforme o avanço científico, e assim em 15 de Janeiro de 2018 foi publicada a RN Nº 16 que estabelece “requisitos técnicos para apresentação de consulta à CTNBio sobre as Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão” ou (TIMP), do inglês *Precision Breeding Innovation* (PBI), os dois termos foram empregado pela União Europeia para englobar técnicas de modificação genética usadas para mudar de forma específica ou pré-determinada, regiões do genoma, sem necessariamente haver grandes modificações no DNA ou transgenia. A classificação das TIMP também engloba novas técnicas de melhoramento, do inglês *New Breeding Technologies* (NBTs), o que inclui diversas ferramentas de como RNAi, Vetor Viral e CRISPR- Cas. O resultado desta RN, é a expansão do uso da CRISPR, que previamente não apresentava espaço para ser inserida na Lei 11.105/2005 (BRASIL, 2018).

Dessa forma, no Brasil para poder iniciar projetos/trabalhos com edição genética, empregando ferramentas como a CRISPR, deve primeiramente estar em uma instituição, seja ela privada ou pública, que possua uma Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), que funcione como uma extensão da CTNBio mas de forma interna, que indicará um técnico responsável pelos projetos desenvolvidos. A comissão precisa depois obter o CQB, cumprindo assim todas as normas exigidas de biossegurança. Posteriormente a obtenção do certificado, os projetos podem ser realizados, e serão supervisionados pela CIBio.

Para garantir o cumprimento da legislação e prevenção de possíveis acidentes, depois da realização dos estudos e a construção de um produto, é necessária a liberação do mesmo pela CTNBio. Vale destacar que atualmente a maioria dos produtos aprovados são plantas, voltadas para o agronegócio como variedades transgênicas de soja e milho, mas há também produtos como vacinas e microorganismos autorizados, como o caso da modificação do mosquito macho do *Aedes aegypti* criado para acasalar com fêmeas da espécie e somente gerar novos machos, que não picam ou transmitem doenças, sendo um novo método de prevenção e controle do inseto e conseqüentemente das doenças que ele transmite, dengue, zika, chikungunya e febre amarela (GATTI, 2021; BRASIL, 2006).

No Brasil, a área da saúde emprega a CRISPR- Cas em diversos estudos que vão do tratamento do câncer à doença de chagas, estudando a caracterização funcional de proteínas em diferentes fases do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. A grande variedade de testes existentes se dá pela adaptabilidade de uso, facilidade do emprego e acesso a técnica, que incentiva estudos exploratórios, e assim avanço de várias frentes e temas voltados à saúde humana, como a pesquisa voltada para a diminuição da rejeição de xenotransplantes transplante de órgãos entre porcos e humanos, por meio do silenciamento dos três principais genes conhecidos causadores dessa reação, realizado pelo Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) da USP (DELLAIRE, 2020).

3.4. Considerações finais do capítulo 3

O avanço científico acerca da edição genética, permite explorar ainda mais suas potencialidades, aumentando a eficácia e rapidez dos processos de edição, garantindo maior abrangência de seu emprego por ser uma ferramenta mais precisa e segura, sendo utilizada para desenvolvimento de vacinas, estudo de doenças em ampla escala, desenvolvimento de novas terapias como a gênica, criação de kits diagnóstico, como o teste rápido da COVID-19 e muitos outros. É quase indiscutível os benefícios do emprego da CRISPR- Cas na área da saúde, entretanto sem a devida legislação e controle, o uso da mesma pode causar grande risco, como o polêmico caso dos bebês chineses, que além de um grave ataque a bioética, fere a Declaração de Direitos Humanos, como visto.

A edição genética apresenta também potencial uso do ponto de vista mercadológico como uso da CRISPR– Cas para “melhoramento genético”. Se caso não forem bem estudados e discutidos, de forma rápida e séria forem legislados, a ferramenta pode acabar caminhando para beneficiar características como suposto aumento da inteligência cognitiva, definição de altura do indivíduo, seu tom de pele, cabelos e olhos e afins. Esses usos, apresentam altíssimo valor comercial, e novamente além de ferir diversos fundamentos bioéticos, apresentam grande impacto social incentivando a eugenia, ditando e incitando qual seria a classe, cor e gênero o que seriam os seres humanos “melhorados”.

O anúncio da edição genética nas gêmeas chinesas, foi estrondoso e colocou a legislação, fiscalização e ética do país em cheque. Entretanto, o caso foi apenas reflexo da lentidão, falta de integração e atualização entre a área jurídica e bioética, permitindo assim que em situações como essa as autoridades estivessem desprovidas de aparatos legais para conter e julgar um caso como este. As consequências desse episódio foram um bombardeio de notícias, muitas com teor sensacionalista frente o caso e a CRISPR- Cas, gerando histeria e desconfiança da população com a técnica desenvolvida. Por parte da comunidade científica, o sentimento não foi diferente o que incentivou a discussão da temática em eventos, como o Summit, congressos e a criação de um documento como a moratória de edição do genoma hereditário, o que nos leva a entender como a legislação mundial hoje olha para a temática, e o quanto estamos e não respaldados por ela.

Do ponto de vista legal, atualmente nenhum país no mundo permite a edição genômica da linha germinativa oficialmente, isso porque dos 106 países estudados por Baylis *et al.*, 2020, 26 países estão entre os que proíbem com exceções, são indeterminados ou que nem mesmo informações sobre esse tipo de atividade, num geral, há brechas nas lei para que esse tipo de procedimento ocorra, mas nenhum deliberadamente o permite. Por outro lado, para uso científico, de estudo que se enquadra em atividades de edição genômica não voltadas para reprodução, dos 106 países, apenas 11 permitem. O Brasil, como comentado anteriormente, possui a Lei de Biossegurança n. 11.105/2005 e, posteriormente, com o advento da Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018, pela primeira vez surgiu a possibilidade da adoção desta técnica, legitimando a realização de pesquisas, até mesmo o uso da CRISPR- Cas em específico, em linhagens não germinativas.

Por fim, é importante trazer a baila prós e contras do uso da CRISPR. Em relação aos prós há diversos potenciais benefícios à saúde como tratamento e possível cura de doenças, no campo da pesquisa, maior abrangência, eficácia e facilidade em estudos envolvendo DNA, desenvolvimento de vacinas, tendo espaço também para melhoramento de plantas, aumentando sua resistência, realizando controle de espécies invasoras nocivas, pesticida reverso e resistência a herbicidas em insetos e plantas daninhas, por exemplo (YANG, *et al.*, 2021).

Ainda uma das vantagens da ferramenta é sua simplicidade para atuar em regiões específicas, isso porque apesar de diversos testes para otimização da técnica para que assim atinja o alvo correto, tudo o que é necessário fazer é projetar e solicitar os novos RNAs guia. A CRISPR- Cas é também muito conhecida por ser eficaz, o que aumenta sua utilização em pesquisas e trabalhos, servindo como incentivo da divulgação da mesma e facilitação para reprodução de estudos realizados e ainda mais consolidação da ferramenta (KHAN, 2019).

Do ponto de vista técnico, como pontos contrários, seria a dificuldade inicial para configurar do zero os primeiros experimentos, isso porque é necessário um protocolo específico e otimizado para cada experimento e esse tipo de procedimento pode ser trabalhoso e desafiador. Outro ponto importante é a eficiência do experimento, em que é descrito essencialmente a porcentagem de células que foram editadas com sucesso em seu recipiente de cultura, e qualquer efeito sutil de sua edição pode ser mascarado pelas células não editadas em sua população, mesmo que existam maneiras de evitar isso, como usando marcadores de seleção. Além desses a ação fora do alvo, criando mutações em outras partes do genoma de forma aleatória, pode influenciar genes ou regiões do genoma em si que podem gerar consequências potencialmente arriscadas e, principalmente, não mapeadas. Como muito foi comentado, a questão da edição de células germinativas é um assunto extremamente delicado, assim como suas consequências e também potenciais usos para armas biológicas (JAVAID *et al.*, 2022).

CONCLUSÃO

O objetivo das considerações levantadas neste trabalho são fomentar o debate e discussões acerca da edição do genoma humano usando a CRISPR-Cas. Aqui foi abordado o tema em três verticais, no campo da genética, bioética e no campo legislativo, além de trazer uma breve revisão sobre os conceitos básicos necessários para compreensão do conteúdo apresentado. Através da perspectiva genética, foi possível ter panorama da origem da área, passando pelo seu surgimento, principais marcos e pontos de desenvolvimento relevantes até chegar ao registro da descrição funcional da CRISPR-Cas, tendo sido apresentadas também as quatro principais técnicas de edição do genoma, e por

fim, aprofundamento da história, funcionalidade e aplicabilidade da CRISPR em si.

Através da bioética, foi possível fazer o levantamento histórico dos seus precursores e conceitos fundamentais que levaram à formação, primeiramente, da bioética principialista, que tem como pauta principal na relação entre médico e paciente, mas que com sua divulgação principalmente chegando aos países periféricos, precisou ser desenvolvida para assim possuir arcabouço frente às novas questões e reflexões contemporâneas, se adaptando e expandindo, formando assim a bioética de intervenção. Foram também apresentadas as declarações que regem a bioética de forma global, através do estudo da Declaração dos Direitos Universais pela Unesco e a Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos, possibilitando assim abrir a discussão e entendimento de como a edição genética, principalmente a do células germinativas, pode impactar não só as próximas gerações, mas a estrutura social e econômica em âmbito geral. Uma vez que temos ciência dos direitos humanos e princípios bioéticos, é possível começar a discutir as consequências e impactos, que a tecnologia, seu desenvolvimento e uso apresentam em nosso contexto atual e futuro.

Do ponto de vista legislativo, a partir do caso da edição do genoma humano que infringiu diversos preceitos bioéticos, foi realizado um estudo mais aprofundado de outros casos nos quais houveram o uso da ferramenta CRISPR-Cas tanto para edição de células germinativas quanto somáticas. Como desdobramento desses casos, surgiu a moratória da edição do genoma hereditário, proposta por uma parcela da comunidade científica envolvida em fóruns e discussões acerca do uso da CRISPR, para países, demais fóruns e até mesmo para outros acadêmicos. A moratória, não foi o primeiro documento ou ação que apresentou intenção de assegurar as formas corretas de uso da CRISPR e demais ferramentas de edição, e assim, no âmbito nacional e internacional foram levantadas o status das legislações vigentes, com objetivo de entender também suas perspectivas futuras.

Por fim, apesar do fato de que a CRISPR-Cas enfrenta vários obstáculos regulatórios e sociais, as aplicações potenciais não podem ser ignoradas. A mesma, pode melhorar significativamente nossa compreensão das doenças em

nível genético, ao mesmo tempo em que oferece novos horizontes para o tratamento e outras aplicações de pesquisa. Há uma grande necessidade de absorção da tecnologia CRISPR-Cas em várias frentes que inclui a participação de especialistas das áreas étnica, social, religiosa, legislativa e tecnológica fundamentais para discutir e desenvolver a mesma de forma consciente e consistente. A ferramenta promove muitas iniciativas éticas e sociais, não só do ponto de vista humano, mas também para o meio ambiente, assim as avaliações de risco para preocupações ecológicas, ambientais e legislativas também devem ser realizadas, necessitando dessa forma pluralidade de visões e envolvimento de diversos setores da comunidade para seu desenvolvimento saudável.

REFERÊNCIAS

ADHIKARI, Prabin; POUDEL, Mousami. CRISPR-Cas9 in agriculture: Approaches, applications, future perspectives, and associated challenges. **Malaysian Journal of Halal Research**, v. 3, n. 1, p. 6-16, 2020.

AKEY, Joshua M. *et al.* Tracking footprints of artificial selection in the dog genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 3, p. 1160-1165, 2010.

ALKHNBASHI, Omer S. *et al.* CRISPRstrand: predicting repeat orientations to determine the crRNA-encoding strand at CRISPR loci. **Bioinformatics**, v. 30, n. 17, p. i489-i496, 2014.

ALMEIDA, Mara; RANISCH, Robert. Beyond safety: mapping the ethical debate on heritable genome editing interventions. **Humanities and Social Sciences Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2022.

AMORIM CINI, Ricardo; ROSANELI, Caroline Filla; FISCHER, Marta Luciane. Direito humano à água e bioética: revisão da literatura latino-americana com foco na realidade brasileira. **Agua y territorio**, n. 14, p. 105-114, 2019.

AREND, Marcela Corso; Pereira, Jessica Olivaes; Markoskil, Melissa Medeiros. O Sistema CRISPR/Cas9 e a possibilidade de edição genômica para a cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 108, p. 81-83, 2017.

ARGUEDAS-RAMÍREZ, Gabriela. Ethics and global governance of human germline genome editing: The problem of techno-scientific colonialist paternalism. **The CRISPR journal**, v. 3, n. 2, p. 83-88, 2020.

ARIAS, G. **Em 1953 foi descoberta a estrutura do DNA: Etapas de um grande avanço científico**. Embrapa Trigo, 2004.

ASANO, Kenji *et al.* Artificial selection for a green revolution gene during japonica rice domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 27, p. 11034-11039, 2011.

AYANOĞLU, FATMA BETÜL; ELÇİN, AYŞE ESER; ELÇİN, YAŞAR MURAT. Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology. **Turkish Journal of Biology**, v. 44, n. 2, p. 110-120, 2020.

BAHIA. Secretaria da Saúde. Manual de Biossegurança. Salvador, Bahia. 2001. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/manuais/biosseguranca/manual_biosseguranca>. Acesso em 6 jul. 2022

BANO, Edwige *et al.* **SiC nanowire-based transistors for electrical DNA detection**. In: Silicon Carbide Biotechnology. Elsevier, 2016. p. 261-310.

BARBOSA, Mariana Pereira. Os Transgenicos na Imprensa: o caso da liberacao da soja Roundup Ready. **Em Questao**, v. 10, n. 2, p. 435-447, 2004.

BARRANGOU, Rodolphe *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, 2007.

BAYLIS, Françoise *et al.* Human germline and heritable genome editing: the global policy landscape. **The CRISPR Journal**, v. 3, n. 5, p. 365-377, 2020.

BEAUCHAMP, Tom L., Childress, James F.,. **Principles of biomedical ethics**. 5 .ed.Oxford University Press, USA, 2001, p.120-160.

BOGGIO, Andrea *et al.* The human right to science and the regulation of human germline engineering. **The CRISPR Journal**, v. 2, n. 3, p. 134-142, 2019.

BOSLEY, Katrine S. *et al.* CRISPR germline engineering—the community speaks. **Nature biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 478-486, 2015.

BOTKIN, Jeffrey R. The case for banning heritable genome editing. **Genetics in Medicine**, v. 22, n. 3, p. 487-489, 2020. Disponível em: <[https://www.gimjournal.org/article/S1098-3600\(21\)01260-0/fulltext](https://www.gimjournal.org/article/S1098-3600(21)01260-0/fulltext)> Acesso em 06 jul.2022.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações .**Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018**. Brasília, Distrito Federal, 2018. Disponível em: <[Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018 - Resoluções Normativas -](#)

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança\$ &ndash CTNBio> Acesso em: 02 jul.2022

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1, DE 20 DE JUNHO DE 2006**. Brasília, Distrito Federal, 2006. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas/-/asset_publisher/OgW431Rs9dQ6/content/resolucao-normativa-n%C2%BA-1-de-20-de-junho-de-2006-alterada-pela-resolucao-normativa-n%C2%BA-11-de-22-de-outubro-de-2013-e-pela-resolucao-normativa-n%C2%BA-14-de-0> Acesso em: 02 jul.2022.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **LEI Nº 11.105, DE 24 DE MARÇO DE 2005**. Brasília, Distrito Federal, 2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm> Acesso em: 04 jul.2022.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **LEI Nº 8.974, DE 05 DE JANEIRO 1995**. Brasília, Distrito Federal, 1995.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018**. Brasília, Distrito Federal, 2018. Disponível em: <[Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018 - Resoluções Normativas - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança\\$ &ndash CTNBio](#)> Acesso em: 02 jul.2022

BROKOWSKI, Carolyn; ADLI, Mazhar. CRISPR ethics: moral considerations for applications of a powerful tool. **Journal of molecular biology**, v. 431, n. 1, p. 88-101, 2019.

BUERMANS, H. P. J.; DEN DUNNEN, J. T. Next generation sequencing technology: advances and applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 10, p. 1932-1941, 2014.

CAPELLA, Vicente Bellver. La revolución de la edición genética mediante crispr-cas 9 y los desafíos éticos y regulatorios que comporta. **Cuadernos de bioética**, v. 27, n. 2, p. 223-239, 2016.

CARROLL, Dana. Genome engineering with zinc-finger nucleases. **Genetics**, v. 188, n. 4, p. 773-782, 2011.

CASTRO, Biancca Scarpeline de. Organismos geneticamente modificados: as noções de risco na visão de empresas processadoras, organizações não governamentais e consumidores. 2012.

COELHO, Ana Flávia Viana Campello de *et al.* Da ética principialista para a bioética de intervenção: sua utilização na área da saúde. 2013.

CONDON, Anne. Designed DNA molecules: principles and applications of molecular nanotechnology. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 7, p. 565-575, 2006.

COOPER, Edwin L.; OVERSTREET, Nicola. Diversity, evolution, and therapeutic applications of small RNAs in prokaryotic and eukaryotic immune systems. **Physics of life reviews**, v. 11, n. 1, p. 113-134, 2014.

COSTA, Sérgio Ibiapina F.; GARRAFA, Volnei; OSELKA, Gabriel. A bioética no século XXI. **Brasília: UnB, 2000.**

CRIBBS, Adam P.; PERERA, Sumeth MW. Focus: Genome Editing: Science and Bioethics of CRISPR-Cas9 Gene Editing: An Analysis Towards Separating Facts and Fiction. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 4, p. 625, 2017.

CRUZ, M. R.; TRINDADE, E. S. Bioética de Intervenção-uma proposta epistemológica e uma necessidade para sociedades com grupos sociais vulneráveis. **Revista Brasileira de Bioética**, v. 2, n. 4, 2006.

DAHM, Ralf. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. **Developmental biology**, v. 278, n. 2, p. 274-288, 2005.

DE LECUONA, I., Casado, M., Marfany, G., Lopez Baroni, M., and Escarrabill, M. (2017). Gene Editing in Humans: Towards a Global and Inclusive Debate for Responsible Research. *Yale J. Biol. Med.* 90, 673–681.

DEJEANNE, Solange. Os fundamentos da bioética e a teoria principialista. **Thaumazein: Revista Online de Filosofia**, v. 4, n. 7, p. 32-45, 2011.

DELLAIRE, Graham. Graham Dellaire: Ciência com cautela. [Entrevista concedida a] Ricardo Zorretto. **Revista Pesquisa Fapesp**, ed.288, fev. 2020. Disponível em: < <https://revistapesquisa.fapesp.br/graham-dellaire-ciencia-com-cautela/>>. Acesso 19 jul.2022.

DOS SANTOS NETO, Manoel Antônio. Reflexões jurídicas acerca das novas terapias em saúde: uma análise à luz da lei de biossegurança. *Juridical reflections on new health therapies: an analysis in the light of the biosafety law.* **Revista Brasileira de Bioética**, v. 7, p. 21-31, 2011.

ENGLER, Carola *et al.* A golden gate modular cloning toolbox for plants. **ACS synthetic biology**, v. 3, n. 11, p. 839-843, 2014.

Forbes. 31 OUT. 2020. Disponível em: <<https://www.forbes.com/sites/farahqaiser/2020/10/31/study-there-is-no-country-where-heritable-human-genome-editing-is-permitted/?sh=176e52ab7617>> Acesso em 14 jul.2022.

FRIDOVICH-KEIL, Judith L.. **Gene editing**: genetics. genetics. 2019. Disponível em: <<https://www.britannica.com/science/gene-editing>>. Acesso em: 14 fev. 2022.

FURTADO, Rafael Nogueira. DESAFIOS ÉTICOS DAS TECNOLOGIAS DE MELHORAMENTO HUMANO. **Kínesis-Revista de Estudos dos Pós-Graduandos em Filosofia**, v. 9, n. 20, p. 235-251, 2017.

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

GALVIN, Molly. Statement from the Organizing Committee on Reported Human Embryo Genome Editing. 2018.

GARRAFA, Volnei. Da bioética de princípios a uma bioética interventiva. 2005a.

GARRAFA, Volnei. Inclusão social no contexto político da bioética. 2005b.

GARRAFA, Volnei; DA CUNHA, Thiago Rocha; MANCHOLA-CASTILLO, Camilo. Ensino da ética global: uma proposta teórica a partir da Bioética de Intervenção/The teaching of global ethics: A theoretical proposal based on Intervention Bioethics/Ensenanza de la ética global: una propuesta teórica a partir de la Bioética de Intervención. **Interface: Comunicação Saúde Educação**, v. 24, p. 1F-1F, 2020.

GARRAFA, Volnei; PORTO, Dora. Intervention bioethics: a proposal for peripheral countries in a context of power and injustice. **Bioethics**, v. 17, n. 5-6, p. 399-416, 2003.

GARRAFA, Volnei; PRADO, Mauro. Mudanças na Declaração de Helsinki: fundamentalismo econômico, imperialismo ético e controle social. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 17 n. 6, novembro/dezembro de 2001.

GATTI, Beatriz. Biotecnologia usa mosquitos modificados para combater "Aedes aegypti". **Revista Galileu**, São Paulo, 4 dez. 2021. Disponível em: <<https://revistagalileu.globo.com/Ciencia/Saude/noticia/2021/12/biotecnologia-usa-mosquitos-modificados-para-combater-aedes-aegypti.html>>. Acesso em 1 jul. 2022.

GAUTHIER, Michel G. **Simulation of polymer translocation through small channels: A molecular dynamics study and a new Monte Carlo approach.** 2008.

GAYON, Jean. From Mendel to epigenetics: History of genetics. **Comptes rendus biologies**, v. 339, n. 7-8, p. 225-230, 2016.

GELEY, Stephan; MÜLLER, Christiane. RNAi: ancient mechanism with a promising future. **Experimental gerontology**, v. 39, n. 7, p. 985-998, 2004.

GÓES, Andréa Carla de Souza; OLIVEIRA, Bruno Vinicius Ximenes de. Projeto Genoma Humano: um retrato da construção do conhecimento científico sob a ótica da revista Ciência Hoje. **Ciência & Educação (Bauru)**, v. 20, p. 561-577, 2014.

GOLDIM, José Roberto. Bioética: origens e complexidade. **Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 26, n. 2,(2006), p. 86-92**, 2006.

GONZAGA, GISDENILTON CARLOS; RAMOS, CAROLINE. **Técnica CRISPR-Cas9 e sua utilização na Área Laboratorial.** 2018.

GONZALEZ, Gabriela Desiree Tormet; SIGRIST, R.; PAULO, B. S. Avanços recentes na manipulação genética de organismos para a produção de peptídeos não ribossomais. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1998-2025, 2016.

GONZALEZ-AVILA, Luis Uriel *et al.* The Challenge of CRISPR-Cas toward bioethics. **Frontiers in Microbiology**, p. 1344, 2021.

GREENLEAF, William J.; SIDOW, Arend. The future of sequencing: convergence of intelligent design and market Darwinism. 2014.

GUIMARÃES, Bruna Gaudêncio; MORALES, Elias David. A IMPLEMENTAÇÃO DO PROTOCOLO exame DE CARTAGENA SOBRE BIOSSEGURANÇA NO BRASIL: UMA ANÁLISE DOS OBSTÁCULOS EXISTENTES PARA A SUA EFETIVIDADE. **Revista de Estudos Internacionais (REI)**, v. 8, n. 3, p. 2017.

HAMEL, Marcio Renan. Da ética kantiana à ética habermasiana: implicações sociojurídicas da reconfiguração discursiva do imperativo categórico. **Revista Katálisis**, v. 14, n. 2, p. 164-171, 2011.

HARRIS, John. Enhancing evolution. In: **Enhancing Evolution**. Princeton University Press, 2010.

HARVARD. **CRISPR: A game-changing genetic engineering technique**. 2014. Disponível em: <<https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2014/crispr-a-game-changing-genetic-engineering-technique/>>. Acesso em: 26 mar. 2022.

HEATHER, James M.; CHAIN, Benjamin. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016.

HOOD, Leroy; GALAS, David. The digital code of DNA. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 444-448, 2003.

HOU, Zhihao Zhang Wei; CHEN, Shuliang. Updates on CRISPR-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy. **Virologica Sinica**, 2022.

ILARDI, Vincenza; TAVAZZA, Mario. Biotechnological strategies and tools for Plum pox virus resistance: trans-, intra-, cis-genesis, and beyond. **Frontiers in Plant science**, v. 6, p. 379, 2015.

ISHINO, Yoshizumi; KRUPOVIC, Mart; FORTERRE, Patrick. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. **Journal of bacteriology**, v. 200, n. 7, p. e00580-17, 2018.

JAVOID, Darakhshan *et al.* CRISPR/Cas9 system: a reliable and facile genome editing tool in modern biology. **Molecular Biology Reports**, p. 1-18, 2022.

JOUNG, J. Keith; SANDER, Jeffry D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 1, p. 49-55, 2013.

KCHOUK, Mehdi; GIBRAT, Jean-Francois; ELLOUMI, Mourad. Generations of sequencing technologies: from first to next generation. **Biology and Medicine**, v. 9, n. 3, 2017

KEYNES, Milo; COX, T. M. William Bateson, the rediscoverer of Mendel. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 101, n. 3, p. 104-104, 2008.

KHAN, Sikandar Hayat. Genome-editing technologies: concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 16, p. 326-334, 2019.

KIM, Daniel H.; ROSSI, John J. RNAi mechanisms and applications. **Biotechniques**, v. 44, n. 5, p. 613-616, 2008.

KIM, Sojung *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome research**, v. 24, n. 6, p. 1012-1019, 2014.

KLUG, William S. *et al.* **Essentials of genetics**. Pearson Education, Inc., 2020.

KNOTT, Gavin J.; DOUDNA, Jennifer A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. **Science**, v. 361, n. 6405, p. 866-869, 2018.

LANDER, Eric S. *et al.* Adopt a moratorium on heritable genome editing. 2019.

LEDFORD, Heidi; CALLAWAY, Ewen. PIONEERS OF CRISPR GENE EDITING WIN CHEMISTRY NOBEL. **Nature**, v. 586, n. 7829, p. 346-347, 2020.

LEDFORD, Heidi; CALLAWAY, Ewen. Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel: emmanuelle charpentier and jennifer doudna share the award for developing the precise genome-editing technology.. **Nature**. [S.l.], p. 1-2. 07 out. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/d41586-020-02765-9>>. Acesso em: 13 ago. 2021

LEE, Choongho. CRISPR/Cas9-based antiviral strategy: current status and the potential challenge. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1349, 2019.

LEI, Ruipeng; QIU, Renzong. Chinese bioethicists: He Jiankui's crime is more than illegal medical practice. In: **Bioethics Forum**. 2020.

LI, Hongyi *et al.* Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-23, 2020.

LIMERA, Cecilia *et al.* New biotechnological tools for the genetic improvement of major woody fruit species. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1418, 2017.

LINDEN, Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 31-69, 2010.

LÓPEZ-DOLZ, Lucio *et al.* Fine-tune control of targeted RNAi efficacy by plant artificial small RNAs. **Nucleic acids research**, v. 48, n. 11, p. 6234-6250, 2020.

LUTHRA, Ritika; KAUR, Simran; BHANDARI, Kriti. Applications of CRISPR as a potential therapeutic. **Life Sciences**, v. 284, p. 119908, 2021.

MABTUM, Matheus Massaro; MARCHETTO, Patrícia Borba. O debate bioético e jurídico sobre as diretivas antecipadas de vontade. 2015.

MAKAROVA, Kira S. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 722-736, 2015.

MARTINEZ-LAGE, Marta *et al.* CRISPR/Cas9 for cancer therapy: hopes and challenges. **Biomedicines**, v. 6, n. 4, p. 105, 2018.

MALATINO, Hilary. Biohacking Gender: cyborgs, coloniality, and the pharmacopornographic era. **Angelaki**, v. 22, n. 2, p. 179-190, 2017.

MATTHEWS, Duncan *et al.* The role of patents and licensing in the governance of human genome editing: a white paper. **Queen Mary Law Research Paper**, n. 364, 2021.

MAYS, Vickie M. Research challenges and bioethics responsibilities in the aftermath of the Presidential Apology to the survivors of the US Public Health Services Syphilis Study at Tuskegee. **Ethics & behavior**, v. 22, n. 6, p. 419-430, 2012.

MERCK. **Sanger Sequencing Steps & Method**. 2012. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing?gclid=Cj0KCQiA09eQBhCxAARIsAAYRiykIXN5h0nuwxKMfcSZxI6Yq2il7oSd2vIUdHG8JuY9pkCJVlafQZxEaAimYEALw_wcB>. Acesso em: 15 jan. 2022.

MIKO, Ilona. Gregor Mendel and the principles of inheritance. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 134, 2008.

MILLER, Jeffrey C. *et al.* Enhancing gene editing specificity by attenuating DNA cleavage kinetics. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 945-952, 2019.

MOJICA, Francisco JM; RODRIGUEZ-VALERA, Francisco. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. **The FEBS journal**, v. 283, n. 17, p. 3162-3169, 2016.

MORAES, Gabriela Bueno de Almeida. **O princípio da precaução no direito internacional do meio ambiente**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MORENO, Jonathan D.; SCHMIDT, Ulf; JOFFE, Steve. The Nuremberg code 70 years later. **Jama**, v. 318, n. 9, p. 795-796, 2017.

NASSER, Mona; SAWICKI, Peter. **Institute for quality and efficiency in health care: Germany**. Commonwealth Fund, 2009.

NIDHI, Sweta *et al.* Novel CRISPR–Cas systems: An updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 7, p. 3327, 2021.

OHKURA, Hiroyuki. Meiosis: an overview of key differences from mitosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 5, p. 1585, 2015.

PESSINI, Leo. As origens da bioética: do credo bioético de Potter ao imperativo bioético de Fritz Jahr. **Revista Bioética**, v. 21, n. 1, p. 09-19, 2013.

PETROVA, Natalya S.; ZENKOVA, Marina A.; CHERNOLOVSKAYA, Elena L. Structure-functions relations in small interfering RNAs. **Pract. Appl. Biomed. Eng**, 2013.

PIRES, Jansen Ribeiro; TRINDADE, José Geraldo Campos. Das origens da Bioética la Bioética principalista. **Revista Facitec**, v. 1, n. 1, 2007.

POSTOLLEC, Florence *et al.* Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

POWELL, Alvin. Harvard University (org.). **CRISPR's breakthrough implications**: Jennifer Doudna delivers Prather Lectures, explaining her gene-editing technology. **The Harvard Gazette**. 16 maio 2018. Disponível em: <<https://news.harvard.edu/gazette/story/2018/05/crispr-pioneer-jennifer-doudna-explains-gene-editing-technology-in-prather-lectures/>>. Acesso em: 15 abr. 2022

PRESSE, F. Cientista chinês que criou bebês geneticamente modificados é condenado a três anos de prisão. **GLOBO.COM**. São Paulo, 30 dez. 2019. Disponível em: <<https://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2019/12/30/cientista-chines-que-criou-bebes-geneticamente-modificados-condenado-a-tres-anos-de-prisao.ghml>> Acesso em 10 jul.2022.

QAISER, F. Study: There Is No Country Where Heritable Human Genome Editing Is Permitted.

RAN, F. A. F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281-2308, 2013.

RAN, F. A. F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281-2308, 2013.

REICH, Warren T. Revisiting the launching of the Kennedy Institute: re-visioning the origins of bioethics. **Kennedy Institute of Ethics Journal**, v. 6, n. 4, p. 323-327, 1996.

REICH, Warren Thomas. The word "bioethics": its birth and the legacies of those who shaped it. **Kennedy Institute of Ethics Journal**, v. 4, n. 4, p. 319-335, 1994.

REY, Michael M.; BONK, Michael P.; HADJILIADIS, Denis. Cystic fibrosis: emerging understanding and therapies. **Annual review of medicine**, v. 70, p. 197-210, 2019.

RODRÍGUEZ, Diana Raquel *et al.* Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases. **International journal of molecular medicine**, v. 43, n. 4, p. 1559-1574, 2019.

ROSES, Allen D. The genome era begins.. **nature genetics**, v. 33, n. 3, p. 217-217, 2003.

RYAN, Daniel E. *et al.* Improving CRISPR–Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs. **Nucleic acids research**, v. 46, n. 2, p. 792-803, 2018.

SAHEL, Deepak Kumar; MITTAL, Anupama; CHITKARA, Deepak. CRISPR/Cas system for genome editing: progress and prospects as a therapeutic tool. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 370, n. 3, p. 725-735, 2019.

SAMPLE, Ian (ed.). **Discovery of oldest human DNA in Spanish cave sheds light on evolution**: Scientists say DNA strands in thigh bone of 400,000-year-old early human can help build clearer picture of human family tree. **The Guardian**.

Londres, p. 11111-22222. 4 dez. 2013. Disponível em: <<https://www.theguardian.com/science/2013/dec/04/oldest-human-dna-discovered-spanish-cave>>. Acesso em: 12 abr. 2020.

SANTOS, Felipe Domingos dos; SILVA, Antonio Fernando Gouvea; FRANCO, Fernando Faria. 110 anos após a hipótese de Sutton-Boveri: a teoria cromossômica da herança é compreendida pelos estudantes brasileiros?. **Ciência & Educação (Bauru)**, v. 21, p. 977-989, 2015.

SANTOS, Ivone L.; SHIMIZU, Helena E. GARRAFA, Volnei. Bioética de intervenção e pedagogia da libertação: aproximações possíveis. **Revista bioética**, v. 22, n. 2, p. 271-281, 2014.

SCHRAMM, Fermin Roland; PALÁCIOS, Marisa; REGO, Sergio. O modelo bioético principialista para a análise da moralidade da pesquisa científica envolvendo seres humanos ainda é satisfatório?. **Ciência & saúde coletiva**, v. 13, p. 361-370, 2008.

SETTEN, Ryan L.; ROSSI, John J.; HAN, Si-ping. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 6, p. 421-446, 2019.

SILVA, Leonardo Eustáquio Sant'Anna; DRUMMOND, Adriano; GARRAFA, Volnei. Bioética de intervenção: uma prática politizada na responsabilidade social. **Universitas: ciências da saúde**, v. 9, n. 2, p. 111-119, 2011.

SIMÕES, Débora da Costa; BURNQUIST, Heloisa Lee. Impactos potenciais do Protocolo de Cartagena sobre biossegurança nas exportações brasileiras de soja. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 48, p. 283-306, 2010.

SLOKENBERGA, Santa. Analysis of the legal and human rights requirements for genomics in and outside the EU: SIENNA D2. 2. 2019.

SMYRLAKI, Ioanna *et al.* Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

STEFFIN, David HM; HSIEH, Emily M.; ROUCE, Rayne H. Gene therapy: current applications and future possibilities. *Advances in pediatrics*, v. 66, p. 37-54, 2019.

STEWART, Fiona. The anatomy of a chromosome. **The Ulster medical journal**, v. 79, n. 3, p. 110, 2010.

STONE, Daniel; NIYONZIMA, Nixon; JEROME, Keith R. Genome editing and the next generation of antiviral therapy. **Human genetics**, v. 135, n. 9, p. 1071-1082, 2016.

SUNG, Young Hoon *et al.* Mouse genetics: catalogue and scissors. **BMB reports**, v. 45, n. 12, p. 686, 2012.

SWENSON, William; WILSON, David Sloan; ELIAS, Roberta. Artificial ecosystem selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 9110-9114, 2000.

SYNTHEGO. **CRISPR Screens: Approaches, Strategies, and Workflow:** introduction to functional genomic screening. Introduction to Functional Genomic Screening. 2019. Disponível em: <<https://www.synthego.com/guide/crispr-methods/crispr-screen>>. Acesso em: 22 abr. 2022

THONG, Wei Li *et al.* Gene editing enables rapid engineering of complex antibiotic assembly lines. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2021.

UDDIN, Fathema; RUDIN, Charles M.; SEN, Triparna. CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 1387, 2020.

UNESCO. Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos (DUBDH-2005).Disponível em: <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000146180_por/PDF/146180por.pdf.multi>. Acesso em 28 jun. 2022

UNESCO.Declaração internacional sobre os dados genéticos humanos (DIDG-2004).Disponível em: <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000122990_por>. Acesso em 28 jun. 2022.

URNOV, Fyodor D. *et al.* Genome editing with engineered zinc finger nucleases. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 9, p. 636-646, 2010.

VALDERRAMA, J. Andrés *et al.* A bacterial gene-drive system efficiently edits and inactivates a high copy number antibiotic resistance locus. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2019

VIZCARRONDO, Felipe E. Human enhancement: The new eugenics. **The Linacre Quarterly**, v. 81, n. 3, p. 239-243, 2014.

WOLINETZ, Carrie D.; COLLINS, Francis S. NIH pro germline editing moratorium. **Nature**, v. 567, n. 7747, p. 175, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Advisory committee on developing global standards for governance and oversight of human genome editing. **Human Genome Editing: World Health Organization**, 2019.

XAFIS, Vicki *et al.* Germline genome modification through novel political, ethical, and social lenses. **PLoS Genetics**, v. 17, n. 9, p. e1009741, 2021.

XU, Yuanyuan; LI, Zhanjun. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 2401-2415, 2020.

YANG, Guang; HUANG, Xingxu. Methods and applications of CRISPR/Cas system for genome editing in stem cells. **Cell Regeneration**, v. 8, n. 2, p. 33-41, 2019.

YANG, Yue *et al.* CRISPR/Cas: advances, limitations, and applications for precision cancer research. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 649-896, 2021.