

MODULAÇÃO GÊNICA EM EMBRIÕES HUMANOS

GENE MODULATION IN HUMAN EMBRYOS

Actualidad Jurídica Iberoamericana N° 9, agosto 2018, ISSN: 2386-4567, pp. 202-223

Dra. Graziella
TRINDADE
CLEMENTE

ARTÍCULO RECIBIDO: 25 de mayo de 2018

ARTÍCULO APROBADO: 30 de junio de 2018

RESUMEN: O recente implemento de moderna tecnologia -CRISPR/Cas9- possibilitou o avanço inquestionável da edição gênica em linhagem germinativa humana, seja por meio da manipulação de células precursoras de gametas, células tronco pluripotentes, gametas ou, até mesmo, de embriões.

Mesmo levando em conta os benefícios terapêuticos preventivos demonstrados nas pesquisas básicas e pré-clínicas em embriões humanos, tais investigações encontram barreiras de aceitação em todo o mundo. Tal situação exige mudança de atitude no sentido de incrementar o debate em torno da aplicabilidade dessas novas tecnologias. Assim, a adequação das atuais regulamentações faz-se necessária e deve incluir a superação dos desafios técnicos, as considerações éticas e o consenso social.

Nesse contexto, torna-se relevante discutir os limites e potencialidades dessa tecnologia; riscos e benefícios para as futuras gerações; regulamentações e recomendações relativas às indicações e contraindicações da técnica, bem como seu reflexo na autonomia reprodutiva e impacto social.

PALABRAS CLAVE: Edição gênica; linhagem germinativa humana; CRISPR/Cas9; pesquisas clínicas; embriões humanos.

ABSTRACT: *Recent modern technology systems –CRISPR/Cas9– have made unquestionable advances in genome editing possible in human germline, whether by means of precursor gamete cell manipulation, pluripotent stem cells or even embryos.*

Even taking into account the preventative therapeutic benefits demonstrated in basic and preclinical research on human embryos, such investigations encounter barriers to their acceptance all over the world. This situation requires a change in attitude in the sense of incrementing the debate on the applicability of these new technologies. Thus, adaptation of existing regulations is needed and should include overcoming technical challenges, ethical considerations and social consensus.

In this context, it becomes relevant to discuss the limits and potential of this technology, the risks and benefits for future generations, regulation and recommendations in regard to the indications and contraindications of the technique, as well as its repercussions on reproductive autonomy and social impact.

KEY WORDS: Gene editing; human germline; CRISPR/Cas9; clinical research; human embryos.

SUMARIO.- I. INTRODUÇÃO.- II. REGULAMENTAÇÕES E RECOMENDAÇÕES.- III. APLICABILIDADE DA TÉCNICA CRISPR/CAS9.- IV. RISCOS E BENEFÍCIOS.- V. AUTONOMIA REPRODUTIVA.- VI. IMPACTOS SOCIAIS.- VII. CONCLUSÃO.

I. INTRODUÇÃO.

Considerada como um dos maiores avanços da ciência nos últimos anos, a técnica de edição gênica, conhecida pela sigla CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), garantiu, de forma simples, acessível, rápida e eficiente a manipulação do DNA humano, possibilitando assim maior conhecimento das doenças genéticas no que diz respeito ao diagnóstico, prevenção e proposta de novas alternativas terapêuticas. Dessa forma, ela constitui ferramenta revolucionária no mapeamento de doenças graves, de caráter hereditário e, na maioria das vezes, incurável.

Inicialmente, a aplicabilidade da edição gênica restringiu-se à linhagem de células somáticas, o que significa dizer que ela se aplica à maioria das células de nosso organismo, ou seja, aquelas responsáveis pela formação dos diferentes tecidos e órgãos. Diferentemente da linhagem germinativa, a linhagem somática não tem o potencial de gerar gametas. Assim sendo, as modificações promovidas em seu material genético não se perpetuam nas futuras gerações. Ao contrário, afetarão apenas o indivíduo em si, jamais sua progênie.

Somente a partir de 2015, os debates se acirraram em torno da possibilidade de edição gênica de células da linhagem germinativa humana - ovócitos, espermatogônias- e embriões. Assim, de forma inédita, possibilitou-se a manipulação de sequências do DNA de embriões humanos¹.

Considerando-se que a modificação gênica de células germinativas é capaz de impactar o organismo do indivíduo como um todo, bem como de seus

¹ LIANG, P., XU, Y., ZHANG, X., DING, C., HUANG, et al.: "CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes", *Protein Cell*, vol. 6, núm. 5, 2015, pp. 363-372.

descendentes, essa técnica ainda é muito criticada seja por razões biomédicas, seja por razões bioéticas ou legais. Apesar dos benefícios terapêuticos que podem advir do seu uso, a possibilidade de promover mudanças permanentes no DNA de células com capacidade de transmitir essas informações para as futuras gerações, tem justificado os intensos debates sobre o tema.

Assim, enquanto no passado considerava-se esse debate distante da realidade devido às limitações técnicas relativas à edição gênica, hoje, com os avanços técnico-científicos, a questão torna-se iminente.

II. REGULAMENTAÇÕES E RECOMENDAÇÕES.

É fato que ainda existe consenso global no sentido de não se permitir a modificação gênica de células germinativas humanas. Mesmo levando-se em consideração a variação dos diferentes sistemas regulatórios atualmente em vigor no mundo, sua proibição, na maioria dos países é evidente, seja por basear-se nos regulamentos que regem a técnica de reprodução assistida, seja por confrontar-se com princípios da bioética, ou, até mesmo, pela ausência de regulamentação específica (casos em que se utilizam as regras convencionais de engenharia genética), tal prática permanece coibida.

Os regulamentos variam não só entre os diferentes países, mas, também dependem do modelo de estudo utilizado. Assim, temos regulamentações distintas se considerarmos edição de células somáticas ou embriões/linhagem germinativa².

Na Europa, a Convenção de Oviedo deixa explícitas as restrições à criação de embriões humanos para pesquisa – 29 países ratificaram cabendo, a cada um, respeitando-se a convenção, criar as próprias leis para regulamentar o tema. Nesses termos, a modificação do genoma humano está limitada às condições de diagnóstico, prevenção ou tratamento, desde que não promova modificação no genoma dos descendentes, e que se respeite a proibição quanto à aplicação clínica restrita à reprodução³.

Com relação à regulamentação das modificações promovidas na linhagem reprodutiva humana, as restrições são ainda mais contundentes. Dependendo da distinção entre a aplicação das pesquisas (básicas ou clínicas) define-se quanto à sua proibição ou não. Entretanto, a ambiguidade torna-se ainda mais evidente

2 ISHII, T.: “Germ line genome editing in clinics: the approaches, objectives and global society”, *Briefings in Functional Genomics*, 2015, pp. 1-11.

3 Oviedo Convention – Interventions on the human genome – Art. 13: “An intervention seeking to modify the human genome may only be undertaken for preventive, diagnostic or therapeutic purposes and only if its aim is not to introduce any modification in the genome of any descendants”.

pois, nos países em que se permite pesquisas básicas, condiciona-se essa prática à destruição dos embriões modificados.

Um dos argumentos que sustentam tais proibições seria o receio do uso indevido de tais técnicas, ou seja, sem qualquer indicação médica, o que poderia ser configurado como prática eugênica⁴.

Como já foi comprovado, a edição gênica de embriões humanos deve ocorrer nos primeiros estágios do desenvolvimento de embriões normais, para que se possa garantir acurácia da técnica. Além disso, é evidente que, nessas situações, promove-se a modificação no genoma dos descendentes. Nesses termos, as pesquisas tornam-se impossíveis em número significativo de países europeus.

Contudo, ocorre maior aceitabilidade se a edição gênica de embriões humanos processa-se no contexto de pesquisas básicas sem finalidade clínica como, por exemplo, na reprodução desde que comprovada a destruição dos embriões modificados.

Assim, enquanto numa minoria de países signatários da Convenção de Oviedo não existe proibição categórica para tais pesquisas (apenas coíbe-se práticas eugênicas), na maioria, a aplicação clínica da edição de células germinativas é proibida.

Existem ainda alguns países em que se permite utilizar a técnica de transferência de mitocôndrias, aceitando a possibilidade de produção de embriões com a finalidade de pesquisa. Em vários países signatários da Convenção de Oviedo, entretanto, quando tais práticas são permitidas, elas só podem ocorrer em embriões excedentários do processo de fertilização in vitro.

Esses exemplos comprovam a necessidade de se adaptar a legislação vigente ao dinamismo técnico científico, pois novas demandas vão surgindo e necessitam ser devidamente regulamentadas. Além disso, é preciso solucionar a diversidade e, até mesmo, a ambiguidade legislativa a fim de possibilitar avanços seguros, responsáveis e promissores. Assim sendo, tais procedimentos exigem regulamentação específica, precisa e atualizada.

Nesse sentido, diante da possibilidade de se prevenir desordens genéticas graves e de difícil, ou até mesmo, impossível tratamento, não seria necessário

4 Práticas eugênicas são tentativas de se obter máximo aprimoramento genético humano, sem qualquer indicação médico-terapêutica. Essas técnicas podem ser classificadas como negativas, quando têm o objetivo de promover o melhoramento genético humano por meio da redução da possibilidade procriativa de indivíduos com características "socialmente indesejadas". Já, quando classificadas como positivas, objetivam estimular a procriação de indivíduos com características "socialmente desejáveis" – ORMOND, K., MORTLOCK, D., SCHOLLS, D., et al.: "Human Germline Genome Editing", *The American Journal of Human Genetics*, núm. 101, 2017, pp. 167-176.

questionar alguns posicionamentos? Considerando-se que, no momento em que essas legislações e regulamentos foram criados, a tecnologia da edição gênica era ainda incipiente, não seria apropriado reconsiderar alguns pontos de vista? Os fundamentos antes utilizados para fundamentar as proibições relativas à aplicabilidade de tais técnicas seriam ainda justificáveis?⁵

III. APLICABILIDADE DA TÉCNICA CRISPR/CAS 9.

A técnica CRISPR/Cas9, que funciona como um “editor de texto genético”, promove a correção ou exclusão de genes portadores de mutações relacionadas a doenças possibilitando, assim, desfazer ou silenciar os efeitos deletérios das mesmas⁶.

É possível distinguir diferentes vias de edição quando se utiliza a técnica CRISPR/Cas9 na linhagem germinativa humana. Assim sendo, a edição implementada em zigotos, ocorrerá nos pró-núcleos, enquanto a implementada em embriões, acontecerá momentos antes da implantação. Esses embriões serão então selecionados por meio de biópsia de trofoblasto (diagnóstico pré-implantação ou pelas técnicas de biópsia de vilosidade/amniocentese) com objetivo de verificar possível ocorrência do mosaïcismo ou modificações gênicas fora do alvo (“off-target”)^{7 8 9 10}.

-
- 5 BERIAN, I.: “Legal issues regarding gene editing at the beginning of life: an EU perspective”, *Regenerative Medicine*, 2017.
 - 6 CRISPR/Cas9 - Trata-se de complexo formado por enzima do tipo endonuclease (Cas9) guiada até a região específica da molécula de DNA (gene marcado) que se pretende editar, por meio de uma molécula de gRNA, programada para reconhecer a sequência específica do DNA. Assim, procede-se a substituição do fragmento de DNA, que possui a mutação, por sequência normal possibilitando a correção da desordem. A molécula de gRNA pode ser personalizada para reconhecer sequências específicas do DNA por meio de alteração de apenas 20 nucleotídeos. Dessa forma, genes específicos podem ser alvo do gRNA e, consequentemente, da Cas 9, o que propicia modificações precisas dos mesmos. REYES, A. and LANNER, F.: “Towards a CRISPR view of early human development: applications, limitations and ethical concerns of genome editing human embryos”, *The Company of Biologists*, núm. 144, 2017, pp. 3-7.
 - 7 O mosaïcismo se manifesta quando há corte ou reparação indevidos do DNA nos estágios precoces do desenvolvimento. Para se evitar o mosaïcismo é ideal que a edição se processe nos momentos iniciais da segmentação. Ocorre que, em razão da proibição quase absoluta (legal/ética) de se produzir embriões humanos para pesquisa, a utilização dos embriões excedentários da fertilização “in vitro” torna-se uma das únicas opções. Entretanto, esses já se apresentam em estágios mais avançados de clivagem o que aumenta a chance de ocorrência do mosaïcismo (ARAKI, M., ISHII, T.: “International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization”, *Reprod Biol Endocrinol*, núm. 12, 2014, pp. 108).
 - 8 YOSHIMI, K., KANEKO, T., VOIGT, B. et al.: “Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas plataforma”, *Nat Commun*, núm. 5, 2014, pp. 4240.
 - 9 Kang, Y., Zheng, B., Shen, B. et al: “CRISPR/Cas9-mediated Dax 1 knockout in the monkey recapitulates AHC-HH”, *Hum Mol Genet.*, 2015, núm. 24, pp. 7255-7264.
 - 10 Alternativas para utilizar embriões humanos nos estágios iniciais de clivagem incluem a utilização de ovócitos descartados da técnica fertilização “in vitro”, ou zigotos com anomalias de fertilização (3PN). Entretanto, nesses casos, o mosaïcismo também tem ocorrido, muito provavelmente devido às anormalidades associadas - KANG, X., HE, W., HUANG, Y. et al.: “Introducing precise genetic modifications into 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing”, *J Assist Reprod Genet.*, núm. 33, 2016, pp. 581-588.

Outra preocupação relevante inclui as modificações gênicas “off-target” que podem ocorrer de forma inesperada em decorrência da técnica. Nesse caso, tanto a técnica -CRISPR/Cas9- quanto a origem dos embriões, poderiam justificar a ocorrência do efeito indesejado. Nesse sentido, têm sido desenvolvidas técnicas que permitem analisar a eficiência da edição e o cálculo do efeito mutagênico correspondente a fim de se aumentar a segurança e acurácia das mesmas¹¹.

Sabe-se, no entanto, que mesmo quando são ultrapassadas as barreiras éticas e legais em relação às pesquisas em embriões humanos, muitos desafios técnicos ainda persistem. Estudos realizados em animais de laboratório, em que foi utilizado método alternativo de edição gênica (CRISPR/Cas9/sgRNA) comprovaram aumento significativo na efetividade da técnica principalmente pela não ocorrência do mosaïcismo¹².

Deve-se destacar, também, resultados obtidos em embriões humanos em que a ferramenta de edição -CRISPR/Cas9- foi utilizada no momento da fertilização. Nesses casos, tanto o mosaïcismo, quanto a ocorrência de modificações gênicas fora do alvo puderam ser efetivamente prevenidas¹³.

Por outro lado, na situação em que se editam células germinativas humanas, ovócitos e espermatozônias, o processo deverá ocorrer ainda durante a gametogênese garantindo-se, assim, a produção de gametas sem alteração, para então serem utilizados na reprodução assistida.

Com relação aos ovócitos, apesar de sua manipulação ser tecnicamente mais fácil, existe a desvantagem da disponibilidade reduzida da amostra.

Tem sido sugerido que, para garantir a eficácia da edição, a mesma deve ocorrer em estágio celular específico (ovócitoII) sendo, portanto, necessário cultivar “in vitro”¹⁴.

Os gametas masculinos, por sua vez, devem ser editados enquanto espermatozônias (precursoras do espermatozoide) para garantir a eficácia da

11 Mutações *off-target* seriam aquelas não intencionais, que podem ocorrer no genoma em decorrência da ação não específica da enzima Cas9. Dessa forma, além do efeito pretendido, pode-se provocar também a mutação de algum outro gene de forma não esperada ou indesejada – BOEL, A., STEYAERT, W., DE ROCKER, N. et al.: “BATCH-GE: batch analysis of next generation sequencing data for genoma editing assessment”, *Sci Rep.*, núm 6, 2016, pp. 30330.

12 HASHIMOTO, M., YAMASHITA, Y., TAKEMOTO, T.: “Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse”, *Dev Biol.*, núm. 418, 2016, pp. 1-9.

13 MA, H., MARTI-GUTIERREZ, N., PARK, SW., et al.: “Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos”, *Nature*, 2017, pp. 1-7.

14 WOODS, D. C., TILLY, J. L.: “Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human varies”, *Nat Protoc.*, núm. 6, 2013, pp. 30330.

técnica. Em seguida, procede-se a diferenciação dessas células “in vitro” e segue-se a fertilização¹⁵.

A edição gênica quando aplicada em pesquisas básicas oferece grande vantagem, uma vez que gera conhecimento científico amplo que poderá contribuir para a saúde e bem estar humanos. Avanços nos estudos relativos ao papel da genética no desenvolvimento humano precoce, incluindo esclarecimento dos mecanismos que justificam a diferenciação celular em modelos humanos, investigação do papel de alguns genes específicos nos momentos iniciais do desenvolvimento embrionário humano, compreensão da gênese de doenças genéticas propiciando o desenvolvimento de medicamentos específicos para essas doenças (utilizando modelo de células tronco embrionárias, que apresentam vantagens significativas sobre o modelo de células pluripotentes – mais diferenciadas), desenvolvimento de terapias gênicas importantes no tratamento de diferentes tipos de câncer (utilizando-se células tronco embrionárias para obtenção de resultados mais confiáveis), entre outros, são exemplos das possíveis indicações das pesquisas básicas nesse âmbito. Assim, mesmo considerando a possibilidade dos objetivos clínicos da edição gênica não serem alcançados, a relevância das pesquisas básicas, nessa área, é indiscutível.

A principal justificativa à objeção a essas pesquisas fundamenta-se na questão da “instrumentalização” dos embriões humanos, questão superada em relação aos embriões nos primeiros estágios de desenvolvimento, já que esses exibiriam um status próprio, diferenciado daquele conferido ao feto e ao recém-nascido. Exatamente por isso, alguns países permitem, com restrições, o uso de embriões excedentários para pesquisas. Nessa mesma linha de raciocínio, justifica-se a alternativa da utilização de embriões triploides para pesquisas, já que esses não apresentam potencial para desenvolvimento¹⁶.

A maior polêmica, entretanto, refere-se à criação de embriões para pesquisa. É evidente que a utilização dos embriões excedentários seria a primeira opção, porém, pesquisas pré-clínicas só são possíveis em embriões no estágio inicial de segmentação, o que inviabiliza a utilização de embriões excedentários. De acordo com ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) e ESHG (European Society of Human Genetics), não existiria diferença entre o status desses dois tipos de embriões (excedentários ou produzidos com a

15 GOOSSENS, E., VAN SAEN, D., THOURNAYE, H.: “Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic”, *Hum Reprod.*, núm. 28, 2013, pp. 897-907.

16 GYNGELL, C., FELLOW, M., DOUGLAS, T., SAVULESCU, J.: “The ethics of germline gene editing”. *J Appl Philos.*, núm. 34 (4), 2017, pp. 498-513.

finalidade de pesquisa), já que ambos teriam o mesmo destino: nunca poderiam ser implantados^{17 18}.

Nota-se, portanto, que a edição gênica da linhagem germinativa em pesquisas básicas pode garantir inúmeros benefícios: em curto prazo, por constituírem importante ferramenta no tratamento de doenças monogênicas e, em longo prazo, por representarem ferramenta eficiente no combate de doenças poligênicas, multifatoriais e infecciosas^{19 20}.

Com relação às pesquisas de aplicação clínica, é irrefutável a importância da edição gênica em embriões humanos na prevenção de doenças genéticas (6% das crianças recém nascidas apresentam problemas genéticos importantes). Utilizando-se dessa técnica, é possível identificar os genes responsáveis por essas condições, o que implicaria na esperança de tratamento preventivo para essas doenças.

Muitos defendem ser desnecessário lançar mão de tal tecnologia, já que tanto a fertilização “in vitro”, quanto a técnica de diagnóstico pré-implantação são eficientes em selecionar embriões não afetados por grande variedade dessas doenças evitando-se, dessa forma, nascimento de crianças portadoras de tais mutações. Entretanto, há uma série de situações em que a possibilidade de seleção de embriões viáveis é muito reduzida ou próxima de zero. Assim sendo, a indicação clínica da edição seria evidente nos casos em que a seleção não é capaz de garantir embrião saudável. Nesse contexto, algumas situações destacam-se como exemplos de indicação para pesquisa clínica a saber: casos em que há produção de apenas um embrião viável na fertilização “in vitro”, no qual se que o mesmo é portador de mutação monogênica; nas situações em que os pacientes são portadores de doenças genéticas autossômicas dominantes,

17 DE WERT, G., HEINDRYCKX, B., PENNINGS, G., et al.: “Responsible innovation in human germline gene editing: Background document to the recommendations of ESHG and ESHRE”, *European Society of Human Genetics*, 2018.

18 DE WERT, G., PENNINGS, G., CLARKE, A., et al.: “Human germline gene editing: Recommendations of ESHG and ESHRE”, *European Journal of Human Genetics*, 2018.

19 “Um distúrbio monogênico é aquele determinado principalmente pelos alelos de um único locus. Uma lista clássica de doenças monogênicas conhecidas, a Mendelian Inheritance in man, foi elaborada pelo falecido Victor A. McKusick e se tornou indispensável aos médicos geneticistas durante décadas (...). Um único gen ou par de genes frequentemente produz múltiplos efeitos fenotípicos diferentes em vários sistemas, com uma diversidade de sinais e sintomas acontecendo em diferentes momentos da vida (...) embora todas as manifestações da doença sejam originárias da mesma mutação”. THOMPSON & THOMPSON: *Genética Médica*, Elsevier, Rio de Janeiro, 2016, p. 546.

20 “A herança complexa dos distúrbios multifatoriais comuns (...) tais doenças raramente resultam simplesmente da herança de um ou dois alelos de efeito maior em um único locus, como ocorre nos distúrbios mendelianos dominantes recessivos. Em vez disso, acredita-se que resultam de interações complexas entre diversas variantes genéticas que alteram a susceptibilidade à doença, combinadas com determinadas exposições ambientais e possíveis eventos causais, todos atuando em conjunto para desencadear, acelerar, ou proteger contra o processo da doença. Por essa razão, estes distúrbios são considerados de origem multifatorial, e a agregação familiar caracteriza um padrão que é referido como complexo”. THOMPSON & THOMPSON: “A herança complexa dos distúrbios multifatoriais comuns”, *Genética Médica*, cit., pp. 133-170.

apresentando duas cópias do gene com mutação; casos de doenças autossômicas recessivas, quando mesmo procedendo-se a seleção de embriões pela técnica de fertilização “in vitro” seguida de diagnóstico pré-implantação, não há como evitar a possível transmissão do gene com mutação para os descendentes do portador sadio; situações em que ambos os pais são portadores do gene com mutação. Na maioria desses casos, mesmo utilizando-se as técnicas de fertilização “in vitro” e diagnóstico pré-implantação seria necessário produzir quantidade significativa de embriões para garantir possível seleção de embrião saudável o que, na maioria dos casos, é inviável. Ademais, isso não garantiria que tal embrião ficasse livre de ser portador da mutação, podendo assim, transmiti-la a seus descendentes²¹.

Em contrapartida, por meio da edição gênica em que se pretende corrigir ou eliminar genes causadores dessas doenças nos embriões, pode-se alcançar total ou parcialmente esses objetivos o que poderia, inclusive, provocar redução da incidência dessas doenças nas futuras gerações.

Comparativamente, na técnica em que se seleciona o embrião saudável, ocorreria um benefício impessoal. Aquele afetado seria eliminado, e não beneficiado com a cura. Por outro lado, o embrião que apresentava o gene com mutação e passou pelo processo de edição, obteria o benefício pessoal da cura da doença.

A indicação clínica da edição seria também uma possibilidade em casos de doenças poligênicas, ou seja, em que vários genes apresentam mutações simultâneas.

Especialmente nos casos de doenças poligênicas em que há interferência de diferentes fatores ambientais, é muito difícil a seleção de um embrião viável. Nessas situações, inúmeras mutações gênicas se associam para caracterizar uma só doença, como, por exemplo, os que ocorrem em diferentes tipos de câncer nos quais mais de duzentos diferentes genes estão envolvidos. Nesse sentido, a edição gênica nas pesquisas, em longo prazo, pode tornar-se importante ferramenta, já que a técnica tem o potencial de promover múltiplas alterações gênicas simultâneas. É fato, entretanto, que isso dependerá do avanço dos estudos, para deixar de ser apenas uma expectativa. A gênese dessas doenças ainda não foi totalmente delineada, por isso há necessidade de se progredir com as investigações a fim de comprovar o possível potencial da técnica em reduzir sua incidência.

No que se refere às doenças infecciosas, a indicação clínica da edição gênica já é uma realidade. Alguns genes podem garantir aumento da resistência do indivíduo

21 CAVALIERI, G.: “Genome editing and assisted reproduction: curing embryos, society or prospective parents?”, *Medicine, Health Care and Philosophy*, 2017, pp. 1-11.

à infecção por diferentes patógenos. Nesse sentido, identificar tais genes para tentar amplificar seu efeito e aumentar a resistência a tais agentes, configuraria imunização efetiva²².

Apesar de serem ainda consideradas especulações, tais resultados serão impossíveis de serem alcançados se as pesquisas clínicas em células germinativas forem proibidas. Os estudos “in vivo”, em animais, indicam viabilidade das pesquisas clínicas de edição gênica em embriões humanos e, tendo em vista os grandes desafios em prevenir e tratar tais doenças, deve-se considerar os benefícios potenciais de tal técnica ainda mais significativos.

IV. RISCOS E BENEFÍCIOS.

Nos embriões em estágio de pré-implantação submetidos à edição gênica pode ocorrer, com alguma frequência, o mosaicismos. O embrião mosaico resulta de um corte ineficiente do DNA pela nuclease e/ou por reparação inapropriada do mesmo. Assim, mesmo após edição, irão coexistir diferentes tipos de células, as originais sem mutação (normais); as originais com mutação e as devidamente editadas (sem mutação). Logo, indivíduos mosaicos apresentam diferentes genomas.

No caso da linhagem germinativa, o mosaicismos, apesar de não determinar que o indivíduo seja afetado, não impede a transmissão dos genes com mutação para os descendentes²³.

Devido às limitações éticas e legais, o uso de embriões humanos nas pesquisas é restrito. Não só a disponibilidade, mas também a viabilidade dos mesmos, configuram obstáculos importantes a serem superados.

Existem diferentes categorias de embriões humanos que podem ser utilizados em pesquisas. Elas incluem embriões que não são viáveis ou não são adequados para tratamento de fertilidade, embriões viáveis supranumerários ou excedentários após tais tratamentos e embriões criados especificamente para pesquisa, resultantes de doações de ovócitos e esperma.

22 XU, L., YANG, H., GAO Y., et al: “CRISPR/Cas9 – mediated CCR5 ablation in human hematopoietic stem/progenitor cells confers HIV-1 resistance in vivo”, *American Society of Gene & Cell Therapy*, vol. 25, núm. 8, 2017.

23 “O mosaicismos é a presença em um indivíduo ou em um tecido de ao menos duas linhagens celulares geneticamente diferentes, porém derivadas de um único zigoto. As mutações que acontecem em uma única célula após a concepção, como na vida pós-natal, podem originar clones celulares geneticamente diferentes do zigoto original porque, devido à natureza da replicação do DNA, a mutação irá permanecer em todos os descendentes clonais dessa célula”. THOMPSON & THOMPSON: “Padrões de herança monogênica”, *Genética Médica*, cit., pp. 107-132.

Os embriões inviáveis não constituem primeira escolha, pois sendo de baixa qualidade podem exibir genomas anormais, o que comprometeria a análise dos resultados. Embriões excedentários, por já terem iniciado o processo de clivagem (estágio de uma célula), tornam a edição gênica mais desafiadora devido ao aumento de chance de ocorrerem mutações, visto que já foi comprovado que o momento da edição gênica influencia diretamente na ocorrência do mosaicismos²⁴.

Os embriões criados exclusivamente para fins de pesquisa, por sua vez, seriam os ideais do ponto de vista da técnica, já que encontram-se no estágio de zigoto ou mesmo antes da fertilização, fase em que o espermatozoide ainda se mantém com apenas uma cópia de DNA mutante, o que seguramente evita o mosaicismos²⁵.

Entretanto, a maioria dos países proíbe essa prática. As limitações se estendem também ao tempo disponível para proceder as investigações desses embriões “in vitro”, já que não se permite cultivá-los além da segunda semana do desenvolvimento (limite de 14 dias). Essa tem sido discussão atual e relevante: a possível extensão desse prazo²⁶.

Assim, diante de tais limitações, não se pode afirmar, ao certo, até que ponto os resultados comprovando índices relevantes de mosaicismos são devidos ao uso de embriões de qualidade duvidosa, utilização de técnicas mais antigas de edição gênica, ou ambos os fatores.

Com relação aos riscos associados às mutações não intencionais (mutações “off-target” ou fora do alvo) que podem ocorrer no genoma em decorrência da ação inespecífica e não pretendida da enzima Cas9, é importante estimar o dano para, assim, avaliar a real possibilidade de contra-indicação da técnica^{27 28}.

É inegável que toda pesquisa médica impõe riscos de danos previsíveis e imprevisíveis aos participantes, sendo esses rotineiramente considerados sob o ponto de vista ético. Nesse contexto, supor tolerância zero ao risco seria equivalente a impedir qualquer inovação clínica.

Sendo, no caso, o destinatário do risco de dano o embrião, faz-se necessário considerar as questões já intensamente discutidas em relação ao seu status.

24 REYES, A. and LANNER, F.: “Towards a CRISPR”, cit., pp. 3-7.

25 MA, H., MARTI-GUTIERREZ, N., PARK, SW., WU, J., LEE, Y. et al: “Correction of a pathogenic”, cit., pp. 1-7.

26 PERA, M., DE WERT, G., DONDRUP, W. et al.: “What if stem cells turn into embryos in a dish?”, *Nat Methods*, núm. 12, 2015, pp. 917-919.

27 MA, H., MARTI-GUTIERREZ, N., PARK, SW., WU, J., LEE, Y. et al: “Correction of a pathogenic”, cit., pp. 1-7.

28 Em condições fisiológicas, erros ou falhas podem ser introduzidos durante a replicação ou reparação do DNA. Essas alterações podem também ocorrer em virtude da ação de agentes físicos ou químicos – denominados agentes mutagênicos. THOMPSON & THOMPSON: “Diversidade genética humana: mutação e polimorfismo”, *Genética Médica*, cit., pp. 43-56.

Mesmo considerando-se eventuais danos ao embrião, há de se questionar se tais danos têm significância moral, ética e legal suficiente para justificar a proibição de pesquisas tão valiosas.

Fato é que, atualmente, são amplamente aceitas pesquisas que envolvem descartes de embriões humanos relacionados às técnicas de reprodução assistida. Assim, as justificativas tanto para a seleção de embriões, nas técnicas de diagnóstico pré-implantação, quanto a criação de embriões excedentários na técnica de fertilização "in vitro", fundamentam-se no status do embrião. Assim sendo, se tais práticas são permitidas, com base nesse argumento, como se pode sustentar que a eventual mutação "off-target", decorrente da edição gênica, seria inaceitável a ponto de se justificar a proibição das pesquisas?²⁹

Vale ressaltar, que se a técnica for aprimorada a ponto de ser considerada como opção terapêutica, poderá ser, inclusive, utilizada em substituição à técnica de diagnóstico pré-implantação evitando-se, assim, o descarte dos inúmeros embriões excedentários resultantes desse processo. Por outro lado, deve-se considerar que a técnica de diagnóstico pré-implantação pode ter sua aplicação para análise da viabilidade do embrião quanto à ocorrência de mutação "off-target". Assim, após edição gênica, seleciona-se o embrião com correto padrão de genoma, para então realizar a implantação. Dessa forma, não se estaria negando o risco de dano, mas evitando que esse dano torne-se moralmente significativo (Ex: nascimento de embrião com altas taxas de mutação). Ao contrário, estudos realizados em embriões triploides negam tal risco pois, nesses casos, a edição gênica foi realizada em embriões que não tinham nenhum potencial para nascer (sofrem aborto espontâneo)^{30 31}.

É preciso destacar, entretanto, que pouco se conhece sobre o risco real dessas mutações, provocadas pela edição gênica, gerarem doenças. Sabidamente, o genoma pode tolerar quantidade significativa de mutações sem necessariamente representar risco de doença. No mesmo sentido, ressalta-se que, existindo o risco, esse parece inexpressivo, na maioria dos casos, diante da certeza das consequências devastadoras das doenças que se pretende tratar pela técnica da edição gênica. Deve-se considerar, também, que mutações estão constantemente sendo introduzidas na linha germinativa humana. Fatores ambientais, tratamentos medicamentosos, alimentos, idade reprodutiva, entre outros, geram mutação do genoma humano, não necessariamente suficientes para provocar risco às futuras gerações³².

29 GYNGELL, C., FELLOW, M., DOUGLAS, T., SAVULESCU, J.: "The ethics", cit., pp. 498-513.

30 GYNGELL, C., FELLOW, M., DOUGLAS, T., SAVULESCU, J.: "The ethics", cit., pp. 498-513.

31 LIANG, P., XU, Y., ZHANG, X., et al.: "CRISPR/Cas9-mediated," cit., pp. 363-372.

32 ORMOND, K., MORTLOCK, D., SCHOLDS, D., et al: "Human Germline", cit., pp. 167-176.

Para reduzir tais riscos, os pesquisadores têm-se dedicado ao aprimoramento tecnológico produzindo guias de RNA e endonucleases Cas9 mais específicas e com maior fidelidade. Atualmente, é possível proceder, de forma prática e eficiente, a análise das possíveis mutações "off-target" geradas após utilização da técnica CRISPR/Cas9, bem como calcular seu efeito mutagênico correspondente - ferramenta de bioinformática. Esse avanço tecnológico, com certeza, contribui para maior segurança e acurácia da técnica de edição^{33 34 35}.

Ademais, estudos em gametas e zigoto humanos, em que foi utilizada proteína Cas9 recombinante, foi possível aumentar a especificidade da enzima e reduzir seu tempo de exposição o que provocou redução significativa na ocorrência do efeito "off-target"³⁶.

Conclui-se, pois, que o desenvolvimento de métodos que monitoram de forma mais eficiente a ocorrência das mutações "off-target" e que definem a frequência de ocorrência das mesmas no modelo humano já são uma realidade³⁷.

Assim, se as medidas de segurança em relação às mutações "off-target" continuarem a ser adotadas, não tem como supor que tais riscos se intensifiquem em longo prazo, a ponto de justificar a proibição da técnica de edição em embriões humanos. Com os avanços tecnológicos, os riscos serão certamente superados pelos benefícios potenciais da edição gênica para as gerações futuras.

Outra questão, também muito polêmica concernente à edição da linhagem germinativa humana, é o impacto que tais modificações irão gerar nas futuras gerações, sem que esses indivíduos tenham manifestado seu consentimento. Eticamente é aceito que, em relação às decisões médicas, os pais são geralmente os mais apropriados para decidir em nome dos filhos até que os mesmos adquiram capacidade. Além das decisões serem tomadas de acordo com os valores e crenças que irão certamente influenciar seus filhos futuramente, os pais são os maiores interessados em uma decisão acertada³⁸.

Argumenta-se, também, que muitas decisões tomadas pelos pais podem ser consideradas ameaça à autonomia dos filhos na medida em que restringem as

33 KLEINSTIVER, B., PATTANAYAK, M., TSAI, S., et al.: "High fidelity CRISPR-Cas9 (nucleases with no detectable genome-wide off-target effects)", *Nature*, núm. 529, 2016, pp. 490-495.

34 SLAYMAKER, I., GAO, L., SCOTT, D., et al.: "Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity," *Science*, núm. 351, 2015, pp. 84-88.

35 BOEL, A., STEYAERT, W., DE ROCKER, N.: "BATCH-GE: batch analysis", cit., pp. 30330.

36 MA, H., MARTI-GUTIERREZ, N., PARK, SW., et al: "Correction of a pathogenic", cit., pp. 1-7.

37 DE WERT, G., HEINDRYCKX, B., PENNING, G. et al.: "Responsible innovation in human germline gene editing: Background document to the recommendations of ESHG and ESHRE", *European Society of Human Genetics*, 2018.

38 ORMOND, K., MORTLOCK, D., SCHOLES, D., et al: "Human Germline", cit., pp. 167-176.

futuras escolhas dos filhos. Nesse contexto é importante destacar que, no caso, ocorre exatamente o oposto, ou seja, os pais agem expandindo as escolhas dos futuros filhos, já que ao eliminar a predisposição à futura doença, por meio da edição gênica, afasta-se uma série de restrições a que os mesmos estariam sujeitos ao longo de toda a vida.

Muitos questionam a autoridade dos “indivíduos atuais” para tomar decisões em nome das gerações futuras. Observa-se, entretanto, que em muitas outras situações, que certamente irão causar importantes efeitos em longo prazo, esse consentimento é sequer cogitado (Ex: impacto das poderosas tecnologias de comunicação). Portanto, questão importante em todas as situações em que se expõe indivíduos que não puderam consentir a riscos, é saber se os benefícios usufruídos por eles superariam os riscos. No caso da edição gênica, dependendo da doença genética que se pretende evitar, o benefício para o indivíduo é existencial, pois as limitações são tão graves que podem comprometer a vida³⁹.

Ainda nesse sentido, outra questão que se impõe é que apesar da ênfase dada à necessidade do consentimento, os defensores dessa tese não indicam uma solução para a questão de como proceder para obter, no caso da edição gênica de embriões, o consentimento. E ainda, se todas as decisões relativas à procriação afetam a geração futura, seria também necessário obter tal consentimento, nessa situação? Como fazer? Logo, como é impossível conseguir o consentimento de pessoas que ainda não existem, não se deve proceder essa análise sob a ótica das gerações futuras^{40 41}.

Argumento também extensamente utilizado ao se questionar a modificação do genoma humano, “pool” genético humano, pela técnica de edição gênica é o desrespeito à dignidade humana. Assim, atribui-se tal desrespeito à ideia de que a espécie humana, como tal, não estaria sendo respeitada na medida em que o patrimônio genético -herança comum- ou seja, de toda a humanidade - estaria sendo modificado. Nesse sentido, algumas ponderações são necessárias.

Seria equivocado definir o “pool” genético humano como um catálogo fixo de todos os genes humanos, e nem tampouco determinar que esse “catálogo atual” deva receber um status especial. Além disso, para o bem da humanidade, o “pool” genético deve continuar a evoluir, já que reflete adaptação evolutiva da espécie ao meio em que está inserida. A objeção a tais modificações significa considerar que toda mutação reflete um problema negando-se, portanto, a importância das modificações adaptativas. É sabido que a maioria das variantes no genoma,

39 GYNGELL, C., FELLOW, M., DOUGLAS, T., SAVULESCU, J.: “The ethics”, cit., pp. 498-513.

40 HARRIS, J.: *Enhancing evolution. The ethical case for making better people*, Princeton University Press, Princeton, 2010.

41 GYNGELL, C., FELLOW, M., DOUGLAS, T., SAVULESCU, J.: “The ethics”, cit., pp. 498-513.

comuns ou raras, refletem diferenças na sequência de DNA que não têm nenhum significado clínico⁴².

Assim, sendo a técnica utilizada para corrigir defeitos e restaurar a saúde em futuras crianças, é difícil visualizar como isso refletiria negativamente na dignidade humana^{43 44}.

V. AUTONOMIA REPRODUTIVA.

Considerando-se a realidade reprodutiva de futuros pais com alto risco de terem filhos afetados por sérias doenças genéticas, pode-se dizer que com a técnica de edição gênica cria-se mais uma alternativa reprodutiva estendendo as opções e, assim, garantindo maior autonomia reprodutiva aos mesmos⁴⁵.

Na realidade, o que ocorre é bem mais do que oferecer uma ferramenta tecnológica adicional para reprodução assistida, pois o que se oferece é opção, nos casos em que todas as outras técnicas falharam, de garantir filhos biológicos saudáveis, bem como seus descendentes⁴⁶.

VI. IMPACTOS SOCIAIS.

Outro aspecto, pertinente ao tema, seria a discussão em torno das questões éticas de repercussão social, relativas à técnica de edição gênica em embriões humanos. Assim, faz-se necessário analisar as práticas eugênicas, o aprimoramento e a questão da acessibilidade a tais tecnologias.

Uma preocupação comum, no que diz respeito à edição gênica de embriões humanos, relaciona-se ao seu uso como ferramenta para aprimoramento humano, e não apenas para prevenir e tratar doenças. Nesse sentido, o aprimoramento torna-se preocupação na medida em que pode ser utilizado para reforçar o preconceito ou restringir a diversidade gênica nas futuras gerações, bem como estreitar o conceito de normalidade^{47 48}.

42 THOMPSON & THOMPSON: "Diversidade genética humana: mutação e polimorfismo", *Genética Médica*, cit., pp. 43-56.

43 CAVALIERI, G.: "Genome editing", cit., pp. I-II.

44 DE WERT, G., HEINDRYCKX, B., PENNING, G. et al.: "Responsible innovation in human germline gene editing: Background document to the recommendations of ESHG and ESHRE", *European Society of Human Genetics*, 2018.

45 DE WERT, G., HEINDRYCKX, B., PENNING, G. et al.: "Responsible innovation in human germline gene editing: Background document to the recommendations of ESHG and ESHRE", *European Society of Human Genetics*, 2018.

46 CAVALIERI, G.: "Genome editing", cit., pp. I-I.

47 ORMOND, K., MORTLOCK, D., SCHOLLS, D., BOMBARD, Y., BRODY, L., FAUCETT, W. et al: "Human Germline", cit., pp. 167-176.

Existem muitas expectativas em relação a utilização da técnica de edição com objetivo de se obter o aprimoramento genético “máximo” da espécie humana – “designer babies”. Entretanto, estudos recentes comprovam que trata-se, ainda, de uma ficção científica na medida em que exigiria uma série de modificações complexas e simultâneas do DNA. Além disso, as características potencialmente desejáveis -alvo da edição- teriam que ser determinadas predominantemente pelo DNA, o que já ficou comprovado que nem sempre ocorre⁴⁸.

Merece destacar que, essas situações são consideradas como uso indevido da edição gênica em embriões humanos, não se tratando de indicação médica. Portanto, não deveriam ser utilizadas como argumento para justificar a proibição do uso da técnica quando essa apresenta finalidade preventiva-terapêutica⁴⁹.

Sabe-se que muitas tecnologias utilizadas na medicina tem a finalidade de aprimoramento, embora isso não seja razão suficiente para proibir ou restringir seu uso (Ex: cirurgias plásticas, diagnóstico pré-implantação). Portanto, não existe motivo para supor que com a técnica da edição gênica seria diferente.

De toda forma, o risco dessas práticas é inegável, o que enfatiza a necessidade da pesquisa continuada e da cuidadosa regulamentação de quaisquer de suas aplicações⁵⁰.

Outro aspecto importante a ser analisado é a acessibilidade à técnica. É notório que quando implementadas clinicamente, essas técnicas, certamente irão representar custo elevado o que pode, inclusive, dificultar sua oferta via planos de saúde. Mesmo que a edição gênica, por si, não seja técnica dispendiosa, para sua implementação clínica é necessário associá-la às técnicas de reprodução assistida, fertilização “in vitro” e diagnóstico pré-implantação que, sabidamente, são onerosas. Assim, inevitavelmente, esse fato poderá limitar o acesso de alguns grupos sociais a essa tecnologia criando-se, desta forma, desigualdade de oportunidades^{51 52}.

Não só as diferenças socioeconômicas mas, também, as culturais e intelectuais podem influenciar na acessibilidade à essas terapias, pois são aspectos que

48 JANSSENS, A.C.J.W.: “Designing babies through gene editing: science or science fiction?”, *Genet Med.*, núm. 18, 2016, pp. 1186-1187.

49 DE WERT, G., HEINDRYCKX, B., PENNING, G. et al.: “Responsible innovation in human germline gene editing: Background document to the recommendations of ESHG and ESHRE”, *European Society of Human Genetics*, 2018.

50 GYNGELL, C., FELLOW, M., DOUGLAS, T., SAVULESCU, J.: “The ethics”, cit., pp. 498-513.

51 VASSENA, R., HEINDRYCKX, B., PECO, R. et al.: “Genome engineering through CRISPR/Cas9 technology in the human germline and pluripotent stem cells”, *Human Reproduction - update advanced access*, 2016.

52 DE WERT, G., HEINDRYCKX, B., PENNING, G. et al.: “Responsible innovation in human germline gene editing: Background document to the recommendations of ESHG and ESHRE”, *European Society of Human Genetics*, 2018.

interferem na questão do entendimento e aceitação da indicação clínica da edição gênica⁵³.

Entretanto, essas questões de acessibilidade podem ser atenuadas, em grande parte, pelos programas de saúde pública – investimento de recursos públicos; o patenteamento e comercialização da técnica. Certamente, a inequidade social deve ser algo a ser combatido, mas jamais uma justificativa para impedir o avanço dessa tecnologia.

VII. CONCLUSÃO.

A técnica de edição gênica (CRISPR/Cas9) é considerada um dos maiores avanços da ciência na era moderna. Por meio desta técnica é possível manipular o DNA humano, o que constitui ferramenta revolucionária no mapeamento de doenças graves, de caráter hereditário, frequentemente incuráveis. O assunto, embora polêmico em relação aos aspectos éticos, traz consigo uma gama imensa de possibilidades que vão desde indicações preventivas até terapêuticas em diferentes afecções monogênicas hereditárias e distúrbios poligênicos.

Seu papel não se limita às doenças hereditárias, mas é muito mais abrangente uma vez que a edição gênica pode interferir na resistência do sistema imunológico favorecendo o combate aos agentes etiológicos de diferentes doenças infecciosas graves.

Inicialmente restrita à linhagem de células somáticas (sem potencial para gerar gametas), a edição gênica, a partir de 2015, tem também sido considerada na linhagem germinativa possibilitando manipulação de sequências do DNA de embriões humanos. Esse processo impacta não só o indivíduo como seus descendentes o que faz avultar, ainda mais, as implicações de caráter biomédico, bioético e legais.

Sua contribuição para a compreensão da gênese das doenças genéticas e do desenvolvimento embrionário humano é inquestionável. Com os avanços tecnológicos ela tende a ser conduzida de maneira cada vez mais segura, gerando riscos aceitáveis e gerenciáveis, garantindo benefícios que superam os danos. Desse modo, alterações indesejáveis como o mosaicismo e as mutações "off - target", deverão ser abolidas ou cada vez menos frequentes.

Embora ainda exista consenso global no sentido de não se permitir a modificação gênica de células germinativas humanas, o progresso inquestionável da ciência

53 Ormond, K., Mortlock, D., Scholes, D., et al.: "Human Germline", cit., pp. 167-176.

nessa área tem potencial para superar as inúmeras adversidades impostas pelas limitações e restrições que o tema impõe.

Sua proibição representa um retrocesso inquestionável. Argumentos teóricos devem ser considerados, respeitados e avaliados dentro de valores éticos bem fundamentados mas não devem constituir empecilhos incontornáveis. Diálogos interdisciplinares serão sempre necessários e desejáveis no sentido de ponderar as regras já existentes, delineando e estabelecendo novos paradigmas objetivando promover as adequações pertinentes.

“Não existem atalhos para a sabedoria”. A Ciência não caminha para trás. O processo científico é exigente, e deve ser construído de forma gradual e contínua.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKI, M., ISHII, T.: "International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization", *Reprod Biol Endocrinol*, núm. 12, 2014.

BERIAN, I.: "Legal issues regarding gene editing at the beginning of life: an EU perspective", *Regenerative Medicine*, 2017.

BOEL, A., STEYAERT, W., DE ROCKER, N.: "BATCH-GE: batch analysis of next generation sequencing data for genome editing assessment", *Sci Rep.*, núm 6, 2016.

CAVALIERI, G.: "Genome editing and assisted reproduction: curing embryos, society or prospective parentes?", *Medicine, Health Care and Philosophy*, 2017.

DE WERT, G., HEINDRYCKX, B., PENNINGS, G., CLARKE, A., EICHENLAUB-RITTER, U., VAN EL, C., FORZANO, F., GODDIJN, M., HOWARD, H., RADOJKOVIC, D., RIAL-SEBBAG, E., DONDORP, W., TARLATZIS, B., CORNEL, M.: "Responsible innovation in human germline gene editing: Background document to the recommendations of ESHG and ESHRE", *European Society of Human Genetics*, 2018.

DE WERT, G., PENNINGS, G., CLARKE, A., EICHENLAUB-RITTER, U., VAN EL, C., FORZANO, F., GODDIJN, M., HEINDRYCKX, B., HOWARD, H., RADOJKOVIC, D., RIAL-SEBBAG, E., TARLATZIS, B., CORNEL, M.: "Human germline gene editing: Recommendations of ESHG and ESHRE", *European Journal of Human Genetics*, 2018.

GOOSSENS, E., VAN SAEN, D., THOURNAYE, H.: "Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic", *Hum Reprod.*, núm. 28, 2013.

GYNGELL, C., FELLOW, M., DOUGLAS, T., SAVULESCU, J.: "The ethics of germline gene editing", *J Appl Philos.*, núm. 34 (4), 2017.

HARRIS, J.: *Enhancing evolution. The ethical case for making better people*, Princeton University Press, Princeton, 2010.

HASHIMOTO, M., YAMASHITA, Y., TAKEMOTO, T.: "Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse", *Dev Biol.*, núm. 418, 2016.

ISHII, T.: "Germ line genome editing in clinics: the approaches, objectives and global society", *Briefings in Functional Genomics*, 2015.

JANSSENS, A.C.J.W.: "Designing babies through gene editing: science or science fiction?", *Genet Med.*, núm. 18, 2016.

KANG, X., HE, W., HUANG, Y.: "Introducing precise genetic modifications into 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing", *J Assist Reprod Genet.*, núm. 33, 2016.

KANG, Y., ZHENG, B., SHEN, B.: "CRISPR/Cas9-mediated Dax 1 knockout in the monkey recapitulates AHC-HH", *Hum Mol Genet.*, núm. 24, 2015.

KLEINSTIVER, B., PATTANAYAK, M., TSAI, S., NGUYEN, N., ZHENG, Z., JOUNG, J.: "High fidelity CRISPR-Cas9 (nucleases with no detectable genome-wide off-target effects)", *Nature*, núm. 529, 2016.

LIANG, P., XU, Y., ZHANG, X., DING, C., HUANG, R., ZHANG, Z., LV, J., XIE, X., CHEN, Y., LI, Y., SUN, Y., BAI, Y., SONGYANG, Z., MA, W., ZHOU, C., HUANG, J.: "CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes", *Protein Cell*, vol. 6, núm. 5, 2015.

MA, H., MARTI-GUTIERREZ, N., PARK, S.W., WU, J., LEE, Y.: "Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos", *Nature*, 2017.

ORMOND, K., MORTLOCK, D., SCHOLES, D., BOMBARD, Y., BRODY, L., FAUCETT, W., GARRISON, N., HERCHER, L., ISASI, R., MIDDLETON, A., MUSUNURU, K., SHRINER, D., VIRANI, A., YOUNG, C.: "Human Germline Genome Editing", *The American Journal of Human Genetics*, núm. 101, 2017.

PERA, M., DE WERT, G., DONDRUP, W.: "What if stem cells turn into embryos in a dish?", *Nat Methods*, núm. 12, 2015.

REYES, A. and LANNER, F.: "Towards a CRISPR view of early human development: applications, limitations and ethical concerns of genome editing in human embryos", *The Company of Biologists*, núm. 144, 2017.

SLAYMAKER, I., GAO, L., SCOTT, D., YAN, W., ZHANG, F.: "Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity," *Science*, núm. 351, 2015.

THOMPSON & THOMPSON: "A herança complexa dos distúrbios multifatoriais comuns", *Genética Médica*, Elsevier, Rio de Janeiro, 2016.

THOMPSON & THOMPSON: “Diversidade genética humana: mutação e polimorfismo”, *Genética Médica*, Elsevier, Rio de Janeiro, 2016.

THOMPSON & THOMPSON: *Genética Médica*, Elsevier, Rio de Janeiro, 2016.

THOMPSON & THOMPSON: “Padrões de herança monogênica”, *Genética Médica*, Elsevier, Rio de Janeiro, 2016.

VASSENA, R., HEINDRYCKX, B., PECO, R. et al.: “Genome engineering through CRISPR/Cas9 technology in the human germline and pluripotent stem cells”, *Human Reproduction - update advanced access*, 2016.

WOODS, DC. and TILLY, J. L.: “Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human varies”, *Nat Protoc.*, núm. 6, 2013.

XU, L., YANG, H., GAO, Y., CHEN, Z., XIE, L., LIU, Y., LIU, Y., WANG, X., LI, H.: “CRISPR/Cas9 – mediated CCR5 ablation in human hematopoietic stem/progenitor cells confers HIV-1 resistance in vivo”, *American society of gene & cell therapy*, 2017.

YOSHIMI K, KANEKO, T., VOIGT, B.: “Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas plataforma”, *Nat Commun*, núm. 5, 2014.