

**FACULDADE DE ENFERMAGEM NOVA ESPERANÇA DE MOSSORÓ  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

**JOSÉ MAURÍCIO DE BRITO JÚNIOR**

**USO DO SISTEMA CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT  
PALINDROMICS REPEATS (CRISPR)-CAS9 NO TRATAMENTO DE  
NEOPLASIAS MALIGNAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

**MOSSORÓ/RN  
2021**

JOSÉ MAURÍCIO DE BRITO JÚNIOR

USO DO SISTEMA CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT  
PALINDROMICS REPEATS (CRISPR)-CAS9 NO TRATAMENTO DE NEOPLASIAS  
MALIGNAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Monografia apresentada pelo aluno José Maurício de Brito Júnior do curso de graduação em Biomedicina na Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Rosueti Diógenes de Oliveira Filho.

MOSSORÓ/RN  
2021

Faculdade Nova Esperança de Mossoró/RN – FACENE/RN.  
Catalogação da Publicação na Fonte. FACENE/RN – Biblioteca Sant'Ana.

B862u Brito Júnior, José Maurício de.

Uso do sistema clustered regularly interspaced short palindromics repeats (CRISPR)-CAS9 no tratamento de neoplasias malignas: uma revisão sistemática / José Maurício de Brito Júnior. – Mossoró, 2021.

43 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Rosueti Diógenes de Oliveira Filho.  
Monografia (Graduação em Biomedicina) – Faculdade Nova Esperança de Mossoró.

1. CRISPR-Associated Protein 9. 2. Cas9 Endonuclease.  
3. Carcinoma. I. Oliveira Filho, Rosueti Diógenes de. II. Título.

CDU 616-006.6

**JOSÉ MAURÍCIO DE BRITO JÚNIOR**

**USO DO SISTEMA CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT  
PALINDROMICS REPEATS (CRISPR)-CAS9 NO TRATAMENTO DE  
NEOPLASIAS MALIGNAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Monografia apresentada pelo aluno José Maurício de Brito Júnior do curso de graduação em Biomedicina na Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Rosueti Diógenes de Oliveira Filho.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Banca examinadora

---

Prof. Dr. Rosueti Diógenes de Oliveira Filho  
FACENE/RN (Orientador)

---

Prof. Dra. Jéssica Costa de Oliveira  
FACENE/RN

---

Prof. Dra. Karoline Rachel Teodósio de Melo  
FACENE/RN

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, à Deus pelo dom da vida e sabedoria para buscar meus objetivos.

À minha família, em especial aos meus pais, Maria Eleneide Fernandes de Brito e José Maurício de Brito, por lutarem todos os dias para que eu possa estar aqui.

Ao meu orientador professor Rosueti Diógenes e a banca examinadora, pela dedicação e apoio na construção desse trabalho.

Não poderia esquecer dos meus amigos, que sempre me proporcionaram momentos de felicidades e alívio, não só durante a construção dessa monografia, mas também durante toda minha vida.

Por fim, a todos meus professores, que contribuíram para a minha formação como profissional e pessoa.

## RESUMO

O câncer é definido como um grupo de mais de cem doenças que tem como característica comum o crescimento descontrolados de células defeituosas, tendo elevadas taxas de morbimortalidade. A dificuldade para realizar um diagnóstico rápido e eficaz, bem como os altos índices de efeitos colaterais causados pelos tratamentos habituais vêm sendo grandes incentivadores para a realização de novos estudos que buscam suprir esse déficit. Nesse âmbito, o sistema CRISPR/Cas9 surge como uma ferramenta promissora, que vem sendo estudada na última década para ser utilizada para o tratamento, diagnóstico e avaliação de novos alvos para a terapia do câncer. O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão sistemática dos estudos de terapia gênica no tratamento de neoplasias malignas utilizando o sistema CRISPR/Cas9. A pesquisa foi realizada entre os meses de fevereiro e março de 2021, nas bases de dados Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Biblioteca Nacional de Medicina (PubMed) e Science Direct, utilizando os descritores: ‘CRISPR-Associated Protein 9’, ‘Cas9 Endonuclease’ e ‘Carcinoma’, com o operador lógico “AND”, de modo a combinar os termos. Como resultados, inicialmente foram encontrados 11.651 artigos, seguida de filtração e seleção de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, totalizando-se 22, dentre estudos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. As evidências encontradas pelos autores denotam, quase em sua totalidade, que a técnica CRISPR/Cas9 é uma alternativa promissora para o combate a diversos tipos de câncer, atuando principalmente através do *knock out* de oncogenes, estimulando a apoptose das células defeituosas e reduzindo a progressão tumoral. Assim, essa revisão sistemática tem grande importância servindo como base de conhecimento para futuros trabalhos que envolvam a utilização de CRISPR/Cas9 para o tratamento do câncer, trazendo grandes contribuições para a área de terapia genética e biologia molecular.

Palavras-chaves: CRISPR-Associated Protein 9, Cas9 Endonuclease, Carcinoma.

## ABSTRACT

Cancer is defined as a group of more than one hundred diseases whose common characteristic is the uncontrolled growth of defective cells, with high rates of morbidity and mortality. The difficulty in making a quick and effective diagnosis, as well as the high rates of side effects caused by the usual treatments, have been great incentives for the realization of new studies that seek to fill this deficit. In this context, CRISPR/Cas9 system emerges as a promising tool, which has been studied in the last decade to be used for the treatment, diagnosis and evaluation of new targets for cancer therapy. The present work aimed to carry out a systematic review of gene therapy studies in the treatment of malignancies using the CRISPR/Cas9 system. The research was carried out between February and March 2021, in the databases Virtual Health Library (VHL), National Library of Medicine (PubMed) and Science Direct, using the descriptors: 'CRISPR-Associated Protein 9', ' Cas9 Endonuclease 'and' Carcinoma ', with the logical operator “AND”, in order to combine the terms. As results, 11,651 articles were initially found, followed by filtration and selection according to the inclusion and exclusion criteria, totaling 22, among studies *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo*. The evidence found by the authors shows, almost in its entirety, that the CRISPR/Cas9 technique is a promising alternative for combating several types of cancer, acting mainly through the *knock out* of oncogenes, stimulating the apoptosis of defective cells and reducing the progression tumor. Thus, this systematic review is of great importance, serving as a knowledge base for future studies involving the use of CRISPR/Cas9 for the treatment of cancer, bringing great contributions to the area of gene therapy and molecular biology.

Keywords: CRISPR-Associated Protein 9, Cas9 Endonuclease, Carcinoma.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Componentes do CRISPR-Cas9.....	17
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de reparo NHEJ e HDR.....	19
<b>Figura 3.</b> Criação de uma tela de CRISPR.....	22
<b>Figura 4.</b> Fluxograma do resultado da busca, seleção e inclusão dos estudos.....	26



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características dos artigos incluídos na revisão sistemática sobre os estudos do CRISPR/Cas9 para tratamento de neoplasias malignas.....	27
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AAV</b>	Vírus Adeno Associados
<b>Akt</b>	Proteína Quinase B
<b>APC</b>	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
<b>BRCA</b>	<i>Breast Cancer</i>
<b>BVS</b>	Biblioteca Virtual em Saúde
<b>Cdk5</b>	Quinase 5 Dependente da Ciclina
<b>CDKs</b>	Quinases Dependentes de Ciclinas
<b>C-erbB-2</b>	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico
<b>CHC</b>	Carcinoma Hepatocelular
<b>CRISPR</b>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromics Repeats
<b>CRISPRa</b>	CRISPR Activation
<b>CRISPRi</b>	CRISPR Interference
<b>crRNA</b>	Crispr RNA
<b>DSB</b>	Quebra da Cadeia Dupla
<b>dCas9</b>	Cas9 Modificada e Inativa
<b>EGFR</b>	Receptor do Fator de Crescimento
<b>EZH2</b>	O Potenciador do Homólogo Zeste 2
<b>GBM</b>	Glioblastoma
<b>GluII<math>\beta</math></b>	Subunidade Beta da Glucosidade II
<b>HBsAg</b>	Antígeno de Superfície de Vírus da Hepatite B
<b>HDR</b>	Reparo Dirigido por Homologia
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator 1 $\alpha$ Induzível por Hipóxia.
<b>HPV</b>	Vírus Epstein Barr
<b>IL-6</b>	Interleucina 6.
<b>Mcl-1</b>	Proteína de Fiferenciação Celular de Leucemia Mieloide Induzida
<b>MLH1</b>	Gene MR Mutl Homólogo 1
<b>NHEJ</b>	Junção de Extremidades Não Homólogas
<b>NRF2</b>	Fator Nuclear 2 Relacionado ao Eritroide 2
<b>NSD1</b>	Proteína 1 do Domínio SET de Ligação ao Receptor Nuclear
<b>PAM</b>	Motivo Adjacente Protoespaçador
<b>PCM1</b>	Material Pericentriolar 1

<b>PD-1</b>	Proteína de Morte Celular Programada
<b>PD-L1</b>	Receptor Ligante de Proteína de Morte Celular Programada
<b>PH</b>	Domínio Quinase
<b>PI3K</b>	Via Fosfoinosítido 3-quinase
<b>PTEN</b>	Fosfatase Homóloga à Tensina
<b>PubMed</b>	Biblioteca Nacional de Medicina
<b>Rb</b>	Proteína do Retinoblastoma
<b>RC21</b>	Linha de Células de Carcinoma de Células Renais
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA Mensageiro
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteínas
<b>RTKs</b>	Receptores de Tirosina Quinases
<b>SAHA</b>	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
<b>SASH1</b>	Proteína 1 Contendo o Domínio SAM e SH3
<b>sgRNA</b>	RNA Guia
<b>SMAD4</b>	Gene Mothers Against Decapentaplegic Homolog
<b>TCR</b>	Receptor de Células T Endógenas
<b>TMZ</b>	Temozolomida
<b>TNBC</b>	Câncer de Mama Triplo-negativo
<b>tracrRNA</b>	RNA Transativador
<b>TTCR</b>	Células T transgênicas
<b>VPR</b>	VP64-p65-Rta

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 CÂNCER.....	14
2.2 TRATAMENTOS PADRÕES PARA O CÂNCER.....	15
2.3 CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS (CRISPR).....	16
2.3.1 Histórico.....	16
2.3.2 Componentes e mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas9.....	17
2.3.3 Tipos de reparos.....	18
2.4 MÉTODOS DE ENTREGA.....	18
2.5 CRISPR-CAS9 COMO FERRAMENTA DE EDIÇÃO GÊNICA.....	19
2.5.1 <i>Knock out</i> .....	19
2.5.2 <i>Knock in</i> .....	20
2.5.3 CRISPR interference (CRISPRi).....	20
2.5.4 CRISPR activation (CRISPRa).....	21
2.5.5 Telas de CRISPR/Cas9.....	21
2.5.6 Desenvolvimento de organoides.....	22
2.6 ESTUDOS CLÍNICOS ENVOLVENDO O CRISPR/Cas9.....	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1 PESQUISA SISTEMÁTICA DE LITERATURA.....	24
3.2 ESTRATÉGIAS DE BUSCAS E SELEÇÃO.....	24
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DE ESTUDOS.....	24
3.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas (câncer) são compreendidas como um grupo de mais de cem doenças que tem como característica comum o crescimento descontrolados de células defeituosas. Essas células podem invadir órgãos, sistemas e tecidos adjacentes, acarretando uma disfuncionalidade geral do organismo, podendo levar o indivíduo à morte (ZAIMY *et al*, 2017).

O câncer tem se tornado um problema de saúde pública recorrente com grande magnitude epidemiológica, social e econômica, se tornando uma doença de difícil combate que vem sendo enfrentada pelo sistema de saúde brasileiro ao longo dos anos. É uma patologia responsável por uma elevada taxa de morbimortalidade, e ainda hoje, suas causas não são conhecidas em sua totalidade, surgindo ao longo dos anos estudos que buscaram compreender e desvendar os mecanismos biológicos e patológicos que estão envolvidos no desenvolvimento desordenado de células tumorais (ZAIMY *et al*, 2017).

Fatores internos e externos como a hereditariedade, a influência do ambiente e estilo de vida influenciam diretamente no risco de desenvolvimento de uma neoplasia. Em conformidade com os estudos, há um consentimento geral na comunidade científica de que os fatores intrínsecos e extrínsecos desencadeiam uma mutação genética que altera o ciclo reprodutivo da célula através da inibição de supressores tumorais e ativação de oncogenes (MARTINEZ-LAGE *et al.*, 2018).

Zaimy *et al* (2017) relatam que o aparecimento de sintomas pode variar de acordo com o tecido afetado, sua função, a atividade funcional do organismo e a pressão que o tumor exerce sobre as áreas adjacentes, podendo levar de meses a anos para aparecerem. As características anteriormente citadas também influenciam no tipo de sintoma que virá a aparecer. Entretanto, alguns deles são comuns à maioria dos cânceres, como fraqueza, mal-estar, edema de linfonodos, infecções recorrentes, perda de peso, sangramento contínuo e dor.

O diagnóstico também irá variar de acordo com a localização do tumor, mas de modo geral, são utilizados exames bioquímicos, de imagem e biópsia de um fragmento do tumor ou tecido (MARTINEZ-LAGE *et al.*, 2018). Rodrigues *et al.* (2019), enfatizam que o rastreamento precoce do câncer aumenta a taxa de sucesso no tratamento, reduzindo o risco de sequelas e morte. Ademais, o médico da atenção básica, levando em conta cada individualidade, deve orientar seu paciente acerca dos sinais que podem vir a dar indícios de uma malignidade tumoral para que ele busque ajuda médica o mais rápido possível.

A confirmação de um diagnóstico de câncer causa um grande impacto à vida do paciente e a das pessoas ao seu entorno. É a partir dela que o paciente passará a ter uma nova rotina, que será influenciada pelos métodos de tratamento escolhido pela equipe que o atende. A escolha

do tratamento deve levar em conta todo o estado de saúde do paciente, bem como as ferramentas dispostas à serviço do sistema de saúde. Os meios mais comuns de terapia incluem: radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, cirurgias de retirada ou transplante e imunoterapia (MATTOS, 2016).

Zhan *et al.* (2019) descrevem que paralelamente ao progresso das terapias e métodos de prevenção oncológico, houve também avanços nos estudos para o entendimento dos mecanismos de resistência do câncer, bem como nos processos bioquímicos envolvidos na expansão tumoral. Também ressaltam que embora os avanços tenham contribuído bastante para a melhora da sobrevida e até mesmo a cura, para muitos outros, as opções de tratamentos tradicionais têm muitas limitações e ainda necessitam de um diagnóstico precoce para um aumento das chances de cura.

Com a descoberta recente do sistema Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR), em português, repetições palindrômicas curtas, agrupadas e regularmente interpassadas, a comunidade científica observou que a edição gênica pode ser uma das alternativas na terapia do câncer e outras doenças causadas por defeitos em genes específicos (ZHAN *et al.*, 2019).

Estudos de 2007 mostraram que o sistema CRISPR fazia parte da imunidade de algumas bactérias contra bacteriófagos. Porém, apenas entre os anos de 2011 e 2013 esse mecanismo foi elucidado pela Emmanuelle Charpentier, uma microbiologista francesa, e sua equipe. Em sua pesquisa, ela observou que a união de um RNA guia com uma endonuclease chamada Cas formava um complexo de ribonucleoproteína (RNP), chamado de CRISPR/Cas9, que era capaz de clivar o DNA do vírus invasor em bactérias da espécie *Streptococcus pyogenes*, tornando-o inativo (MORANGE, 2015).

Nesse contexto, os pesquisadores observaram que esse mecanismo poderia ser utilizado para realizar diversos experimentos envolvendo a deleção, inativação, ativação ou edição de genes, incluindo estudos em busca de tratamentos efetivos contra as mutações no ciclo reprodutivo das células que causam as neoplasias (MARTINEZ-LAGE *et al.*, 2018; MORANGE, 2015).

A versatilidade e especificidade da técnica são duas características fortes que deixa à frente das técnicas normalmente usadas para a edição gênica, como é o caso do RNA de interferência. Nessa técnica é possível silenciar um ou mais genes através da destruição dos transcritos. Diferente do CRISPR/Cas9, nessa técnica não temos controle direto sobre qual gene será silenciado. Com relação à versatilidade, o CRISPR/Cas9 além de permitir a edição

genética, permite também a criação de métodos de triagem e rastreamento genômico que podem ser utilizados para descobrir novos alvos para a terapia do câncer (ZHAN *et al.*, 2019).

Assim, o presente trabalho faz-se necessário para avaliar e elencar, através de uma revisão sistemática, os principais estudos envolvendo o sistema CRISPR/Cas9 no tratamento de neoplasias malignas, bem como ressaltar as principais formas como esse mecanismo pode ser utilizado no tratamento do câncer. Tendo como objetivo geral realizar uma revisão sistemática dos estudos de terapia gênica no tratamento de neoplasias malignas utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Ainda, como objetivos específicos evidenciar os mecanismos genéticos envolvidos na carcinogênese, descrever a técnica CRISPR/Cas9, seus componentes e mecanismo de ação, elencar as formas de tratamento do câncer utilizando a técnica CRISPR/Cas9, além de analisar as perspectivas futuras desse sistema.

Nesse contexto, para a elaboração desse trabalho foi considerada a seguinte questão: como o sistema CRISPR/Cas9 pode contribuir para o tratamento do câncer e até que ponto ele pode ser eficaz?

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CÂNCER

O ambiente ao redor do indivíduo e sua herança genética têm influência sobre os mecanismos que regulam a divisão celular. Fisiologicamente, o ciclo celular é duramente regulado para que não haja mutações a ponto de gerar efeitos deletérios ao organismo (MARTINEZ-LAGE *et al.*, 2018). Quando há dano genético nas células de um tecido é aberta uma brecha nos mecanismos de regulação e apoptose celular, ocasionando uma série de divisões mitóticas de células defeituosas, de modo desenfreado que resultam em um câncer (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002)

Os tumores podem ser classificados em benignos, quando permanecem em seu local de origem, e em malignos, quando possuem a capacidade de se multiplicar e invadir os tecidos adjacentes. Independentemente da sua classificação, a multiplicação tumoral ocorre quando há defeitos em genes supressores de tumores e nos oncogenes (genes responsáveis por codificar proteínas que controlam o ciclo de divisão da célula) (LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002).

De acordo com Lopes, Oliveira e Prado (2002), genes supressores de tumores são genes recessivos que levam ao aparecimento do tumor somente quando se encontram inativos ou pouco expressos em ambos os cromossomos. Por outro lado, os oncogenes são genes dominantes que quando expressados codificam proteínas que favorecem o descontrole no ritmo de crescimento celular. Dessa forma, o câncer é basicamente uma doença do DNA.

Os principais genes supressores de tumor envolvidos no processo de regulação são o gene P53, o *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) e o *breast cancer* (BRCA) 1 e 2. O primeiro, quando fosforilado atua como um fator de transcrição no próprio gene ativando o gene P21 que codifica a proteína de mesmo nome. A proteína P21 induz um feedback negativo na produção de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e das ciclinas, reduzindo a sua síntese. Essas proteínas atuam na transição entre as fases da divisão celular, principalmente de G1 para S e de G2 para M. Quando esse gene se encontra inativo ou pouco expresso a produção de CDKs e ciclinas não é interrompida, favorecendo o descontrole celular (WARD, 2002).

O Gene p53 também atua estimulando a via das caspases no processo de apoptose celular e na ativação da DNA polimerase III, que é responsável pelo mecanismo de reparo do DNA. Os genes APC e BRCA 1 e 2 também atuam na regulação da síntese de CDKs e ciclinas, com efeito de feedback negativo (WARD, 2002).

Regulando positivamente a produção das CDKs e ciclinas, tem-se os genes myc e ras. O primeiro, quando fosforilado atua como um fator de transcrição para a produção dos reguladores cíclicos estimulando o processo de mitose. O segundo codifica a proteína de mesmo



nome que atua como uma proteína de transmembrana interagindo com receptores de fatores de crescimento celular na fase G1 do ciclo (WARD, 2002; LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002).

Uma das teorias mais aceitas é que o câncer ocorre devido ao nocaute (inativação) dos genes supressores de tumores, juntamente com uma superexpressão dos oncogenes. Esses dois processos causam a produção aumentada das CDKs e ciclinas, levando a síntese elevada de fatores de crescimento e fuga dos mecanismos de apoptose e reparo do DNA. O resultado dessa desregulação em massa é o surgimento de uma neoplasia. Existem muitos outros genes envolvidos no processo, porém eles têm relação mais íntima com tipos específicos de câncer como o de pulmão e cólon, entre outros (WARD, 2002; LOPES; OLIVEIRA; PRADO, 2002).

## 2.2 TRATAMENTOS PADRÕES PARA O CÂNCER

Os sistemas de saúde dispõem de vários protocolos para o tratamento do câncer, variando de acordo com o tipo, a gravidade e tempo de diagnóstico. Além do tratamento da doença em si, muitos pacientes necessitam de acompanhamento psicossocial, visto que os tratamentos são muito ofensivos ao organismo, produzindo diversos efeitos colaterais que prejudicam o estado de saúde mental deles (ZAIMY *et al.*, 2017).

O maior desafio enfrentado pelos protocolos atuais é extinguir as células tumorais de forma precisa, sem destruir células saudáveis. Tratamentos como a quimioterapia e radioterapia não são precisos ao ponto de matar apenas as células cancerígenas, são muito caros, e ainda assim acabam danificando e matando células saudáveis. Em grande parte dos casos, os medicamentos utilizados na quimioterapia não são bem aceitos pelo organismo do paciente, podendo ter sua biodisponibilidade prejudicada e conseqüentemente seu efeito terapêutico reduzido. Além disso, há muitos relatos de hipersensibilidade ou efeitos colaterais exacerbados que podem contribuir para a não aceitação da terapia pelo paciente. Alguns efeitos colaterais incluem perda de cabelo, náuseas, vômitos, perda de apetite, diarreias, fadiga e hematomas (MONTERO *et al.*, 2005; ARAÚJO; BARBOSA; BARICHELLO, 2014).

Da mesma forma, a hormonioterapia pode ter um efeito contrário ao esperado, aumentar ou reduzir a produção de um hormônio pode ser perigoso, visto que eles têm atuação em diversos tecidos do organismo (MONTERO *et al.*, 2005; ARAÚJO; BARBOSA; BARICHELLO, 2014).

Em alguns casos, é necessário a retirada de parte de um tecido ou até mesmo um órgão inteiro que está afetado pelo câncer. Em grande parte dos casos, isso causa uma enorme debilidade ao paciente, fazendo com que ele passe o resto de sua vida realizando procedimentos que substituem a função do órgão retirado, como ocorre em pacientes que retiram os rins e

necessitam realizar hemodiálise frequentemente. Além disso, não há a certeza de que as células não voltarão a se reproduzir descontroladamente, o que leva as pessoas a lutarem contra a doença por anos (DALL'OGGIO *et al.*, 2004).

O grande gasto gerado pelos tratamentos usuais, a elevada taxa de efeitos colaterais e a efetividade dependente de tempo de diagnóstico são fatores que impulsionaram a busca por novas formas de enfrentar as neoplasias malignas. Assim, com base na biologia molecular e engenharia genética o surgimento do sistema CRISPR/Cas9 gerou muita expectativa na comunidade científica com relação a sua utilização para o tratamento de câncer e diversas doenças de caráter genético (MORANGE, 2015).

### 2.3 CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS (CRISPR)

Esse sistema foi desenvolvido a partir dos mecanismos de defesa de bactérias contra a invasão por bacteriófagos. Quando ocorre a invasão, o DNA do vírus é clivado por enzimas e associado ao DNA bacteriano numa região denominada de CRISPR *locus*. A união intercalada entre o DNA viral e bacteriano é o que forma as Repetições Palindrômicas Curtas, Agrupadas e Regularmente Interespaçadas, sendo essa região responsável pela memória imunológica bacteriana (HSU; LANDER; ZHANG, 2014; AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2017).

O sistema CRISPR/Cas9 é uma ferramenta composta por duas unidades capaz de realizar o pareamento de bases nitrogenadas em uma sequência específica do DNA, permitindo o seu corte por meio de uma endonuclease (Cas9), que é guiada por uma sequência de RNA específico (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2017).

#### 2.3.1 Histórico

As primeiras descobertas sobre o sistema CRISPR/Cas9 datam do ano de 1987, quando pesquisadores relataram um conjunto peculiar de repetições no DNA de bactérias *Escherichia coli*, enquanto estudavam a enzima *iap* envolvida na conversão de isoenzimas de fosfatase alcalina na bactéria (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

De acordo com Hsu, Lander e Zhang (2014), com base nas primeiras descobertas iniciou-se o interesse por tais elementos de repetição microbiana. Em 2002, dois pesquisadores nomearam essa matriz de repetições interespaçadas de CRISPR e em 2007 foi descoberto que esse sistema estava relacionado aos mecanismos de defesa de bactérias.

Em 2012, as pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna descreveram os processos bioquímicos e moleculares por trás do sistema. Desse modo, conseguiram isolar uma

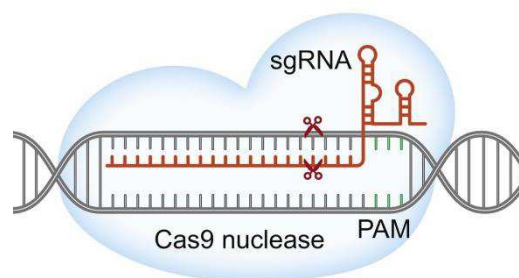
forma pura da enzima Cas9 do *Streptococcus pyogenes* e guiá-la para clivar a molécula de DNA em experimentos *in vitro* no ano de 2013. A partir desse ano, vários estudos demonstraram o uso do sistema CRISPR como ferramenta para edição genética, surgindo assim várias pesquisas relacionadas ao seu uso para o tratamento de doenças e criação de alimentos transgênicos (HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

### 2.3.2 Componentes e mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas9

Atualmente são estudados três tipos de sistemas CRISPR/Cas9 (I, II e III) que atuam de formas distintas clivando o DNA alvo. Os tipos I e III utilizam um grande complexo de endonucleases para clivar o ácido nucleico, diferentemente do tipo II que utiliza apenas uma endonuclease Cas (CAETANO *et al.*, 2019). Esse sistema pode ser obtido de diversas espécies de bactérias, entretanto, o sistema CRISPR/Cas do tipo II proveniente da *Streptococcus pyogenes* é o mais utilizado por ter melhor aplicação na terapia gênica e menor complexidade em sua produção (RAMOS, 2016).

Como descrito anteriormente, o sistema CRISPR/Cas9 é composto por duas unidades, sendo um RNA guia (sgRNA) e uma endonuclease (Cas 9). O sgRNA possui cerca de 20 nucleotídeos e surge da união de dois outros RNAs: o CRISPR RNA (crRNA) e o RNA transativador (tracrRNA). Esses dois irão orientar a endonuclease Cas para realizar o corte no DNA alvo (ZHAN *et al.*, 2019) (Figura 1).

**Figura 1.** Componentes do CRISPR/Cas9



Fonte: Adaptado de ZHAN *et al.* (2019).

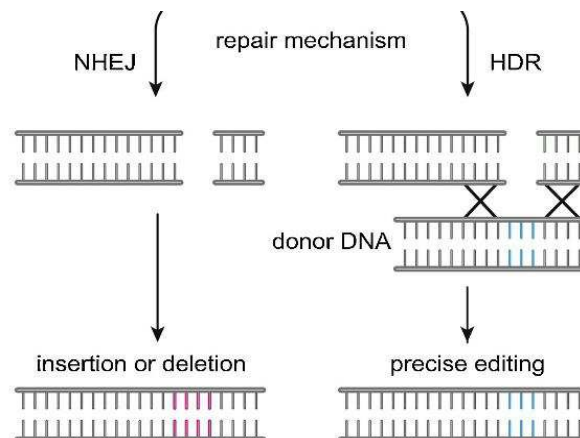
Para o reconhecimento do DNA alvo é necessário motivo adjacente do protoespçador (PAM), uma sequência de três nucleotídeos (NGG ou NAG, sendo N qualquer base nitrogenada) que é reconhecida pela endonuclease Cas 9. Após a ligação, há uma quebra da cadeia dupla (DSB) que irá induzir os mecanismos de reparo (ZHAN *et al.*, 2019).

### 2.3.3 Tipos de reparos

A célula pode responder uma DSB com duas formas de reparo endógeno diferentes: a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ou reparo dirigido por homologia (HDR). A NHEJ é um sistema de reparo propenso a erros, pois pode levar a exclusão ou adição de sequências de nucleotídeos (*indels*) por mecanismos endógenos, que podem condicionar a formação de códon de paradas, promovendo a inativação do gene (ZHAN *et al.*, 2019).

A HDR utiliza um modelo de DNA pré-programado, contendo uma sequência de nucleotídeos desejada como molde para realizar o reparo. Esse tipo de reparo é mais específico e amplamente utilizado quando se há a necessidade de introduzir mutações genéticas bem definidas, como por exemplo, ativar um gene específico que expressará determinada proteína desejada pelo pesquisador (ZHAN *et al.*, 2019) (Figura 2).

**Figura 2.** Mecanismos de reparo NHEJ e HDR.



Fonte: ZHAN *et al.*, 2019.

### 2.4 MÉTODOS DE ENTREGA

Para ocorrer a clivagem do DNA e conseqüentemente a edição do gene, é necessário que o sistema CRISPR/Cas9 seja entregue a célula-alvo. O transporte é feito através de vetores, podendo ser um plasmídeo, vírus, RNPs (Ribonucleoproteínas) ou nanopartículas lipídicas (RAMOS, 2016).

Segundo Ramos (2016), a técnica de entrega por meio de plasmídeos é a mais utilizada atualmente, pois é de fácil produção e necessita de apenas um vetor para sua entrega. Esse método foi um dos primeiros a serem estudados, podendo ser entregue por injeções ou eletroporação. Entretanto, em alguns casos possui uma baixa eficiência devido o mau controle

da Cas 9. Com isso, outros métodos passaram a ser estudados a fim de se aumentar a eficácia da técnica na edição gênica (ZHAN, *et al.*, 2019).

Os vírus adeno-associados (AAV) têm um enorme potencial, pois realizam uma boa transdução, não são integrantes e possuem uma alta compatibilidade sorológica com grande parte dos humanos. Ainda induzem uma rápida resposta e possuem diversos sorotipos, que têm atração por diversos tecidos, permitindo a entrega do sistema para diferentes órgãos. Em contrapartida, tem como desvantagem a dificuldade no empacotamento do sistema e devido ao seu tamanho é necessário codificar o gene da Cas9 e o sgRNA em vetores separados (RAMOS, 2016; ZHAN *et al.*, 2019).

As RNPs têm sido descritas como um método promissor para entrega do sistema CRISPR/Cas9, pois têm grande especificidade, evitando mutações em genes indesejados, além de possuírem uma ação muito rápida. A entrega de RNPs numa cultura de células pode ser realizada através de microinjeções ou eletroporação. Por ser produzido em larga escala, esse método vem sendo amplamente estudado como forma alternativa a vetores virais e plasmídeos (RAMOS, 2016).

Por último, estudos recentes têm mostrado eficácia na entrega do sistema CRISPR/Cas9 por meio de nanopartículas lipídicas modificadas artificialmente. A sua maior vantagem é a capacidade de ser carregada com o DNA molde para o reparo dirigido por homologia, além de permitir o empacotamento do sistema completo em seu interior (ZHAN *et al.*, 2019).

## 2.5 CRISPR-CAS9 COMO FERRAMENTA DE EDIÇÃO GÊNICA

A versatilidade, alta precisão e relativa simplicidade colocaram o CRISPR/Cas9 no posto de uma das principais técnicas de edição gênica. Ao longo dos anos, os estudos mostraram que essa técnica poderia ser utilizada de muitas outras formas e não apenas para silenciar, editar ou expressar um gene. Várias são as ramificações do uso do CRISPR/Cas9, desde a triagem de genes-alvos para terapia do câncer, com as telas de CRISPR até a produção de organoides para estudos *in vitro* (RAMOS, 2016; ZHAN *et al.*, 2019).

### 2.5.1 *Knock out*

*Knock out* (nocaute) é o termo utilizado quando induzimos um gene à sua inativação. A capacidade de gerar códon de paradas pelo mecanismo NHEJ pode ser utilizada para nocautear um gene, coibindo a síntese de uma proteína específica e consequentemente sua ação no organismo. Outra forma de inativar um gene é utilizando-se de vários sgRNA que guiarão o

sistema CRISPR para realizar múltiplas deleções no gene-alvo inativando-o (KAWAMURA *et al.*, 2015; ZHAN *et al.*, 2019).

A inativação de um gene permite que pesquisadores estudem o seu impacto sobre o fenótipo de uma célula ou organismo, ou seja, realiza uma triagem para verificar quais genes têm maior importância no desenvolvimento de uma neoplasia. Também é possível inativar um gene visando cessar a produção de uma proteína que estimule a divisão celular, geralmente codificada por um oncogene. Como exemplo, o nocaute do gene NANOGPG (gene que promove a entrada de células na fase S da divisão celular) diminui a tumorigenicidade *in vivo* de células no câncer de próstata (KAWAMURA *et al.*, 2015).

### **2.5.2 Knock in**

O reparo por HDR permite a inserção de uma sequência específica de nucleotídeos no DNA, codificando um RNA mensageiro (RNAm) que irá expressar a proteína desejada pelo pesquisador. Esse método é conhecido como *knock in* e é utilizado para ativar ou superexpressar um gene-alvo. Com relação ao câncer, esse método pode ser utilizado para superexpressão de um gene supressor de tumor, sendo uma alternativa de tratamento, ou ser utilizado para ativar oncogenes e gerar modelos transgênicos de camundongos com câncer, que serão utilizados para estudos e experimentos (PLATT, *et al.*, 2014; ZHAN, *et al.*, 2019).

Platt *et al.* (2014) demonstram a utilização desse método para gerar modelos de camundongos com câncer no pulmão. Com a ativação do oncogene KRAS e nocaute dos genes supressores P53 e LKB1 (três principais genes envolvidos no desenvolvimento do câncer de pulmão), observou-se o aparecimento de nódulos cerca de dois meses após a inserção do sistema no organismo dos ratos, enquanto camundongos não tratados com Cas9 não tiveram nenhuma alteração fisiológica.

Nesse estudo também foi verificado que edição por meio do sistema CRISPR/Cas9 não gerou alterações em outros sistemas do organismo dos camundongos, todos eram férteis com reprodução e desenvolvimento embrionário normal e possuíam um sistema nervoso íntegro e funcional (PLATT *et al.*, 2014).

### **2.5.3 CRISPR interference (CRISPRi)**

Uma alternativa para silenciar genes é a CRISPRi, técnica na qual é possível silenciar um gene-alvo utilizando uma Cas9 modificada e inativa (dCas9). O sistema permanece o mesmo com a endonuclease e o sgRNA, porém, como a Cas9 está inativa, ao se ligar ao sítio-

alvo ela impede a fase de alongamento da transcrição do DNA, impedindo a ligação da RNA polimerase, seus fatores de transcrição e finalmente silenciando o gene desejado. Essa técnica pode reprimir a expressão de múltiplos genes, de forma reversível e eficiente, sem efeitos fora do local desejado (QI *et al.*, 2013).

Como ferramenta no estudo e tratamento para o câncer, Yoshida *et al.* (2018) utilizaram o CRISPRi para reduzir a expressão de uma isoforma do gene P63, a  $\Delta Np63$  que tem papel importante no descontrole celular em neoplasias malignas de pulmão e esôfago. O método testado *in vitro* e *in vivo* demonstrou ser eficiente na redução da proliferação celular em tumores pulmonares e esofágicos.

#### **2.5.4 CRISPR *activation* (CRISPRa)**

O sistema CRISPRa utiliza uma Cas9 mutada (dCas9) que não possui a capacidade de criar uma DSB, mas sim de ativar o gene-alvo através de ativadores transcricionais que são carregados juntamente com o sgRNA e a dCas9 no vetor escolhido. Ao se ligar ao sítio desejado, uma RNA polimerase II é recrutada e promove a expressão gênica no *locus* desejado (WANGENSTEEN *et al.*, 2018).

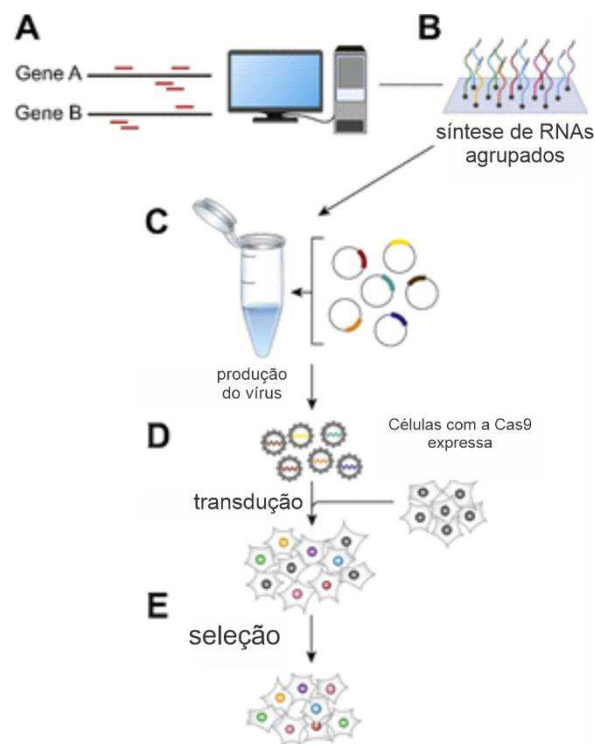
A ativação por CRISPR foi estudada como forma de triagem genética para resistência a drogas de forma *ex vivo* em camundongos modelados com leucemias. Por ter a capacidade de produzir várias ativações, o CRISPRa é estudado com o intuito de elencar quais genes geram fenótipos resistentes ao tratamento para diversas doenças, incluindo o câncer e assim silenciá-los utilizando o próprio CRISPR/Cas9 ou outra técnica de silenciamento genético. Além disso, a dCas9 pode ser formatada para aumentar a expressão de genes supressores de tumores com o objetivo de regular o crescimento desordenado de uma célula cancerígena (WARD, 2002; WANGENSTEEN *et al.*, 2018)

#### **2.5.5 Telas de CRISPR/Cas9**

A tela de CRISPR/Cas9 é uma ferramenta poderosa de triagem da genômica funcional, sendo utilizada para descobrir possíveis alvos na terapia contra o câncer funcionando através de uma inibição ou ativação sistemática de genes por todo o genoma. Nessa técnica, inicialmente são produzidos vários RNAs guias para cada gene alvo, agrupados em uma biblioteca. A biblioteca CRISPR é copiada e empacotada em um vetor viral, que infectará com baixa multiplicidade células com a Cas9 expressa, para que cada célula carregue em seu interior o nocaute de um gene específico (Figura 3) (ZHAN *et al.*, 2019).

Posteriormente, o conjunto de células *knock out* sofre perturbações específicas e têm seu DNA extraído, amplificado e sequenciado. Esse processo permite verificar quais genes inoperantes configuram fenótipos com sensibilidade aumentada ou diminuída a determinado medicamento (ZHAN *et al.*, 2019).

**Figura 3.** Criação de uma tela de CRISPR. (A): elaboração do RNA guia. (B): anexo do RNA a um plasmídeo e posteriormente a um vírus em (C). (D): transdução dos vetores nas células com Cas9 expressa. (E): seleção positiva ou negativa das células com o gene mutado.



Fonte: adaptado de Zhan *et al.* (2019).

O maior foco dessa técnica é identificar possíveis fragilidades ao longo do genoma estudado. A detecção de um gene vulnerável é importante, pois seu esgotamento funcional pode levar à uma diminuição da progressão do tumor, podendo esse gene ser um possível alvo de drogas para o tratamento de neoplasias malignas (ZHAN *et al.*, 2019).

### 2.5.6 Desenvolvimento de organoides

Os organoides são tecidos epiteliais criados a partir da cultura 3D de células-tronco adultas e funcionam como uma espécie de “miniórgão”. A capacidade de gerar organoides saudáveis ou cancerígenos permite o estudo da progressão tumoral em laboratório, bem como pesquisar novas formas de diagnóstico, sendo essa técnica frequentemente empregada para



gerar fenótipos com nocaute em genes supressores de tumor e *knock in* de oncogenes (ZHAN *et al.*, 2019).

Recentemente, o CRISPR/Cas9 foi aplicado para gerar organoides do cólon humano geneticamente mutados com nocaute dos genes APC, Mothers against decapentaplegic homolog 4 (SMAD4) e P53 (Genes supressores de tumor) e expressão aumentada dos oncogenes KRAS e/ou PIK3CA para desenvolver células cancerígenas. A manipulação desses tecidos permite o estudo mais seguro e detalhado da progressão tumoral, bem como a análise da influência de fatores extrínsecos e perturbações selecionadas, e ainda podem ser utilizados na busca por novas formas de tratamento para o câncer e medicamentos experimentais (MATANO *et al.*, 2015).

Em outro estudo, Drost *et al.* (2017) realizaram o uso do sistema CRISPR/Cas9 em organoides intestinais para induzir a perda de função do gene MR Mutl homólogo 1 (MLH1) e assim estudar os efeitos de mutações genéticas que interrompem o sistema de reparo de DNA. O gene MLH1 quando inativo predispõe o desenvolvimento de câncer colorretal.

## 2.6 ESTUDOS CLÍNICOS ENVOLVENDO O CRISPR/Cas9

De acordo com Zhan *et al.* (2019), o primeiro estudo envolvendo o uso desse sistema foi desenvolvido na China em 2016 e contava com pacientes do Hospital da China Ocidental da Universidade de Sichuan, que doavam linfócitos do sangue periférico para estudo *ex vivo* do nocaute do receptor ligante de proteína de morte celular programada (PD-L1). O PD-L1 é presente em larga escala em tumores malignos e são responsáveis pela morte de linfócitos T citotóxicos quando ligados a PD-1. Os linfócitos T citotóxicos são responsáveis por destruir células infectadas por vírus ou células com ciclo reprodutivo descontrolado. Assim, após o nocaute do gene que codifica o receptor PD-L1, os linfócitos foram reintroduzidos nos pacientes e sua ação foi avaliada. Esse estudo é considerado um dos mais promissores, relacionado a redução da progressão tumoral.

Outro estudo de fase I e II avaliou o nocaute desse mesmo gene (*ex vivo*) em linfócitos T específicos para o vírus Eppstein-Barr (herpesvírus ou HPV), sendo objeto de pesquisa no tratamento de cânceres de nasofaringe. Outra abordagem é a produção de células T quiméricas do receptor de antígeno utilizando CRISPR/Ca9. Sua aplicação produziu células T com capacidade muito maior de reconhecer tumores malignos, frente à linfócitos normais. Futuramente, se aprovada, esse tratamento permitirá que o próprio sistema imunológico do paciente lute contra o desenvolvimento desenfreado das células cancerígenas. Ensaios clínicos *in vivo* com CRISPR/Cas9 são ainda mais raros (ZHAN *et al.*, 2019).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 PESQUISA SISTEMÁTICA DE LITERATURA**

Esta revisão sistemática foi realizada de acordo com as diretrizes dos itens de relatório preferenciais para revisões sistemáticas e meta-análises (declaração PRISMA), com modificações.

A pesquisa seguiu conforme o código de ética da profissão de Biomédico diante da resolução 198/2011 do Conselho Federal de Biomedicina, que regulamenta as atividades éticas e legais dos profissionais de Biomedicina. Mesmo sendo de revisão, os preceitos éticos estabelecidos no que se refere à zelar pela legitimidade das informações, privacidade e sigilo das informações, quando necessárias, tornando os resultados desta pesquisa públicos, foram considerados em todo o processo de construção do trabalho.

#### **3.2 ESTRATÉGIAS DE BUSCAS E SELEÇÃO**

A pesquisa foi realizada no período entre fevereiro e março de 2021 nas bases de dados, incluindo artigos publicados nos últimos 10 anos. Foram utilizadas as seguintes bases de dados: Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Biblioteca Nacional de Medicina (PubMed) e ScienceDirect. Foram utilizados os descritores na língua inglesa: ‘CRISPR-Associated Protein 9’, ‘Cas9 Endonuclease’ e ‘Carcinoma’. No rastreamento das publicações foi utilizado o operador lógico “AND”, de modo a combinar os termos.

#### **3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DE ESTUDOS**

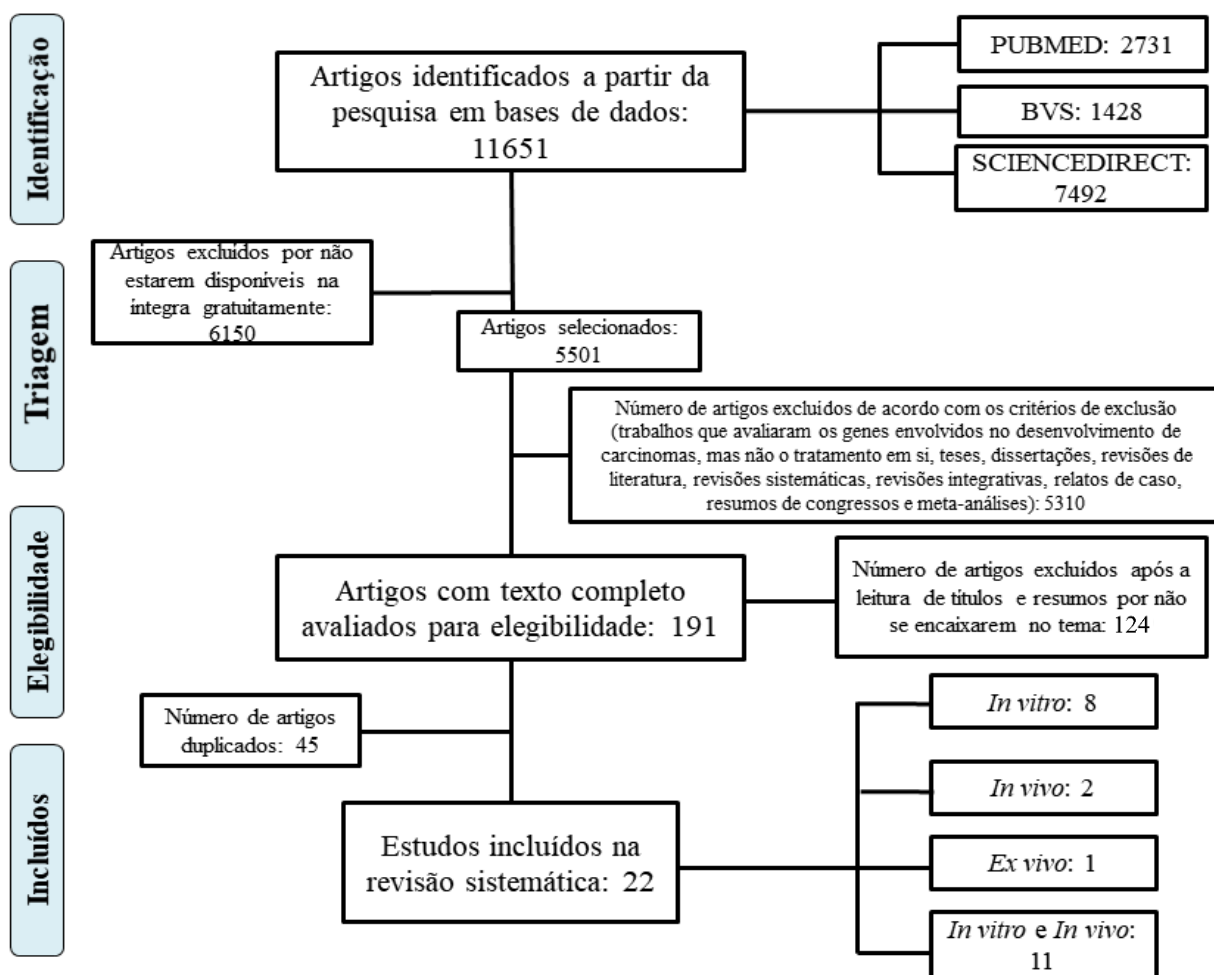
A seleção dos artigos foi realizada de acordo com os descritores encontrados em títulos e resumos, acompanhado de seleção e leitura integral dos artigos, com o intuito de identificar quais estudos atendiam aos critérios de inclusão e exclusão. Desse modo, foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: a) estudos experimentais que avaliaram o uso do sistema CRISPR/Cas9 para o tratamento do câncer; b) trabalhos publicados entre 2010 e 2021 e c) publicações em inglês. Os critérios de exclusão foram trabalhos que avaliaram os genes envolvidos no desenvolvimento de carcinomas, mas não o tratamento em si, teses, dissertações, revisões de literatura, revisões sistemáticas, revisões integrativas, relatos de caso, resumos de congressos e meta-análises.

### 3.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram extraídos manualmente e separados em um formulário padronizado em tabelas, seguido de análises descritivas. As variáveis extraídas de cada artigo e incluídas na revisão foram: autores e ano de publicação, tipo de amostra e câncer, abordagem CRISPR utilizada, genes e proteínas alvo, e função.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 11.651 artigos obtidos na busca inicial, sendo eles na base de dados PubMed (2.731), ScienceDirect (7.492) e BVS (1.428), apenas 5.501 encontravam-se disponíveis na íntegra gratuitamente. Ao aplicar os demais critérios de inclusão e exclusão, restaram ao total 191 artigos, dos quais foram excluídos 45 por estarem duplicados. Foi realizada a leitura dos títulos e resumos dos 146 artigos restantes e desse total, 22 artigos tornaram-se elegíveis por estarem de acordo com o tema proposto, sendo realizada a leitura na íntegra para compor a revisão sistemática. Os resultados da busca estão representados no fluxograma abaixo (Figura 4).



**Figura 4.** Fluxograma do resultado da busca, seleção e inclusão dos estudos.

Fonte: O autor (2021).

Foram ponderados artigos publicados em periódicos científicos entre 2010 e 2021, contudo, não foram achados estudos nos anos de 2010, 2011, 2012, 2013 e 2015 que acatassem aos critérios da pesquisa. Restando assim, 22 estudos científicos para discussão do papel do

CRISPR/Cas9 no tratamento de neoplasias malignas. Dentre os trabalhos que foram selecionados após a aplicação dos critérios de seleção, há estudos *in vitro*, *in vivo* (pré-clínico), *ex vivo* e trabalhos que realizaram estudos *in vitro* e *in vivo* simultaneamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características dos artigos incluídos na revisão sistemática sobre os estudos do CRISPR/Cas9 para tratamento de neoplasias malignas.

Autor (ano)	Tipo de amostra e câncer	Abordagem CRISPR utilizada	Genes e proteínas alvo	Função
<i>In vitro</i>				
<b>Kennedy et al. (2014)</b>	Linhagem de células de carcinoma cervical transformada pelo HPV tipos 16 e 18	<i>Knock out</i>	Superexpressão dos genes e proteínas E6 e E7 do HPV; Supressão do gene e proteína P53 e da Rb	E6 induz a degradação do P53; E7 desestabiliza a Rb; P53 controla o ciclo celular, reparo de DNA e apoptose celular; Rb atua como <i>feedback</i> negativo no ciclo celular e estabiliza a cromatina
<b>Hoang-Minh et al. (2016)</b>	Linhagem de células humanas GBM	<i>Knock out</i>	Superexpressão da PCM1	Proteína pericentriolar que participa na organização de microtúbulos, da actina, da estabilidade dos centrossomos, atua na duplicação centriolar antes da mitose e está intimamente associada à proteínas de reparo de DNA nos centrossomos
<b>Bui et al. (2018)</b>	Linhagem de células de câncer de cabeça e pescoço positivas e negativas para HPV	<i>Knock out</i>	Superexpressão da NSD1	Proteína co-reguladora de transcrição codificante da histona metiltransferase
<b>Moses et al. (2019)</b>	Linhagem de células de melanoma e de TNBC	<i>CRISPR activation</i>	Baixa expressão do PTEN	Atua como um antagonista da via PI3K/Akt. PTEN impede essa interação e a ativação de Akt, inibindo os efeitos sob a sobrevivência celular; progressão do ciclo e a

				regulação da transcrição, tradução e metabolismo
<b>Cai et al. (2019)</b>	Linhagem de células de câncer endometrial	<i>Knock out</i>	Superexpressão oncogene do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico (C-erbB-2)	Regula às proteínas quinases da tirosina, sendo um importante regulador do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular
<b>Khaodee et al. (2019)</b>	Linhagem de células de adenocarcinoma de pulmão	<i>Knock out</i>	Expressão do gene PRKCSHO significativamente aumentada que codifica a GluII $\beta$	Regulação da glicosilação ligada a N de vários receptores de crescimento
<b>Fan et al. (2019)</b>	Amostras de tecido da tireoide saudáveis e cancerígenas	<i>Knock out</i>	Superexpressão do gene Ku80 que codifica a proteína Ku	Reparo de quebras de dupla fita do DNA
<b>Liu et al. (2020)</b>	Linhagem de células de carcinoma de células renais RC21	<i>Knock out</i>	Superexpressão do EGFR	Transdução de sinalização de fator de crescimento do meio extracelular para a célula
<b><i>In vivo</i></b>				
<b>Taeyoung et al. (2017)</b>	Xenoinxerto de adenocarcinoma pulmonar humano em camundongos machos	<i>Knock out.</i>	Superexpressão do gene e proteína EGFR	Transdução de sinalização de fator de crescimento do meio extracelular para a célula
<b>Jubai, Fallaha e Mcmillan (2019)</b>	Xenoinxerto de carcinoma cervical em camundongos	<i>Knock out</i>	Superexpressão dos genes e proteínas E6 e E7 do HPV; Supressão do gene e proteína P53 e da Rb	E6 induz a degradação do P53; E7 desestabiliza a Rb; P53 controla o ciclo celular, reparo de DNA e apoptose celular; Rb atua como <i>feedback</i> negativo no ciclo celular e estabiliza a cromatina
<b><i>In vitro/In vivo</i></b>				
<b>Zhu et al. (2017)</b>	Linhagem de células de carcinoma hepatocelular (CHC)	<i>Knock out</i>	Superexpressão Nogo-B	Papel fundamental na remodelação vascular, migração e proliferação

	e camundongos xenoenxertados			celular e na transição epitelial-mesenquimal, sendo amplamente expresso nos rins, fígado e pulmão
<b>Bu et al. (2018)</b>	Xenoexerto de linfomas, adenocarcinomas pulmonares, hemangiomas e sarcomas histolíticos em camundongos machos e fêmeas	<i>Knock out</i>	Superexpressão do gene CD38 e da proteína multifuncional CD38	Adesão mediada por receptor, sinalização e atua como enzima a depender do tecido onde é expressa
<b>Song et al. (2018)</b>	Linhagem de células de carcinoma hepatocelular e camundongos xenoenxertados com essas células	<i>Knock out e Knock in</i>	Superexpressão do HBsAg	Faz parte da superfície viral que invade o organismo humano
<b>Franke et al. (2018)</b>	Linhagem de células de câncer colorretal e camundongos xenoenxertados	<i>Knock out e knock in</i>	SAHA1	Proteína supressora de tumor envolvida em diversos mecanismos da divisão celular, incluindo a apoptose
<b>Ardelt et al. (2018)</b>	Linhagem de células com CHC e camundongos imunodeficientes xenoenxertados	<i>Knock out</i>	Superexpressão da Cdk5	Atua no ciclo celular estimulando o crescimento, diferenciação e migração celular, também possuindo funções antiapoptóticas
<b>Bialk et al. (2018)</b>	Linhagem de células de câncer de pulmão e camundongo xenoenxertados	<i>Knock out</i>	Superexpressão do f NRF2	Proteína que regula a expressão de 100 a 200 genes que participam da resposta ao estresse oxidativo causado por lesões e inflamações
<b>Li et al. (2019)</b>	Linhagem de células tumorais pancreáticas e camundongo xenoenxertados com	<i>Knock out</i>	Superexpressão do gene HIF1A que codifica o HIF-1 $\alpha$	Induzir a transcrição de genes responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular

	carcinoma pancreático			
<b>Albers et al. (2019)</b>	Células T primárias humanas	<i>Knock out</i> e <i>Knock in</i>	Gene que codifica a TCR	Região compartilhada entre todas as células T, que tem como função reconhecer fragmentos processado de antígenos
<b>Chen et al. (2019)</b>	Linhagem de células de adenocarcinoma pulmonar e camundongos machos xenoenxertados	<i>Knock out</i> e inibição molecular com PH-687 que se liga ao domínio PH de Akt interrompendo a interação Mcl-1/Akt	Expressão do gene MCL1 que codifica a Mcl-1	Mcl-1 é um membro único da família Bcl-2 que restringe as funções pró-apoptóticas
<b>Zhou et al. (2020)</b>	Linhagem de células de câncer de cabeça e pescoço; Modelos de carcinoma de células escamosas oral de camundongos; Camundongos fêmeas xenoenxertados com linhagem de células cancerosas	<i>Knock out</i> ; Inibição farmacológica do gene; Terapia de bloqueio de PD-1 utilizando os inibidores	EZH2	Catalisa a metilação H3 na lisina 27. Esta modificação da histona H3K27me3 pode suprimir a acessibilidade da cromatina e silenciar a expressão de genes supressores de tumores
<b>Deng et al. (2020)</b>	Camundongos implantados com células tumorais de melanoma e câncer de mama	<i>Knock out</i>	Superexpressão de Cdk5 e PD-L1	Cdk5 atua no ciclo celular estimulando o crescimento, diferenciação e migração celular, também possuindo funções anti-apoptóticas e PD-L1 causa a morte de células T ao se ligar com a PD-1
<i>Ex vivo</i>				
<b>Stadtmauer et al. (2020)</b>	Células T de pacientes com Mieloma refratário	<i>Knock out</i>	Superexpressão dos genes TRAC, TRBC e PDCD1	TCR tem função na imunidade antitumoral reconhecendo



avançado e sarcoma metastático	que codificam o TCR e PD-1, respectivamente	reconhecimento de antígenos e peptídeos estranhos. PD-1 está envolvida na morte de células T como foi explicado anteriormente
--------------------------------	---	---

---

Fonte: O Autor (2021). Akt: proteína quinase B; Cdk5: quinase 5 dependente da ciclina; C-erbB-2: receptor 2 do fator de crescimento epidérmico; CHC: carcinoma hepatocelular; EGFR: receptor do fator de crescimento; EGFR: receptor do fator de crescimento; EZH2: potenciador do homólogo zeste 2; GBM: glioblastoma; GluII $\beta$ : subunidade beta da glucosidase II; HBsAg: antígeno de superfície de vírus da hepatite B; HIF-1 $\alpha$ : fator 1 $\alpha$  induzível por hipóxia; HPV: papilomavírus humano; Mcl-1: proteína de diferenciação celular de leucemia mielóide induzida; Nogo-B: proteína Retículo 4B ou Nogo 4B; NRF2: fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2; NSD1: proteína 1 do domínio SET de ligação ao receptor nuclear; NSD1: proteína 1 do domínio SET de ligação ao receptor nuclear; PCM1: proteína material pericentriolar 1; PI3K: fosfoinosítídeo 3-quinase; PTEN: fosfatase homóloga à tensina; Rb: proteína do retinoblastoma; SAHA1: Proteína 1 contendo o domínio SAM e SH3, TCR: receptor de células T endógenas; TNBC: câncer de mama triplo-negativo; TCR: cadeia alfa de células T transgênicas.

De acordo com os estudos *in vitro* selecionados, Kennedy *et al.* (2014) avaliaram a viabilidade da inibição dos genes E6 e E7 do vírus do papiloma humano (HPV) tipos 16 e 18 como forma de reduzir a progressão tumoral em carcinomas endocervicais. No presente estudo, foi utilizada a técnica CRISPR/Cas9 baseada na bactéria *Streptococcus pyogenes* para clivar e inativar o gene viral, visando aumentar a expressão do gene P53 e da proteína do retinoblastoma (Rb), responsáveis por controlar o ciclo celular, induzindo a sua parada. Os resultados comprovaram que as endonucleases guiadas por RNA eram capazes de clivar e inativar de forma eficiente o gene E6 ou E7 em linhagem de células de carcinoma cervical transformadas por HPV tipo 16 ou 18, assim constituindo uma alternativa promissora para o tratamento do câncer cervical.

Hoang-Minh *et al.* (2016) estabeleceram relações entre o *knock out* do gene PCM1, que codifica a proteína de mesmo nome, à ampliação do apoptose celular em glioblastomas e ao aumento da sensibilidade à temozolomida (TMZ). No estudo, o CRISPR/Cas9 foi utilizado para gerar uma linhagem de celulares pobres em PCM1 e KIF3A, proteínas que atuam na formação de cílios primários na divisão celular. Esses cílios estão envolvidos na sinalização celular e são importantes em vários processos de divisão e multiplicação das células. Como resultados, as células nocauteadas de PCM1 apresentaram quantidade reduzida de proteínas satélites AZI1, reduzindo ciliogênese e a sinalização tumoral. Ademais, foi observada diminuição da proliferação celular devido à morte celular apoptótica induzida. Assim como as células com nocaute de PCM1 que apresentaram sensibilidade ao TMZ aumentada em comparação com as respectivas células controle. Todavia, os autores esclarecem que serão necessários estudos que

comprovem a relação entre a diminuição de PCM1 ao aumento da sensibilidade ao medicamento.

Bui *et al.* (2018) correlacionaram o *knock out* da NSD1 à maior sensibilidade a cisplatina em cânceres de cabeça e pescoço positivos ou não para HPV. Ao inibir a NSD1 utilizando CRISPR/Cas9, os autores observaram que a baixa produção dessa proteína levou a hipometilação da transcrição genética de células tumorais negativas para HPV e ainda aumentaram a sensibilidade ao quimioterápico cisplatina, reduzindo sua concentração inibitória (IC50) em média de 23% em comparação com células não nocauteadas. Esses achados indicaram que a cisplatina deve ser fortemente acatada em pacientes com câncer de cabeça e pescoço com NSD1 nocauteado.

A partir dos estudos *in vitro*, Moses *et al.* (2019) avaliaram a eficácia da utilização de uma dCas9 para ativar o gene PTEN em linhagens celulares de melanoma e de TNBC, e assim suprimir o desenvolvimento tumoral. Foi utilizada uma Cas9 inativa para entregar o promotor de ativação de gene VP64-p65-Rta (VPR) e assim ativar o gene que codifica a PTEN, bloqueando a interação entre PI3k, Akt e do alvo da rapamicina em mamíferos, as três principais oncoproteínas envolvidas no crescimento tumoral em melanomas e TNBC's. Os resultados evidenciaram que as células mutantes migração reduzida, bem como formação de colônia diminuída, demonstrando que essa abordagem pode ser utilizada como uma terapia potencial para tratar tumores altamente invasivos os quais não possuem tratamento efetivo atualmente. Além disso, o estudo comprovou que a ativação de PTEN reduz a resistência das células de melanoma aos inibidores B-Raf dabrafenibe e PI3K/mTOR, que são comumente utilizados para a terapia desse câncer.

Cai *et al.* (2019) correlacionaram o *knock out* do oncogene C-erbB-2 à diminuição do desenvolvimento do câncer endometrial. O nocaute foi mediado por plasmídeos transfectados nas células por meio de ultrassom utilizando 3 tipos de sgRNA (sgRNA1, sgRNA2 e sRNA3). Os resultados evidenciaram que a expressão de C-erbB-2 foi significativamente menor nos grupos nocauteados, quando comparados ao grupo branco e ao controle. Dentre os 3 tipos de RNAs guias, o sgRNA1 atingiu o nocaute do gene de forma mais eficiente do que o sgRNA2 e o sgRNA3, deste modo, sendo sugerido como escolha para estudar o desempenho biológico do câncer endometrial em futuros trabalhos.

Khaodee *et al.* (2019) investigaram o bloqueio da proteína GluII $\beta$  para avaliar o seu papel no desenvolvimento tumoral, na capacidade metastática e na atividade de sinalização do receptor tirosina quinases (RTKs) em adenocarcinomas pulmonares. Ao nocautear o gene responsável, foi evidenciado que a capacidade de migração celular reduziu em cerca de 35 a

40%, mostrando uma alta redução da capacidade de metástase. Os ensaios de crescimento celular também mostraram uma menor capacidade de formação de colônias das células do câncer de pulmão. Além disso, os resultados propuseram que o nocaute da GluII $\beta$  elevou a sensibilidade das células malignas à Cisplatina, por outro lado, diminuiu com relação ao quimioterápico Gefitinibe. Por fim, a ablação do gene possibilitou uma diminuição da atividade sinalizadora das RTKs, cessando uma série de cascatas de sinalização a jusante que levam ao crescimento celular, migração, diferenciação, sobrevivência ou apoptose.

Fan *et al.* (2019) avaliaram a relação entre a expressão do gene Ku80, codificante da proteína de ligação de DNA Ku, importante na restauração do DNA por meio do mecanismo NHEJ, bem como o desenvolvimento do carcinoma de tireoide humana em células *in vitro*. Os autores evidenciaram que a expressão anormal dessa proteína resultou em mecanismos alterados de reparo de DNA e instabilidade genômica que levaram ao desenvolvimento de tumores. Os resultados demonstraram que o *knock out* do gene Ku80 promove a apoptose das células cancerígenas e diminui a progressão tumoral, bem como redução da proliferação, invasão e formação de colônias em células tumorais.

Liu *et al.* (2020) analisaram a remoção do gene EGFR mediada por CRISPR/Cas9 em combinação com o quimioterápico Sunitinibe e sua ação no tratamento para o carcinoma de células renais RC21 em testes *in vitro*. De acordo com os resultados, a terapia utilizando a técnica de clivagem por endonucleases eficaz para interrupção do crescimento tumoral de forma isolada e em associação com o medicamento. Entretanto, a inibição do EGFR em células RC21 levou a resistência a outros medicamentos comumente utilizados como a Cisplatina e ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA, do inglês suberoylanilide hydroxamic acid). Em resumo, ainda que a perda desse gene leve a resistência à alguns medicamentos, o Sunitinibe pode bloquear ainda mais a propagação de células cancerígenas renais posteriormente a perda do EGFR, sendo uma combinação eficiente para redução da tumorigenicidade.

Nos estudos *in vivo* (pré-clínico), Taeyoung *et al.* (2017) correlacionaram o aumento da expressão do receptor do fator de crescimento (EGFR), desencadeado por uma mutação genética missense de nucleotídeo único (C T G> C G G) no exon 21 do EGFR, ao aumento da progressão tumoral em câncer de pulmão. Nessa pesquisa, o *knock out* foi mediado por CRISPR/Cas9, interrompendo o alelo mutante em camundongos com xenografts com o adenocarcinoma pulmonar. Assim, os autores evidenciaram que o tratamento com essa técnica, por meio da entrega por adenovírus no tecido subcutâneo, levou a uma inibição significativa do crescimento do tumor com taxas de redução de 78,3 e 81,5% quando comparadas às amostras não tratadas com esse método.

Jubai, Fallaha e Mcmillan (2019) utilizaram o CRISPR/Cas9 para mediar o nocaute dos genes E6 e E7 do HPV 16 e 18 diretamente em células de câncer de colo de útero xenoenxertados em camundongos. Nesse estudo, os lipossomas empregados na entrega *in vivo* do sistema foram revestidos com uma camada de polietilenoglicol (PEG), um polímero que é solúvel em água, atóxico e não imunogênico. Os lipossomas PEG foram utilizados para aumentar a eficiência da entrega e os resultados mostram que o tratamento de edição *in vivo* com CRISPR/Cas9 em tumores é veemente eficaz, entretanto, a capacidade citotóxica e garantia de tratamento precisam ser analisadas em modelos animais que não são imunodeficientes, o que segundo os autores, está em andamento no momento.

Com relação aos estudos que utilizaram de avaliações *in vitro* e *in vivo* (pré-clínico), Zhu *et al.* (2017) averiguaram o impacto do nocaute do gene RTN4, que codifica a proteína Nogo-B, fazendo uso da técnica CRISPR/Cas9 em linhagem de células de CHC e em modelos de camundongos xenoenxertados. Após os ensaios de *knock out*, houve elevada diminuição na proliferação celular e no crescimento do tumor, com taxas de inibição em média de 50%. Além disso, as células apresentaram transição epitelial-mesenquimal diminuída, reduzindo a capacidade de desenvolver metástases, com taxas que alcançavam 75%. Também foi relatado que a perda de Nogo-B reduz a sinalização da interleucina 6 (IL-6), que também é responsável por *feedback* positivo na multiplicação celular. Por fim, essas descobertas estabelecem essa proteína como um novo alvo terapêutico no CHC.

Bu *et al.* (2018) investigaram as consequências do nocaute do gene responsável pela expressão da proteína multifuncional CD38 utilizando a técnica CRISPR/Cas9 em modelos de camundongos xenoenxertados com diversos modelos de câncer (linfomas, adenocarcinomas pulmonares, hemangiomas e sarcomas histolíticos) e em linhagens de células de adenocarcinoma pulmonar CD38KO (gene CD38 nocauteado) *in vitro*. Os resultados demonstraram que o nocaute do gene diminuiu drasticamente a proliferação tumoral, bem como o desenvolvimento do tumor, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Song *et al.* (2018) avaliaram a relação entre a superexpressão do gene do antígeno de superfície de vírus da hepatite B (HBsAg) e o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular CHC positivos para infecção do vírus da hepatite B. Com a deleção mediada por CRISPR/Cas9, verificou-se que a diminuição desse antígeno causa a redução da proliferação celular no CHC, tanto em linhagens de células *in vitro* quanto em camundongo xenoenxertados (*in vivo*). No entanto, foi observada uma variação na eficácia dessa técnica a depender do tamanho em que se encontrava o tumor nos camundongos. Ademais, foi demonstrado que a interrupção do antígeno diminuiu a produção de IL-6 nestas células, uma citocina pleiotrópica que funciona

como um fator de crescimento em várias células tumorais. Ao utilizar a técnica baseada em endonucleases, os autores evidenciaram que a expressão aumentada de HBsAg elevou o crescimento de células com CHC tanto nos testes *in vitro* quanto *in vivo*.

Franke *et al.* (2018) correlacionaram a inibição do gene supressor de tumor SASH1 ao aumento da capacidade de metástase em câncer colorretal. Para os estudos *in vitro* foram geradas, através de CRISPR/Cas9, células de câncer de cólon deficientes em SASH1 ou com superexpressão desse gene. Nos estudos *in vivo* foram utilizados camundongos com xenoenxerto do câncer estudado. Os resultados evidenciaram que SASH1 é um regulador negativo da agressividade tumoral associada a transição epitelial-mesenquimal (EMT), que é uma das principais vias pelas quais o tumor gera uma metástase. Logo, a sua superexpressão foi responsável por diminuir a EMT, reduzindo a capacidade metastática *in vitro* e *in vivo*.

Ardelt *et al.* (2018) relacionaram a ablação de Cdk5, mediada por CRISPR e pelo fármaco Dinaciclib, como uma estratégia para melhorar a resposta do CHC ao medicamento sorafenibe em estudos *in vitro* e *in vivo*. Nos resultados, a inibição de Cdk5 melhorou a resposta do CHC ao sorafenibe por impedir a ativação compensatória da sinalização do fator de crescimento, que é uma forma desse câncer adquirir resistência aos efeitos do quimioterápico. Concluiu-se que o bloqueio de Cdk5 pode ser uma técnica promissora para aumentar a eficácia do sorafenibe, contribuindo para a melhora do quadro clínico de pacientes com CHC em estágio avançado.

Bialk *et al.* (2018) concatenaram o nocaute de NRF2, proteína responsável por aumentar a resistência de tumores à quimioterápicos, à diminuição da progressão tumoral e ao aumento da quimiossensibilidade em linhagem de células de câncer de pulmão e modelos de camundongos xenoenxertados. Ao utilizar CRISPR/Cas9, os autores evidenciaram que cerca de 68% das células continham o gene responsável nocauteado, levando a uma diminuição da proliferação celular e aumento da sensibilidade aos quimioterápicos cisplatina e carboplatina. Como resultados, o nocaute desse gene tem um ótimo potencial para ser utilizado no tratamento desse câncer, entretanto, essa metodologia não dispensa o uso dos medicamentos citados, considerados os de uso habitual para o tratamento desta enfermidade.

Li *et al.* (2019) empregaram lipossomas para carrear o sistema CRISPR/Cas9 diretamente para o tumor e bloquear a síntese de HIF-1 $\alpha$  de forma *in vivo* e *in vitro*, com o objetivo de reduzir a capacidade metastática do câncer pancreático. Os autores concluíram que o bloqueio de HIF-1 $\alpha$  mediado por CRISPR foi maior nos modelos *in vitro* quando comparados aos *in vivo*. Por outro lado, a inibição em camundongos não resultou em toxicidade de células normais, evidenciando uma alta precisão desse sistema. Por fim, ressaltaram que o bloqueio

desse fator aumentou a atividade antitumoral e reduziu a capacidade de metástase dos tumores tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*.

Albers *et al.* (2019) aplicaram o CRISPR/Cas9 para realizar um nocaute do gene que codifica a cadeia alfa de células T e posteriormente substituíram-na por uma capaz de reconhecer um peptídeo proveniente da mieloperoxidase, um antígeno associado ao tumor em pacientes com neoplasias mieloides, utilizando a metodologia *knock in* através do mecanismo HDR, com uma taxa de sucesso em média de 27%. Ao final, evidenciou-se que as células transgênicas construídas reconheciam e lisavam especificamente as células tumorais que expressavam o peptídeo da mieloperoxidase *in vitro*, sem causar danos a células saudáveis. Ademais, foram capazes de rejeitar potentemente os tumores em modelos de camundongos xenoenxertados *in vivo*.

Chen *et al.* (2019) buscaram relacionar a interação entre o gene Mcl-1 e a proteína quinase B (Akt) ao crescimento tumoral em linhagem de células e camundongos xenoenxertados com adenocarcinoma pulmonar. Os autores evidenciaram que o bloqueio de Mcl-1, mediado por CRISPR/Cas9, interrompe a sua interação com a Akt (proteína oncogênica) no domínio de homologia de pleckstrina. As interações desse domínio e o domínio quinase (PH) são importantes para manter a proteína quinase B inativa. Os autores utilizaram a molécula PH-687 para bloquear a interação entre Mcl-1 e a Akt a fim de interromper a progressão tumoral. Os resultados evidenciaram que tanto o bloqueio mediado por CRISPR/Cas9 quanto o pela molécula inibiram fortemente o avanço do tumor nos testes *in vitro* e *in vivo*, considerando ser uma estratégia altamente atrativa para o tratamento de câncer de pulmão.

Zhou *et al.* (2020) correlacionaram a inibição do gene EZH2 ao aumento da apresentação de antígenos tumorais, à redução da resistência na terapia anti-PD-1 e ao aumento da imunidade antitumoral. Foi empregada uma terapia conjunta que bloqueou a produção dessa proteína utilizando o CRISPR/Cas9 ou bloqueadores farmacológicos (GSK126 e EPZ6438). Além disso, foram utilizados anticorpos de bloqueio anti PD-1 para evitar a apoptose dos linfócitos responsáveis por exercer a função de imunidade antitumoral. Os resultados evidenciaram que o bloqueio de EZH2 regulou positivamente a expressão de Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe I, aumentando a imunidade antitumoral em células de câncer de cabeça e pescoço em teste *in vitro* e em modelo *in vivo*. Assim, a combinação de bloqueio de EZH2 com antiPD-1 pode aumentar a sensibilidade terapêutica no câncer de cabeça e pescoço.

Deng *et al.* (2020) estabeleceram relações entre o nocaute de Cdk5 mediado por *knock out* de CRISPR/Cas9 e diminuição da expressão de PD-L1 em modelos de câncer de mama e

melanoma murino. Os resultados mostraram que o nocaute da Cdk5 atenuou a expressão de PD-L1, contribuindo para o aumento da atividade antitumoral mediada por linfócitos T, suprimindo o crescimento dos tumores e reduzindo a capacidade de metástase.

Dentre os estudos incluídos, o único com teste *ex vivo* foi realizado por Stadtmauer *et al.* (2020) que buscaram nocautear, utilizando CRISPR/Cas9, três genes (TRAC, TRBC e PDCD1) que estão altamente relacionados a imunidade antitumoral de células T em diversos tipos de câncer. No teste, os linfócitos T foram retirados dos próprios pacientes, modificados utilizando a técnica baseada em endonucleases e novamente inseridos para que os seus efeitos sob o tumor fossem avaliados. Os resultados revelaram que após a edição, 30% das células não possuíam mutações detectáveis, ao mesmo tempo que 40% tinham uma mutação única, e 20 e 10% eram duplamente e triplamente mutadas, respectivamente. Outras evidências mostraram que as células T editadas enxertadas nos pacientes se mantiveram estáveis por pelo menos 9 meses. Durante esse período houve redução dos antígenos tumorais, evidenciando que a edição de linfócitos T para o tratamento do câncer é segura e viável usando CRISPR-Cas9.

A pesquisa evidenciou que a metodologia de *knock out* foi a mais empregada quando o objetivo é utilizar a técnica para o tratamento direto da doença, podendo ou não, ser utilizada em conjunto com um inibidor farmacológico, como mostram os estudos de Kennedy *et al.* (2014), Taeyoung *et al.* (2017), Chen *et al.* (2019), Zhou *et al.* (2020). A metodologia *knock in* foi amplamente utilizada para potencializar a ação de oncogenes e introduzir mutações corretivas em genes defeituosos, demonstradas nos trabalhos de Song *et al.* (2018), Franke *et al.* (2018) e Albers *et al.* (2019). Por fim, a metodologia CRISPR *activation* foi utilizada em apenas no estudo de Moses, *et al.* 2019, muito provavelmente devido ao alto custo e os poucos estudos com relação a utilização dessa metodologia CRISPR.

Com relação aos tipos de estudos, a maioria dos estudos utilizaram métodos *in vitro* associado ao *in vivo*, totalizando 11 estudos. Essa associação entre os dois tipos de estudo é de suma importância, pois permite realizar uma comparação do efeito da técnica entre linhagem de células e sistemas vivos propriamente ditos.

Estudos *in vitro* foram o segundo tipo mais encontrado, somando 8 trabalhos discutidos, apesar de serem relativamente mais baratos do que a associação de estudos *in vitro* e *in vivo*. Por outro lado, foram discutidos apenas dois estudos que utilizavam somente metodologias *in vivo*. Apenas um trabalho (Stadtmauer *et al.*, 2020) utilizou-se de experimentos *ex vivo*, podendo ser um novo caminho a ser estudado em futuros trabalhos.

As evidências encontradas pelos autores dos estudos incluídos nessa revisão sistemática denotam, quase em sua totalidade, que a técnica CRISPR/Cas9 é uma alternativa promissora para o combate a diversos tipos de câncer que atualmente são de difícil tratamento, assim como demonstram os estudos de Jubai, Fallaha e Mcmillan (2019), Liu *et al.* (2020), Stadtmauer *et al.* (2020) e Deng *et al.* (2020).

Além de inibir uma gama de oncogenes e oncoproteínas, o CRISPR/Cas9 consegue aumentar, com alta taxa de sucesso, a sensibilidade de células tumorais à diversos quimioterápicos, podendo evitar a necessidade de cirurgias para retirada do tumor ou órgão. Assim, essa técnica pode contribuir para um melhor prognóstico sem a necessidade de tratamentos invasivos. Ademais, a técnica poderá ser utilizada no futuro para potencializar a imunidade antitumoral através da manipulação dos linfócitos T, aumentando sua resistência a apoptose pela retirada da PD-1 e do seu receptor PD-L1.

Vale ressaltar que existem muitos trabalhos interessantes, como o de Moses *et al.* (2019) que utilizaram CRISPa para superexpressar uma proteína supressora de tumor, trazendo resultados promissores que evidenciam que o aumento da expressão desses genes pode ser tão eficaz quanto o silenciamento de oncogenes. Ou ainda o trabalho de Albers *et al.* (2019), que nos permite refletir sobre o papel da edição de linfócitos no tratamento dessa doença, demonstrando resultados que evidenciam que a cura do câncer pode estar no nosso próprio sistema imunológico, caso ele esteja completamente funcional.

Por fim, diante de várias evidências apresentadas pelos trabalhos exibidos nessa revisão sistemática, destaca-se que o CRISPR/Cas9 vem ganhando o posto de uma das principais alternativas para o tratamento do câncer e outras doenças de caráter genético. Todos os autores apresentaram resultados promissores que apontavam o CRISPR/Cas9 como um método muito preciso e versátil. É notório que a metodologia de *knock out* é o principal caminho a ser trilhado por essa técnica, pois observa-se que o silenciamento de oncogenes e oncoproteínas é veemente eficaz para a redução de tumores malignos.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do trabalho foi atingido, já que foram encontradas evidências que referem a técnica estudada como uma alternativa promissora para o tratamento à carcinomas malignos.

No que diz respeito às evidências encontradas, os dados publicados pelos autores dos artigos incluídos na revisão demonstraram que o CRISPR/Cas9 tem um potencial promissor para o tratamento oncológico, tendo importantes resultados na inibição de genes e proteínas oncogênicas, aumento da imunidade antitumoral, potencialização de genes supressores de tumores e no aumento da sensibilidade à quimioterápicos. Ademais, a maior parte dos autores postularam por novos métodos de entrega, principalmente para tratamentos *in vivo*, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de novos sistemas de empacotamento para a entrega da endonuclease no local alvo.

Contudo, os resultados alcançados com a elaboração desse trabalho demonstram que essa técnica é inovadora, possui resultados positivos e tem uma alta taxa de eficácia para o tratamento de doenças oncológicas, principalmente nos casos de metástase ou onde o câncer se encontra em estado avançado. Assim, essa revisão sistemática tem grande importância servindo como base de conhecimento para futuros trabalhos e trazendo grandes contribuições, pois realiza um apanhado dos artigos mais atuais no que tange a utilização da técnica CRISPR/Cas9 para o tratamento de câncer na área de terapia gênica e biologia molecular.

## REFERÊNCIAS

- ALBERS, J.J. *et al.* Gene editing enables t-cell engineering to redirect antigen specificity for potent tumor rejection. **Life Science Alliance**, v. 02, n. 02, mar. 2019.
- ARAÚJO, I. C. S.; BARBOSA, M. H.; BARICHELLO, E. Distúrbios do sono em homens com câncer de próstata em hormonioterapia. **Escola Anna Nery**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 4, p. 705-709, dez. 2014.
- ARDELT, M.A. *et al.* Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 5: A Strategy to Improve Sorafenib Response in Hepatocellular Carcinoma Therapy. **Hepatology**, v. 69, n. 01, p. 376-393, dez. 2018.
- AREND, M. C.; PEREIRA, J. O.; MARKOSKI, M. M. O. Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v. 108, n. 1, p. 81-83, jan. 2017.
- BATISTA, D. R. R.; MATTOS, M.; SILVA, S. F. Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Enfermagem da UFSM**, Rio Grande do Sul, v. 5, n. 3, p. 499-510, 1 out. 2015.
- BIALK, P. *et al.* Functional Gene Knockout of NRF2 Increases Chemosensitivity of Human Lung Cancer A549 Cells In Vitro and in a Xenograft Mouse Model. **Molecular Therapy Oncolytics**, v. 11, p. 75-89, dez. 2018.
- BU, X. *et al.* CD38 knockout suppresses tumorigenesis in mice and clonogenic growth of human lung cancer cells. **Oxford journals Carcinogenesis**, v. 39, n. 02, p. 242-251, fev. 2018.
- BUI, N. *et al.* Disruption of NSD1 in Head and Neck Cancer Promotes Favorable Chemotherapeutic Responses Linked to Hypomethylation. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 17, n. 07, p. 1585-1594, jul. 2018.
- CAETANO, G.C.G. *et al.* Técnica crispr-cas9 e sua utilização na área Laboratorial. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, Minas Gerais v. 25, n. 2, p. 96-99, fev. 2019.
- CAI, J. *et al.* Ultrasound microbubble-mediated crispr/cas9 knockout of c-erbb-2 in hec-1a cells. **Journal of International Medical Research**, v. 47, n. 05, p. 2199-2206, maio, 2019.
- CHEN, G. *et al.* Mcl-1 Interacts with Akt to Promote Lung Cancer Progression. **Cancer Research**, v. 79, n. 24, p. 6126-6138, out. 2019.
- DALL'OGGIO, M. *et al.* Carcinoma de células renais incidentais e sintomáticos: fatores patológicos e sobrevida. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 50 no. 1, p. 27-31, 2004.
- DENG, H. *et al.* Cdk5 knocking out mediated by CRISPR-Cas9 genome editing for PD-L1 attenuation and enhanced antitumor immunity. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 02, p. 358-373, fev. 2020.

DROST, J. *et al.* Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. **Science**, v. 358, n. 6360, p. 234–238, set. 2017.

FAN, Y. *et al.* Ku80 gene knockdown by the CRISPR/Cas9 technique affects the biological functions of human thyroid carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 42, n. 06, p. 2486-2498, dez. 2019.

FRANKE, F.C. *et al.* The Tumor Suppressor SASH1 Interacts With the Signal Adaptor CRKL to Inhibit Epithelial–Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 07, N. 01, p. 33-53, set. 2018.

HOANG-MINH, L.B. *et al.* PCM1 Depletion Inhibits Glioblastoma Cell Ciliogenesis and Increases Cell Death and Sensitivity to Temozolomide. **Translational Oncology**, v. 09, n. 05, p. 392-402, out. 2016.

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Revista Cell**, v. 157, n. 06, p. 1262-1278, jun. 2014.

JUBAI, L.; FALLAHA, S.; MCMILLAN, N. A. Systemic Delivery of CRISPR/Cas9 Targeting HPV Oncogenes Is Effective at Eliminating Established Tumors. **Molecular Therapy**, v. 27, n. 12, p. 2091-2099, dez. 2019.

KAWAMURA, N. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG and NANOGP8 decreases the malignant potential of prostate cancer cells. **Oncotarget**, v. 06, n. 26, p. 22361–22374, set. 2015.

KENNEDY, E.M. *et al.* Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. **American Society of Microbiology: Journal of Virology**, v. 88, n. 20, p. 11965-11972, out. 2014.

KHAODEE, W. *et al.* Knockout of glucosidase II beta subunit inhibits growth and metastatic potential of lung cancer cells by inhibiting receptor tyrosine kinase activities. **Scientific Reports**, relatório n. 9, artigo n. 10394, jul. 2019.

LI, M. *et al.* Knockdown of hypoxia-inducible factor-1 alpha by tumor targeted delivery of CRISPR/Cas9 system suppressed the metastasis of pancreatic cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 304, p. 204-215, jun. 2019.

LIU, B. *et al.* CRISPR-mediated ablation of overexpressed EGFR in combination with sunitinib significantly suppresses renal cell carcinoma proliferation. **Plos One**, v. 15, n. 05, maio 2020.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 2, n. 2, p. 0, 2002.

MARTINEZ-LAGE, M. *et al.* CRISPR/Cas9 for Cancer Therapy: Hopes and Challenges. **Biomedicines**, v. 6, n. 4, p. 105. Nov. 2018.

- MATANO, M. *et al.* Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. **Nature Medicine**, Tokyo, v. 21, n. 3, p. 256 – 262, mar 2015.
- MATTOS, K. *et al.* Estratégias de Enfrentamento do Câncer Adotadas por Familiares de Indivíduos em Tratamento Oncológico. **Revista Psicologia e Saúde**, Campo Grande, v. 8, n. 1, p. 1-6, jan./jun. 2016.
- MONTERO, A. *et al.* Control de síntomas crónicos. Efectos secundarios del tratamiento de radioterapia y quimioterapia. **Oncología**, Barcelona, v. 28, n. 3, p. 147-156, mar. 2005.
- MORANGE, M. What history tells us XXXIX. CRISPR-Cas: From a prokaryotic immune system to a universal genome editing tool. **Journal of Biosciences**, v. 40, p. 829-832, nov. 2015.
- MOSES, C. *et al.* Activating PTEN Tumor Suppressor Expression with the CRISPR/dCas9 System. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 14, p. 287-300, mar. 2019.
- PLAT, R.J. *et al.* CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. **Cell**, v. 159, n. 02, p. 440–455, out. 2014.
- QI, L.S. *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. **Resource**, v. 152, n. 05, p. 1173-1183, fev. 2013.
- RAMOS, A.D.F. **CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias.** (Dissertação) Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2016. Disponível em: <https://eg.uc.pt/bitstream/10316/42065/1/MONO-DAVID.pdf>. Acesso em 05 out. 2020.
- RODRIGUES, A.N. *et al.* Rastreo de câncer na prática clínica: recomendações para a população de risco habitual. **Revista Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, Belo Horizonte, v. 17, n. 04, p. 01-10, 2019.
- SONG, J. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated knockout of HBsAg inhibits proliferation and tumorigenicity of HBV-positive hepatocellular carcinoma cells. **Wiley: Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 10, p. 8419-8431, jun. 2018.
- STADTMAUER, E.A. *et al.* CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. **Science Journals**, v. 367, n. 6481, fev. 2020.
- TAEYOUNG, K. *et al.* Selective disruption of an oncogenic mutant allele by CRISPR/Cas9 induces efficient tumor regression. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 13, p. 7897-7908, jul. 2017.
- WANGENSTEEN, K.J. *et al.* Combinatorial genetics in liver repopulation and carcinogenesis with a in vivo CRISPR activation platform. **Revista Hepatology**, v. 68, n. 02, p. 663-676, ago. 2018.
- WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351-360, ago. 2002.

ZAIMY, M.A. *et al.* New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. **Cancer Gene Therapy**, v. 24, p. 233-243, jun. 2017.

ZHAN, T. *et al.* CRISPR/Cas9 for câncer research and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 55, p. 106-119, abr. 2019.

ZHOU, L. *et al.* Targeting EZH2 Enhances Antigen Presentation, Antitumor Immunity, and Circumvents Anti-PD-1 Resistance in Head and Neck Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 01, p. 290-300, jan. 2020.

ZHU, B. *et al.* Knockout of the Nogo-B Gene Attenuates Tumor Growth and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma. **Neoplasia**, v. 19, n. 07, p. 583-593, jul. 2017.