



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Luiz Felipe Mendes Da Silva

**Aplicação da técnica CRISPR-Cas9 como possível alternativa de tratamento à neoplasias
malignas**

Rio de Janeiro

2022

Luiz Felipe Mendes Da Silva

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA CRISPR-CAS9 COMO POSSÍVEL ALTERNATIVA DE TRATAMENTO À
NEOPLASIAS MALIGNAS**

**Monografia apresentada à Escola Politécnica de
Saúde Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo
Cruz (EPSJV-Fiocruz) como requisito parcial
para aprovação no Curso Técnico em
Biotecnologia.**

Orientador(a): Daniel Santos Souza

Rio de Janeiro

2022

*Mesmo desacreditado
e ignorado por todos,
não posso desistir,
pois para mim, vencer
é nunca desistir.
(Albert Einstein)*

RESUMO

O CRISPR refere-se a uma região do genoma bacteriano que, associado a endonuclease cas9, atua como um sistema de defesa da bactéria contra fagos. Nos últimos anos, porém, pesquisadores perceberam que esse sistema poderia ser projetado para cortar qualquer sequência de DNA com extrema precisão, possibilitando alterações em materiais genéticos. Uma das aplicações clínicas dessa técnica é a engenharia de materiais autólogos de pacientes para tratamento de câncer. A mais recente estimativa (2018) aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos (INCA, 2020). Portanto, medidas são necessárias para resolver o impasse. A técnica CRISPR aparece como uma forte opção de tratamento anticâncer. Este projeto tem como objetivo analisar o CRISPR enquanto sistema de defesa bacteriano, compreender a técnica CRISPR como ferramenta de edição genética e estudar a técnica CRISPR como alternativa de tratamento a certos tipos de neoplasias malignas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
1.1 JUSTIFICATIVA	08
2. OBJETIVOS	09
2.1. OBJETIVO GERAL	09
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	09
3. METODOLOGIA	10
4. DESENVOLVIMENTO	11 - 25
5. CONCLUSÃO	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27 - 28

1. INTRODUÇÃO

A técnica de edição genética conhecida como CRISPR está ganhando novos usos e pode transformar o diagnóstico e o tratamento de muitas doenças, incluindo o câncer. Em 2011, a microbiologista francesa Emmanuelle Charpentier colaborou com a bioquímica americana Jennifer Doudna para descobrir esta ferramenta baseada em "tesouras moleculares" (CRISPR-Cas9). Essa conquista rendeu às pesquisadoras o Prêmio Nobel de Química de 2020 (MELLO, 2021).

CRISPR significa Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, ou conjunto de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas, e refere-se a uma região do genoma bacteriano caracterizada pela presença de sequências curtas de DNA repetitivo. As bactérias têm um sistema que replica o DNA do vírus cada vez que são atacadas. No próximo ataque, eles usam essa memória para identificá-lo. A proteína Cas9 da bactéria, codificada pelo RNA, age como uma tesoura, eliminando partes do DNA do vírus em um novo ataque, impedindo que ele se multiplique. (MELLO, 2021).

Em 2013, o pesquisador do MIT, Feng Zhang, publicou o primeiro relatório sobre edição de genes humanos baseada em CRISPR. O cientista e sua equipe reconheceram o potencial do sistema CRISPR para gerar modificações altamente direcionadas em genes humanos e criaram um método para identificar o RNA guia e a proteína Cas9 em células humanas.

A principal vantagem da edição genética via CRISPR sobre outros métodos é sua especificidade e precisão, mesmo para sequências genéticas muito pequenas. A ferramenta já foi testada em um estudo de fase I em pacientes humanos, no qual as células do paciente foram coletadas, modificadas em laboratório e reintroduzidas (MELLO, 2021).

Em comparação com outras tecnologias, a engenharia CRISPR apresenta vantagens no diagnóstico rápido e menor custo. É, sem dúvida, outro recurso importante para o tratamento de muitas doenças, mas ainda está em estágio inicial para pacientes humanos.

As estruturas de pesquisa do câncer ampliam as possibilidades de diagnóstico e tratamento dos pacientes. Dessa forma, desenvolvimentos como o CRISPR estão tendo um grande impacto e anunciando novas abordagens para o tratamento do câncer nas próximas décadas (MELLO, 2021).

1.1 JUSTIFICATIVA

Dados mostram que o câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura na maioria dos países, segundo informações obtidas através dos registros de câncer de base populacional (RCBP), Registros hospitalares de câncer (RHC) e pelo sistema de informações sobre mortalidade (SIM). A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo, em parte pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico.

A mais recente estimativa, ano 2018, aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos (INCA, 2020). Ou seja, mais de 50% dos pacientes diagnosticados com câncer morrem, o que evidencia uma certa ineficiência por parte dos tratamentos anticâncer. Portanto, medidas são necessárias para resolver o impasse. A técnica CRISPR aparece como uma forte opção de tratamento anticâncer, logo, esse estudo busca salientar a técnica CRISPR como alternativa ao combate a esse problema.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Salientar a técnica CRISPR como alternativa de tratamento a neoplasias malignas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Descrever o CRISPR enquanto sistema de defesa bacteriano.
- 2) Compreender a técnica CRISPR como ferramenta de edição genética e estudar a Técnica CRISPR como alternativa de tratamento a certos tipos de neoplasias malignas.

3. METODOLOGIA

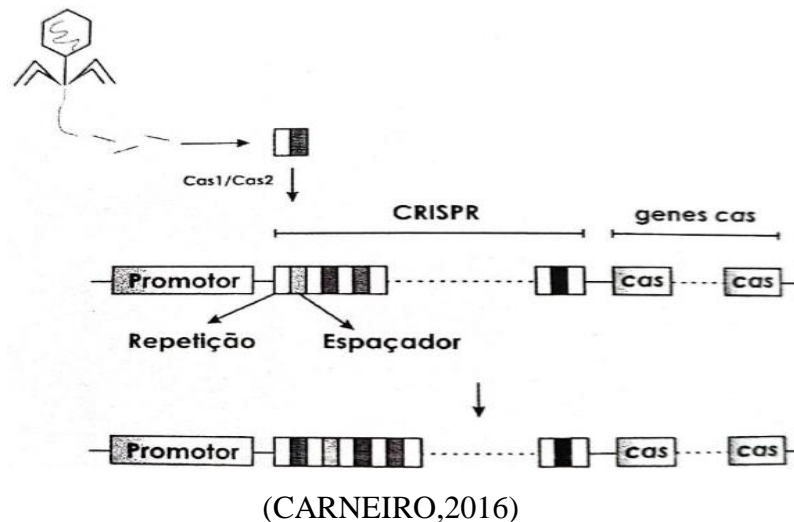
O projeto estará baseado na abordagem qualitativa. Usará como estratégias de pesquisa a revisão da literatura por meio da busca nas bases de dados Medline, e por meio do portal PubMed, e do buscador google acadêmico e tendo como referência os descritores CRISPR, Cas9, câncer e genome-engineering.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1. CAPÍTULO 01

4.1.1. DESCOBERTA DO LOCO CRISPR

Yoshizumi Ishino, pesquisador da Universidade de Osaka, no Japão, e seus colaboradores descobriram um locus (região) específico no genoma da *Escherichia coli* que consistia em uma estrutura incomum: sequências repetidas e funções esporádicas com intervalos de sequências desconhecidas. Essas sequências foram estudadas independentemente em 1993 e identificadas nos genomas de várias bactérias e archaeas em 2000. Somente em 2002 o acrônimo CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) designou essas sequências (CARNEIRO, 2016).



Ao longo dos anos, foi identificado um grupo de genes muito próximos do locus CRISPR e denominados genes Cas (genes associados ao CRISPR). Exemplificados por nucleases¹, polimerases² e helicases³, que são centrais para a função de todo o sítio (CARNEIRO, 2016).

¹ Nucleases são enzimas com a capacidade de quebrar ligações entre nucleotídeos.

² Polimerases são enzimas que sintetizam longas cadeias de polímeros ou ácidos nucleicos.

³ Helicases são enzimas que se ligam e podem até remodelar complexos de ácido

Em 2005, três grupos independentes de pesquisadores mostraram que as sequências espaçadoras (ou simplesmente espaçadores) são de origem extracromossômica, ou seja, de plasmídeos⁴ ou vírus. Além disso, também foi relatado que os vírus não conseguem infectar bactérias com sucesso com espaçadores cujas sequências correspondem às suas sequências genômicas (CARNEIRO, 2016).

Com base nessas descobertas, o CRISPR-Cas foi hipotetizado em 2005 como o sistema imunológico adaptativo dos procariontes⁵, no qual os espaçadores agem como uma "memória de invasões passadas". Assim, as moléculas de RNA geradas a partir desses espaçadores seriam complementares ao patógeno (re)invasor, permitindo combatê-lo de maneira sequência-específica (CARNEIRO, 2016).

4.1.2. papel biológico do CRISPR-Cas

O sistema CRISPR-Cas é um mecanismo de defesa adaptativo que permite que os procariontes se protejam contra a (re)invasão de elementos genéticos móveis indesejados, como fagos, transposons⁶ e plasmídeos, assemelhando-se a um sistema imunológico adaptativo nesses organismos. O mecanismo de defesa consiste em três etapas: adaptação, biogênese do crRNA e ação contra o invasor (CARNEIRO, 2016).

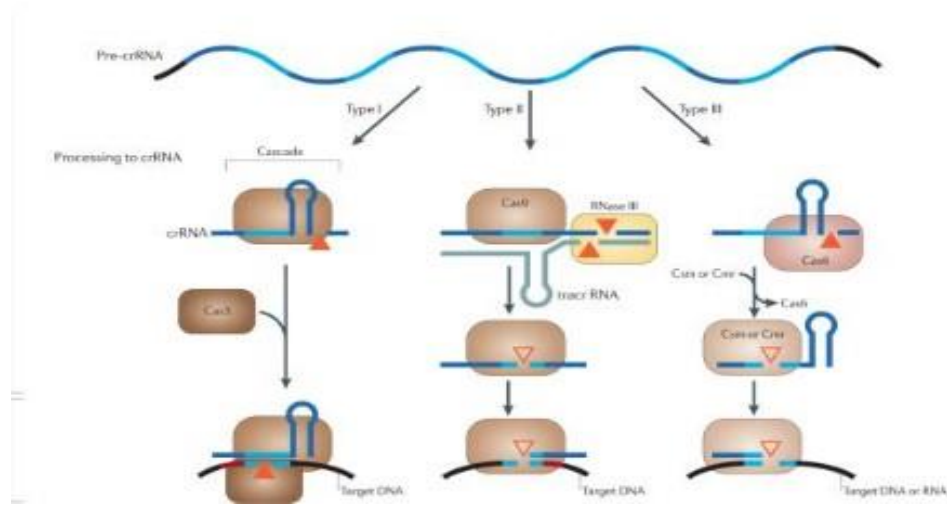
A primeira etapa, adaptação, caracteriza-se pela aquisição de novos espaçadores no locus CRISPR. Isso acontece, por exemplo, quando uma bactéria é infectada por um vírus pela primeira vez. Nesse ponto, algumas das enzimas codificadas pelos genes Cas (Cas1 e Cas2) clivam o DNA do patógeno em pequenos fragmentos (24 a 48 pares de bases) e os integram ao locus CRISPR como novos espaçadores (ou seja, repetições). A partir deste momento, a bactéria estará imune a futuras invasões deste patógeno (CARNEIRO, 2016). Os espaçadores são componentes importantes do sistema CRISPR-Cas, pois são fundamentais para a geração da memória imunológica. Esses espaçadores também servem como um indicador de quantas invasões ocorreram em uma célula, pois quanto mais colunas houver no sistema CRISPR-Cas, mais invasões ocorreram (ANDRADE, 2022).

⁴ Estrutura de DNA circular extracromossomial, de duplicação independente (replicon), localizada no citoplasma da célula, que não é responsável por características essenciais da bactéria. (TEVA, 2010)

⁵ Organismos unicelulares com material genético disperso no citoplasma.

⁶ Sequências de DNA móveis que podem se autorreplicar em um determinado genoma.

No segundo estágio - biogênese do crRNA (RNA derivado do CRISPR) - ocorre a transcrição ininterrupta do locus CRISPR. Esse processo é mediado pela sequência líder (L), uma região rica em adenina e timina que serve como sítio promotor. A transcrição deste local resulta em "pré-RNA CRISPR" (ou pré-crRNA), que contém múltiplas repetições e múltiplos espaçadores em um longo RNA. Em seguida, esse pré-crRNA é processado, dando origem a diversos RNAs menores – os crRNAs -, cada qual correspondendo a um espaçador distinto (CARNEIRO, 2016).



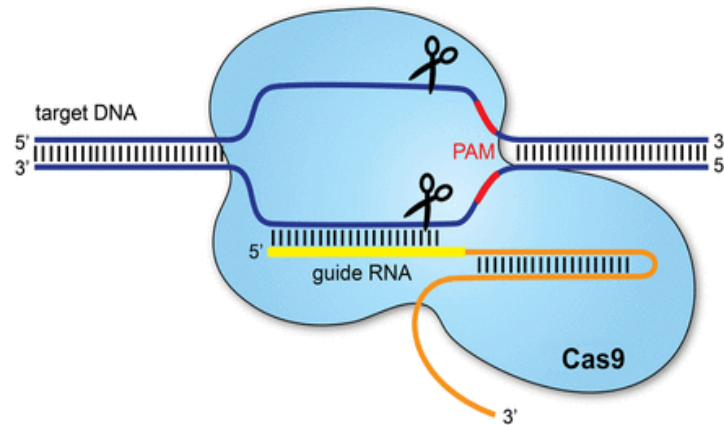
(MAKAROVA, 2022)

Por fim, no terceiro momento - ação contra o DNA invasor - o RNA maduro forma um complexo com a proteína Cas, que reconhece e destrói a sequência genética estranha (plasmídeo, transposon ou vírus) (CARNEIRO, 2016).

4.1.3. Moléculas envolvidas na técnica CRISPR-Cas9

Uma proteína relacionada é a Cas9, uma endonuclease⁷ que cliva o DNA de fita dupla. A Cas9 é direcionada ao seu alvo por uma seção de RNA.

⁷ grupo de enzimas que quebram a ligação fosfodiéster presente dentro da cadeia de polinucleotídeos de uma molécula de DNA. (CHEE, 2022)



SISTEMA CRISPR/CAS9 (REDMAN, 2016).

O núcleo Cas9 realiza clivagem específica de fita usando domínios de nuclease HNH e RuvC conservados que podem ser mutados e usados para outras funções (RAN, FA, 2013).

Outra molécula envolvida é o RNA guia. A dupla TracrRNA:crRNA foi desenvolvida como um RNA guia único (sgRNA) com duas características críticas: uma sequência no lado 5'⁸ que especifica o direcionamento do DNA e uma estrutura duplex de RNA no lado 3' que se liga a Cas9. Essa descoberta estabeleceu um sistema simples de dois componentes no qual as alterações na sequência líder do sgRNA Cas9 são direcionadas a qualquer sequência de DNA de interesse (DOUDNA, 2014).

DNA alvo, a região de DNA cortada pela nuclease Cas9 possui dois elementos: o próprio alvo e a sequência PAM. Na extremidade 5' do sgRNA está uma sequência líder (~20 nt⁹) que direciona Cas9 para encontrar uma sequência alvo complementar de ~20 nt no DNA. Esse recurso teoricamente tornaria o evento específico, porque o alvo de 20 nt ocorre apenas uma vez em cada trilhão de nt. O complexo Cas9/sgRNA interage com o alvo apenas quando a segunda fita de DNA possui um motivo PAM adjacente (CARNEIRO, 2016).

4.1.4. Sistema CRISPR tipo II

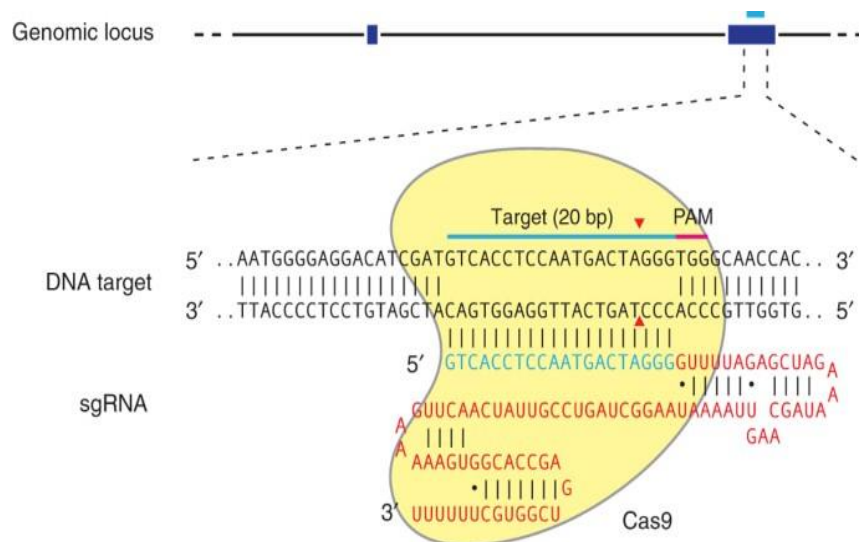
⁸ As duas extremidades de uma cadeia de ácido nucleico denominam-se extremidade 5' e extremidade 3'.

⁹ Nucleotídeos

O sistema CRISPR Tipo II é o sistema mais simples de todos. É determinado pela endonuclease Cas9 dirigida por crRNA. O gene Cas9 é o único necessário para combater o DNA invasor neste sistema. Durante a infecção, o complexo formado pela Cas9 destrói o genoma viral, contando também com o domínio PAM. A enzima Cas9 contém dois domínios com atividade de nuclease (RuvC e HNH¹⁰) que estão envolvidos na imunidade (CARNEIRO, 2016).

Cada unidade de crRNA contém então uma sequência de guia de 20 nt e uma repetição direta parcial, onde o primeiro direciona Cas9 para um alvo de DNA de 20 bps via emparelhamento base Watson-Crick. No sistema CRISPR-Cas o DNA alvo deve preceder imediatamente um PAM de 5'-NGG (CARNEIRO, 2016).

A função nuclease guiada por RNA do CRISPR-Cas é reconstituída em células mamíferas através da expressão heteróloga do Cas9 otimizado pelo códon humano e dos componentes necessários do RNA. Além disso, o crRNA e o tracrRNA podem ser fundidos para criar um RNA quimérico de guia único (sgRNA). Portanto, Cas9 pode ser redirecionado para quase qualquer alvo de interesse próximo à sequência PAM, modificando a sequência líder de 20 nt do sgRNA (RAN, FA, 2013).

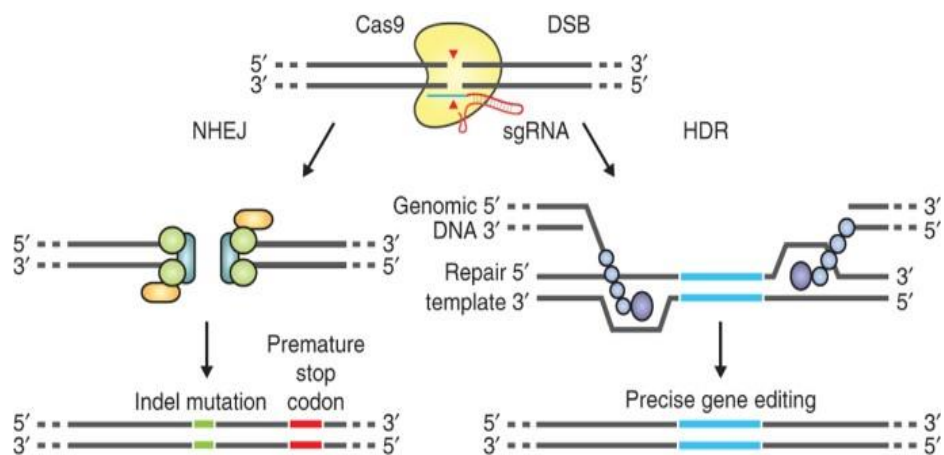


¹⁰ Os motivos do local ativo RuvC e HNH do Cas9 contribuem para o decote de fios de DNA opostos. (GASEUNAS, GIEDRIUS, 2012)

O nuclease Cas9 de *S. pyogenes* (em amarelo) é direcionado para o DNA genômico por um sgRNA consistindo de uma sequência guia de 20 nt (azul). A sequência guia combina com o alvo de DNA (barra azul no fio superior), diretamente acima de um motivo adjacente necessário de 5'-NGG (PAM; rosa) (RAN, FA, 2013).

4.1.5. Vias de reparação NHEJ e HDR

Após a clivagem de Cas9, o locus alvo geralmente segue uma das duas vias principais para reparar danos no DNA: a via NHEJ propensa a erros ou a via HDR altamente precisa, ambas as quais podem ser usadas para alcançar o resultado de edição desejado. Na ausência de um modelo de reparo, os DSBs são ligados pelo processo NHEJ, deixando cicatrizes na forma de mutações de inserção/exclusão (indel). NHEJ pode ser aproveitado para mediar nocautes genéticos, como indels ocorrendo dentro de um exon, e sua codificação pode levar a mutações de mudança de quadro e codons de parada prematura. Vários DSBs podem ser explorados adicionalmente para mediar exclusões maiores no genoma (RAN, FA, 2013).



Os DSBs induzidos pelo Cas9 (amarelo) podem ser reparados de duas maneiras. Na via NHEJ propensa a erros, as extremidades de um DSB são processadas por máquinas de reparação de DNA endógenas e reencontradas, o que pode resultar em mutações indelís aleatórias no local da junção. Mutações indel que ocorrem dentro da região de codificação de um gene podem resultar em mudanças de quadros e a criação de um códon de parada prematura, resultando em nocaute genético. Alternativamente, um modelo de reparo na forma de um plasmídeo ou ssODN pode ser

fornecido para aproveitar a via HDR, que permite alta fidelidade e edição precisa. Cortes de uma única cadeia no DNA também podem induzir HDR (RAN, FA, 2013).

HDR é uma alternativa para reparar DNA. Embora o HDR normalmente ocorra em frequências mais baixas e substancialmente mais variáveis do que o NHEJ, ele pode ser aproveitado para gerar modificações precisas e definidas em um locus alvo na presença de um modelo de reparo exógeno introduzido. O modelo de reparo pode estar na forma de construções convencionais de alvo de DNA de dupla-retração com braços de homologia flanqueando a sequência de inserção, ou oligonucleotídeos de DNA de fio único (ssODNs). Este último fornece um método eficaz e simples para fazer pequenas edições no genoma, como a introdução de mutações de nucleotídeos únicos para sondar variações genéticas causais (RAN, FA, 2013).

4.2 CAPÍTULO 02

4.2.1. Introdução ao câncer

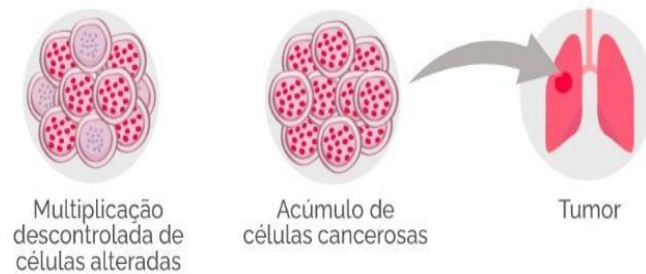
As células que compõem os tecidos do nosso corpo geralmente possuem mecanismos próprios de replicação e regeneração que diferem de acordo com as características fisiológicas e funcionais do grupo de células a que pertencem. Algumas células, por exemplo, são classificadas como células lábeis, ou seja, células que têm vida curta, mas possuem alta capacidade reprodutiva para renovar constantemente esses tecidos. Um exemplo de células lábeis são as células epiteliâis, que devem ser constantemente substituídas. Outras células, como os neurônios, são classificadas como células permanentes de vida longa com baixíssima capacidade proliferativa. Entre esses dois extremos estão células estáveis que mantêm uma maquinaria reprodutiva silenciosa, mas respondem rapidamente aos estímulos recebidos pelo organismo, reativando instantaneamente sua capacidade reprodutiva. Um exemplo disso são os fibroblastos (MEDRADO, 2015)

Assim, a proliferação celular é uma propriedade intrínseca das células que não implica necessariamente malignidade, mas pode simplesmente atender a necessidades específicas de diferentes tecidos do corpo (MEDRADO, 2015).

A condição das células cancerígenas é que as células crescem e se reproduzem de forma diferente das células normais. Em vez de passar por um ciclo de nascimento, maturação e morte, as células cancerígenas continuam a crescer descontroladamente e formam outras novas células com as mesmas características reprodutivas anormais. Entre muitos outros desvios do estado

normal da fisiologia tecidual que interferem na proliferação celular, o câncer promove o crescimento rápido, violento e descontrolado das células afetadas e permite que elas migrem para outros tecidos e espalhem essa anormalidade em diferentes regiões do corpo (MEDRADO, 2015).

O resultado desse crescimento desordenado e independente é o acúmulo gradual de células cancerígenas, culminando em uma massa volumosa chamada tumor.



(INCA, 2022)

Essas massas - tumores - que se formam a partir de células cancerígenas deformam, comprimem ou, dependendo da velocidade com que crescem, destroem o órgão de onde surgiram. Além disso, as células cancerígenas podem se infiltrar nos espaços entre os órgãos, atingir a circulação sanguínea e linfática e metastatizar para outros órgãos, onde podem crescer e formar novas massas tumorais chamadas metástases (MEDRADO, 2015).

Pode-se destacar como importante propriedade das células cancerígenas: a capacidade de proliferação, independentemente dos marcadores moleculares de crescimento, como a presença de fatores de crescimento; como a inibição por contato; resistirem à morte celular programada ou apoptose; apresentarem potencial para crescimento ilimitado, não alcançando o envelhecimento celular ou senescência; induzirem a formação de novos vasos sanguíneos ou angiogênese; apresentarem invasão de tecidos vizinhos e metástase. Estas características, associadas ou não, estão presentes em todos os tumores malignos e ilustram a complexidade desta doença (PIMENTEL, 2013).

4.2.2. Bases moleculares do câncer

O câncer é uma doença na qual as células perdem a capacidade de controlar sua multiplicação, e essa falta de controle está associada ao funcionamento inadequado dos

mecanismos de regulação dos genes. O genoma humano contém uma ampla gama de genes envolvidos na regulação de muitas funções celulares básicas, como proliferação celular, sobrevivência e diferenciação celular. No entanto, esses genes são propensos a mutações, resultando na incapacidade de regular adequadamente esses processos celulares. Acredita-se que o acúmulo gradual de pequenas mutações seja a forma como o câncer ocorre (MEDRADO, 2015).

Um dos fundamentos moleculares vitais para a compreensão da carcinogênese é a compreensão de que o câncer pode começar em células individuais que sofreram danos genéticos ou mutações. Esse dano, sem destruir a célula, pode ser transmitido para outras células por meio dos processos de reprodução e multiplicação celular, podendo piorar a cada linhagem germinativa (MEDRADO, 2015).

Como mencionado acima, alterações em genes-chave que controlam o crescimento celular podem levar ao desenvolvimento de câncer. Essas alterações podem ser hereditárias, características das síndromes de câncer hereditário, ou podem ser causadas por substâncias mutagênicas às quais estamos expostos todos os dias. A ocorrência de mutações teciduais ao longo da vida é uma característica dos carcinomas esporádicos, ou seja, não hereditários, e constituem a maioria dos tumores malignos (PIMENTEL, 2013).

Um avanço importante no entendimento dos fatores que desencadeiam o câncer foi a descoberta de um pequeno grupo de genes capazes de causar essa doença em humanos e atuar sistematicamente em vias que controlam a proliferação celular, são eles: os proto-oncogenes, os antioncogenes e os genes reguladores do apoptose (MEDRADO, 2015).

Os proto-oncogenes são os responsáveis pela produção de proteínas que sinalizam positivamente para a proliferação celular, e são responsáveis pelo crescimento de populações celulares normais. São chamados também por alguns autores de oncogenes dominantes, devido à sua potente capacidade de sofrer mutações específicas e converter células não neoplásicas em células neoplásicas. Alterações genéticas podem ocorrer se um alelo dessa combinação de genes sofrer mutação (MEDRADO, 2015).

Esses genes são encontrados nas células normais do nosso corpo e são responsáveis por codificar certas proteínas celulares, como fatores de crescimento, proteínas de sinalização transmembranar etc. (MEDRADO, 2015).

Como todos os demais genes, os proto-oncogenes possuem duas regiões: uma estrutural e outra reguladora. As regiões estruturais seriam responsáveis por codificar a sequência de

aminoácidos de uma proteína específica, enquanto as regiões regulatórias regulariam a expressão desse gene em resposta aos estímulos fisiológicos recebidos. Quando esse oncogene sofre alterações estruturais espontâneas ou extrínsecas, proteínas funcionalmente alteradas podem ser sintetizadas, levando ao desenvolvimento do tumor (MEDRADO, 2015).

Antioncogenes: os oncogenes são causados por mutações que prejudicam a função de seus produtos proteicos. Já os genes conhecidos como supressores tumorais, ou antioncogenes, são caracterizados pela perda da função de seu produto proteico, principalmente por mutações deletérias (PIMENTEL, 2013).

Se as mutações atingem determinados genes responsáveis pela supressão da proliferação celular - os genes anticancerígenos - a sua capacidade reguladora é alterada e as células não encontram obstáculos ao seu crescimento e expansão. O verdadeiro papel desse conjunto de genes nas células normais não é especificamente combater o aparecimento de tumores, mas regular negativamente o crescimento celular. Por exemplo, o crescimento de células normais cultivadas em laboratório pode ser inibido pelo contato com outras células. Eles crescem e se multiplicam até que suas membranas se tocam e começam a secretar fatores que regulam o crescimento de suas próprias células e das células vizinhas. No entanto, quando há a inativação ou a ausência de algum componente desse sistema de regulação, o que pode ser provocado por uma mutação de caráter oncogênico, a célula continua a responder positivamente aos estímulos mitogênicos e promove a formação do tumor (MEDRADO, 2015).

Genes que controlam a apoptose, recentemente, descobriu-se que os genes envolvidos na morte celular programada, também conhecida como apoptose, desempenham um papel na oncogênese. Como o equilíbrio entre as populações celulares é mediado pela taxa de proliferação celular versus taxa de perda celular, o crescimento do tumor pode ser induzido não apenas pela estimulação da proliferação celular, mas também pela redução da perda celular, entre outros motivos, através da morte celular programada.

Assim, alterações nos mecanismos genéticos que regulam a apoptose podem avançar o processo neoplásico, independentemente da taxa de proliferação celular.

Pode-se ver que as mutações no domínio do gene são responsáveis pelo aparecimento de células cancerígenas. Sabe-se também que vários estímulos, internos ou externos ao nosso corpo, podem entrar em fatores de risco e constituir as condições necessárias para o desenvolvimento do câncer. E podemos identificar três classes de agentes carcinogênicos: os agentes químicos

(substâncias produzidas por plantas, agentes alquilantes, fármacos etc.); os agentes físicos (radiação UV, radiação ionizante etc.) e os agentes biológicos (vírus de RNA, vírus de DNA etc.) (MEDRADO, 2015).

A mais recente estimativa, ano 2018, aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos (INCA, 2020). Ou seja, mais de 50% dos pacientes diagnosticados com câncer morrem, o que evidencia uma certa ineficiência por parte dos tratamentos anticâncer. Portanto, medidas são necessárias para resolver o impasse. A técnica CRISPR aparece como uma forte opção de tratamento anticâncer.

4.3. Aplicações da técnica CRISPR-Cas9 como tratamento à certos tipos de neoplasias malignas

4.3.1 HPV16, HPV18, hepatite B e poliomavírus

Foi demonstrado que a tecnologia do sistema CRISPR/Cas9 pode especificamente atingir e interromper genes virais essenciais, como resultado, o sistema CRISPR/Cas9 foi aplicado a vários vírus humanos para tratar o câncer, esses vírus incluem o vírus da HPV16 e o HPV18.

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é uma das principais causas de quase todos os tipos de carcinoma cervical. O HPV16 e o HPV18 são classificados como vírus de DNA que induzem o carcinoma cervical juntamente com as proteínas virais E6 e E7 do papilomavírus. Uma endonuclease bacteriana guiada por CRISPR/Cas RNA pode ser reprogramada em uma linha celular transformada por HPV e excluir os genes E6 ou E7. Em 2017, foi lançado um programa de pesquisa para investigar a eficácia e segurança de CRISPR/Cas9-HPV E6/E7 e talen-HPV E6/E7 no tratamento de neoplasia intraepitelial persistente relacionada ao HPV1. Os resultados mostraram que a deleção do genoma do HPV18 e HPV16 usando CRISPR é altamente eficiente na inibição do crescimento de carcinoma cervical relacionado ao HPV18. Portanto, o sistema CRISPR/Cas9 pode servir como uma nova terapia para tratar malignidades relacionadas ao HPV18 e HPV16 (XING, 2020).

4.3.2 CRISPR + CAR-T

A imunoterapia é uma estratégia de tratamento emergente com resultados clínicos promissores em tumores. Uma das aplicações mais atraentes da edição do genoma mediada por

CRISPR-Cas9 na terapia genética é a geração de células quiméricas do receptor de antígeno T (CAR-T). Normalmente, as células T autólogas são coletadas e geneticamente modificadas para atacar os antígenos do câncer *ex vivo* e, em seguida, essas células são transplantadas de volta para o paciente, uma etapa fundamental na terapia com células CAR-T. A edição do genoma das células usando o sistema CRISPR-Cas9 para produzir um CAR pode expandir significativamente os tipos de pacientes com câncer que podem usar células CAR-T para tratamento. Além disso, CAR-T promove a eficácia e segurança da terapia tumoral convencional (XING, 2020).

Atualmente, vários ensaios clínicos foram estabelecidos para explorar a eficiência e a segurança da tecnologia CRISPR-Cas9 em diferentes cânceres. Como a imunoterapia se tornou uma das abordagens terapêuticas mais importantes em múltiplas doenças, os benefícios potenciais da tecnologia CRISPR-Cas9 podem desencadear uma melhoria revolucionária na imunoterapia contra o câncer.

A terapia com células T do receptor de antígeno quimérico (CAR) mostrou efeitos significativos e perspectivas promissoras em pacientes com malignidades refratárias ou recidivantes. A tecnologia CRISPR/Cas9 é uma grande promessa para o avanço do campo devido à sua flexibilidade, simplicidade, alta eficiência e multiplexação para edição precisa do genoma. Aqui, revisamos as aplicações e usos da tecnologia CRISPR/Cas9 na engenharia de células CAR T alogênicas universais, interrompendo a sinalização inibitória para aumentar a eficácia e aproveitando novas células CAR T mais seguras e controláveis (Chenggong Li, 2020).

4.3.3 Leucemia mieloide

Em um estudo com animais, foi relatado que o sistema CRISPR/Cas9 foi usado para corrigir uma mutação sem sentido no homólogo ASXL1 na linha celular de leucemia mieloide crônica KBM5, que não tem expressão da proteína ASXL1. Seus resultados mostraram que a correção de uma mutação genética absurda em células de leucemia aumentou a sobrevivência dos camundongos *in vivo*. Este estudo demonstrou o conceito de correção de mutação genética usando a tecnologia CRISPR/Cas9 em células de leucemia humana (VALLETTA S, 2015).

4.3.4 Osteosarcoma, câncer de mama e carcinoma de nasofaringe

O sistema CRISPR-Cas9 foi usado para silenciar o gene CDK11 endógeno em uma linha celular de osteosarcoma, e os resultados mostraram que a deleção de CDK11 poderia reduzir

significativamente a proliferação e a atividade invasiva de células cancerígenas, o que indicou que o nocaute mediado do CDK11 crispr-Cas9 poderia ser uma nova forma terapêutica de tratar o osteosarcoma. Da mesma forma, a deleção mediada por CRISPR-Cas9 do gene SHCBP1 inibiu significativamente a proliferação de células de câncer de mama e promoveu a apoptose de células de câncer de mama. Além disso, o knockdown mediado por CRISPR-Cas9 de KLHDC aparentemente inibiu a proliferação e migração de células cancerígenas em uma linha celular de carcinoma de nasofaringe (FENG, 2014).

4.3.5 Inativação de genes de resistência a medicamentos

O sistema CRISPR-Cas9 também foi usado para inativar genes de resistência a medicamentos para aumentar a eficácia da quimioterapia como uma estratégia de tratamento potencial para um determinado câncer. usaram uma abordagem CRISPR em todo o genoma combinada com um inibidor de EGFR TKI (erlotinib) e CDK7/12 (THZ1) para investigar um novo medicamento para superar a resistência a medicamentos em uma linha celular de câncer de pulmão dependente de EGFR. Além disso, CRISPR/Cas9 tem sido amplamente utilizado para estudar os mecanismos de resistência a drogas em linhagens celulares de câncer de mama. A deleção baseada em CRISPR de MAP3K1 em uma linha celular de câncer mutante PIK3CA aumentou a proliferação celular e reduziu a sensibilidade celular a um inibidor de Akt (AZD5363) aumentando a fosforilação da actina in vitro e in vivo (XING, 2020).

CONCLUSÃO

A técnica CRISPR-Cas9 tem se mostrado eficiente na edição de genomas em uma variedade de tipos e organismos celulares. A curta jornada do CRISPR até agora é altamente fascinante e fornece uma esperança significativa de cura médica contra doenças mortais, como o câncer, e este trabalho teve por objetivo salientar essa técnica como tratamento à esta terrível doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE LM. **CRISPR-CAS: O SISTEMA IMUNE DAS BACTÉRIAS**. 2022. Disponível em: [CRISPR-Cas: o sistema imune das bactérias – CurtaMicro \(ufrj.br\)](#). Acesso em: Nov, 2022.
2. CARNEIRO, ANDRÉA. et al. **INTRODUÇÃO À TÉCNICA DE CRISPR**. Belo Horizonte: São José, 2016.
3. CHEE, JON. **WHAT ARE ENDONUCLEASES: DEFINITION AND FUNCTIONS**. excedr, 2022. Disponível em: <https://www.excedr.com/resources/what-are-endonucleases-definition-functions/>. Acesso em: Out, 2022.
4. Chenggong Li, Heng Mei e YU Hu. **Applications and explorations of CRISPR/Cas9 in CAR T-cell therapy**. 2020. Disponível em: [Applications and explorations of CRISPR/Cas9 in CAR T-cell therapy - PMC \(nih.gov\)](#). Acesso em: Nov, 2022.
5. Cheng, Xing. Et al. **CRISPR/Cas9 for cancer treatment: technology, clinical applications and challenges**. 2020. Disponível em: [CRISPR/Cas9 for cancer treatment: technology, clinical applications and challenges | Briefings in Functional Genomics | Oxford Academic \(oup.com\)](#). Acesso em: Nov, 2022.
6. DOUDNA, JENNIFER; CHARPENTIER, EMMANUELLE. **THE NEW FRONTIER OF GENOMA ENGINEERING WITH CRISPR-CAS9**. Science, 2014. Disponível em: [The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 | Science](#). Acesso em: Out, 2022.

7. GASIUNAS, GIEDRIUS. et al. **CAS9-CRRNA RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEX MEDIATES SPECIFIC DNA CLEAVAGE FOR ADAPTIVE IMMUNITY IN BACTERIA.** ResearchGate, 2012. Disponível em: [\(PDF\) Gasiunas, G, Barrangou, R, Horvath, P and Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc Natl Acad Sci USA 109: E2579-E2586 \(researchgate.net\).](#) Acesso em: Out, 2022.
8. INCA. **Estimativa 2020.** Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: [Estimativa 2020 - Introdução | INCA - Instituto Nacional de Câncer.](#) Acesso em: Fev, 2022.
9. INCA. **COMO SURGE O CÂNCER.** Rio de Janeiro. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>. Acesso em: Out, 2022.
10. MAKAROVA KS. et al. **EVOLUTION AND CLASSIFICATION OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS.** Pubmed, 2011. Disponível em: [Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems - PubMed \(nih.gov\).](#) Acesso em: Nov, 2022.
11. MEDRADO, LEANDRO. **CARCINOGENESE: DESENVOLVIMENTO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS.** 1. ed. São Paulo: érica, 2015.
12. Mello, R. A. D. **CRISPR, Uma Ferramenta De edição Genética, No tratamento Do Câncer.** Ver Veja Saúde. 2021. Disponível em: [CRISPR, uma ferramenta de edição genética, no tratamento do câncer | Veja Saúde \(abril.com.br\).](#) Acesso em: Jan, 2022.
13. PIMENTEL, MÁRCIA; SANTOS-REBOUÇAS, CÍNTIA; GALLO, CLÁUDIA. **GENÉTICA: ESSENCIAL.** Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
14. RAN, FA. et al. **GENOME ENGINEERING USING THE CRISPR-CAS9 SYSTEM.** Pubmed, 2013. Disponível em: [Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system | Nature Protocols.](#) Acesso em: Nov, 2022.
15. RATH, D. et al. **The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications.** Biochimie, Amsterdã, v. 117, p.119-128, abr. 2015. Acesso em jun, 2022.
16. Redman, M. et al. **What is CRISPR/Cas9?.** PubMed, 2016. Disponível em: [What is CRISPR/Cas9? - PMC \(nih.gov\).](#) Acesso em: Jan. 2022.
17. TEVA, ANTÔNIO. et al. **CONCEITOS E MÉTODOS PARA A FORMAÇÃO DE PROFISSIONAIS EM LABORATÓRIOS DE SAÚDE.** 4. Ed. Rio de Janeiro. 2010.
18. Valletta S, Dolatshad H, Bartenstein M, et al. **ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts.** 2015. Disponível em: [ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts - PMC \(nih.gov\).](#) Acesso em: Nov, 2022.

19. Yong Feng. Et al. **Targeting CDK11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system. 2014. Disponível em:** [Targeting CDK11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em: Nov, 2022.

20. Zhan, T. et al. CRISPR/Cas9 for Cancer Research And Therapy. PubMed, 2018. Disponível em: [CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em: Fev. 2022.