

O SISTEMA CRISPR-CAS9 E A POSSIBILIDADE DA EDIÇÃO GENÔMICA NO TRATAMENTO DE CÂNCER.

THE CRISPR-CAS9 SYSTEM AND THE POSSIBILITY OF GENOME EDITING IN CANCER TREATMENT.

PALARO, Emanuelle Amaral¹; GODOY, Taiany Antoniassi¹; CURIEL, Alline²,
CREMONESI, Aline Sampaio²

¹Graduando do Curso de Biomedicina – Universidade São Francisco; ²Professor do Curso de Biomedicina – Universidade São Francisco)

emanuelle.palaro@mail.usf.edu.br; taiany.godoy@mail.usf.edu.br

RESUMO. Sabemos que o câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, que compreende um grupo de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado e agressivo de células. Estimativas recentes da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) apontam que, em 2020, ocorreram aproximadamente 19 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, com 10 milhões de óbitos. A tecnologia de edição de genes conhecida como CRISPR vem ganhando novas aplicações com alto potencial para transformar o diagnóstico e o tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer. Com base nisso, o objetivo deste artigo é descrever o sistema CRISPR-CAS9 e como essa técnica poderá ser aplicada na Oncologia, apontando seus principais avanços na área, e as possibilidades da edição genômica no tratamento de câncer.

Palavras-chave: oncologia, edição de genes, terapia gênica.

ABSTRACT. It is known that cancer is one of the main public health problems in the world, which comprises a group of more than 100 diseases characterized by the disordered and aggressive growth of cells. Recent estimates from the International Agency for Cancer (IARC) point out that in 2020 there will be approximately 19 million new cases of cancer worldwide, with 1 million deaths. The gene editing technology known as CRISPR brings new cancer applications with high potential to transform the diagnosis and treatment of various diseases, among them the. Thus, the objective of this project is to describe the CRISPR-CAS9 system and how it can be applied in Oncology, its main advances in the area and the possibilities of genomic editing in the treatment of cancer.

Keywords: oncology, gene editing, gene therapy.

INTRODUÇÃO

Na década de 80, cientistas japoneses relataram a descoberta de uma estrutura presente no DNA bacteriano. Naquela época, como não existiam dados suficientes sobre a sequência do DNA, e não possuíam tecnologias avançadas como as que possuímos nos dias atuais, não foi possível aos pesquisadores descobrir a função biológica daquela estrutura conhecida hoje como CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* - Sequências curtas repetitivas palindrômicas regularmente inter espaçadas) (CARREIRA, et al., 2022). Foi então que no ano de 2011, durante seus estudos com a bactéria *Streptococcus pyogenes*, Emmanuelle Charpentier descobriu um elemento responsável por parte do sistema

imunológico da bactéria: o RNA CRISPR transativador (tracrRNA), uma molécula que atua no reconhecimento do DNA invasor. No mesmo ano, Emmanuelle Charpentier fez uma parceria com Jennifer Doudna, que trabalhava decifrando estruturas de ribozimas, também em bactérias. Assim, no ano de 2014, esta parceria resultou no desenvolvimento de uma técnica muito promissora: o sistema CRISPR-Cas9, uma “tesoura molecular” capaz de clivar, não somente o DNA viral invasor, mas qualquer sequência de DNA de qualquer organismo que contenha material genético, de maneira direcionada e específica (CARREIRA, et al., 2022).

Quando um vírus invade uma bactéria, a estrutura do DNA bacteriano conhecida como CRISPR, é capaz de armazenar o material genético desse vírus e guardar como uma espécie de memória na forma de protoespaçadores entre sequências repetidas (repetições CRISPR), formando as regiões CRISPR. O conjunto de protoespaçadores é transcrito em um RNA (tracrRNA) que funciona como guia quando interage com a endonuclease Cas9 (proteína responsável pela clivagem). Esta enzima cliva uma região específica do DNA viral, e incapacita o vírus de causar prejuízo à célula (SANDER; JOUNG, 2014).

Por utilizarem do mesmo princípio do sistema imunológico bacteriano, a descoberta dessa “tesoura molecular” rendeu às pesquisadoras Emmanuelle e Jennifer o Prêmio Nobel de Química em 2020. Essa técnica abriu muitas oportunidades para a realização de modelos experimentais que têm sido amplamente utilizados em várias linhas de células e organismos, sendo vista como uma técnica promissora para curar mutações genéticas responsáveis por diversas doenças, sendo uma delas, como exemplo, o câncer (SACHDEVA et al., 2015).

O câncer tem sido uma das patologias que mais tem atingido pessoas no Brasil e ao redor do mundo, estando entre as quatro principais causas de morte prematura na maioria dos países. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva o número de casos novos de câncer cresce a cada ano. Em 2018/2019, a estimativa de ocorrência de novos casos de cânceres foi de cerca de 600 mil para cada um desses anos (INCA, 2018).

Devido à gravidade do câncer, métodos de edição genética como o sistema CRISPR-Cas9 podem contribuir muito no tratamento dessa doença. O passo inicial no processo da edição de genes utilizando o sistema CRISPR-Cas9 é a escolha do gene alvo. É muito importante conhecer as características moleculares e estruturais dos genes e de seus produtos que se deseja editar. Quando se tem um alvo e o conhecimento da sequência de nucleotídeos que se deseja editar do gene, que, quando mutado, é associado ao desenvolvimento do câncer, por exemplo, o sistema CRISPR-Cas9 por ser uma técnica capaz de cortar e inativar ou silenciar esse gene, possibilitando o estudo do câncer em cultura de células ou, alternativamente, a correção da mutação que gera o câncer, além de criar muitas hipóteses de novas terapias gênicas para oferecer à população no futuro (CARREIRA, et al., 2022).

Este artigo tem como objetivo analisar a viabilidade da edição do material genético através do sistema de edição genômica denominado CRISPR/Cas9 no tratamento de câncer.

METODOLOGIA

Para a realização desta pesquisa bibliográfica, foram realizadas buscas em fontes publicadas em artigos científicos e livros, sendo eles acessados no período de Agosto a Novembro de 2022, nos bancos de dados do Google Acadêmico, da Scientific Electronic Library Online (SciELO), no site da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e na base de dados PubMed.

Na busca de artigos científicos nas bases de dados foram encontrados inicialmente 36 (trinta e seis) artigos científicos, resultando na seleção de 24 (vinte e quatro) artigos que contemplavam os critérios estabelecidos, tratando do tema escolhido.

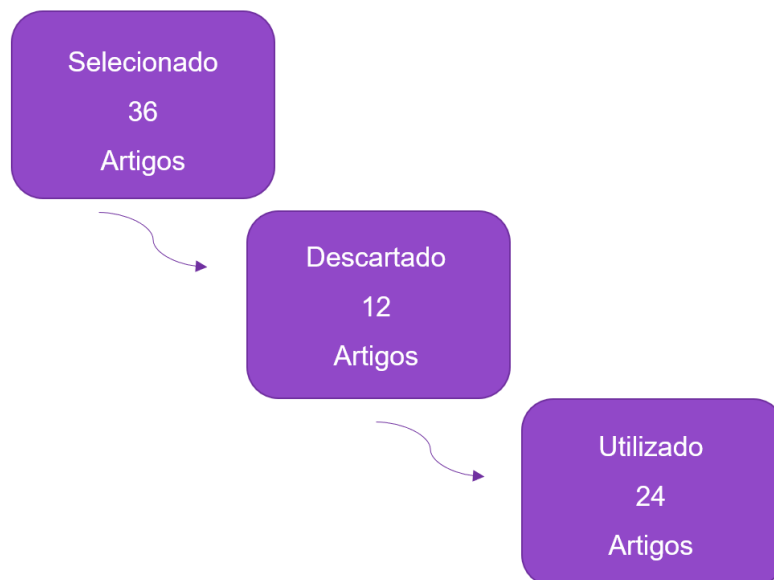


Figura 1: Para a realização deste artigo bibliográfico foram separados 36 artigos e 1 livro. Durante a elaboração, foram filtrados e selecionados 24 artigos.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Estrutura, mecanismo e vantagens do sistema CRISPR/Cas9

Existem muitos vírus no ambiente que ameaçam a sobrevivência das bactérias, e como método de defesa, elas desenvolveram um sistema imunológico adaptativo, conhecido como CRISPR que associado com a proteína Cas deu início a um sistema tecnológico promissor para edição de genes. O sistema CRISPR-Cas9 é categorizado principalmente em duas classes (1 e 2). No sistema CRISPR/Cas classe I, várias proteínas Cas são necessárias para realizar sua função. Já no sistema de classe 2, é necessário apenas uma proteína. Devido à sua simplicidade, o sistema de classe 2 é o mais explorado para edição de genes (CARREIRA, et. al, 2022).

O sistema CRISPR-Cas Tipo II foi descrito no ano de 2012 na bactéria *Streptococcus pyogenes* e tem como assinatura a proteína Cas9, que, junto com RNA CRISPR (crRNA) e o crRNA transativador (tracrRNA), cliva a molécula do DNA invasor, por meio do reconhecimento PAM. A proteína Cas9 funciona como uma tesoura molecular que é guiada com precisão para os locais-alvo por um único RNA guia e, em seguida, produz as quebras de fita dupla do DNA (DSBs), considerada um dos insultos mais letais às células. Após a indução do DSB, a maquinaria de reparo do DNA é ativada para reparar o DSB, resultando em modificação genômica específica do local (TIANZUO et al., 2019).

As bactérias conseguem ser resistentes aos vírus por incorporar novas sequências espaçadoras. Essas sequências são homólogas aos nucleotídeos invasores e são identificadas como PAM (do inglês *Protospacer-Adjacent Motif* - motivos adjacentes proto espaçadores). PAM é uma sequência curta adjacente à sequência direcionada ao RNA guia do DNA invasor.

A ligação inicial e a clivagem do DNA requer o reconhecimento de PAM, pois sem ele a proteína Cas9 não consegue clivar uma sequência alvo, mesmo que seja complementar ao sgRNA, já que a interação PAM desencadeia a atividade Cas9. Isso torna essa ferramenta muito importante, visto que o RNA guia é programável e pode ser desenhado para se alinhar a qualquer região genômica de interesse (STERNBERG et al., 2014).

Em 2012, as pesquisadoras Charpentier e Doudna desenvolveram a técnica do sistema CRISPR-Cas9, criaram um protocolo dividido em três etapas. A primeira etapa se iniciava com a formação de um sgRNA vinculado a enzima Cas9, a segunda etapa compreende a introdução *in vitro* do complexo CRISPR-Cas9 na célula alvo, iniciando o processo de clivagem do gene alvo. A terceira e última etapa consiste na ativação dos mecanismos de reparo celular, ocasionando a inativação do gene e reparo da fita de DNA (CASTILLO, 2016).

A proteína Cas9 é constituída por três domínios principais, a interação PAM, HNH e RuvC, sendo o HNH e o RuvC dois domínios característicos com função de nuclease. O domínio HNH cliva a cadeia complementar de DNA e o domínio RuvC cliva a cadeia não complementar de DNA (CARREIRA, et. al, 2022). O RNA guia geralmente possui uma sequência protoespaçadora de 20 nucleotídeos e uma parte extra usada para o pareamento complementar do tracrRNA. Para o tracrRNA, sua estrutura possui duas partes funcionais utilizadas para ligar à proteína crRNA e Cas9, respectivamente. Além disso, o complexo crRNA-tracrRNA pode ser facilmente manipulado com um único RNA guia (CARREIRA, 2022).

Em resumo, a proteína Cas9 pode ser ativada ligando-se ao RNA guia, em seguida, ele procurará a sequência de DNA de direcionamento que corresponda ao seu sítio PAM. Após o pareamento, a Cas9 cliva as duas fitas do material genético invasor, através dos domínios catalíticos, HNH e RuvC, resultando na quebra de DNA de fita dupla em regiões específicas do genoma (FROCK et al., 2015). Os DSBs são reparados por diferentes mecanismos de reparo de danos ao DNA nas células de reparo dirigido por homologia (HDR) e junção de extremidade não homóloga (NHEJ) Figura 2 (SANDER et, al. 2014).

O NHEJ geralmente resulta na inserção/deleção (InDel) de fitas de DNA editadas e pode unir as sequências de quebra diretamente, enquanto o HDR permite que o DNA correto seja inserido no local alvo com precisão. Isso pode ser explorado para inserir o gene de interesse, fornecendo um molde de DNA exógeno adjacente para gerar DNA especialmente projetado e modificado. Na prática clínica, esses métodos de reparo são utilizados para atingir o objetivo de aliviar ou até mesmo curar doenças (SANDER et, al. 2014).

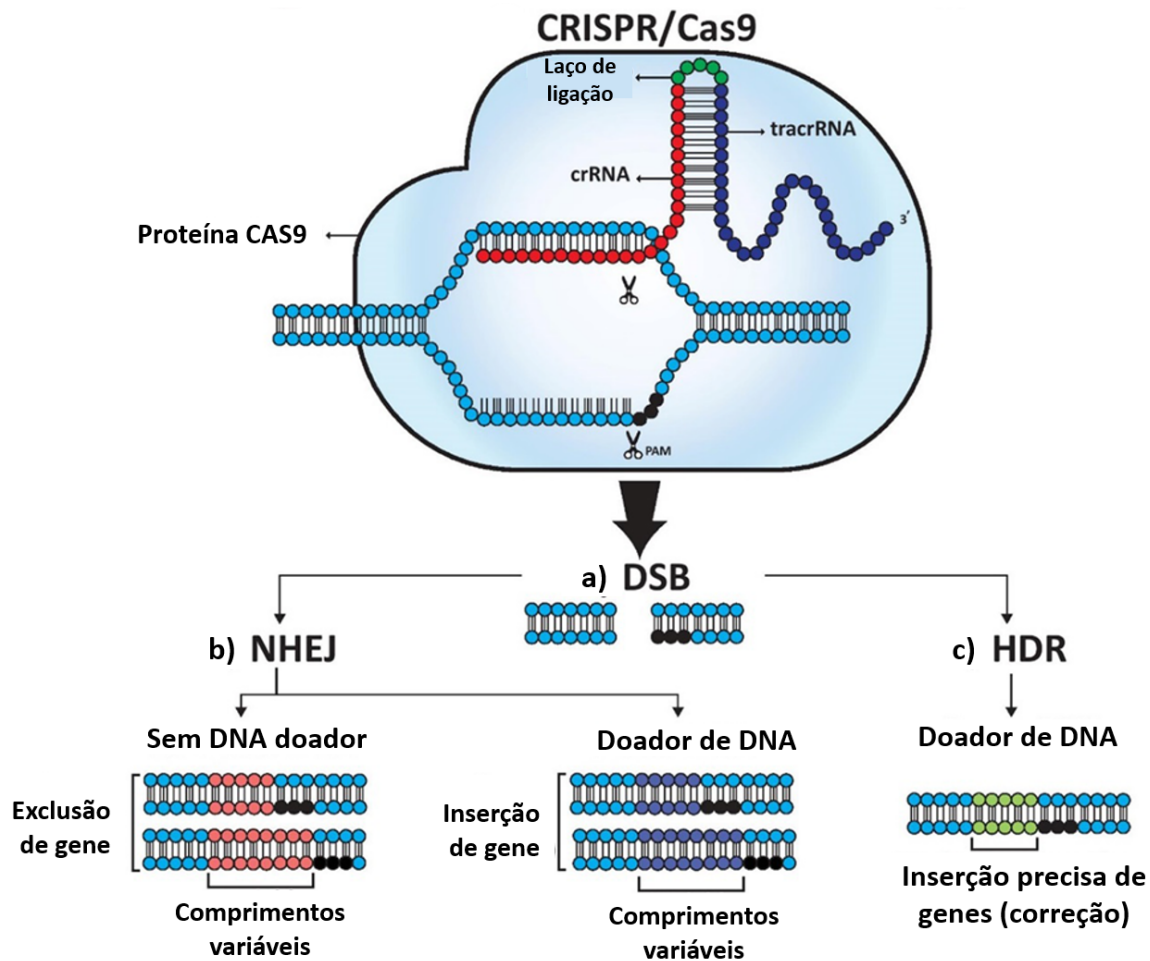


Figura 2: Imagem esquemática da edição do genoma mediada por repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente inter espaçadas (CRISPR) associada a CRISPR 9 (Cas9) e reparo de DNA. A proteína Cas9, guiada pelo RNA guia de fita simples desejado, corta o DNA de fita dupla e forma o DSB. Subsequentemente, o reparo do DNA ocorre através das vias de junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ou das vias de reparo dirigido por homologia (HDR) (Adaptado de SANDER et al. 2014).

2.2 Mecanismos de entrega do CRISPR/Cas9

Para aplicar o CRISPR-Cas9, são necessários mecanismos que permitam entregar o sistema CRISPR-Cas9 até a célula alvo de uma forma segura e eficiente, para isto, diferentes métodos virais e não virais foram desenvolvidos, a entrega física, a entrega não viral e a entrega viral. As primeiras abordagens de edição de genoma em células de mamíferos basearam-se em plasmídeos de Cas9 e sgRNA. Em modelos de organismos, como os camundongos, esse método também é adequado para aplicações *in vivo*, já que o plasmídeo pode ser entregue ao tecido por método de injeção ou eletroporação. No entanto, a eficiência de edição é baixa e a atividade do Cas9 pode ser mal controlada (LINO et al., 2018).

Os métodos de entrega física utilizam-se de técnicas como a microinjeção e eletroporação, sendo a eletroporação o mecanismo de entrega mais utilizado para transportar componentes através da membrana celular. Essa técnica aumenta a permeabilidade da

membrana por meio de descargas elétricas, permitindo que o complexo CRISPR-Cas9 seja introduzido na célula alvo, sendo bastante utilizado para a edição de uma população de células (Figura 3). Outra técnica mecânica é a microinjeção, considerada o 'padrão ouro' para a introdução de componentes CRISPR nas células, com eficiências próximas de 100% (MALI et al., 2013).

Neste método, tanto o DNA de plasmídeo que codifica a proteína Cas9, quanto o sgRNA, podem ser injetados diretamente em células individuais e as cargas são entregues diretamente a um local-alvo dentro da célula (Figura 4) (LIU et al., 2017).



Figura 3. Mecanismo de entrega físico via eletroporação. (adaptado de LIU et al., 2017).



Figura 4. Mecanismo de entrega físico via microinjeção. Atualmente essa é a técnica mais simples entre os mecanismos de entrega (adaptado de LIU et al., 2017).

Além dos mecanismos de entrega físico, existem também os métodos de mecanismo viral que utilizam vírus adenoassociados especificamente projetados (AAV) e outros vírus como adenovírus e lentivírus. Os vírus AAV são considerados uma ferramenta potente, pois não são integradores, possuem alta eficiência de transdução e são sorologicamente compatíveis com uma grande fração da população humana. No entanto, devido ao tamanho limitado da carga de AAVs, a Cas9 e o sgRNA precisam ser codificados em vetores separados (LINO et al., 2018).

Outra abordagem alternativa para entrega viral é a aplicação de nanopartículas lipídicas. Uma grande vantagem das nanopartículas é que elas podem ser fabricadas em escala industrial e permitir uma dosagem mais semelhante às drogas comumente usadas. Nanopartículas lipídicas foram usadas para entregar com sucesso o sgRNA ou mRNA em ensaios clínicos. Recentemente, uma série de estudos mostrou que o mRNA Cas9 e o sgRNA podem ser carregados em nanopartículas lipídicas e entregues ao fígado murino com alta eficiência. Além disso, as nanopartículas modificadas podem ser adicionalmente carregadas com um modelo doador e, assim, também permitir o reparo dirigido por homologia. Uma vez que grandes esforços estão sendo realizados para estabelecer e melhorar o CRISPR/Cas9 como uma ferramenta de reparo de genes, espera-se que esse conhecimento também seja usado para desenvolver o CRISPR/Cas9 em um agente terapêutico contra o câncer. O sucesso de tal abordagem dependerá fortemente dos avanços na entrega específica do tecido de Cas9/sgRNA e nas experiências adquiridas em ensaios atuais e futuros (XU et al., 2021).

Graças ao seu mecanismo de ação, que permite efetuar um corte em segmentos específicos do DNA, CRISPR-CAS9 passou a ser explorado para inúmeras finalidades. O sistema CRISPR-Cas9 é uma ferramenta versátil que pode ser utilizada no âmbito terapêutico com finalidade de estudar genes associados a doenças, além de descobrir suas vias de ativação e seus mecanismos, bem como estudar a resposta celular a medicamentos. Outra possibilidade de aplicação é a sua utilização na modulação e tratamento de diversas doenças, sendo o câncer o principal alvo de pesquisas (KHADEMPAR et al., 2018).

2.3 Índices de incidência e mortalidade de câncer no mundo

O Câncer é a principal causa de morte em todos os países do mundo, sendo uma barreira para o aumento da expectativa de vida. De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) para 2019 o câncer já é a primeira ou segunda causa de morte antes dos 70 anos, e abrange mais de 100 doenças distintas com diversos fatores de risco e epidemiologia que se originam da maioria dos tipos de células e órgãos do corpo humano que são caracterizadas por uma proliferação desenfreada de células que podem invadir além dos limites normais dos tecidos e metastizar para órgãos distantes (SUNG, 2021).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) publicou alguns dados do ano de 2020 e registraram uma incidência de aproximadamente 19 milhões de casos de câncer em todo mundo, com 10 milhões de mortes.

A Figura 5 mostra os 10 principais tipos de câncer para casos e mortes estimados em todo o mundo para homens e mulheres. Para ambos os sexos combinados, os 10 principais tipos de câncer são responsáveis por mais de 60% dos casos de câncer, sendo responsáveis também por 70% de todas as mortes. O câncer de mama feminino é o câncer mais comumente diagnosticado (11,7% do total de casos), seguido de perto pelos cânceres de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%). O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer (18,0% do total de mortes por câncer), seguido por câncer de cólon (9,4%), fígado (8,3%), estômago (7,7%) e câncer de mama feminino (6,9%). O câncer de pulmão é o câncer de ocorrência mais frequente e é a principal causa de morte por câncer em homens. Nas mulheres, o câncer de mama é o câncer mais comumente diagnosticado e a principal causa de morte por câncer (SUNG, 2021).

AMBOS OS SEXOS

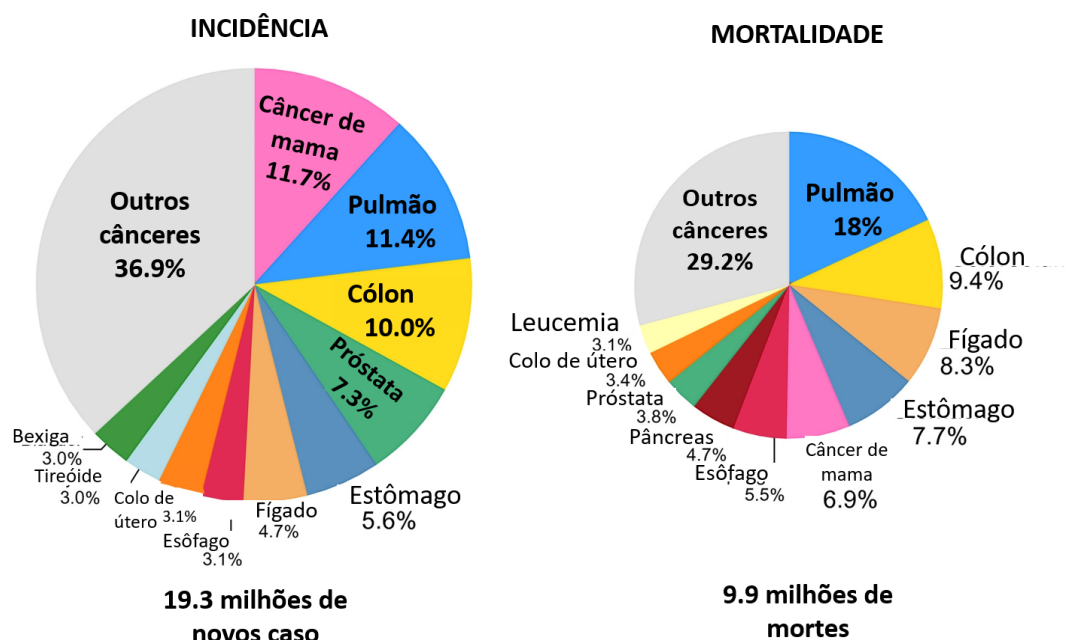


Figura 5: Índices de incidência e mortalidade de câncer no mundo no ano de 2020. A imagem mostra a distribuição de casos e óbitos para os 10 principais cânceres mais comuns em 2020 (Adaptado de SUNG et al; 2021).

2.4 Aplicação do CRISPR/CAS9 no câncer

O câncer existe em diversas formas complexas, dificultando sua prevenção e/ou tratamento. É muito importante estudar a etiologia, patogênese, prognóstico e seus fenótipos para desenvolver novas terapias e melhorar os tratamentos já existentes. As mutações estão entre as principais causas de câncer. Até o momento, cerca de 140 genes com mutações deletérias são relatados. Isso complica ainda mais a capacidade de desenvolver terapias eficazes apropriadas (SUNG et. al., 2021).

Sabendo que o câncer se desenvolve devido a alterações genômicas, o sistema CRISPR-Cas9 pode ser utilizado para gerar um efeito de knockout em oncogenes, essa ferramenta também pode ser utilizada para fazer reparos em genes supressores tumorais, restaurando sua função na inibição da oncogênese (JIANG; LIN; ZHAO, 2019). Proto-oncogenes estão relacionados no crescimento células, genes que estimulam esse crescimento. Quando um proto-oncogene sofre alguma alteração, ou existem muitas cópias do mesmo, ele se torna um gene maligno, que pode ficar permanentemente ligado ou ativado quando não deveria ser assim. Quando isso ocorre, a célula cresce desenfreadamente, podendo gerar o câncer. Este gene ruim é chamado de oncogene. Do mesmo modo que os proto-oncogenes desempenham um importante papel na regulação celular, os supressores tumorais também atuam como agentes reguladores do crescimento celular, além de induzir a apoptose em células neoplásicas e inibir a metástase (MOURA, 2019).

2.4.1 Aplicação do CRISPR-CAS9 no câncer de pulmão

O câncer de pulmão está dentro das doenças oncológicas que mais têm tido mortes no mundo, sendo que 90% dos enfermos faziam o uso do tabagismo, sendo esse um dos principais causadores da doença (INCA, 2022).

Dentro das últimas pesquisas em relação ao câncer de pulmão, tem existido a relação e probabilidade no tratamento através da técnica de CRISPR. Estudo realizado por You (2016) na universidade de Sichuan, concluiu que nas superfícies das células cancerígenas existia uma proteína chamada de PDL-1 que se une com a proteína PD-1 encontrada nos linfócitos T, que bloqueiam a resposta imune. Esta ligação está totalmente relacionada com o crescimento do tumor, bloqueando a possibilidade de destruição dessas células (CYRANOSKI, 2016).

A CRISPR-CAS9 foi utilizada para alterar o código genético da proteína PD-1 para evitar essa ligação, fazendo com que a resposta imune pelos linfócitos fosse mais forte e eficaz, a ponto de destruir as células cancerígenas. Apesar de a imunoterapia conseguir inibir a PD-1 nos tratamentos convencionais, a técnica de CRISPR vem como uma possibilidade revolucionária de ser mais eficiente e ter menos instabilidade durante o tratamento (CYRANOSKI, 2016).

O principal objetivo do artigo *CRISPR gene-editing tested in a person for the first time* na revista *Nature* era a possibilidade de edição genômica pela CRISPR-CAS9 em pacientes com câncer pulmonar, de forma com que o tratamento fosse seguro. Nos testes foram escolhidos 10 pacientes para serem administrados 3 tipos de doses e serem monitorados os efeitos da modificação da reação linfocitária. Primeiramente foram separados pacientes com câncer de pulmão metastático que já haviam passado por uma quimioterapia e tiveram a reincidência da doença novamente. Nesses pacientes foram coletados linfócitos do sangue para que passassem pelo tratamento de edição pela CRISPR-CAS9 e conseguirem modificar o gene que gere a proteína PD-1 de forma com que ela fosse silenciada. Essas células PD-1 desativadas foram testadas para que ao serem administradas novamente nos pacientes, não tivessem algum outro efeito de linfoproliferação durante o tratamento. O passo seguinte do experimento foi a administração desses linfócitos por meio da transfusão em um paciente, que ficou em observação até que essas células mutadas chegassem até o tecido lesionado e estimulassem a resposta imune contra as células cancerígenas. Até o presente momento a resposta tem sido positiva e o paciente sem efeito adverso ao tratamento e a segunda dose já tem uma previsão para ser administrada (CASTILLO, 2016).

Outro método de tratamento é chamado de Chimeric Antigen Receptor T (CART-1), nessa metodologia de tratamento, os receptores das células T são modificadas pelo sistema CRISPR-Cas9 para expressar um receptor quimérico de antígeno T em sua membrana, esses receptores modificados atuam como marcadores imunológicos que se ligam a epítomos específicos das células tumorais. O CART-1 é dividido em três domínios o primeiro é responsável pela acoplagem na célula neoplásica, o segundo faz a ligação do alvo com a célula T, o último é o domínio de sinalização que atua na ativação da célula T por meio da sinalização de CD3 e moléculas, deste modo aumentando a quantidade de linfócitos T CD8. A utilização desse método permite que o sistema imune identifique e elimine especificamente as células neoplásicas tornando-o mais eficiente no tratamento do câncer de pulmão (SELVAKUMAR et.al, 2022).

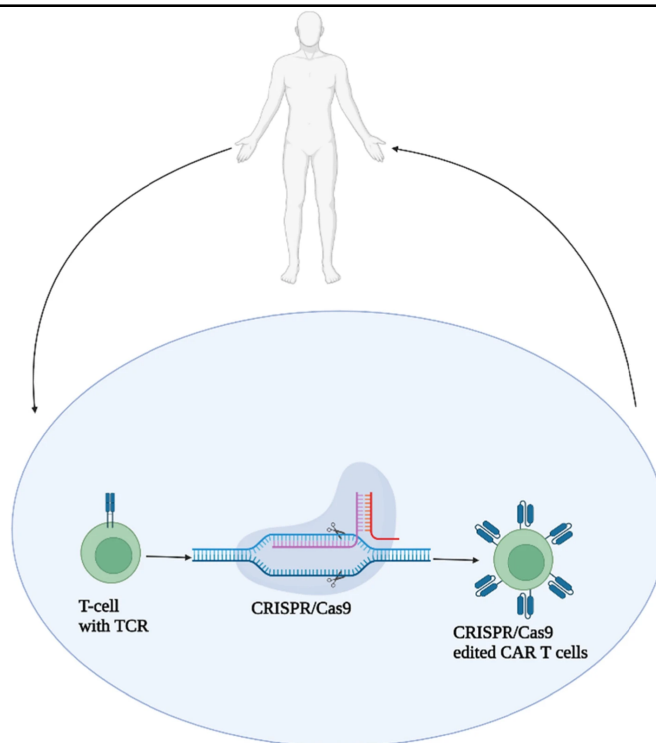


Figura 6: Representa o mecanismo imunoterápico, onde as células T são removidas do paciente, modificadas pelo sistema CRISPR-Cas9 e devolvidas ao paciente após alterações (SELVAKUMAR et.al, 2022).

2.4.2 Aplicação do CRISPR/CAS9 no papiloma vírus humano

A porcentagem de incidência de câncer do colo de útero está relacionada com a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), onde os genes E6 e E7 do HPV inicia e mantém o crescimento de células tumorais. O sistema CRISPR-Cas9 foi aplicado de forma com que eliminasse o gene E7 no câncer, assim o tumor sendo inibido eficientemente e como consequência, destruindo e evitando a proliferação e crescimento dessas células tumorais (TIANZUO, Et al 2019).

Desafios e limitações do CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR/Cas9 vem aumentando a expectativa de eliminação do câncer em uma escala nunca antes vista. Por sua facilidade de uso, as chances de tratar doenças definidas como incuráveis aumentaram muito. Ainda assim, alguns problemas do câncer e da terapia genética precisam ser abordados, sendo a entrega do CRISPR/Cas9 em malignidades sólidas o maior desafio (LIU, 2017).

Um desafio geral com qualquer método de entrega é alcançar uma alta concentração de CRISPR/Cas9 no tecido alvo que possa atingir todas as células alvo. Até o momento, parece improvável que qualquer sistema de entrega possa atingir cem por cento de entrega nas células-alvo, o que pode levar ao fracasso do tratamento. Portanto, desenvolver um sistema de entrega que permita uma entrega segura e eficiente do CRISPR/Cas9 certamente será um grande passo na aplicação de CRISPR/Cas9 para uso terapêutico em oncologia (RAFII et al., 2022).

Outro grande desafio com a tecnologia CRISPR/Cas9 é a edição de genes fora do alvo. Clivagens de fitas de DNA fora do alvo que levam a mutações fora do alvo e rearranjos cromossômicos maiores, como inversões e translocações, são observadas em todas as técnicas de edição de genes. Em CRISPR/Cas9, as mutações fora do alvo estão relacionadas com a incompatibilidade do PAM e gRNA. Para reduzir a chance de incompatibilidade de gRNA, um software sofisticado é usado para prever locais de clivagem fora do alvo. Além disso, métodos mais novos e mais sensíveis, estão em desenvolvimento para monitorar as mutações fora do alvo com mais precisão. Um dos exemplos desses rearranjos é a respeito da P53, que ao ser interrompida pode levar a mutações e aumentar a chance de malignidade devido ao seu efeito supressor no tumor (RAFII et al., 2022).

Essas preocupações em relação à segurança do sistema CRISPR/Cas9 são objeto de extensa pesquisa para aumentar a especificidade do local e reduzir as atividades de nuclease fora do alvo. Algumas estratégias como técnicas de edição mais avançadas, vem sendo pesquisadas, como por exemplo os editores base e prime, que reduzem a chance de mutações fora do alvo. As técnicas de edição de base permitem mutações sintéticas com alterações de nucleotídeo único, permitindo essencialmente uma alteração de base direcionada no DNA (RAFII et al., 2022).

Uma vantagem da tecnologia de edição básica é que ela não depende de DSBs e, portanto, elimina a chance de rearranjos cromossômicos. Outra plataforma flexível é a edição primária, que usa uma variante Cas9 fundida a uma transcriptase reversa e um RNA guiado. Ele se beneficia de uma sequência guiada na extremidade 5' e um sítio de ligação ao primer na extremidade 3' com um modelo de RNA que edita e substitui a sequência desejada. Esta plataforma versátil reduz a chance de confiar no DSB e reduz os rearranjos cromossômicos fora do alvo (RAFII et al., 2022).

2.6 Perspectivas futuras do CRISPR para a pesquisa do câncer

A tecnologia CRISPR/Cas9 revolucionou a medicina, fornecendo um método simples e versátil para manipular o genoma em uma ampla gama de organismos. O potencial do CRISPR/Cas9 para a pesquisa do câncer ainda está começando a se desdobrar, já que o mesmo fornece uma ferramenta para manipular regiões não codificantes do genoma e acelera a exploração funcional de algo até agora mal caracterizado do genoma do câncer. A engenharia precisa de mutações comuns e raras pelo CRISPR/Cas9, permitirá que os pesquisadores do câncer copiem a sequência genética da carcinogênese de muitas entidades cancerígenas. Isso fornecerá insights mais profundos sobre as mudanças biológicas que são provocadas por mutações individuais (MEDHIN et al., 2021).

Espera-se ver resultados ainda imprevisíveis dos ensaios clínicos que aplicam o CRISPR/Cas9 como uma ferramenta terapêutica para direcionar o sistema imunológico contra o câncer. O uso futuro de CRISPR/Cas9 na medicina dependerá em grande parte da capacidade de desenvolver variantes de Cas9 com mínimo ou nenhum efeito fora do alvo e novos métodos para melhorar a engenharia ainda ineficiente de alterações genéticas precisas por reparo direcionado por homologia. Além disso, melhorias futuras dos métodos de entrega virais e não virais serão necessárias para melhorar os resultados ainda imprevisíveis dos ensaios clínicos que aplicam a aplicação *in vivo* do CRISPR/Cas9, preparando o terreno para o uso terapêutico do CRISPR no futuro. O desenvolvimento da tecnologia CRISPR/Cas9 acelerou e acelerará a pesquisa do câncer em muitas áreas (MEDHIN et al., 2021).



CONCLUSÃO

Ao longo dos anos, a tecnologia CRISPR nos deu novas perspectivas que antes eram inatingíveis no mundo científico. No contexto do câncer, o CRISPR tem sido um aliado na descoberta de novos mecanismos e genes que desempenham papéis fundamentais, pois além de ajudar a entender os mecanismos moleculares envolvidos no surgimento do câncer, o CRISPR é uma ferramenta promissora com potencial para modificar genes específicos importantes para a carcinogênese e processos reversos como nunca antes. A tecnologia CRISPR tem se mostrado uma ferramenta muito vantajosa, pois podemos ver seu potencial por meio de estudos in vitro, in vivo e clínicos, comprovando ser uma tecnologia aplicável para diversas abordagens. Áreas como ciências médicas, básicas, industriais e agrícolas se beneficiarão com a técnica. A tecnologia CRISPR/Cas9 pretende revolucionar o mundo com o tratamento e eliminação de doenças, sendo essa apenas uma de suas perspectivas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a universidade, e aos professores que nos acompanharam ao longo do curso e que, com empenho, se dedicam à arte de ensinar.

REFERÊNCIAS

CARREIRA, A. C. O.; LOPES, C. L.; FERREIRA, H. C. J.; SOGAYAR, M. C.; ALMEIDA, M. S. M.; MACHADO, R. A. C. **Edição gênica por CRISPR/CAS9 da teoria à prática**. Blucher Open Access. São Paulo, 2022. 80 p.

CASTILLO, A. **Gene editing using CRISPR-Cas9 for the treatment of lung cancer**. Colomb Med (Cali). 2016 Dec 30;47(4):178-180.

CYRANOSKI, David. Nature: **CRISPR gene-editing tested in a person for the first time**. 2016.

Doenças relacionadas ao tabagismo. **Instituto Nacional de Câncer**. 2022.

FROCK, R. L.; HU, J.; MEYERS, R. M.; HO, Y. J.; KII, E.; ALT, F. W. **Genome-wide Detection of DNA Double-Stranded Breaks Induced by Engineered Nucleases**. Nat. Biotechnol. 2015. 33, 179–186. doi:10.1038/nbt.3101

GHAFFARI, S.; KHALILI, N.; REZAE, N. **CRISPR/Cas9 revitalizes adoptive T-cell therapy for cancer immunotherapy**. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research volume 40, Article number: 269. 2021.

GONZAGA, G. C. R. **Técnica CRISPR-Cas9 e sua utilização na Área Laboratorial**. Minas Gerais, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estatísticas de câncer**. 2018.



JIANG, C.; LIN, X.; ZHAO,Z.; **Applications of CRISPR-Cas9 Technology in the Treatment of Lung Cancer.** 2019.

KHADEMPAR, S.; FAMILGHADAKCHI, S.; MOTLAGH, R. A.; FARAHANI, N.; DASHTIAHANGAR, M.; REZAEI, H.; HAYAT, S. M. G. **CRISPR–Cas9 in genome editing: Its function and medical applications.** Journal of Cellular Physiology. 2018

LANG, Y.; JINMING L. **CRISPR-Cas9 therapeutics in cancer: promising strategies and present challenges,** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, Volume 1866, Issue 2, 2016, Pages 197-207.

LINO, C. A.; HARPER, J. C.; CARNEY, J. P.; TIMLIN, J. A. **Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches.** Drug Deliv. 2018.

LIU, C.; ZHANG, L.; LIU, H.; CHENG, K. **Delivery strategies of the CRISPRCas9 gene-editing system for therapeutic applications.** Journal Of Controlled Release, v. 266, p. 17-26, nov. 2017. Elsevier BV.

MALI P, YANG L, ESVELT KM, AACH J, GUELL M, DICARLO JE, NORVILLI JE, CHURCH GM. **RNA-guided human genome engineering via Cas9.** 2013

MEDHIN, M. T G.; ABEBE, E. C.; SISAY, T.; BERHANE, N.; BEKELE, T. DEJENIE, T. A. **Current Applications and Future Perspectives of CRISPR-Cas9 for the Treatment of Lung Cancer.** 2021. Biologics: targets & therapy, 15, 199–204.

MOURA, D. M. **Comunicação celular.** 1 ed. 2019.

RAFII, S.; TASHKANDI, E.; BUKHARI, N.; AL-SHAMSI, H. O. **Current Status of CRISPR/Cas9 Application in Clinical Cancer Research: Opportunities and Challenges.** Cancers 2022, 14, 947.

SACHDEVA, V. M. et al.; **CRISPR/Cas9: Molecular Tool for Gene Therapy to Target Genome and Epigenome in the Treatment of Lung Cancer.** Nature, Cancer Gene Therapy 22, 509–517. Out/ 2015.

SANDER, J. D.; JOUNG, JK; **CRISPR-Cas systems for editing, regulation and targeting genomes.** Nature Biotechnol. 2014.

SELVAKUMAR, S. C.; PREETHI, K. A.; ROSS, K.; TUSUBIRA, D.; KHAN, M. W. A.; MANI, P.; RAO, T. N.; SEKAR, D. **CRISPR/Cas9 and next generation sequencing in the personalized treatment of Cancer.** Mol Cancer 21, 83 (2022).

STERNBERG, S. H.; REDDING, S.; JINEK, M.; GREENE, E. C.; DOUDNA, J. A. **DNA Interrogation by the CRISPR RNA-Guided Endonuclease Cas9.** 2014. Nature 507, 62–67.



<http://ensaios.usf.edu.br>

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. **Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021.

TIANZUO Z.; NIKLAS R.; JOHANNES B.; MATTHIAS P.; EBERT, M. B. **CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy**, Seminars in Cancer Biology, Volume 55, 2019, Pages 106-119.

XU, X; LIU, C; WANG, Y; KOIVISTO, O; ZHOU, J; SHU, Y; ZHANG H. **Nanotechnology-based delivery of CRISPR-Cas9 for cancer treatment**. 2021.