

CRISPR: Edição genômica aplicada à Oncologia

CRISPR: Genomic editing applied to Oncology

DOI:10.34117/bjdv7n9-310

Recebimento dos originais: 07/08/2021

Aceitação para publicação: 20/09/2021

Eduarda Bresolin

Graduanda em Biomedicina

Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul - FASURGS

Rua Reni Grazziotin, 49 - Passo Fundo - RS

E-mail: dudabresolin@hotmail.com

Paula Wiethölter

Doutorado em Melhoramento Genético

Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul - FASURGS

Rua Angélica Otto, 160 - Passo Fundo - RS

E-mail: paulawiet@gmail.com

Karina Schreiner Kirsten

Doutorado em Farmacologia

Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul - FASURGS

Rua Diogo de Oliveira, 445, Ap. 503 - Passo Fundo - RS

E-mail: karina.kirsten@fasurgs.com

RESUMO

O sistema CRISPR é uma ferramenta de engenharia genômica, que foi descoberta, inicialmente, como um mecanismo de imunidade bacteriana contra vírus invasores, sendo adaptada, posteriormente, para edição gênica em células de mamíferos. A técnica sobrepôs-se às surgidas anteriormente por ser extremamente versátil, simples, específica e de baixo custo. O câncer é caracterizado por ser uma doença que apresenta acúmulo de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas no genoma, podendo, assim, ser alvo da técnica CRISPR a fim de modificar genes envolvidos com a doença, buscar novas alternativas de tratamento e criar modelos de estudo. Com base nisso, o objetivo deste estudo é descrever como o sistema CRISPR tem sido aplicado na Oncologia. O trabalho trata-se de uma revisão de literatura, buscando reunir e sintetizar resultados acerca da aplicação de CRISPR no câncer e os principais tipos de neoplasias que são alvos da técnica. A coleta de informações foi realizada nas bases de dados Bireme e Pubmed por meio dos descritores “sistema CRISPR-Cas” e “neoplasias”, nos idiomas português e inglês. Os critérios de inclusão envolveram a utilização de artigos na íntegra, no idioma inglês e publicados nos últimos 6 anos, totalizando 20 artigos. Tendo em vista que o câncer está entre as principais causas de morte e de problemas de saúde pública, e sabendo que se trata de uma doença causada por alterações genéticas, CRISPR surge como uma técnica promissora na pesquisa, diagnóstico e tratamento dessa patologia. A técnica tem sido utilizada, principalmente, para o silenciamento de oncogenes e genes supressores de tumor, tanto in vitro quanto in vivo, a fim de obter modelos de estudo e avaliar o envolvimento de genes no processo de tumorigênese. Esses resultados satisfatórios sugerem que a aplicação da técnica na Oncologia é promissora e sua utilização

diretamente em seres humanos, apesar de ainda requerer aprimoramento de inúmeros processos, pode se tornar uma realidade.

Palavras-chave: Engenharia genômica, Edição gênica, Sistema CRISPR, Oncologia.

ABSTRACT

The CRISPR system is a genomic engineering tool that was initially discovered as a mechanism for bacterial immunity against invading viruses, being later adapted for gene editing in mammalian cells. The technique superseded those previously developed because it is extremely versatile, simple, specific, and low-cost. Cancer is characterized as a disease that presents an accumulation of multiple genetic and epigenetic alterations in the genome, and may, therefore, be the target of the CRISPR technique in order to modify genes involved with the disease, seek new treatment alternatives and create study models. Based on this, the aim of this study is to describe how the CRISPR system has been applied in Oncology. The work is a literature review, seeking to gather and synthesize results about the application of CRISPR in cancer and the main types of neoplasms that are targets of the technique. Data collection was performed in Bireme and Pubmed databases using the descriptors “CRISPR-Cas system” and “neoplasms”, in Portuguese and English. The inclusion criteria involved the use of full articles, in English and published in the last 6 years, totaling 20 articles. Considering that cancer is among the main causes of death and public health problems and knowing that it is a disease caused by genetic alterations, CRISPR emerges as a promising technique in the research, diagnosis, and treatment of this pathology. The technique has been used mainly for the silencing of oncogenes and tumor suppressor genes, both in vitro and in vivo, in order to obtain study models and evaluate the involvement of genes in the tumorigenesis process. These satisfactory results suggest that the application of the technique in Oncology is promising and its use directly in human beings, despite still requiring improvement in numerous processes, could become a reality.

Key-words: Genomic engineering, Genetic editing, CRISPR System, Oncology.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento a respeito dos mistérios contidos na dupla hélice do DNA trouxe a necessidade de buscar, através da Biologia Molecular, técnicas que possibilitassem a edição genômica, visto que inúmeras doenças apresentam caráter genético ou hereditário. Nesse sentido, a descoberta do sistema CRISPR, um mecanismo de imunidade adaptativa de bactérias e arqueas que utiliza RNAs antisensos para detecção de ácidos nucleicos estranhos (JINEK et al., 2012), tornou a alteração e substituição de genes mais próxima da realidade. Assim, esse sistema foi adaptado e transformado numa técnica simples, precisa, e de baixo custo para edição gênica de células eucarióticas.

O sistema CRISPR foi descoberto inicialmente como um mecanismo de imunidade adaptativa de bactérias contra vírus. As bactérias desenvolvem uma memória imunológica de seus invasores “arquivando” sequências curtas de DNA destes, chamadas

de protoespaçadores e que se tornam integradas ao seu próprio material genético (YOSEF; QUIMRON, 2015). Esse sistema de defesa é composto pelo locus CRISPR contendo os protoespaçadores, além de um grupo de quatro genes estritamente localizados às matrizes CRISPR que codificam as proteínas Cas (BHAYA; DAVISON; BARRANGOU, 2011). Esses genes estão presentes somente em genomas que apresentam matrizes CRISPR, possuindo funções preditas de helicases, polimerases, e nucleases, levando à hipótese que o sistema CRISPR/Cas poderia estar envolvido na reparação do DNA (BURMISTRZ; PYRĆ, 2015).

O mecanismo CRISPR-Cas envolve a integração do material genético invasor entre as sequências repetidas, seguido da transcrição e processamento desse locus em um crRNA, processo facilitado por outro tipo de RNA chamado tracrRNA (SAHA et al., 2018). Por fim, havendo a entrada de um DNA estranho, previamente armazenamento no sistema CRISPR, ocorre a formação de um complexo entre crRNA, tracrRNA e a enzima Cas9, que é direcionada a introduzir quebras de fita dupla no DNA alvo (JINEK et al., 2012).

Um dos primeiros relatos de sequências repetidas no DNA de seres procarióticos foi feito por Francisco Mojica, ao estudar Arqueas halofílicas (MOJICA et al., 1995). Essas descobertas foram relacionadas a achados que datam de 1987 e 1989, os quais já relatavam sequências altamente conservadas e repetidas no genoma de *Escherichia coli* (ISHINO et al., 1987; NAKATA; AMEMURA; MAKINO, 1989). Jansen et al. (2002), ao estudar uma nova família de sequências repetitivas presentes nos domínios Archaea e Bacteria, criam o termo CRISPR – Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas. Ao comparar as sequências desconhecidas existentes entre o locus CRISPR com DNAs já estudados, Mojica constatou que os espaçadores CRISPR derivavam de sequências preexistentes, como bacteriófagos e plasmídeos conjugados (MOJICA et al., 2005). Deltcheva et al. (2011), complementando os estudos de Mojica, relataram que o sistema CRISPR constitui uma ampla classe de mecanismos de imunidade, que protegem bactérias e arqueas contra agentes invasores.

De acordo com Ran et al. (2013), esse sistema imunológico bacteriano poderia ser usado para facilitar a engenharia genômica em células eucarióticas especificando uma sequência de direcionamento em seu RNA guia. O sistema CRISPR mais estudado é o tipo II, que consiste na endonuclease Cas9, um crRNA e um tracrRNA. A fusão de crRNA e tracrRNA forma o RNA de guia único (sgRNA), e assim, a Cas9 pode ser direcionada para qualquer alvo de interesse, apenas alterando-se a sequência de sgRNA (RAN et al.,

2013). Após a clivagem do DNA pela endonuclease Cas9 guiada pelo sgRNA, a quebra de fita dupla (DSB) é alvo das vias endógenas de reparo NHEJ e HDR, que permitem a geração de inserções, deleções ou substituições de sequências no local alvo do genoma (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2019).

Diante de sua versatilidade e especificidade, a técnica CRISPR tem sido utilizada em uma ampla variedade de modelos experimentais, incluindo linhagens celulares, plantas, animais de laboratório e até mesmo ensaios clínicos em seres humanos (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2019). A técnica tem sido útil, em plantas, para o melhoramento de safras (CORTE et al., 2019); para a suspensão da replicação viral em doenças virais como HIV e hepatite B, e interrupção do ciclo celular, *in vitro*, em células de carcinoma cervical infectadas por HPV (KENNEDY et al., 2014). O sistema, ainda, possui um grande potencial terapêutico no tratamento de doenças em que a causa genética é conhecida – como é o caso da fibrose cística, hemoglobinopatias e hemofilias.

Ainda se tratando de doenças genéticas, a Oncologia também tem sido alvo da tecnologia CRISPR-Cas9, visando, principalmente, o silenciamento de genes envolvidos na tumorigênese, além de identificar alvos para o desenvolvimento de novas drogas. De acordo com Tian et al. (2019), modelos CRISPR de câncer geneticamente modificados podem ser produzidos de forma rápida e eficiente, incluindo modelos de leucemia com alvo em genes inativados por Cas-sgRNA. Ademais, o sistema pode ser útil na identificação de novos alvos de drogas com um sistema de rastreamento genético, e na busca de interações gênicas sinérgicas que podem ser úteis para bloquear a resistência a medicamentos (TIAN et al., 2019).

Sabe-se que o câncer está entre as principais causas de morte antes dos 70 anos de idade na maioria dos países (INCA, 2020), sendo o principal problema de saúde pública no mundo. Por se tratar de uma doença provocada por alterações genéticas, a Biologia Molecular surge como uma aliada na investigação dos mecanismos envolvidos. Diante disso, sabendo que CRISPR é uma técnica vista como promissora no tratamento de doenças – incluindo as genéticas –, e tendo em vista que um dos seus principais alvos é a Oncologia, faz-se necessário abordar os avanços que essa tecnologia de edição genômica já obteve na área. Desta forma, o objetivo deste estudo foi descrever como a técnica CRISPR tem sido aplicada na Oncologia, identificando os principais cânceres que são alvo dessa tecnologia e apresentando os principais resultados observados até o momento em relação a sua utilização. Além disso, também é importante discorrer sobre as perspectivas futuras da aplicação de CRISPR no tratamento de câncer.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada por meio de uma revisão de literatura, buscando reunir e sintetizar os resultados encontrados em pesquisas prévias que analisaram exclusivamente a aplicação de CRISPR na Oncologia e os principais tipos de cânceres que são alvos da técnica. Para responder à questão norteadora do estudo, que envolve a aplicação da técnica CRISPR na Oncologia, entre os meses de dezembro de 2020 e fevereiro de 2021, foram buscados artigos nas bases de dados Bireme e Pubmed, no período de 2015 a 2021, utilizando os descritores “sistemas CRISPR-Cas” e “neoplasias” para Bireme, e os mesmos termos no idioma inglês para Pubmed.

Foram incluídos os artigos disponíveis na íntegra, no idioma inglês e publicados nos últimos 6 anos. Os critérios de exclusão envolveram artigos de revisão de literatura e meta-análise. Esta análise foi feita a partir da seleção dos títulos, resumos e textos na íntegra. Foram coletadas as seguintes informações em cada artigo: título do trabalho, citação, objetivo, tipo de estudo, tipo de câncer, genes alvos e conclusões. As informações foram reunidas e apresentadas em tabelas, figuras e quadros.

3 RESULTADOS

A busca pelos artigos foi iniciada pela base de dados da Bireme em que foram localizados 703 artigos, enquanto na base de dados PubMed foram localizados 945 artigos. Após foi feita a leitura dos títulos de cada artigo buscando evidências de estudos acerca das aplicações da técnica CRISPR na Oncologia. Dos 112 artigos aceitos da base de dados Bireme, 21 estavam repetidos no Pubmed, restando 91 artigos para a próxima etapa. Dos 179 selecionados na base de dados PubMed, 91 estavam na Bireme, resultando em 88 artigos.

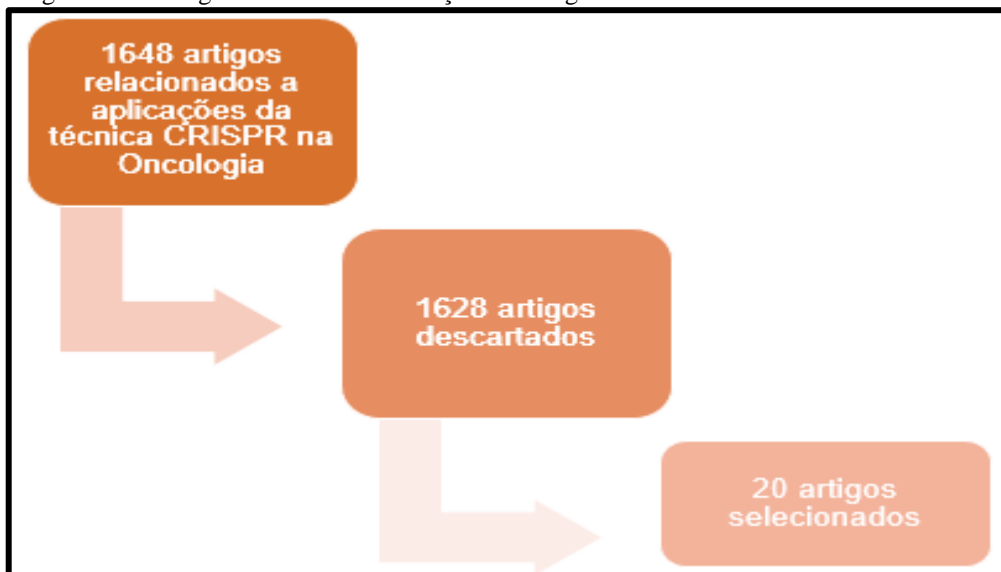
Os artigos selecionados pelo título passaram para a etapa seguinte, em que foi realizada a leitura dos resumos. Dos 91 resumos lidos da base de dados Bireme, 19 foram selecionados, e dos 88 artigos da base de dados PubMed, apenas 4 foram selecionados, pois a grande maioria dos artigos constavam de revisão de literatura e meta-análise. A próxima etapa consistiu na leitura dos artigos na íntegra, em que um total de 20 artigos foram selecionados (Tabela 1). O processo de exclusão dos artigos pode ser observado na Figura 1.

Tabela 1 - Seleção de artigos científicos nas bases de dados Bireme e Pubmed, no período de dezembro de 2020 a fevereiro de 2021, publicados entre 2015 e 2021

| Base de dados | Títulos | | Resumos | | Artigos | |
|---------------|-------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | Total | Aceitos | Total | Aceitos | Total | Aceitos |
| Bireme | 703 | 112 | 91 | 19 | 19 | 17 |
| PubMed | 945 | 179 | 88 | 4 | 4 | 3 |
| Total | 1648 | 291 | 179 | 23 | 23 | 20 |

Fonte: os autores

Figura 1 – Fluxograma associado a seleção dos artigos nas bases de dados Bireme e Pubmed



Fonte: os autores

Dos artigos, foram extraídas informações referentes ao tipo de estudo, objetivo do estudo, tipo de câncer, genes alvo, conclusões, título e citação. Os resultados foram divididos em dois quadros, um com estudos in vitro (Quadro 1) e outro com estudos in vivo (Quadro 2).

Quadro 1 – Principais resultados obtidos *in vitro* com a utilização da técnica CRISPR na Oncologia

| Título/citação | Tipos de células | Objetivos | Tipo de câncer | Genes alvo | Conclusão |
|---|--|---|-------------------------------|------------|---|
| CRISPR/Cas9-Mediated Knock-Out of KrasG12D Mutated Pancreatic Cancer Cell Lines. (LENTSCH et al., 2019) | Células humanas (Panc-1 e Suit-2) e células murinas (TB32047) de câncer pancreático. | Inativar o proto-oncogene mutante KRAS ^{G12D} em linhagens celulares de câncer de pâncreas. | Câncer de pâncreas | KRAS | O nocaute de KRAS mostrou uma diminuição da taxa de crescimento celular em comparação com o tipo selvagem. Apoptose e parada de crescimento não foram observados. |
| CRISPR/Cas9-mediated knockout of NSD1 suppresses the hepatocellular carcinoma development via the NSD1/H3/Wnt10b signaling pathway. (ZHANG et al., 2019) | Células humanas de fígado normal (HL-7702) e células de carcinoma hepatocelular (Huh7, Hep3B, SMMC-7721, HepG2 e SK-Hep1). | Investigar o comportamento da via de sinalização NSD1 / H3 / Wnt10b após nocaute mediado por CRISPR/Cas9. | Carcinoma hepatocelular (HCC) | NSD1 | O nocaute de NSD1 suprime a proliferação celular, migração e invasão em HCC através da via de sinalização NSD1/ H3/ Wnt10b, que pode servir como alvo potencial para o HCC. |
| CRISPR-Cas9 mediated CD133 knockout inhibits colon cancer invasion through reduced epithelial-mesenchymal transition. (LI et al., 2019) | Linha de células LoVo de adenocarcinoma do cólon humano | Realizar o nocaute do marcador CD133 usando CRISPR-Cas9 e analisar seu efeito nas células de câncer de cólon. | Câncer de cólon | CD133 | O nocaute mostrou efeitos inibitórios na propriedade tumorigênica, incluindo diminuição da capacidade de formação de colônias, proliferação celular, migração e invasão. |
| TP53 Mutation by CRISPR System Enhances the Malignant Potential of Colon Cancer. (WATANABE et al., 2019) | Linhas celulares LS174T e HCT116 derivadas de adenocarcinoma de cólon humano. | Avaliar os efeitos da mutação de TP53 induzidas por CRISPR/Cas9 em células de câncer de cólon. | Câncer de cólon | TP53 | Os mutantes TP53 exibiram um potencial maligno aprimorado, caracterizado por crescimento celular acelerado, capacidade de invasão e quimiorresistência. |

| | | | | | |
|--|--|---|---|-----------------------------------|---|
| <p>CRISPR/Cas9-Mediated BRCA1 Knockdown Adipose Stem Cells Promote Breast Cancer Progression.</p> <p>(ZHAO et al., 2019)</p> | <p>Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano, de tecido adiposo de mama humana e células MDA-MB-231.</p> | <p>Gerar células-tronco de tecido adiposo humano com mutação de BRCA1 e analisar seu efeito na progressão do câncer de mama.</p> | <p>Câncer de mama</p> | <p>BRCA1</p> | <p>A mutação BRCA1 promoveu progressão, crescimento e invasão do câncer de mama.</p> |
| <p>CRISPR/Cas9-mediated knockout of the PDEF gene inhibits migration and invasion of human gastric cancer AGS cells.</p> <p>(ZHANG, et al., 2019)</p> | <p>Linhas de células de câncer gástrico AGS.</p> | <p>Realizar o nocaute de PDEF em uma linha de células de câncer gástrico humano (GC) e avaliar seu efeito no comportamento celular.</p> | <p>Câncer gástrico</p> | <p>PDEF</p> | <p>As células mostraram aumento da apoptose, inibição da formação de colônias celulares, redução da migração, invasividade e capacidade proliferativa.</p> |
| <p>CRISPR/Cas9 Genome Editing of Epidermal Growth Factor Receptor Sufficiently Abolished Oncogenicity in Anaplastic Thyroid Cancer.</p> <p>(HUANG, et al., 2018)</p> | <p>Linha de células MDA-MB-231 e SW579.</p> | <p>Induzir o nocaute do gene EGFR e eliminar a expressão da proteína EGFR em células MDA-MB-231 e SW579 através da técnica CRISPR/Cas9.</p> | <p>Carcinoma anaplásico da tireoide (ATC)</p> | <p>EGFR</p> | <p>O nocaute suprimiu a viabilidade celular e a capacidade de invasão em células ATC. Além disso, genes metastáticos foram inibidos nessas células.</p> |
| <p>CRISPR-Cas9-Mediated Silencing of CD44 in Human Highly Metastatic Osteosarcoma Cells.</p> <p>(LIU et al., 2018)</p> | <p>Células de osteossarcoma humano altamente metastático MNNG / HOS e 143B.</p> | <p>Nocautear CD44 em células de osteossarcoma altamente metastático humano a fim de avaliar seus efeitos funcionais.</p> | <p>Osteossarcoma</p> | <p>CD44</p> | <p>O nocaute inibiu significativamente a expressão de CD44 nas células, bem como suprimiu sua atividade de migração e invasão, e inibiu a formação de esferoides em condições de cultura 3-D.</p> |
| <p>CRISPR/Cas9 targeting of the androgen receptor suppresses the growth of LNCaP human prostate cancer cells.</p> <p>(WEI et al., 2018)</p> | <p>células de câncer de próstata andrógeno-positivas LNCaP.</p> | <p>Gerar um nocaute parcial do receptor de andrógeno (AR) a fim de observar seus efeitos nas funções celulares.</p> | <p>Câncer de próstata</p> | <p>Receptor de andrógeno (AR)</p> | <p>O nocaute restringiu significativamente o crescimento de células de câncer de próstata sensíveis a andrógenos ao inibir a proliferação celular e promover um aumento da apoptose.</p> |

| | | | | | |
|--|---|--|--|------------------|---|
| <p>Generation and characterization of a human oral squamous carcinoma cell line SCC-9 with CRISPR/Cas9-mediated deletion of the p75 neurotrophin receptor.</p> <p>(HUANG et al., 2017)</p> | <p>Linhas de células de carcinoma escamoso de língua SCC-9.</p> | <p>Construir linhas de células SCC-9 nocaute de p75NTR e avaliar seu efeito nas funções e características celulares.</p> | <p>Carcinoma oral de células escamosas</p> | <p>p75NTR</p> | <p>O nocaute de p75NTR suprimiu a proliferação celular, invasão, migração e formação de colônias.</p> |
| <p>Target sequencing and CRISPR/Cas editing reveal simultaneous loss of UTX and UTY in urothelial bladder cancer.</p> <p>(AHN et al., 2016)</p> | <p>Linhas de células HT-1197 e UMUC3 de câncer urotelial de bexiga (UBC).</p> | <p>Nocautear os genes UTX e UTY em linhas de células UBC a fim de avaliar seu papel funcional nesse tipo de câncer.</p> | <p>Câncer urotelial de bexiga (UBC)</p> | <p>UTX e UTY</p> | <p>O nocaute UTX ou UTY único aumentou a proliferação celular, e com o nocaute duplo dos genes foi observada uma proliferação ainda maior.</p> |
| <p>BIRC5 Gene Disruption via CRISPR/Cas9n Platform Suppress Acute Myelocytic Leukemia Progression.</p> <p>(NARIMANI et al., 2019)</p> | <p>Linhas de células HL-60 e KG-1 de Leucemia Mieloide Aguda (LMA).</p> | <p>Silenciar o gene BIRC5 em linhas de células de LMA para avaliar o papel do gene nessas células.</p> | <p>Leucemia Mieloide Aguda (LMA)</p> | <p>BIRC5</p> | <p>A supressão de BIRC5 resultou na redução da viabilidade celular e indução de apoptose e necrose nas células de LMA.</p> |
| <p>CRISPR-mediated ablation of overexpressed EGFR in combination with sunitinib significantly suppresses renal cell carcinoma proliferation.</p> <p>(LIU et al., 2020)</p> | <p>Linha de células HEK293 de rim embrionário humano.</p> | <p>Investigar o nocaute do gene EGFR usando CRISPR/Cas9 como uma opção terapêutica para o carcinoma de células renais (RCC).</p> | <p>Carcinoma de células renais (RCC)</p> | <p>EGFR</p> | <p>O nocaute de EGFR inibiu o crescimento das células cancerosas renais. A associação com sunitinibe pode inibir ainda mais a proliferação de células cancerosas renais após a perda de EGFR.</p> |

Fonte: os autores

Quadro 2 – Principais resultados obtidos *in vivo*, a partir de modelos animais, com a utilização da técnica CRISPR na Oncologia

| Título/autores/ano | Modelo animal | Objetivos | Tipo de câncer | Genes alvo | Conclusão |
|--|---------------------------------------|---|---|--|--|
| CRISPR-mediated modeling and functional validation of candidate tumor suppressor genes in small cell lung cancer. (NG et al., 2020) | Modelo de camundongo de CPPC | Gerar mutações de perda de função nos genes p107 e p130 em modelos de camundongos de câncer de pulmão de pequenas células (CPPC). | Câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) | P107 e p130 | A perda dos genes p107 e p130 acelerou significativamente a progressão do CPPC, mostrando que esses genes funcionam como supressores de tumor nesse tipo de câncer. |
| Programmed cell death ligand 1 disruption by clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-genome editing promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression. (YAHATA et al., 2019) | Modelo de camundongo | Avaliar o impacto do nocaute do gene PD-L1 na progressão do câncer de ovário em modelos de camundongos. | Câncer de ovário | PDL-1 | O nocaute promoveu imunidade antitumoral, aumentando os linfócitos infiltrantes de tumor. O tempo de sobrevivência dos animais foi maior e o peso do tumor e a ascite foram menores. |
| Blockade of a Laminin-411-Notch Axis with CRISPR/Cas9 or a Nanobioconjugate Inhibits Glioblastoma Growth through Tumor-Microenvironment Cross-talk. (SUN, et al., 2019) | Modelo de camundongo SUPRESSAO | Bloquear a expressão de laminina-411 em linhas de células de glioblastoma multiforme (GBM) e analisar o crescimento tumoral em camundongos. | Glioblastoma multiforme | Genes $\alpha 4$ e $\beta 1$ da laminina-411 | Os animais exibiram tumores menores, crescimento tumoral mais lento e melhor sobrevivência em comparação com camundongos com células não tratadas. |

| | | | | | |
|---|--------------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------|--|
| CRISPR/Cas9-mediated knockout of HBsAg inhibits proliferation and tumorigenicity of HBV-positive hepatocellular carcinoma cells (SONG, et al., 2018) | Modelo de camundongos | Estabelecer linhas de células de carcinoma hepatocelular (HCC) com nocaute de HBsAg, avaliando seus efeitos tanto in vitro quanto in vivo. | Carcinoma hepatocelular (HCC) | ORF preS1 / preS2 / S de HBsAg | As células de HCC tiveram seu potencial maligno e proliferação in vitro reduzidas, além de diminuição da tumorigenicidade in vivo. |
| Role of BMI1 in epithelial ovarian cancer: investigated via the CRISPR/Cas9 system and RNA sequencing. (ZHAO, et al., 2018) | Modelo de camundongo | Silenciar BMI1 em células de câncer epitelial de ovário (EOC) e avaliar o comportamento dessas células, in vitro e in vivo. | Câncer epitelial de ovário (EOC) | BMI1 | O nocaute de BMI1 reduziu a proliferação celular, invasão e migração, além de aumentar as taxas de apoptose. A sensibilidade à platina foi aumentada e a taxa de formação de tumor mostrou-se diminuída. |
| ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. (VALETTA et al., 2015) | Modelo de camundongo | Corrigir a mutação ASXL1 em células de LMC através da via de reparo HDR, determinando o impacto da correção in vitro e in vivo. | Leucemia Mieloide Crônica (LMC) | ASXL1 | A expressão da proteína ASXL1 foi restaurada, e houve uma redução do crescimento celular e aumento da diferenciação mieloide. Os experimentos in vivo demonstraram sobrevivência mais longa dos animais. |
| CRISPR/Cas9 mediated knockout of rb1 and rb1l1 leads to rapid and penetrant retinoblastoma development in Xenopus tropicalis (NAERT, et al., 2016) | Embriões de Xenopus tropicalis | Desenvolver um novo modelo de retinoblastoma em Xenopus tropicalis através da inativação dos genes rb1 e rb1l1 por CRISPR/Cas9 | Retinoblastoma (RB) | rb1 e rb1l1 | A inativação dupla de rb1 e rb1l1 criou o primeiro modelo de retinoblastoma em um não mamífero, desenvolvendo tumores oculares visíveis externamente. |

Fonte: os autores

4 DISCUSSÃO

O acúmulo de mutações genéticas ao longo do tempo pode levar ao desenvolvimento do câncer (LIU et al., 2019). Conhecendo os potenciais alvos moleculares e mecanismos genéticos envolvidos com a carcinogênese, CRISPR surge como uma técnica capaz de alterar genes envolvidos com a doença, identificar novos alvos de tratamento e criar modelos de estudo. Os artigos analisados mostraram, principalmente, a busca por modelos de nocaute de genes tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a fim de estudar as bases moleculares de inúmeros tipos de cânceres. CRISPR/Cas9 também foi utilizada para produzir mutações específicas em determinados genes e investigar o papel dessas mutações no desenvolvimento e progressão da doença.

O ciclo celular é um processo importante que permite a duplicação das células e a passagem de seu material genético para as células descendentes. Para que isso ocorra de forma fidedigna, existem inúmeros mecanismos de reparo e pontos de controle do ciclo celular. Entretanto, há agentes físicos, químicos e biológicos que podem causar danos ao DNA. Quando esses danos não são corrigidos pelos mecanismos de reparação celular, provocam mutações que podem levar a tumorigênese (WARD, 2002).

Os genes que atuam estimulando a progressão do ciclo celular são chamados de proto-oncogene, que, ao sofrerem mutações, tornam-se permanentemente ativados e provocam proliferação celular descontrolada, denominando-se oncogenes (GRAZIANO; GONZALO, 2017). Genes supressores de tumor, por sua vez, são responsáveis por retardar a divisão celular, reparar danos ao DNA e estimular a apoptose. Assim, quando sofrem uma mutação, as células podem se dividir descontroladamente (WARD, 2002). Dessa forma, a tumorigênese pode ser provocada pela ativação de proto-oncogene em oncogenes ou pela inativação dos genes supressores de tumor.

Os estudos *in vitro* utilizaram uma variedade de linhagens celulares com o objetivo de realizar o nocaute de genes que frequentemente estão envolvidos em determinados tipos de cânceres. Após o silenciamento de genes utilizando CRISPR, e a confirmação da sua inativação, as células foram cultivadas e suas características após o nocaute analisadas a partir de ensaios de proliferação celular, formação de colônias, invasão e migração. Dentre os dez estudos que tinham por objetivo o silenciamento de oncogenes envolvidos com a progressão tumoral, todos obtiveram resultados satisfatórios, com diminuição da proliferação, invasão e migração celular, diminuição da capacidade de formação de colônias, bem como aumento de apoptose, e diminuição da viabilidade celular e malignidade. Lentsch et al. (2019) não observaram diminuição da

apoptose nem parada de crescimento celular, porém, houve uma considerável diminuição da taxa de crescimento.

A fim de avaliar a progressão tumoral, dois estudos *in vitro* utilizaram a técnica CRISPR com o intuito de induzir o nocaute de genes que estão envolvidos com a supressão tumoral, para confirmar a importância destes genes no controle da replicação celular. A inativação dos genes supressores provocou aumento da proliferação celular, capacidade de invasão e malignidade acentuada. Além disso, genes que estão frequentemente mutados em tumores, como o BRCA1 no câncer de mama (ZHAO et al., 2019) e a proteína TP53 no câncer de cólon (WATANABE et al., 2019) tiveram mutações induzidas por CRISPR/Cas9 a fim de avaliar a progressão tumoral, que foi acentuada e, no caso de TP53, ainda houve aumento da quimiorresistência (WATANABE et al., 2019).

De todos os estudos *in vivo*, apenas um deles usou um modelo animal não mamífero. Naert et al. (2016), utilizando embriões de *Xenopus tropicalis*, inativaram os genes supressores de tumor *rb1* e *rb11* – frequentemente mutados em alguns tipos de cânceres – e foram capazes de criar um modelo de retinoblastoma, com tumores oculares externamente visíveis. Todos os outros ensaios fizeram uso de modelos animais de camundongos, os quais foram inoculados com as células nocaute de genes específicos, analisando a progressão ou a supressão de tumores.

Em mamíferos, a maioria dos genes inativados nos estudos *in vivo* estavam envolvidos com a progressão tumoral, e assim, após a introdução das células editadas por CRISPR em camundongos, obteve-se crescimentos tumorais mais lentos, de tamanho menor e malignidade reduzida e um tempo de sobrevida maior dos animais. Zhao et al. (2018), ao silenciar o gene *BMI1* em células de câncer epitelial de ovário, além de obter a redução da tumorigênese, também observou um aumento da sensibilidade do tumor à platina, um dos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer.

Valetta et al. (2015) utilizaram a via de reparo HDR para corrigir uma mutação no gene *ASXL1*, que é comum em malignidades mieloides, principalmente na Leucemia Mieloide Crônica (LMC). Após a restauração do gene *in vitro*, estudos *in vivo* foram realizados em modelos de camundongos, os quais apresentaram uma sobrevida maior após a inoculação das células restauradas. Após a clivagem do DNA pela endonuclease Cas9 guiada pelo sgRNA, a quebra de fita dupla (DSB) é alvo das vias de reparo NHEJ e HDR. Segundo Ran et al. (2013), a via HDR requer uma sequência homóloga para guiar a reparação, ou seja, esse mecanismo possibilita a criação de modificações definidas em

uma determinada sequência de genes, como observado no estudo, no qual o gene alvo foi reparado a partir de uma sequência específica.

As aplicações da técnica CRISPR na Oncologia abrangem tanto os estudos *in vitro* quanto estudos *in vivo*, ambos com resultados satisfatórios. Os ensaios *in vitro* envolvem culturas de células que tiveram seus genes modificados pela técnica. Entretanto, estudos *in vitro* não são uma representação completa de um organismo multicelular, são apenas a etapa inicial do estágio de testes. O próximo passo são os ensaios *in vivo*, onde é possível observar a interação entre os diferentes tipos celulares do organismo, e são comumente realizados em camundongos, como observado nos artigos analisados. Em ambos os tipos de estudos o foco foi a inativação de genes envolvidos com a progressão tumoral, resultando tanto em crescimento celular diminuído quanto em maior sobrevivência dos animais testados.

Os estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que essa tecnologia apresenta um potencial elevado no tratamento do câncer, editando oncogenes ou genes supressores de tumor, diminuindo a progressão tumoral e criando modelos de estudo para avaliar a participação de genes na tumorigênese. A baixa eficácia dos tratamentos existentes para pacientes com diversos tipos de câncer também torna a técnica promissora para a identificação de novas vias que reduzam a resistência aos quimioterápicos (JIANG; LIN; ZHAO, 2019). Contudo, tratando-se da utilização de CRISPR diretamente em seres humanos, ainda há um longo caminho a ser percorrido e muitos ensaios clínicos já estão em curso.

Um ensaio clínico de fase 1 publicado em 2020 objetivou avaliar a segurança e viabilidade da interrupção de genes por CRISPR/Cas9 em três pacientes com câncer, dois deles com mieloma avançado, e um deles com sarcoma metastático refratário. Os linfócitos T desses pacientes foram removidos e os genes TRAC, TRBC e PDCD1 destas células foram silenciados por CRISPR com o objetivo de melhorar a imunidade antitumoral (STADTMAUER et al., 2020). As células editadas foram administradas nos pacientes e foram bem toleradas. A persistência dessas células T foi mais durável do que em outros estudos e biópsias de medula óssea e tumores mostraram a migração desses linfócitos T para os locais de tumor. Não foi demonstrada toxicidade relacionada às células manipuladas geneticamente.

A utilização de CRISPR *in vivo* envolve o aprimoramento de inúmeros processos, como a diminuição dos efeitos fora do alvo, e para isso o RNA guia deve ser projetado com alta homologia de sequência para o gene desejado (WU; CAO, 2018); além de poderem ser usados softwares online para ajudar a minimizar a probabilidade de ligação

generalizada (MOSES et al., 2018). A otimização dos métodos de entrega viral e não viral também é imprescindível, pois a distribuição por vírus adenoassociados (AAV) é um desafio devido a capacidade de empacotamento limitada, por isso uma alternativa seria a entrega do sistema via nanopartículas (MOSES et al., 2018). A observação das respostas imunológicas provocadas pela técnica e a validação de seu uso em modelos animais são outros desafios que requerem estudos (LIU; SABER; HAISMA, 2019).

Apesar das dificuldades, a técnica CRISPR/Cas9 revolucionou a terapia gênica com sua versatilidade, rapidez e baixo custo, e abriu novos caminhos para a pesquisa do câncer. Não só essa técnica, mas a engenharia genética como um todo está no caminho para se tornar a nova realidade do ser humano, uma realidade que abrange desafios e novas oportunidades. (SANTOS; WIETHÖLTER, 2021). Assim, sabendo dos principais genes e mecanismos envolvidos com a carcinogênese, modelos de câncer *in vitro* e *in vivo* podem ser projetados através da técnica e novos genes envolvidos tanto com a progressão quanto com a supressão tumoral podem ser estudados. Além disso, a técnica pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de resistência dos quimioterápicos, e os resultados satisfatórios dessas pesquisas abrem caminho para a utilização futura da técnica em seres humanos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mutações em oncogenes e genes supressores de tumor são responsáveis por desencadear o processo de tumorigênese. A técnica CRISPR vem revolucionando a engenharia genômica do câncer por ser capaz de silenciar ou alterar genes específicos que provocam seu desenvolvimento. O principal foco tem sido o silenciamento de oncogenes, avaliando a supressão tumoral *in vitro* e *in vivo*. Também foram realizados estudos com o objetivo de silenciar genes supressores de tumor, a fim de confirmar seu papel na progressão tumoral e criar modelos de estudo.

Ensaio *in vitro* e *in vivo* obtiveram resultados satisfatórios e que se mostraram promissores. Estudos que tiveram como alvo o silenciamento de oncogenes, demonstraram, *in vitro*, redução da proliferação celular, migração, capacidade de invasão e malignidade, além do aumento da apoptose das células. *In vivo*, o nocaute destes genes resultou em crescimento tumoral diminuído, de tamanho menor e proporcionou uma sobrevivência maior dos animais testados. Já nos ensaios que visaram silenciar genes envolvidos com a supressão tumoral, obteve-se crescimento celular, capacidade de invasão e malignidade aumentados *in vitro*, bem como a progressão tumoral *in vivo*.

Através do aprimoramento dessa tecnologia e aproveitando seu potencial como uma técnica simples, de baixo custo e específica, CRISPR abre portas para sua futura aplicação em seres humanos no campo da Oncologia. Através dela será possível compreender ainda mais os mecanismos da tumorigênese, inativando e alterando genes que participam desse processo, bem como buscar novas vias de tratamento, contornando a resistência aos quimioterápicos. Embora os desafios de sua aplicação ainda existam, CRISPR tornou-se uma técnica promissora e com potencial para atuar no tratamento e pesquisa dessa doença altamente complexa.

REFERÊNCIAS

- AHN, J. et al. Target sequencing and CRISPR/Cas editing reveal simultaneous loss of UTX and UTY in urothelial bladder cancer. *Oncotarget*, [s.l.], v. 7, n. 39, p. 63252-63260, 2016.
- BHAYA, D.; DAVISON, M.; BARRANGOU, R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics*, Palo Alto, v. 45, [s. n.], p. 273-297, 2011.
- BURMISTRZ, M.; PYRÓC, K. CRISPR-Cas systems in prokaryotes. *Polish journal of microbiology*, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 193-202, 2015.
- CORTE, E. D. et al. Development of improved fruit, vegetable, and ornamental crops using the CRISPR/Cas9 genome editing technique. *Plants*, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 601-622, 2019.
- DELTCHEVA, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, London, v. 471, n. 7340, p. 602-607, 2011.
- GRAZIANO, S.; GONZALO, S. Mechanisms of oncogene-induced genomic instability. *Biophysical chemistry*, Amsterdam, v. 225, [s.n.], p. 49-57, 2017.
- HUANG, L. et al. CRISPR/Cas9 genome editing of epidermal growth factor receptor sufficiently abolished oncogenicity in anaplastic thyroid cancer. *Disease markers*, Chichester, v. 2018, [s.n.], p. 1-14, 2018.
- HUANG, P. et al. Generation and characterization of a human oral squamous carcinoma cell line SCC-9 with CRISPR/Cas9-mediated deletion of the p75 neurotrophin receptor. *Archives of oral biology*, Oxford, v. 82, [s.n.], p. 223-232, 2017.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2020. Brasil: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>. Acesso em: 02 set. 2020.
- ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, Washington, v. 169, n. 12, p. 5429-5433, 1987.
- JANSEN, R. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, Oxford, v. 43, n. 6, p. 1565-1575, 2002.
- JIANG, C.; LIN, X.; ZHAO, Z. Applications of CRISPR/Cas9 technology in the treatment of lung cancer. *Trends in molecular medicine*, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1039-1049, 2019.
- JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, Washington v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.

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. *Journal of virology*, Washington, v. 88, n. 20, p. 11965-11972, 2014.

LENTSCH, E. et al. CRISPR/Cas9-mediated knock-out of krasG12D mutated pancreatic cancer cell lines. *International journal of molecular sciences*, [s.l.], v. 20, n. 22, p. 5706, 2019.

LIU, B. et al. CRISPR-mediated ablation of overexpressed EGFR in combination with sunitinib significantly suppresses renal cell carcinoma proliferation. *PloS ONE*, San Francisco, v. 15, n. 5, p. 1-13, 2020.

LIU, B; SABER, A; HAIMA, H. J. CRISPR/Cas9: a powerful tool for identification of new targets for cancer treatment. *Drug discovery today*, Oxford, v. 24, n. 4, p. 955-970, 2019.

LIU, T. et al. CRISPR-Cas9-mediated silencing of CD44 in human highly metastatic osteosarcoma cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, Basel, v. 46, n. 3, p. 1218-1230, 2018.

LI, W. et al. CRISPR-Cas9 mediated CD133 knockout inhibits colon cancer invasion through reduced epithelial-mesenchymal transition. *PloS ONE*, San Francisco, v. 14, n. 8, p. 1-10, 2019.

MOJICA, F. J. M. et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, New York, v. 60, n. 2, p. 174-182, 2005.

MOJICA, F. J. M. et al. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular microbiology*, Oxford, v. 17, n. 1, p. 85-93, 1995.

MOSES, C. et al. Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. *European Journal of Cancer*, Oxford, v. 93, [s.n.], p. 10-18, 2018.

NAERT, T. et al. CRISPR/Cas9 mediated knockout of *rb1* and *rb1l* leads to rapid and penetrant retinoblastoma development in *Xenopus tropicalis*. *Scientific reports*, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

NG, S. R. et al. CRISPR-mediated modeling and functional validation of candidate tumor suppressor genes in small cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v. 117, n. 1, p. 513-521, 2020.

NAKATA, A.; AMEMURA, M.; MAKINO, K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of bacteriology*, Washington, v. 171, n. 6, p. 3553-3556, 1989.

NARIMANI, M. et al. BIRC5 gene disruption via CRISPR/Cas9n platform suppress acute myelocytic leukemia progression. Iranian biomedical journal, Tehran, v. 23, n. 6, p. 369-378, 2019.

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

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, D. R. et al. Genome editing: a perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases. International Journal of Molecular Medicine, Athens, v. 43, n. 4, p. 1559-1574, 2019.

SAHA, S. K. et al. Programmable molecular scissors: applications of a new tool for genome editing in biotech. Molecular Therapy-Nucleic Acids, San Diego, v. 14, [s. n.], p. 212-238, 2019.

SANTOS, V. S.; WIETHÖLTER, P. Contribuições da engenharia genética no tratamento de doenças. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 3, p. 31157-31176, 2021.

SONG, J. et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of HBsAg inhibits proliferation and tumorigenicity of HBV-positive hepatocellular carcinoma cells. Journal of cellular biochemistry, New York, v. 119, n. 10, p. 8419-8431, 2018.

STADTMAUER, E. A. et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. Science, Washington, v. 367, n. 6481, p. 1-15, 2020.

SUN, T. et al. Blockade of a laminin-411–notch axis with CRISPR/Cas9 or a nanobioconjugate inhibits glioblastoma growth through tumor-microenvironment cross-talk. Cancer research, Baltimore, v. 79, n. 6, p. 1239-1251, 2019.

TIAN, X. et al. CRISPR/Cas9—An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. NPJ precision oncology, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1-8, 2019.

VALLETTA, S. et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. Oncotarget, [s.l.], v. 6, n. 42, p. 44061, 2015.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, Campinas, v. 46, [s.n.], p. 351-360, 2002.

WATANABE, S. et al. TP53 mutation by CRISPR system enhances the malignant potential of colon cancer. Molecular Cancer Research, Philadelphia, v. 17, n. 7, p. 1459-1467, 2019.

WEI, C. et al. CRISPR/Cas9 targeting of the androgen receptor suppresses the growth of LNCaP human prostate cancer cells. Molecular medicine reports, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 2901-2906, 2018.

WU, H.; CAO, C. The application of CRISPR-Cas9 genome editing tool in cancer immunotherapy. Briefings in functional genomics, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 129-132, 2019.

YAHATA, T. et al. Programmed cell death ligand 1 disruption by clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-genome editing promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression. *Cancer science*, Tokyo, v. 110, n. 4, p. 1279-1292, 2019.

YOSEF, I.; QIMRON, U. Microbiology: how bacteria get spacers from invaders. *Nature*, London, v. 519, n. 7542, p. 166-167, 2015.

ZHANG, S. et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of NSD1 suppresses the hepatocellular carcinoma development via the NSD1/H3/Wnt10b signaling pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, Roma, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2019.

ZHANG, Y. et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of the PDEF gene inhibits migration and invasion of human gastric cancer AGS cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Paris, v. 111, [s.n.], p. 76-85, 2019.

ZHAO, Q. et al. Role of BMI1 in epithelial ovarian cancer: investigated via the CRISPR/Cas9 system and RNA sequencing. *Journal of ovarian research*, London, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2018.

ZHAO, R. et al. CRISPR/Cas9-Mediated BRCA1 knockdown adipose stem cells promote breast cancer progression. *Plastic and reconstructive surgery*, Baltimore, v. 143, n. 3, p. 747, 2019.