

Aplicação do CRISPR-Cas9 no rastreamento de linhagens de células tumorais como nova perspectiva na terapia de tumores

Application of CRISPR-Cas9 in the screening of tumor cell lines as a new perspective in tumor therapy

DOI:10.34119/bjhrv7n1-073

Recebimento dos originais: 05/12/2023

Aceitação para publicação: 08/01/2024

Mi Hwa Morais Oliveira

Graduanda em Biomedicina

Instituição: Centro Universitário Unifavip

Endereço: Av. Adjar da Silva Casé, 800, Indianópolis, Caruaru - PE, CEP: 55024-740

E-mail: mihwaoliveira@gmail.com

Adrya Lúcia Peres

Doutora em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Instituição: Faculdade de Medicina do Sertão

Endereço: Avenida Osvaldo Cruz, 10017, São Cristóvão, Arcoverde - PE, CEP: 56512-670

E-mail: adrya.medeiros@medicinadosertao.com.br

Sérgio Luiz da Rocha Gomes Filho

Doutor em Biologia Aplicada a Saúde

Instituição: Faculdade Medicina do Sertão

Endereço: Avenida Osvaldo Cruz, 10017, São Cristóvão, Arcoverde - PE, CEP: 56512-670

E-mail: rochagomesfilho@gmail.com

Willians Emanuel da Silva Melo

Mestre em Saúde Pública pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Instituição: Faculdade de Medicina do Sertão

Endereço: Avenida Osvaldo Cruz, 10017, São Cristóvão, Arcoverde - PE, CEP: 56512-670

E-mail: williansmelo1@gmail.com

Bárbara Virgínia Mendonça da Silva

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Instituição: Faculdade de Medicina do Sertão

Endereço: Avenida Osvaldo Cruz, 10017, São Cristóvão, Arcoverde - PE, CEP: 56512-670

E-mail: barbaravmsilva@hotmail.com

Thaise Gabriele da Silva Brito

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Instituição: Centro Universitário Unifavip

Endereço: Av. Adjar da Silva Casé 800, Indianópolis, Caruaru – PE, CEP: 55002970

E-mail: thaise.gabrielle@gmail.com

Fernanda Miguel de Andrade

Doutora em Bioquímica e Fisiologia

Instituição: Faculdade de Medicina do Sertão

Endereço: Avenida Osvaldo Cruz, 10017, São Cristóvão, Arcoverde - PE, CEP: 56512-670

E-mail: fernanda.andrade@medicinadosertao.com.br

Estefani Pontes Simão

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Instituição: Centro Universitário Unifavip

Endereço: Av. Adjar da Silva Casé, 800, Indianópolis, Caruaru – PE, CEP: 55002970

E-mail: estefanipontes@gmail.com

RESUMO

Ao longo dos anos, os pesquisadores têm dedicado grandes esforços para entender e combater a adaptação do câncer, visando à cura. A arquitetura do câncer é complexa, composta por vários aspectos que tornam sua abordagem desafiadora. No entanto, essa complexidade também abre diferentes maneiras de abordar o problema. O campo da biologia tumoral tem uma vasta quantidade de literatura que é atualizada rapidamente. Portanto, descobrir o estado atual do conhecimento sobre a evolução do câncer e as ferramentas emergentes usadas nesses estudos pode proporcionar a clareza necessária para pesquisas futuras. Nesta revisão da literatura, foi apresentada uma visão geral das diferentes estratégias de aplicação da CRISPR-Cas9 na compreensão da evolução do tumor e seus respectivos níveis de contribuição. Foram selecionados artigos originais dos bancos de dados NCBI, Scielo e Biblioteca Virtual em Saúde que aplicaram a CRISPR-Cas9 para investigar a dinâmica tumoral. Através dos descritores "lineage tracing" "CRISPR-Cas9" "cancer" 22 artigos foram encontrados, e selecionados 12 artigos experimentais com base nos critérios estabelecidos. Por meio da análise desses artigos, foi averiguado que a incorporação da CRISPR-Cas nos estudos da evolução tumoral e na abordagem clínica do câncer proporcionou contribuições significativas. Seja por meio do desenvolvimento de modelos experimentais, da criação de marcadores moleculares ou do aprimoramento das técnicas de sequenciamento e rastreamento da linhagem tumoral. Apesar dos desafios inerentes à edição de genes, como a edição fora do alvo e mutações indesejadas, resultados promissores foram obtidos com a modificação da proteína Cas9 e do gRNA, tornando a ferramenta mais segura para uso em humanos.

Palavras-chave: CRISPR-Cas9, rastreamento de linhagem, Câncer.

ABSTRACT

For many years, Researchers have dedicated extensive efforts over the years to understand and combat cancer's adaptation, aiming for a cure. Cancer's architecture is complex, comprising various aspects that make it challenging to approach. However, this complexity also opens different ways of addressing the problem. The field of tumor biology has a vast amount of literature that is updated quickly. Therefore, finding the current state of knowledge on cancer evolution and the emerging tools used in these studies can provide the necessary clarity for future research. In this literature review, we present an overview of the different strategies for applying CRISPR-Cas9 in understanding tumor evolution and their respective levels of contribution. We collected original articles from the NCBI, Scielo, and Virtual Health Library databases that applied CRISPR-Cas9 to investigate tumor dynamics. We used the descriptors "lineage tracing," "CRISPR-Cas9," and "cancer." Out of the 22 articles found, we selected 12 experimental articles based on the established criteria. Through the analysis of these articles, we found that the incorporation of CRISPR-Cas in studies of tumor evolution and in the clinical

approach to cancer has provided significant contributions. Whether through the development of experimental models, the creation of molecular markers, or the improvement of sequencing and tumor lineage tracking techniques. Despite the challenges inherent to gene editing, such as off-target editing and unwanted mutations, promising results have been obtained with the modification of the Cas9 protein and gRNA, making the tool safer for use in humans.

Keywords: CRISPR-Cas9, lineage tracing, Cancer.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença complexa e dinâmica. Pois, a partir da transformação de uma única célula acumula mutações sequenciais no genoma que serão transmitidas e incrementadas nas gerações seguintes. As causas das mutações variam entre fatores ambientais, disposição hereditária, ou por natureza estocástica. Algumas delas são denominadas mutações “*drivers*”, ou mutações-chave, e ocorrem em genes importantes para o controle celular fornecendo vantagens seletiva às células malignas; tal como invasão tecidual, e evasão da supressão de crescimento e da apoptose. No entanto, os tumores apresentam também mutações somáticas adicionais, essas podem não conferir uma vantagem evolutiva a célula, mas contribui para a diversidade genética do tumor (Dagogo-Jack & Shaw, 2018; Davis et al., 2017).

Acredita-se que as assinaturas genéticas das mutações *drivers* são a chave para o desenvolvimento de terapias antineoplásicas eficazes (Anjos Filho et al., 2020). Mas, apesar do uso cada vez mais aprimorado das terapias-alvo (Da Silva & Da Silva, 2022), ainda são enfrentados obstáculos relacionados à resistência e recidiva (Gerlinger et al., 2012). Os mecanismos que promovem a resistência a drogas e a adaptação do tumor ainda não estão completamente elucidados. No entanto, a literatura atual relata que a heterogeneidade tumoral desempenha um papel crítico na falha terapêutica, sendo considerada "o combustível da resistência". (Li et al., 2023; Stewart et al., 2020)

A heterogeneidade é um tópico de destaque nos estudos de evolução tumoral, pois é a principal característica quando se trata da natureza dinâmica do câncer. Ela pode ocorrer devido a alterações genéticas, epigenéticas, transcriptômicas e/ou fenotípicas. Abordando este tópico pelo prisma genômico, estudos de rastreamento de linhagens tumorais têm utilizado tecnologias de sequenciamento que viabilizam a investigação dos mecanismos de evolução tumoral (Borgsmüller et al., 2023; Dentro et al., 2021; Lüönd et al., 2022). O rastreamento de linhagem em mamíferos foi inicialmente aplicado aos estudos de biologia do desenvolvimento, mas logo mostrou seu valor no campo da oncologia (Amirouchene-Angelozzi et al., 2017). A partir de uma célula-mãe, o rastreamento pode informar sobre o número de descendentes, a localização,

status e composição da sua progênie. Através do sequenciamento desta única célula podemos obter informações acerca da trajetória evolutiva de subclones, as rotas e momento da disseminação metastática, e desenvolvimento da resistência terapêutica (Bowling et al., 2020; Guernet et al., 2016; Simeonov et al., 2021; Yang et al., 2022; Zhang et al., 2021).

Um rastreador adequado deve marcar a célula progenitora, preservando suas propriedades originais, ele deve ser herdado durante a divisão e permanecer exclusivamente nas células descendentes ao longo do tempo sem que haja compartilhamento horizontal (Kretzschmar & Watt, 2012). Para uma clara visão da arquitetura tumoral vários fatores, como instabilidade genômica, as interações entre o microambiente tumoral, a evolução clonal e subclonal, precisam ser analisados em conjunto (Dagogo-Jack & Shaw, 2018).

Através do rastreamento unicelular do tumor podemos ter um quadro de alta resolução deste cenário complexo que forneça possibilidades de ação. Por este motivo, abordagens de rastreamento tumoral aplicados a diferentes tipos de câncer vêm realizando os ajustes necessários que aprimora a leitura e fornecendo insights significativos nos últimos anos (Jones et al., 2023)

Uma das recentes adaptações que tem se mostrado promissora nos estudos de rastreamento de tumores é o CRISPR (do inglês: Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas). Uma ferramenta de edição genética, originária de bactérias e arqueas, que utiliza uma molécula guia associada a uma enzima de restrição para localizar regiões específicas e realizar modificações direcionadas no DNA. Desde seu advento, o uso no genoma de mamíferos tem sido demonstrado com sucesso (Mali et al., 2013; Ran et al., 2013).

No que se refere aos estudos de tumores, o CRISPR tem sido diversamente aplicado para marcação e seleção celular (Bowling et al., 2020; Choi et al., 2022; Simeonov et al., 2021; Zhang et al., 2021), na criação de modelos geneticamente modificado (Bowling et al., 2020; Cortina et al., 2017; Goto et al., 2019; McCann et al., 2020; Teng et al., 2021; Yang et al., 2022), e no aprimoramento de pipeline e métodos de sequenciamento (Guernet et al., 2016; Sayed et al., 2019; Tang et al., 2019). Essa ferramenta demonstra tal versatilidade, que por meio de ajustes nos seus efetores e enzimas associadas possibilita o aprimoramento contínuo de sua especificidade. A capacidade de ajuste não apenas expande as aplicações já existentes do CRISPR, mas também abre espaço para a criação de abordagens inovadoras, como será visto nas seções seguintes.

Essa revisão integrativa se propõe a explorar como o CRISPR-Cas9 tem sido aplicado para superar os desafios da heterogeneidade na evolução tumoral e seu impacto no desenvolvimento de estratégias para terapias antitumorais.

2 METODOLOGIA

Este estudo é uma revisão integrativa da literatura de caráter qualitativo e exploratório. No qual, por meio da busca na base de dados da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (NCBI), Biblioteca Virtual da Saúde e Scielo, onde foram selecionados estudos originais experimentais *in vitro* e *in vivo* dos últimos 7 anos, por meio dos descritores “*Lineage tracing*”, “*CRISPR-Cas9*”, “*Cancer*”. Apenas artigos em inglês foram encontrados.

Foram incluídos apenas estudos originais que aplicaram o CRISPR para investigar a evolução tumoral como estratégia para o tratamento e elucidação do câncer. Os critérios foram delineados com o objetivo entender qual o potencial do CRISPR-Cas9 para superar a heterogeneidade tumoral e alcançar melhorias no tratamento do câncer. Para uma análise precisa e integral foram excluídos artigos de revisões narrativas e artigos pré-print não revisados por pares, assim como os demais que não entenderam aos critérios de inclusão.

A sequência metodológica adotada iniciou com a definição da pergunta de pesquisa, depois a busca na literatura e seleção dos artigos conforme os critérios estabelecidos. Posteriormente, foi feita a extração dos dados, seguida da análise crítica dos resultados, síntese e organização de forma lógica para apresentação desta revisão (Tavares De Souza et al., 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a metodologia proposta foram encontrados 22 artigos dos quais foram selecionados 12 seguindo os critérios predefinidos, sendo todos experimentais. Os estudos foram organizados quanto ao foco de pesquisa: geração de modelos geneticamente modificados, desenvolvimento de ferramentas para marcação e seleção de células, novas abordagens de sequenciamento e elaboração de novos pipelines.

Os artigos experimentais incluem ensaios *in vitro* em células humanas e *in vivo* em murinos, incluindo provas de conceitos. Um deles trata-se de uma prova de princípio, que realiza validação *in vivo* de um modelo transgênico para examinar o papel do microambiente tumoral na metástase, especificamente das vesículas extracelulares (McCann et al., 2020).

Como dito anteriormente, um passo crítico para superar os desafios impostos pelo câncer é compreender a dinâmica evolutiva do tumor. Para isso, deve-se obter condições de estudo adequadas que mimetize o ambiente natural do tumor com maior fidelidade possível. Atendendo a este propósito, seis dos estudos observados desenvolveram modelos geneticamente modificados editados por CRISPR-Cas9, quatro deles utilizando murinos (Bowling et al., 2020; McCann et al., 2020; Teng et al., 2021; Yang et al., 2022) e dois com organoides tumorais humanos (Cortina et al., 2017; Goto et al., 2019).

Adicionalmente, reconstruir os caminhos da progressão tumoral permite elucidar os mecanismos de evolução e adaptação do câncer. A fim de destrinchar essa questão, cinco estudos fizeram a leitura de um vasto número de células empregando o CRISPR-Cas9 como gravador. Com inserções de *indels* permite o registro simultâneo e ilimitado das linhagens tumorais, criando ferramentas inéditas que superam limitações de métodos tradicionais (Bowling et al., 2020; Choi et al., 2022; Simeonov et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Outros três estudos identificaram alvos terapêuticos, incluindo genes supressores de metástase e crescimento tumoral através da elaboração de pipelines (Guernet et al., 2016; Sayed et al., 2019; Tang et al., 2019). Complementar a isso, foi feito o monitoramento da terapia antitumoral com 5-Fluorouracil e a avaliação multiplex da resistência medicamentosa com gefitinib (Bowling et al., 2020; Guernet et al., 2016).

3.1 MODELOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Como exposto na fundamentação teórica, a heterogeneidade tumoral configura um problema espinhoso para gerar entendimento quanto a biologia tumoral. Utilizar das próprias mutações somáticas naturais para rastrear a linhagem tumoral, tal como as variações do número de cópias (CNVs), ainda que possível pode ser complicado, devido a sua variabilidade intrínseca. Por este motivo, os modelos geneticamente modificados se apresentam como uma opção mais vantajosa, por sua reprodutibilidade, e estudo da doença em um ambiente nativo e controlado.

A edição mediada por CRISPR permite a criação de modelos de camundongos geneticamente modificados (sigla em inglês: GEMMs) com mutações direcionadas, específicas para o desenho do estudo, que mimetizam o câncer humano e geram dados de alta resolução. Como verificado no desenvolvimento de GEMMs autóctones de câncer de pulmão, onde os autores fizeram um rastreamento contínuo de células únicas inédito, desde a transformação maligna até a metástase, e em alta resolução, isto é, registrando mutações adicionais. Entre outros resultados, este estudo gerou entendimento acerca do papel de alterações subclonais na progressão do tumor e sobre a determinação destas na trajetória evolutiva (Yang et al., 2022).

Em outro estudo, foram desenvolvidos dois modelos de camundongos transgênicos para investigar a função de possíveis *drivers* no carcinoma seroso de ovário de alto grau (CSOAG), a edição mediada por CRISPR foi feita diretamente *in vivo* por meio de eletroporação no genoma somático de camundongos. Uma estratégia de edição com o sistema CRISPR simples e versátil, a qual possibilita editar diferentes conjuntos de genes e rastrear o efeito de múltiplos genes candidatos. Os modelos possuem um padrão de variabilidade, semelhante aos tumores

humanos, sendo útil no estudo de subtipos tumorais. Além disso, a estratégia pode ser adaptada para a finalidade do estudo pré-clínico através de modular expressão da Cas9 (Teng et al., 2021).

Além da criação de GEMMs para tumores específicos, foi desenvolvido um modelo de camundongos predefinido com maior estabilidade genética que pode ser aplicado em estudos de função e filogenia, em geral, incluindo estados patológicos. Os pesquisadores fizeram uma seleção criteriosa de gRNA de alta eficiência, reduzindo os efeitos adversos da edição. O CARLIN (em inglês: CRISPR Array Repair LINEage tracing) foi capaz de realizar a análise filogenética e funcional do desenvolvimento à fase madura de células-tronco hematopoiéticas, gerando até 44.000 marcações distintas (Bowling et al., 2020).

Não só modelos animais, mas também, organoides tumorais humanos têm sido projetados com auxílio do CRISPR-Cas9 para o estudo da heterogeneidade do cancer colorretal (CCR). O diferencial destes modelos é que os organoides permitem a análise das relações de linhagens e diversidade fenotípica com maior proximidade dos tumores humanos. Testes *in vitro* e *in vivo* com organoides tumorais humanos revelou que o CCR possui uma natureza hierárquica semelhante ao estado normal do epitélio intestinal, e que um subtipo celular de baixa proliferação marcado pela expressão de LGR5 pode estar envolvido na resistência terapêutica (Cortina et al., 2017). Outro subtipo celular em CCR humano foi identificado como potencial alvo terapêutico, demonstrando uma forte supressão tumoral em estudo pré-clínico. Neste estudo, a aplicação do CRISPR se deu tanto na criação de modelos de murinos transgênico para validação experimental, como também criação de organoides humanos e rastreio de linhagem (Goto et al., 2019).

Para além do genoma, componentes envolvidos no microambiente tumoral, que modulam o estado celular, também têm sido foco de investigação. Fisiologicamente, as vesículas extracelulares (EVs) fazem o tráfego de proteínas e ácidos nucleicos entre células próximas e distantes. No contexto patológico são componentes interessantes se tratando de microambiente tumoral, pois através do intercâmbio destas moléculas as vesículas favorecem o aumento da aptidão de células cancerígenas. Sendo assim, uma vez caracterizadas elas poderiam fornecer informações valiosas acerca do progresso da doença, diagnóstico e mesmo acompanhamento de terapias. Foi desenvolvida uma abordagem com murinos transgênicos capaz de marcar, isolar e caracterizar EVs envolvidas na angiogênese por McCann et al. (2020). Para isso ser possível, a aplicação do sistema CRISPR foi otimizada com uso de uma Cas9 adaptada para os códons e encurtamento do gRNA para maior precisão da edição minimizando edições fora do alvo, e como resultado, o estudo conseguiu marcar e localizar EVs específicas

in vivo com sucesso. Interessantemente, este modelo pode ser aplicado para compreensão de outros processos da carcinogênese como, por exemplo, as vias de sinalização que induzem a metástase e supressão do sistema imune (McCann et al., 2020).

3.2 GRAVADORES MOLECULARES

O GESTALT (em inglês: Genome Editing of Synthetic Target Arrays for Lineage Tracing) é uma ferramenta de marcação molecular que utiliza o CRISPR para inserir mutações progressivas e exclusivas no genoma como um tipo de código de barras. As marcações podem ser organizadas a fim de reconstruir a trajetória filogenética da célula ou até de um organismo completo (McKenna et al., 2016). Esta ferramenta quando acoplada ao sequenciamento de RNA de células únicas (scRNA-seq), faz com que além de dados filogenéticos seja possível obter informações dos estados transcricionais e ampliar a leitura dos dados. No entanto, os elementos de marcação precisam ser inseridos na fase inicial do desenvolvimento e as marcações tendem a diminuir ao longo do tempo, o que limita a ferramenta para investigar os diferentes momentos da progressão tumores, por exemplo.

Em busca de aprimorar a leitura e gerar maior compreensão acerca dos processos celulares, novas adaptações do método GESTALT foram desenvolvidas. Uma delas, a ferramenta denominada macsGESTALT, induz a ativação dos códigos de barras em momentos específicos e possui uma gRNA compactada de fácil transferência para sistemas de mamíferos, aprimorando o controle, integração e escala das marcações. Isso permitiu investigar em alta resolução (clonal e subclonal) o processo metastático através do registro de células únicas cruzando informações filogenéticas e transcricionais. Mediante sua aplicação experimental, foi observado no câncer pancreático de camundongos subpopulações celulares com alta expressão de genes da família S100 (um grupo de importância fisiológica e patológica, que se acredita estarem relacionados com a progressão tumoral e invasão tecidual) (Simeonov et al., 2021).

Outra abordagem recentemente desenvolvida é o Typewriter. Um marcador multiplexado e unidirecional, que permite o registro simultâneo de diferentes eventos na ordem exata em que eles ocorrem. O Typewriter usa RNAs guias únicos, chamados pegRNAs (do inglês: *primer editing gRNA*), que inserem o marcador (k-mer) em um só alvo. O marcador k-mer possui na região 5' uma sequência variável que corresponde ao pegRNA específico que o inseriu, e na região 3' possui uma sequência constante, responsável pela ativação do próximo alvo. Dessa forma, é feito o registro sequencial dos processos celulares, que pode ser direcionado para diferentes linhagens celulares e contextos fisiológico ou patológico. Para validação foi feito o registro bem sucedido de uma linhagem monofilética de 3.257 células,

onde os autores ainda afirmaram que o Typewriter tem a capacidade de registrar até 20 eventos em série, mostrando ser um método promissor e altamente escalonável (Choi et al., 2022).

3.3 ABORDAGEM DE SEQUENCIAMENTO

Métodos de sequenciamento também são utilizados para inferir relações filogenéticas de eventos patológicos e normais. Alterações genômicas podem informar sobre a dinâmica evolutiva como se fosse uma espécie de impressão digital do DNA, como é o caso dos tratos de poliguaninas (PolyGs). Os PolyGs são repetições de Guanina (G) de diferentes comprimentos que pode ocorrer em qualquer local do genoma. Essas mutações genéticas são comuns a todo tipo de tecido, estado fisiológico ou patológico e são mutações neutras, o que significa que elas não decorrem apenas de transformações condutoras.

Em um experimento *in vitro*, Zhang et al. propuseram um novo método de sequenciamento, o PolyG-DS, que combinou o sequenciamento duplex (DS) de PolyGs com CRISPR-Cas9. O PolyG-DS aplicou o CRISPR no enriquecimento das sequências, e com sua edição direcionada seccionou o DNA em pontos invariáveis, o que minimizou erros de leitura pela polimerase, reduziu ruídos de artefatos de variantes e garantiu o acoplamento de códigos de barras de dupla fita. Além do rastreamento de tumores no câncer colorretal e de ovário, os autores demonstraram a possibilidade de identificar mutações condutoras sem conhecimento prévio destas, e ainda revelar a expansão clonal em lesões pré-neoplásicas (Zhang et al., 2021).

3.4 FORMULAÇÃO DE NOVOS PIPELINES

A combinação de ferramentas já existentes e elaboração de novos pipelines também permite uma abordagem diferencial no rastreamento tumoral e pode contribuir para maior compreensão dessa questão. Foi o que Tang e colaboradores fizeram ao combinar dois tipos de marcação molecular, fluoróforos *confetti* e inserção de *indels* mediada por CRISPR, para realizar um rastreamento prospectivo, ou seja, a captura dos eventos celulares em tempo real, da sua transformação maligna com o tumor primário até a evolução metastática (Tang et al., 2019).

Por meio dos resultados observados, os autores concluíram que a recidiva pode ser causada pela expansão de múltiplos clones, enquanto a metástase pela expansão monoclonal. Devido a isso, os autores sugerem que as células seguem uma evolução pontual, ou seja, eventos adaptativos pontuais onde clones mais aptos emergem e expandem, superando os demais. Embora este estudo gere compreensão sobre a baixa variabilidade clonal na atividade metastática não fornece um panorama sobre a real dinâmica evolutiva, pois se concentra nas

alterações clonais e desconsidera alterações típicas de subpopulações, como a frequência alélica mutante (MAF) ou CNVs. Já uma análise multiplexada feita em 40.386 células de 35 tumores por Yang et al. (2022), obteve resultados que sustentam que a aquisição de aptidão e agressividade, e conseqüentemente, a progressão metastática está relacionada expansão de subclones. O que sugere que a progressão tumoral desempenha também uma dinâmica evolutiva neutra, onde a seleção positiva não é determinante na expansão (Yang et al., 2022).

Outro pipeline desenvolvido para verificar a relevância funcional de mutações malignas validou uma mutação de importância na progressão tumoral no câncer colorretal (UTP14A:S99delS), demonstrando a viabilidade da criação de perfis funcionais por meio do sistema CRISPR-Cas9. Através desta investigação também foi constatado que outra mutação previamente categorizada como cancerígena era, na verdade, um polimorfismo humano. Esse achado enfatiza a necessidade de uma ferramenta capaz de examinar e validar os dados presentes nos bancos de dados do genoma do câncer (Sayed et al., 2019).

A combinação do CRISPR e códigos de barras (em inglês: barcoding) tem sido muito utilizada para reconstruir linhagens tumorais e estudar mutações. Essa abordagem, introduzida por Guernet et al. (2017), combina a marcação sensível dos códigos de barras com o potencial de edição multiplexada e precisão do CRISPR. E viabiliza a avaliação simultânea de diferentes medicamentos inibidores, como também possibilita projetar e validar tratamentos com múltiplos alvos. O CRISPR-barcoding também superou limitações de métodos anteriores, como a edição fora do alvo e baixa eficiência Reparo Direcionado por Homologia (HDR). Isso graças a fácil identificação dos códigos de barras pela qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa) e a disponibilidade de obter o perfil funcional das células editadas, o que dispensa a necessidade de selecionar e amplificar clones individuais (Guernet et al., 2016).

4 CONCLUSÃO

Evidências têm cada vez mais sustentado a influência da heterogeneidade na tumorigênese e na aquisição de aptidão. O aprimoramento de modelos experimentais tem sido um elemento essencial na quantificação e modelagem da heterogeneidade intratumoral. O CRISPR tem desempenhado um papel crucial no melhoramento de ferramentas existentes, e no desenvolvimento de sequenciamento e marcadores moleculares que aumentam a precisão, resolução e performance da captura dos eventos celulares, além de possibilitar o cruzamento de múltiplos dados. Contudo, edições fora do alvo e potenciais alterações adversas apresentam obstáculos para a aplicação dessas ferramentas mediadas por CRISPR em humanos, tanto na

marcação molecular quanto na edição do genoma propriamente. Um caminho para aumentar a acurácia do CRISPR-Cas9 é através modificação da endonuclease Cas9 e do gRNA.

REFERÊNCIAS

- Amirouchene-Angelozzi, N., Swanton, C., & Bardelli, A. (2017). Tumor evolution as a therapeutic target. In *Cancer Discovery* (Vol. 7, Issue 8, pp. 805–817). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0343>
- Anjos Filho, I. A. dos, Anjos, I. W. T. dos, França, M. E. de, Silva, J. J. da, Villabón, J. L. de O. B., Silva, L. G. da, & Cezar, N. J. B. (2020). Use of bioinformatic tools for Etv6-Runx1 fusion detection associated with acute lymphocytic leukemia / Utilização de ferramentas de bioinformática para detecção da fusão Etv6-Runx1 associada à leucemia linfocítica aguda. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(5), 12754–12770. <https://doi.org/10.34119/bjhrv3n5-113>
- Borgsmüller, N., Valecha, M., Kuipers, J., Beerenwinkel, N., & Posada, D. (2023). Single-cell phylogenies reveal changes in the evolutionary rate within cancer and healthy tissues. *Cell Genomics*, 3(9), 100380. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2023.100380>
- Bowling, S., Sritharan, D., Osorio, F. G., Nguyen, M., Cheung, P., Rodriguez-Fraticelli, A., Patel, S., Yuan, W. C., Fujiwara, Y., Li, B. E., Orkin, S. H., Hormoz, S., & Camargo, F. D. (2020). An Engineered CRISPR-Cas9 Mouse Line for Simultaneous Readout of Lineage Histories and Gene Expression Profiles in Single Cells. *Cell*, 181(6), 1410-1422.e27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.048>
- Choi, J., Chen, W., Minkina, A., Chardon, F. M., Suiter, C. C., Regalado, S. G., Domcke, S., Hamazaki, N., Lee, C., Martin, B., Daza, R. M., & Shendure, J. (2022). A time-resolved, multi-symbol molecular recorder via sequential genome editing. *Nature*, 608(7921), 98–107. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04922-8>
- Cortina, C., Turon, G., Stork, D., Hernando-Momblona, X., Sevillano, M., Aguilera, M., Tosi, S., Merlos-Suárez, A., Stephan-Otto Attolini, C., Sancho, E., & Batlle, E. (2017). A genome editing approach to study cancer stem cells in human tumors. *EMBO Molecular Medicine*, 9(7), 869–879. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707550>
- Da Silva, G. A., & Da Silva, L. G. (2022). Vantagens e desafios da terapia gênica no tratamento do câncer / Advantages and challenges of gene therapy in cancer treatment. *Brazilian Journal of Health Review*, 5(3), 10982–10993. <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n3-251>
- Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 15, Issue 2, pp. 81–94). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
- Davis, A., Gao, R., & Navin, N. (2017). Tumor evolution: Linear, branching, neutral or punctuated? *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1867(2), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.01.003>
- Dentro, S. C., Leshchiner, I., Haase, K., Tarabichi, M., Wintersinger, J., Deshwar, A. G., Yu, K., Rubanova, Y., Macintyre, G., Demeulemeester, J., Vázquez-García, I., Kleinheinz, K., Livitz, D. G., Malikic, S., Donmez, N., Sengupta, S., Anur, P., Jolly, C., Cmero, M., ... Yang, T. P. (2021). Characterizing genetic intra-tumor heterogeneity across 2,658 human cancer genomes. *Cell*, 184(8), 2239-2254.e39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.009>

Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N. Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C. R., ... Swanton, C. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine*, 366(10), 883–892. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1113205>

Goto, N., Fukuda, A., Yamaga, Y., Yoshikawa, T., Maruno, T., Maekawa, H., Inamoto, S., Kawada, K., Sakai, Y., Miyoshi, H., Taketo, M. M., Chiba, T., & Seno, H. (2019). Lineage tracing and targeting of IL17RB+ tuft cell-like human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(26), 12996–13005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900251116>

Guernet, A., Mungamuri, S. K., Cartier, D., Sachidanandam, R., Jayaprakash, A., Adriouch, S., Vezain, M., Charbonnier, F., Rohkin, G., Coutant, S., Yao, S., Ainani, H., Alexandre, D., Tournier, I., Boyer, O., Aaronson, S. A., Anouar, Y., & Grumolato, L. (2016). CRISPR-Barcoding for Intratumor Genetic Heterogeneity Modeling and Functional Analysis of Oncogenic Driver Mutations. *Molecular Cell*, 63(3), 526–538. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.017>

Jones, M. G., Yang, D., & Weissman, J. S. (2023). Downloaded from www.annualreviews.org Access provided by 189. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2023, 7, 111–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-061421>

Kretzschmar, K., & Watt, F. M. (2012). Lineage tracing. In *Cell* (Vol. 148, Issues 1–2, pp. 33–45). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.002>

Li, X., Wang, Y., Deng, S., Zhu, G., Wang, C., Johnson, N. A., Zhang, Z., Tirado, C. R., Xu, Y., Metang, L. A., Gonzalez, J., Mukherji, A., Ye, J., Yang, Y., Peng, W., Tang, Y., Hofstad, M., Xie, Z., Yoon, H., ... Mu, P. (2023). Loss of SYNCRIP unleashes APOBEC-driven mutagenesis, tumor heterogeneity, and AR-targeted therapy resistance in prostate cancer. *Cancer Cell*, 41(8), 1427–1449.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.06.010>

Lüönd, F., Santacrose, N., Beisel, C., Guérard, L., Bürglin, T. R., Christofori, G., & Sugiyama, N. (2022). Tracking and characterization of partial and full epithelial-mesenchymal transition cells in a mouse model of metastatic breast cancer. *STAR Protocols*, 3(2). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101438>

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>

McCann, J. V., Bischoff, S. R., Zhang, Y., Cowley, D. O., Sanchez-Gonzalez, V., Daaboul, G. D., & Dudley, A. C. (2020). Reporter mice for isolating and auditing cell type-specific extracellular vesicles in vivo. *Genesis*, 58(7). <https://doi.org/10.1002/dvg.23369>

McKenna, A., Findlay, G. M., Gagnon, J. A., Horwitz, M. S., Schier, A. F., & Shendure, J. (2016). Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *Science*, 353(6298). <https://doi.org/10.1126/science.aaf7907>

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>

Sayed, S., Paszkowski-Rogacz, M., Schmitt, L. T., & Buchholz, F. (2019). CRISPR/Cas9 as a tool to dissect cancer mutations. *Methods*, 164–165, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.007>

Simeonov, K. P., Byrns, C. N., Clark, M. L., Norgard, R. J., Martin, B., Stanger, B. Z., Shendure, J., McKenna, A., & Lengner, C. J. (2021). Single-cell lineage tracing of metastatic cancer reveals selection of hybrid EMT states. *Cancer Cell*, 39(8), 1150–1162.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.05.005>

Stewart, C. A., Gay, C. M., Xi, Y., Sivajothi, S., Sivakamasundari, V., Fujimoto, J., Bolisetty, M., Hartsfield, P. M., Balasubramanian, V., Chalishazar, M. D., Moran, C., Kalhor, N., Stewart, J., Tran, H., Swisher, S. G., Roth, J. A., Zhang, J., de Groot, J., Glisson, B., ... Byers, L. A. (2020). Single-cell analyses reveal increased intratumoral heterogeneity after the onset of therapy resistance in small-cell lung cancer. *Nature Cancer*, 1(4), 423–436. <https://doi.org/10.1038/s43018-019-0020-z>

Tang, Y. J., Huang, J., Tsushima, H., Ban, G. I., Zhang, H., Oristian, K. M., Puvindran, V., Williams, N., Ding, X., Ou, J., Jung, S. H., Lee, C. L., Jiao, Y., Chen, B. J., Kirsch, D. G., & Alman, B. A. (2019). Tracing Tumor Evolution in Sarcoma Reveals Clonal Origin of Advanced Metastasis. *Cell Reports*, 28(11), 2837–2850.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.029>

Tavares De Souza, M., Dias Da Silva, M., & De Carvalho, R. (2010). *Revisão integrativa: o que é e como fazer Integrative review: what is it? How to do it?* (Vol. 8, Issue 1).

Teng, K., Ford, M. J., Harwalkar, K., Li, Y. Q., Pacis, A. S., Farnell, D., Yamanaka, N., Wang, Y. C., Badescu, D., Nu, T. N. T., Ragoussis, J., Huntsman, D. G., Arseneau, J., & Yamanaka, Y. (2021). Modeling High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Using a Combination of in Vivo Fallopian Tube Electroporation and CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Cancer Research*, 81(20), 5147–5160. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1518>

Yang, D., Jones, M. G., Naranjo, S., Rideout, W. M., Min, K. H. (Joseph), Ho, R., Wu, W., Replogle, J. M., Page, J. L., Quinn, J. J., Horns, F., Qiu, X., Chen, M. Z., Freed-Pastor, W. A., McGinnis, C. S., Patterson, D. M., Gartner, Z. J., Chow, E. D., Bivona, T. G., ... Weissman, J. S. (2022). Lineage tracing reveals the phylodynamics, plasticity, and paths of tumor evolution. *Cell*, 185(11), 1905–1923.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.015>

Zhang, Y., Kohrn, B. F., Yang, M., Nachmanson, D., Soong, T. R., Lee, I.-H., Tao, Y., Clevers, H., Swisher, E. M., Brentnall, T. A., Loeb, L. A., Kennedy, S. R., Salk, J. J., Naxerova, K., & Risques, R. A. (2021). *PolyG-DS: An ultrasensitive polyguanine tract-profiling method to detect clonal expansions and trace cell lineage*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023373118/-/DCSupplemental>