

FACULDADE INTEGRADA DE VILA VELHA
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

JÉSSICA SANTOS PIOVEZAN, MÁRIO ARTHUR OLIVEIRA VIANNA, THAÍS
RIBEIRO COSTA

**MÉTODO CRISPR/CAS9 PRA EDIÇÃO GENÉTICA: REVISÃO PARA
APLICAÇÃO NA PESQUISA E TERAPIA DO CÂNCER**

VILA VELHA

2022

Resumo

Com a descoberta do sistema imunológico CRISPR de bactérias e arqueobactérias e sua associação com a proteína Cas9, os avanços de pesquisas na área de biologia molecular relacionadas com a clivagem e modificações no material genético sofreram um grande aumento. Portanto, o interesse da utilização dessa tecnologia como possível cura e tratamento de doenças associadas a mutações genéticas também surgiu a medida que as pesquisas com o CRISPR foram se desenvolvendo. Apesar de ainda existirem barreiras para a aplicação do sistema in vivo como efeitos fora do alvo e toxicidade de dano ao DNA, os avanços do uso do CRISPR na pesquisa do câncer são cada vez mais promissores visto que ele possui um grande potencial para nocaute de oncogenes e rastreamento de genes supressores de tumor. Portanto, neste artigo de revisão bibliográfica, visa-se abordar como funciona a técnica CRISPR/Cas9 e suas principais aplicações na pesquisa do câncer. Ao final do artigo conclui-se que as pesquisas da técnica de CRISPR são essenciais para que ele possa ser utilizado como um possível tratamento futuro para o câncer e que isso vai contribuir para a melhora do sistema de saúde, permitindo que a população tenha acesso a um tratamento mais eficaz, específico e menos custoso para a saúde pública.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9. Oncogenes. Câncer. Edição genética.

Abstract

With the discovery of the CRISPR immunological system of bacteria and archaeobacteria and its association with the Cas9 protein, research advances in the area of molecular biology related to cleavage and modifications in the genetic material have been greatly increased. Therefore, the interest in using this technology as a possible cure and treatment of diseases associated with genetic mutations also emerged as research with CRISPR was developed. Although there are still barriers to the application of the system in vivo such as off-target effects and DNA damage toxicity, advances in the use of CRISPR in cancer research are increasingly promising as it has great potential for knockout

oncogenes. and screening for tumor suppressor genes. Therefore, in this literature review article, we aim to address how the CRISPR/Cas9 technique works and its main applications in cancer research. At the end of the article, it is concluded that research on the CRISPR technique is essential so that it can be used as a possible future treatment for cancer and that this will contribute to the improvement of the health system, allowing the population to have access to a more effective, specific and less costly treatment for public health.

Keywords: CRISPR/Cas9. oncogenes. Cancer. Genetic editing.

1. Introdução

Edição de genes compreende uma área da genética que tem como propósito introduzir mutações de DNA por meio de deleções, inserções ou substituição de bases em sequências específicas, que compõem o material genético de seres vivos. A edição de genoma possui uma gama de técnicas para realização destas manipulações, tais como nucleases efetoras do tipo ativador transcricional (TALENs), nucleases de dedo de zinco (ZFNs) e conjunto de repetições palindrômicas curtas regularmente interespacadas (CRISPR). Está última, uma das mais recentes e revolucionárias técnicas de edição gênica (MANGHWAR et al., 2019).

Bactérias e Arqueobactérias possuem diversos mecanismos e estratégias de defesa como: genomas virais, plasmídeos e ácidos nucleicos estranhos, capaz de fornecer resistência à exposição à diversos fatores de risco. Utilizando estes sistemas, estes microrganismos podem se lembrar de seus invasores virais, como uma espécie de memória imunológica, a partir de curtas sequências de DNA do material genético viral chamadas de protoespaçadores. Uma integração entre os protoespaçadores e as repetições palindrômicas de CRISPR passam a se denominadas de espaçadores. Quando transcritas e processadas em RNAs, se tornam capazes de conduzir um complexo de proteínas multifuncionais (proteínas Cas) para reconhecer e promover a clivagem e deterioração do material genético invasor, levando a sua inativação (MANGERICAO et al., 2016).

A descoberta e aplicação do sistema CRISPR/Cas revolucionou a área da biologia molecular. Entre 2010 e 2013, o número de pesquisas associadas a CRISPR cresceram exponencialmente. Entre 2013 e 2014, esse crescimento se mostrou ainda mais radical, com mais de 700 estudos sendo publicados no intervalo de um ano. No mesmo período, houve um acentuado aumento no financiamento dos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA para desenvolvimento de projetos envolvendo CRISPR, iniciativa que impulsionou os estudos e diversos avanços futuros.

Os pedidos de patente em todo o mundo, relacionados à nova tecnologia, também tiveram um salto com o objetivo principal de estudar e promover aplicação terapêutica do CRISPR. O potencial clínico da técnica no tratamento de doenças e na edição de genoma, impulsiona o ritmo de pesquisas biológicas em áreas como compreensão e identificação de mecanismos de doenças genéticas, desenvolvendo modelos de doenças animais, validando alvos de doenças, facilitando a engenharia genética em plantas e permitindo estudos epigenéticos de maior complexidade (LINO et al., 2018, LEDFORD, 2015).

As principais utilizações do sistema CRISPR/Cas9 em linhas de pesquisa, dentre algumas outras, incluem a criação de mutações germinativas e geração de modelos animais transgênicos, que por sua vez apresentam eficiência e velocidade, transplantes baseados em modelos “in vivo”, nos quais células-tronco ou células progenitoras são modificadas por CRISPR e posteriormente transplantadas para receptores alvo, e a adaptação mais afamada, no qualum método de administração “in vivo” direto é utilizado, como a microinjeção de CRISPR por meio de um vírus adenoassociado no tecido. (DING et al., 2014).

Considerando as vantagens do sistema CRISPR na terapia gênica, a ferramenta tem se mostrado bastante promissora para uso em células humanas devido a sua alta versatilidade, eficácia em seleção de genes alvo, especificidade e facilidade de uso da técnica. Entretanto a ideia da utilização desta técnica para aplicações futuras de modificação genética em humanos, embora a terapia gênica em células somáticas tenha a aprovação condicional da União Europeia, qualquer modificação ou interferência em material genético que compreenda

linhagens germinativas é estritamente proibida, conforme ressaltado na Convenção de Direitos Humanos e Biomedicina do Conselho Europeu. O tratado permite engenharia genética apenas em pretexto diagnóstico, preventivo ou terapêutico.

Perante o exposto, este trabalho tem como alvo de análise o mecanismo e as funcionalidades do sistema CRISPR/Cas9 de manipulação gênica, assim como suas áreas de aplicação e suas aplicações na pesquisa do câncer utilizando uma metodologia de pesquisa bibliográfica em diversas plataformas científicas como Scielo, Pubmed e revistas científicas para destacar a técnica, suas limitações atuais, os avanços e suas projeções futuras, principalmente envolvendo o câncer como doença alvo para a aplicação da técnica.

2. MÉTODO CRISPR/CAS9 DE EDIÇÃO GENÉTICA

O sistema imune adaptativo bacteriano se baseia em genes de repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas denominadas CRISPR, e enzimas Cas associadas. As sequências CRISPR foram encontradas pela primeira vez no genoma de bactérias *Escherichia coli*, no ano de 1987 por Ishio, ao observar *locus* gênicos de função desconhecida, direcionado a um gene indutor de apoptose *iap*. Incorporando sequências curtas do material genético de vírus em adição a elementos do gene localizados no *locus* CRISPR do próprio hospedeiro, estas sequências podem ser transcritas e processadas em RNAs guia, promovendo a destruição de ácidos nucleicos invasores. Assim os *locus* CRISPR associados a enzimas Cas conferem as bactérias um mecanismo de defesa altamente adaptável e hereditário promovendo resistência frente a infecções (HRYHOROWICZ et al., 2016).

O sistema CRISPR compreende uma matriz de cópias repetidas de repetições diretas, vinculadas umas às outras por sequências de conexões de comprimento fixo. As sequências ligantes são sínteses dos curtos pedaços de material viral supracitados chamados protoespaçadores, com o material genético da bactéria infectada, formando um complexo denominado espaçadores. Um CRISPR é então acionado por genes adjacentes associados denominados Cas,

e assim os espaçadores serão processados em RNA molecular. Os espaçadores em forma de RNA possuem a função de reprimir atividades e funções de elementos estranhos à bactéria que possuem regiões do DNA complementares e reversas. (MAI, et al., 2016)

Posteriormente ao locus CRISPR, encontra-se uma região rica em Adenina e Timina, denominada sequência líder. As sequências líderes possuem cerca de 500 bp (pares de bases) de comprimento, são responsáveis por carregar elementos promotores para adaptação de sistemas CRISPR essenciais para a transcrição de crRNA (RNA CRISPR) e associação do material genético invasor ao sistema (WATSON et al., 2015).

Este sistema de defesa tem início na etapa de adaptação, no qual o fago invasor tem seu material genético agregado ao sistema CRISPR-Cas, formulando o começo de uma memória imunológica. A adaptação depende da seleção de protoespaçadores, que por sua vez, é executada pelos motivos adjacentes ao protoespaçador (PAMs). PAMs são formados por 2 a 5 nucleotídeos específicos para cada subtipo de CRISPR-Cas, determinando assim o alinhamento dos espaçadores dentro do CRISPR (LOUREIRO, SILVA, 2019).

A biogênese do RNA CRISPR é a etapa no qual ocorre a transcrição do CRISPR e gene Cas em pequenos crRNAs por meio de processos enzimáticos específicos. O locus CRISPR é transcrito em um pré-crRNA (precursor de RNA CRISPR), que é posteriormente clivado e processado por proteínas Cas, gerando unidades menores do crRNA maduro, contendo apenas uma única sequência conjugada espaçadora, cercada por porções da região de repetição (MARRAFFINI, 2010).

A etapa de interferência ocorre após a infecção do microrganismo hospedeiro, no qual as moléculas de crRNA maduras apontam os instrumentos de interferência específicos para os ácidos nucleicos invasores, impedindo a expressão de seu material genético. Nos sistemas CRISPR-Cas tipo II, esta etapa se apoia na participação da proteína Cas9 e tracrRNA, assim como na etapa da biogênese. Aqui a Cas9 age como uma endonuclease, sendo

direcionada por crRNA, tracrRNA e dois RNAs, que por sua vez se conjugam pela afinidade entre sequências espaçadoras carregadas pelo crRNA e os tracrRNAs, produzindo um complexo duplo tracrRNA:crRNA. Este complexo recém-formado ativa o Cas9 provocando um rearranjo em sua estrutura, e juntos começam a promover o rastreamento de genes não naturais da bactéria para o sítio PAM oposto à fita alvo. Após a identificação, o DNA é desenrolado enquanto o crRNA se liga ao ssDNA (DNA de fita simples) alvo, levando a Cas9 e suas propriedades catalíticas a romperem a fita dupla do DNA invasor (LOUREIRO, SILVA, 2019).

Em 2012, Martin Jinek e um grupo de pesquisadores publicaram um estudo acerca da eficácia do sistema CRISPR-Cas tipo II em clivar fitas duplas de DNA alvo. Fundindo o complexo duplo tracrRNA:crRNA em um RNA quimérico que mantém as características necessárias para clivagem pelo Cas9, seria possível a clivagem programada do DNA através da engenharia do RNA quimérico, posteriormente denominado como RNA guia ou sgRNA. Para testar a hipótese, foram projetados cinco gRNAs quiméricos para direcionar um seguimento do gene codificador da proteína fluorescente verde (GFP), sendo sua eficácia testada em um plasmídeo que codifica o GFP *in vitro*. O projeto obteve sucesso, e em todos os 5 testes, a proteína Cas9 tendo o gRNA como guia clivou com sucesso o DNA em seu local alvo, confirmando a hipótese proposta (JINEK, 2012).

Por depender de apenas um complexo proteico multidomínio, o sistema CRISPR de classe 2 tem sido o preferido para estudos na engenharia genética. Duas sequências importantes estão presentes na molécula do RNA guia, uma que se liga à proteína Cas9 e outra ao locus alvo, servindo como direcionadora para o sistema. Ao detectar um alvo compatível as 8-12 bases nitrogenadas iniciais de PAM presentes no gRNA promovem o emparelhamento do complexo com o material genético alvo, seguindo a direção 3´-5´. Esta ação depende da homologia estabelecida entre o gRNA e o DNA alvo, e possui como resultado uma quebra de fita dupla no mesmo (DSB, do inglês double strand break) resultante da ação catalítica da enzima Cas9 (SEMENOVA et al., 2011, ANDERS et al., 2014).

A região de fita dupla clivada pode ser reparada por dois mecanismos celulares. O reparo mediado por junção de extremidades não homólogas (NHEJ), utiliza o alinhamento de porções randômicas do DNA alinhados ao DSB por reparo endógeno, contanto que as bases das extremidades tenham um grau mínimo de compatibilidade, podendo resultar em indels, que são deleções ou inserções nos nucleotídeos. O outro sistema de reparo é denominado reparo dirigido por homologia (HDR), atuando na dependência de uma sequência de DNA molde para reparar a quebra com mais precisão ao inseri-la no local de DSB (ZHANG et al., 2020).

O NHEJ está mais suscetível a formação de mutações devido a não exigência de um molde para reparo, sendo inadequado para inserções precisas em bases do DNA, além disto, o DSB *in vivo* conta com extremidades complexas que dificultam o alinhamento entre os terminais de reparo, porém, os indels formados podem ser utilizados de forma benéfica, tendo em vista que códon de parada prematuros gerados silenciam o gene e o tornam inativo (WATERS et al., 2015).

O reparo em fita dupla acontece de forma diferente na presença de um DNA molde de doador, nestes casos temos a ocorrência do reparo dirigido por homologia. O HDR depende da compatibilidade entre as duas extremidades do molde e a região terminal do DSB para que seja bem-sucedido. Se fragmentos de DNA exógenos forem alocados na região entre os braços homólogos, o reparo será realizado inserindo estas sequências no produto final, assim o HDR pode ser utilizado para programar indels de base específicas no locus alvo (LI et al., 2014).

O sistema CRISPR-Cas9 conta ainda com uma variação frequentemente aplicada nas pesquisas da terapia do câncer, devido a sua capacidade de rastreio e identificação de genes. Esta variação surgiu com a introdução de duas mutações em domínios da Cas9 que modelaram a proteína para manter sua capacidade de ligar-se ao DNA, porém sem atividades catalíticas, criando o complexo Cas9 “morto” ou dCas9 (BIKARD et al., 2013).

O sistema CRISPR-Cas9 tem demonstrado resultados espetaculares em múltiplos campos de pesquisa e com grande velocidade. Está cada vez mais preciso, simples de ser aplicado e versátil, porém, mesmo com tantos avanços a técnica não está livre de limitações e tribulações. (YANG et al., 2021).

Efeitos fora do alvo (OTEs) são algumas das mais importantes barreiras a serem vencidas na aplicação do CRISPR. O direcionamento da clivagem depende do RNA guia da proteína Cas9 e sítios PAM, simulações com o objetivo de prever clivagens fora do alvo são utilizadas através de programas especializados, porém são limitadas a genes homólogos e dificilmente prevêm com eficácia mutações epigenéticas. (YANG et al., 2021).

Avanços recentes permitiram aos cientistas aprimorarem as proteínas Cas9 para aumentar sua especificidade e reduzirem a ocorrência de OTEs. Cas9 de especificidade aprimorada (eSpCas9), Cas9 de alta fidelidade (Cas9-HF) e Sniper-Cas9 são alguns exemplos com rastreamento de alvo superior a Cas9 selvagem, projetados sob a hipótese de que, ao enfraquecer as interações não específicas entre o DNA e o complexo Cas9-RNA, o efeito fora do alvo poderia ser reduzido. (LEE et al., 2018).

Ao induzirem a quebra de fita dupla, o sistema CRISPR ocasionalmente gera apoptose ao invés de editar o genoma como desejado, fenômeno denominado toxicidade de dano ao DNA, mais uma das dificuldades enfrentadas pela aplicação do CRISPR. Isso se torna ainda mais grave quando se refere ao uso da ferramenta em células tronco pluripotentes humanas, nessas situações a proteína p53, que possui função essencial na regulação do ciclo celular, pode desencadear um apoptose subsequente. A supressão da p53 pode levar a ocorrência de uma edição mediada por CRISPR-Cas9 mais segura (UDDIN, RUDIN, SEN, 2020).

A proteína Cas9 anteriormente citada também possui grande utilidade terapêutica na prevenção da toxicidade de dano ao DNA, uma vez que mantém sua capacidade de aderir ao local alvo, porém sem provocar quebra de fita dupla, em vez disso, o Cas9 é agregado a outros domínios efetores para promover, além da ativação e repressão de genes, a edição epigenética e uma gama de

outras funções especialmente efetivas nas pesquisas relacionadas ao câncer (MOSES et al., 2019).

Outro tipo de toxicidade que pode ser ocasionada pelo sistema CRISPR-Cas9 é a toxicidade imunogênica ou imunotoxicidade. São diversos os ortólogos de Cas9 caracterizados, entretanto os mais comumente utilizados são derivados de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) e *Staphylococcus aureus* (SaCas9). O *S. pyogenes* é encontrada em relações de comensalismo em 40% dos humanos, enquanto *S. aureus* são verificadas em 20% (CHARLESWORTH et al., 2019). Conseqüentemente, respostas imunes adaptativas, presença de anticorpos e células T estão amplamente presentes em adultos, o que reverbera na possibilidade da existência de imunidade adaptativa contra ortólogos de Cas9 provenientes dessas bactérias (CHEW et al., 2016).

As terapias baseadas em proteínas, como é o caso da aplicação de CRISPR associado a proteína Cas9, em alguns casos requerem tratamentos recorrentes devido à degradação da mesma, renovação de células tratadas e até mesmo baixa expressão do gene. A exposição repetida ao mesmo antígeno aumenta gradativamente as chances de ocorrência de respostas imunes, o que acrescenta na complexidade deste desafio (JACOBS et al., 2012).

Diversos foram os genes ortólogos de Cas9 testados, comparando a similaridade da sequência desejada e as forças de ligação para as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, buscando os ortólogos com maior compatibilidade e menor chance de desencadear uma resposta imunológica durante a terapêutica. A Cas9 produzida por meio da *Campylobacter jejuni* (CjCas9) demonstrou eficácia na edição de bases e toxicidade imunogênica reduzida em testes com camundongos imunizados contra Cas9, surgindo como uma boa alternativa para pacientes resistentes aos outros dois ortólogos mais comuns anteriormente citados (MORENO et al, 2019).

A atual capacidade do CRISPR/Cas9 em rastrear genes, estudar suas funções e corrigir alterações no DNA torna a técnica uma importante ferramenta na terapia e pesquisa na área do câncer. Células disfuncionais que se proliferam indiscriminadamente compõem a principal característica da neoplasia, que por

sua vez é uma das principais causas de mortalidade no mundo. A modificação genética precisa e facilitada mediada por CRISPR/Cas9 tem aproximado a ciência de resultados cada vez mais promissores no combate aos mais variados tipos de câncer (YANG et al., 2021).

3. APLICAÇÕES DO CRISPR/CAS9 NA PESQUISA DO CÂNCER

Por ser uma doença de origem genética, a complexidade do surgimento do câncer se dá pelos diversos estágios que o precedem, no qual mutações de linhagem genética germinativa, adquirida e clonagem de células com potencial canceroso intensificado, representam seus principais iniciadores. Apesar das possíveis mutações germinativas, as alterações genéticas e epigenéticas das células somáticas compreendem a causa da maioria dos cânceres. Podem ser caracterizados por cessação ou resistência a morte celular, proliferação celular descontrolada, aquisição de metástase e angiogênese (VOGELSTEIN et al., 2013).

As diversas terapias contra o câncer têm como finalidade selecionar e restringir as mutações que acarretam o surgimento, crescimento e progressão tumoral. Potencializar a expressão de genes que promovem a destruição de células neoplásicas e regular a quimiorresistência das mesmas também são fatores essenciais para o combate ao câncer (MAKI et al., 2018).

O sistema CRISPR/Cas9 apresenta grande potencial em métodos como nocaute de oncogenes e aumento da sensibilidade celular aos agentes quimioterápicos. Porém, sua aplicabilidade no rastreamento de genes supressores de tumor compreende grande parte do uso da técnica na terapia do câncer e conta com resultados bastante promissores (LIU et al., 2015).

3.1 PESQUISA DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR

Genes supressores de tumor possuem importante função no mantimento do ciclo celular adequado. Sua inativação através do silenciamento, mutação ou deficiência funcional levam a iniciação e posterior progressão de tumores. Crescimento e divisão acelerada de células também podem resultar de genes anormais denominados oncogenes. A identificação rápida e precisa dos genes

supressores de tumor se tornou possível com o uso de CRISPR/Cas9, revolucionando a pesquisa do câncer (KARNAN et al., 2018).

Através de eletroporação, foram introduzidos plasmídeos contendo genes codificadores de proteínas Cas9 e gRNA no prosencéfalo de embriões de camundongos em desenvolvimento. O gRNA foi direcionado aos locos NF1, PTEN e TRP52 promovendo nocaute por deleção nos mesmos, induzindo a manifestação de glioblastoma multiforme e outros tipos de tumores cerebrais específicos, reforçando a eficácia de CRISPR/Cas9 em identificar genes supressores de tumor in vivo (ZUCKERMANN et al., 2015).

Em um estudo realizado com camundongos, os efeitos do gene LATS1 e 2, codificador de enzimas quinases supressoras de tumor, foram observados em diversas linhagens de câncer. A deleção mediada por CRISPR/Cas9 de LATS1 e 2 em linhagens de células Panc02 de câncer de próstata, células MB49 de câncer de bexiga, células GL261 de câncer de glioma e células MyC-CaP de câncer de próstata promoveram crescimento tumoral considerável, enquanto o efeito da deleção em células MC38 no câncer de cólon levaram ao efeito inverso, inibindo o crescimento e proliferação celular. A aplicação da técnica nos genes citados reforça sua eficácia no rastreamento de genes específicos e classificação de suas funções (PAN et al., 2019).

Utilizando um plasmídeo de Cas9/GFP e gRNAs direcionados para genes ARID2, ACVR2A e ACR1B, organoides derivados de câncer colorretal humano (CCR) foram transfectados e permaneceram em observação para posterior comparação com os organoides de controle também derivados de CCR. O tamanho dos tumores gerados pelos organoides com gRNA era substancialmente maior do que os gerados nos exemplos de controle, confirmando a funcionalidade destes genes como supressores de tumor (TAKEDA et al., 2019).

Em uma pesquisa acerca de genes supressores de tumor no câncer de mama, CRISPR/Cas9 foi utilizado para promover mutação nos genes PTEN, P53 e RB1. Cas9 foi introduzido no organoide seguido por lentivírus expressando gRNAs para os genes desejados. O resultado da edição foi verificado utilizando

sequenciamento de última geração, observando uma eficácia de 97 a 100% nas leituras. Na vistoria dos tecidos in vitro, observou-se que nos organoides de controle, a taxa de proliferação tumoral se estabilizou espontaneamente com o tempo, enquanto nos organoides com P53, RB1 e PTEN mutados, houve aumento na proliferação de tumores mamários em comparação ao controle. Portanto, CRISPR/Cas9 se mostrou eficaz na identificação de três genes com potencial supressor de tumores em câncer de mama (DEKKERS et al., 2019).

Nas pesquisas do câncer, o PTEN é um importante gene e frequentemente citado pela sua ação supressora de tumor e multifuncional, inibindo e regulando uma série de processos celulares como sobrevivência da célula e progressão do ciclo celular. O sistema CRISPR/dCas9 associado ao ativador transcricional VP64 com alvo em PTEN foi introduzido em linhagens de células de melanoma e câncer de mama triplo-negativo (TNBC) com baixos níveis de expressão do gene. Com a característica de endonuclease cessada do dCas9, foi possível reestabelecer a expressão de PTEN a níveis normais e inibir as vias oncogênicas nos tecidos observados, mostrando as propriedades reparadoras da técnica e os benefícios de sua aplicação em tecidos tumorais (MOSES et al., 2019).

3.2 NOCAUTE DE ONCOGENES

Oncogenes são caracterizados pela desregulação no exercício de suas funções, podendo ser causada por mutações, expressão acentuada ou fusão com outros genes. Em geral, oncogenes provocam o desequilíbrio em processos celulares essenciais como etapas do ciclo de divisão, proliferação e apoptose, colaborando para o surgimento de tumores. A aplicação de CRISPR/Cas9 tem mostrado resultados promissores no nocaute desses genes para o controle da proliferação tumoral (BROWN, 2021).

No câncer de pâncreas, o gene Kras é dado como um dos principais indutores de lesão celular e posterior evolução para tumor. Mutações em sua estrutura são detectadas em 90% dos casos desse tipo de câncer. Utilizando CRISPR/Cas9, nocaute gênico foi induzido em três linhagens de células

heterozigóticas Kras, sendo elas Panc-1, TB32047 e SUIT-2, com o objetivo de analisar as consequências diretas no tecido tumoral (LENTSCH et al., 2019).

Como resultado, não foi observada inibição do crescimento ou apoptose de células, mas uma diminuição na taxa de crescimento quando comparado com o tecido controle, indicando resultados positivos. Com isso, nota-se que o gene Kras possui papel importante no surgimento de câncer de pâncreas, porém a progressão e crescimento do mesmo é sustentada pela mutação e disfunção de uma série de outros genes (CHEN et al., 2018).

Utilizando novamente o câncer de mama como alvo, CRISPR/Cas9 foi utilizado no nocaute de lipocalina 2 (LCN2), um oncogene já conhecido em múltiplas linhagens celulares deste tipo de tumor utilizando o método de entrega de nano partículas de polímero. O estudo foi realizado em células de câncer de mama triplo-negativo e os resultados apontam que perda da função em LCN2 promoveu um significativo enfraquecimento de seu potencial invasivo e inibição de migração (WANG et al., 2022).

O câncer de pulmão é atualmente a maior causa de morte por tumores no mundo, e o nocaute gênico tem mostrado resultados promissores na supressão da proliferação de células cancerígenas. Utilizando camundongos xenoenxertados com células tumorais de linhagem H1975 ou A549, CRISPR/Cas9 foi utilizado junto a gRNA com alvo em genes para o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), introduzidos por adenovírus para avaliar os efeitos do nocaute gênico no desenvolvimento de câncer de pulmão (KOO et al., 2017).

Após 31 dias de observação notou-se significativa diminuição no tamanho do tumor nos camundongos tratados com adCas9 (Cas9 associada a adenovírus), assim como aumento na taxa de sobrevivência, após um mês os animais portadores do tumor H1975 ainda estavam viáveis enquanto os abordados com outras terapêuticas não sobreviveram (KOO et al., 2017).

3.3 BIBLIOTECA CRISPR/CAS9 NA PESQUISA E TERAPIA DO CÂNCER

Mutações celulares podem se desenvolver naturalmente através de falhas durante processos de divisão celular ao longo da vida de um organismo e se propagarem através da expansão do tecido, quando se trata de células tumorais, essas falhas genômicas se tornam abundantes em seu DNA. A triagem genética em larga escala é utilizada para detecção destes genes mutantes com potencial para geração de tumores (HANAHAN et al., 2011). Com a introdução da ferramenta CRISPR junto a triagem, se torna possível a identificação de alterações pontuais no gene que podem se desdobrar em novos alvos para o tratamento do câncer.

A superexpressão de AURORA-A, uma quinase reguladora do ciclo de divisão celular, seja causada por amplificação gênica ou desregulação epigenética, é uma característica comumente observada no câncer de mama. Chen et al. Realizaram uma triagem sistêmica de sgRNAs mediada por CRISPR/Cas9 com alvo em 507 quinases diferentes na proporção de 10 sgRNAs para cada quinase visando selecionar genes que caso inativados, poderiam aumentar a sensibilidade de células tumorais ao inibidor altamente específico de AURORA-A conhecido como MLN823.

O gene GSG2, codificador da quinase Haspin, necessária para o recrutamento do complexo passageiro de cromossomo para o centrômero, foi escolhido para depleção e análise de efeitos. Como resultado, a inibição dupla de AURORA-A e Haspin leva a interrupção da agregação do centrômero mitótico e conseqüentemente a inibição do crescimento tumoral, validando o procedimento como estratégia alternativa para o tratamento de câncer de mama (CHEN et al., 2020).

Em camundongos imunossuprimidos, uma linhagem celular de câncer de pulmão foi transduzida com lentivírus transportador de Cas9 para induzir a geração de tumores. Uma varredura de perda de função moderado por CRISPR/Cas9 foi realizada utilizando uma biblioteca de sgRNA denominada mGeCKOa, que conta com 67.405 sgRNAs com alvo em 20.611 genes codificadores de proteínas e 1.175 precursores de microRNA no genoma dos camundongos. Pela varredura foram identificados 5 novos genes codificadores

de proteínas, sendo eles Nf2, PTEN, Cdkn2a, Trim72 e Fga, além de outros 2 microRNAs supressores de metástases, o miR345 e miR-152 (CHEN et al., 2015).

O câncer de vesícula biliar (GBC) é um tumor maligno com altas taxas de mortalidade, apresentando sobrevida de apenas 5 anos em até 18% dos casos, e a quimioterapia é sua principal abordagem não cirúrgica (MILLER et al., 2016). A gemcitabina é um quimioterápico específico de fase celular, destruindo células que passam pelo processo de síntese de DNA na fase S e bloqueiam a progressão das células entre fase G1 e S. A combinação de gemcitabina com cisplatina, por exemplo, é um tratamento de primeira linha para GBC, porém é comum observar a baixa sensibilidade ao fármaco neste tipo de câncer (ABDELRAHMAN et al., 2018).

Em uma pesquisa acerca dos fatores de resistência a gemcitabina, Xu et al. Selecionaram uma linhagem de células NOZ em meio as possíveis presentes no GBC. Utilizando uma varredura mediada por CRISPR em todo o genoma com alvo em perda de função gênica, a subunidade 5 do complexo alongador acetiltransferase (ELP5) foi identificada como um gene supressor tumoral capaz de induzir efeitos citotóxicos quando associado a gemcitabina em células de câncer de vesícula biliar (XU et al., 2019).

A mutação do gene supressor de tumor ATR-X é frequentemente apontada em estudos recentes como um fator relevante no surgimento de diversos tipos de câncer como o tumor ósseo osteossarcoma e gliomas, raros tumores do Sistema Nervoso Central (DEWITT et al., 2022. HAASE et al., 2018).

Utilizando uma triagem de genoma completo por CRISPR/Cas9 em células de hepatocarcinoma, identificou-se o gene WEE1 como potencial alvo na terapia de cânceres com mutações em ATR-X. Aplicando doses de AZD1775, um inibidor de WEE1 aprovado pelo regulamento de segurança do paciente, o resultado obtido foi um significativo aumento do número de células em apoptose em camundongos xenoenxertados. O resultado implica no possível uso da estratégia em tumores humanos, demonstrando a eficácia das bibliotecas

CRISPR/Cas9 no rastreio de genes com potencial auxiliar na terapia do câncer (LIANG et al., 2020).

4. APLICAÇÕES DE CRISPR-CAS9 NO TRATAMENTO DE CÂNCER

Após a primeira aplicação bem sucedida da tecnologia de modificações genéticas feitas em mamíferos, muitos cientistas enxergam positivamente o desenvolvimento dessas inovações na tecnologia em diversas áreas da saúde. Parando para pensar na necessidade de encontrar terapias ou doenças que se beneficiem dessa técnica de CRISPR-CAS9, diversas pesquisas vem sendo realizadas em torno desse âmbito genético que consiste na transferência de genes “saudáveis” para células afetadas de pacientes que estão passando por alguma doença. (Mota et al., 2019).

A terapia gênica iniciou com o intuito de tratar doenças genéticas, é no decorrer dos estudos viram que existe uma grande chance de utilizar essa terapia no tratamento contra diversos cânceres, criando vetores virais e não virais para fazer alterações do DNA das células. Essa técnica vem abrindo novos caminhos para a pesquisa do câncer, não só essa técnica, mas toda a engenharia genética em geral está no caminho para se tornar a nova realidade do ser humano, uma possível realidade que abrange novas oportunidades e desafios. (LADISLAU., 2019, BRESOLIN et al., 2021).

4.1 APLICAÇÕES DE CRISPR-CAS9 NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é um dos cânceres mais aparente em mulheres, cerca de 10% das mulheres são diagnosticadas com câncer de mama em algum tempo de suas vidas, e desses números 3,5% dessas mulheres diagnosticadas morrerão. Essa mortalidade ocorre pela rápida metástase para outros órgãos, como, pulmão e fígado. (MITRA et al., 2022)

Esse sistema de CRISPR-Cas9 pode induzir a quebra da dupla fita de DNA, através do reparo direcionado por homologia ou pela união terminal não homóloga, podendo aplicar para criar novos modelos para terapias genéticas, tirando sequências mutadas responsáveis por causar doenças genéticas. Esses

estudos retiram células imunológicas do paciente com câncer (células T ou CAR-T), alteram essas células *in vitro* utilizando CRISPR-Cas9 e depois as reintroduziram no organismo do paciente.

Muitas pesquisas e estudos são necessários para confirmar a eficácia e principalmente a segurança da utilização dessa tecnologia em humanos, ainda e preciso observar e entender como o sistema atua dentro do nosso organismo e pensar também nas consequências que podem trazer ao editar nosso genoma.

Dados publicados mostram que o CRISPR/Cas-9 utilizado para tratamentos de células cancerosas podendo efetivamente atingir essas células e suprimir o crescimento do tumor, induzindo a apoptose e inibindo a proliferação e metástase celular. A proteína Cas-9 induziu quebras de DNA de fita dupla (DSBs) em locais alvo. Esse processo de reparo do DNA começa pelo mecanismo de reparo de junção de extremidade não homóloga (NHEJ) de inserção e deleção de uma pequena parte de uma sequência. Recentemente, o CRISPR/Cas9 mostrou ser um alvo terapêutico novo, revolucionário e eficaz no tratamento de células de câncer de mama. Experimentos verificaram a proficiência terapêutica da sinergia de diferentes quimioterapias com CRISPR/Cas9, tanto em modelos de chip de tumor 2D quanto em 3D. Relataram que as linhas celulares BRCA1m e PARP1m, câncer de mama triplo negativo (TNBC), foram mais sensíveis com três drogas quimioterápicas diferentes, incluindo doxorrubicina, gencitabina e docetaxel, no modelo de cultura de tumor 2D em comparação com o modelo de chip de tumor 3D. Entretanto outro estudo mostrou que a entrega não viral de sgRNA (um componente de CRISPR) em linhas celulares HCC1806 e MCF10A nocauteia significativamente ambos os alelos dos genes APOBEC3G no tratamento do câncer de mama viabloqueando a conversão da fase G1 para S no ciclo celular e inibindo a proliferação celular. Dessa forma, os estudos pré-clínicos de câncer de mama com CRISPR/Cas9 mostram à identificação de muitas novas proteínas e genes que poderiam trazer resultados de tratamento significativos na supressão do tumor de mama. (HAZAFÁ et al., 2020).

Outros estudos recentes em células de câncer de mama MCF7 demonstraram que o KO da expressão do gene miR-23b e miR-27b usando a tecnologia CRISPR aliviou o crescimento tumoral em camundongos nus de xenoenxerto pela regulação positiva de ST14, que diminui a proliferação e invasão de células de câncer de mama. A expressão desregulada da síntese de ácidos graxos (FASN), complicando a síntese endógena de ácidos graxos e o ajuste na sinalização de ER α , pode contribuir para o aparecimento e para o progresso do câncer de mama que se tornou outro fator favorável no tratamento desse tipo de câncer. (BAGHINI et al., 2022).

4.2 APLICAÇÕES DE CRISPR/CAS9 NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO

A neoplasia maligna de pulmão é considerada uma das principais causas de mortalidade no mundo, são cerca de 1,8 milhões de diagnósticos e 1,6 milhão de óbitos. Esses pacientes possuem grande risco de desenvolver um segundo tumor, e por fatores hereditários os seus descendentes tem mais chances de adquirir essa enfermidade, E uma das principais causas de câncer de pulmão estar relacionada ao uso de tabagismo. (LADISLAU et al., 2019).

Mesmo em buscas de terapias e tratamentos contra a carcinogenicidade da nicotina, na tentativa de evitar grandes causas das mortes de câncer de pulmão, visto que 80% delas é resultado do fumo de tabaco. A edição de células de defesa através da técnica de CRISPR é uma inovação na manipulação genética, que mesmo nova, tem se mostrado como renovadora e promissora na cura, não só do câncer, mais sobre outras patologias também. (FARIAS et al.,).

O câncer de pulmão é um dos mais devastadores ficando atrás apenas do câncer de próstata e de mama, através dele foi possível injetar linfócitos geneticamente modificados como uma resposta terapêutica à resposta do sistema imunológico contra as células cancerosas presentes no pulmão, CRISPR e sua proteína associada (cas9) desativou uma proteína PH-1, que fica responsável por inibir a resposta imunológica do sistema imunológico contra as células neoplásicas, isso foi com o que facilitou na resposta imunológica dos linfócitos contra o câncer (PAIVA, 2019).

Através da clivagem molecular do DNA e futuramente uma reparação pelo método NHEJ para deleção de gene e separação pelo mecanismo de HDR, no qual através de vários estudos base para esses testes viram que é permitido alterar e corrigir as características na expressão de um gene. Praticamente todas as células podem ser editadas, podendo ter características gênicas pela ação de CRISPR/Cas9, com isso tudo só mostra o poder e esperança em torno dessa técnica. (FARIAS et al.,).

Pelo fato dos tumores terem várias mutações genéticas, o CRISPR/Cas9 pode ser utilizado para construir um modelo de tumor com múltiplas mutações no gene in vivo no intuito de simular doenças complexas. Estudos da deleção de AMPK (Proteína quinase ativada por AMP) $\alpha 1$ e $\alpha 2$, através de uma edição feita com CRISPR/Cas9 em células de adenocarcinoma de pulmão, mostrou uma diminuição substancial no tamanho do tumor. O CRISPR/Cas9 também foi utilizado para obter mutações comuns nos genes Kras, P53 e Lkb1, em estudos com camundongos, levando a alterações patológicas do adenocarcinoma pulmonar em camundongos. (LADISLAU., 2019).

O sistema CRISPR-cas9 é o início de uma revolução, no entanto métodos como cirurgias e radiação eram e são usados como tratamentos. Posteriormente os tratamentos vão inovando, mudando e começam a serem testados novos métodos de aplicações na intenção de se obter a cura dessas doenças. Estudos mostram que aplicações de CRISPR/Cas9 no tratamento do câncer de pulmão pode também ser feito de duas maneiras. A primeira protegendo o sgRNA que procura a sequência EGFR mutada, que é então acompanhada pela proteína Cas9. Os cientistas criaram um dispositivo CRISPR que possui sequências complementares com o EGFR mutado e o introduziu no paciente, a medida que essa sequência complementar se liga ao EGFR mutado, a proteína Cas9 (endonuclease) cria uma quebra de DNA de fita dupla ou fita simples, dependendo do tipo de enzima utilizada, em seguida por mecanismos de reparo de DNA. Caso a mutação do receptor for limitada, não haverá contato entre o ativador do ligante, resultando em ausência de neovascularização, proliferação celular, ou metástase de câncer, e o problema será resolvido. Essa inibição do EGFR por CRISPR/Cas9 ajuda a melhorar o reconhecimento de linfócitos

citotóxicos e a lise das células tumorais. Outra técnica a ser utilizada são os efeitos fora do alvo, que consiste em usar uma variante de Cas9 ou Cas9 modificada que pode gerar um único corte em uma fita de DNA. Para que o efeito fora do alvo seja reduzido. (TIRUNEH et al., 2021).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacidade de integração entre sequências de repetições palindrômicas de DNA (CRISPR) com sequências curtas de uma outra molécula de DNA pode ser traduzida em proteínas com atividades catalíticas multifuncionais (proteínas CAS). Devido a capacidade destas proteínas em clivar e deteriorar materiais genéticos, as proteínas CAS promovem a inativação de sequências gênicas.

Essa tecnologia, denominada de CRISPR/CAS, transformou-se em uma fundamental ferramenta da engenharia genética. Desde a sua descoberta, tornou-se uma importante alvo na aplicação em edição gênica, pesquisa e terapêutica de doenças, na área genética e molecular. Vale destacar os importantes progressos nas pesquisas e desenvolvimento de mecanismos de tratamentos nos diversos tipos de câncer. A utilização do CRISPR/CAS tem permitido importantes progressos acerca do entendimento desta doença e suas complexidades.

A partir do presente estudo foi possível verificar aplicações de maior potencial do CRISPR/CAS na terapia gênica, pesquisa e tratamento do câncer, verificando a crescente eficácia da ferramenta como método de terapia primária e/ou adjuvante, porém com aprimoramentos para sua implementação de forma segura e eficaz.

Apesar das vantagens do sistema CRISPR/CAS na terapia gênica, devido a sua alta versatilidade, eficácia em seleção de genes alvo, especificidade e facilidade de uso da técnica, a suas aplicações na modificação genética humana, tem sido discutida e aprovada de forma pontual, estritamente com objetivo de prevenção, diagnóstico e terapia em células somáticas. Sendo totalmente proibido qualquer modificação ou interferência em material genético que compreenda linhagens germinativas.

As terapias baseadas em proteínas do sistema CRISPR/CAS permitem realizar modificações genéticas específicas na cadeia de DNA ou induzir rearranjos gênicos. As suas aplicações na terapia gênica envolvem: silenciamento, repressão, indução, modulação e alteração da expressão gênica. Estas atividades podem alterar a expressão módulos gênicos determinantes de características carcinogênicas, podendo ser utilizado de forma direta no controle de células cancerosas ou de forma indireta estimulando o sistema imunológico.

Terapias contra o câncer apresentam com finalidade selecionar e restringir as mutações que acarretam o surgimento, crescimento e progressão tumoral. A capacidade do sistema CRISPR/CAS em atuar em sequências específicas do DNA, de forma eficaz e eficiente, fez com que esta ferramenta seja aplicada em diversas pesquisas, que visam identificar e modular sequências específicas associadas às mais diversas mutações carcinogênicas.

A modulação de genes supressores de câncer, utilizando o sistema CRISPR/CAS têm sido aplicadas em pesquisas com diversos tipos de câncer, desde tumores na mama, bexiga, próstata até tumores cerebrais.

A aplicação de sistema CRISPR/CAS tem mostrado resultados promissores no nocaute de oncogenes para o controle da proliferação tumoral de tipos de câncer como: pâncreas, mama e pulmão. O nocaute dos oncogenes nestas pesquisas, reduziu o desequilíbrio dos processos celulares essenciais como etapas do ciclo de divisão, proliferação e apoptose, indicando a possibilidade de utilização desta ferramenta no controle do surgimento de tumores.

Ao atuar em sequências específicas do DNA, o sistema CRISPR/CAS tem sido utilizado na construção de bibliotecas genômicas a serem utilizadas nas pesquisas e terapia de importantes tipos de câncer como: de mama, de pulmão, de vesícula biliar e de fígado.

Estas possibilidades abrem portas para a redução de gastos na saúde e um relevante aumento da qualidade de tratamento a neoplasias. Portanto, a facilidade de manipulação, precisão da técnica e sua acessibilidade econômica

são fatores importantes a serem considerados quanto a aplicação da técnica na terapia do câncer. Os avanços nos aspectos que cerceiam o CRISPR/CAS proporcionarão oportunidades sem precedentes no tratamento direcionado ao câncer.

6. REFERÊNCIAS

BIKARD, D., JIANG, W., SAMAIS, P., et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. **Oxford Academic**, v.41, n.15, p. 7429-7437, 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/41/15/7429/2411254?login=false>. Acesso em: 29 de maio de 2022.

CHARLESWORTH, C. T., DESHPANDE, P. S., DEVER, D. P. et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. **Nature Medicine**, v. 25, p. 249-254, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-018-0326-x#citeas>. Acesso em: 03 de jun. de 2022.

CHEW, W., TABEBORDBAR, M., CHENG, M. et al. A multifunctional AAV–CRISPR–Cas9 and its host response. **Nature Methods**, v.13, p. 868-874, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth.3993#citeas>. Acesso em: 03 de jun. de 2022.

CHYLINSKI, K., RHUN, L. A., CHARPENTIER, E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. **Taylor and Francis Online**, 2013. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/rna.24321?scroll=top&needAccess=true>. Acesso em: 7 de maio de 2013.

DING, Q., STRONG, A., PATEL, M. K., NG, S., GOSIS, S. B. et al. Permanent Alteration of PCSK9 With In Vivo CRISPR-Cas9 Genome Editing. **Circulation Research**, v.115, n.5, 2014. Disponível em: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.115.304351?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 23 de abr. de 2022.

HEIDARI, R., SHAW, M. D., ELGER, S. B. CRISPR and the Rebirth of Synthetic Biology. **National Library of Medicine**, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27325413/>. Acesso em: 16 de abr. de 2022.

HRYHOROWICZ, M., LIPINSKI, D., ZEYLAND, J. et al. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. **Arch**, 2016. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00005-016-0427-5#citeas>. Acesso em: 30 de abr. de 2022.

HSU, D. P., LANDER, S. E., ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, 2014. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(14\)00604-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867414006047%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(14)00604-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867414006047%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 30 de abr. de 2022.

JACOBS, F., GORDTS, C. S., MUTHURAMU, I., GEEST, D. B. The Liver as a Target Organ for Gene Therapy: State of the Art, Challenges, and Future Perspectives. **MDPI Open Access Journals**, 2012. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/5/12/1372>. Acesso em: 05 de jun. de 2022.

JINEK, M., CHYLINSKI, K., DOUDNA, A. J., CHARPENTIER, E. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v.337, n.6069, p. 816-821, 2012. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/science.1225829?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 15 de maio de 2022.

LEDFORD, Heidi. CRISPR, the disruptor. **Nature**, v.522, 20-24, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/522020a#citeas>. Acesso em: 23 de abr. de 2022.

LEE, K. J., JEONG, E., LEE, J., JUNG, M. et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. **Nature Communications**, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05477-x>. Acesso em: 29 de maio de 2022.

LI, K., WANG, G., ANDERSEN, T., ZHOU, P., PU, T. W. Optimization of Genome Engineering Approaches with the CRISPR/Cas9 System. **Plos One**, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0105779>. Acesso em: 28 de maio de 2022.

LINO, C. C., HARPER, C. J., CARNEY, P. J., TIMLIN, A. J. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. **Taylor and Francis Online**. V.25, n.1, 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717544.2018.1474964>. Acesso em: 16 de abr. de 2022.

LOUREIRO, A., SILVA, J. G. CRISPR-Cas: Converting A Bacterial Defence Mechanism into A State-of-the-Art Genetic Manipulation Tool. **MDPI Open Access Journals**, v.8, n.18, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/8/1/18>. Acesso em: 7 de maio de 2022.

MAI, G., GE, R., SUN, G., MENG, Q., ZHOU, F. A Comprehensive Curation Shows the Dynamic Evolutionary Patterns of Prokaryotic CRISPRs. **Hindawi**,

V.2016, n.especial, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/7237053/>. Acesso em: 1 de maio de 2022.

MANGERICAO, C. T., PENG, Z., ZHANG, X., Computational prediction of CRISPR cassettes in gut metagenome samples from Chinese type-2 diabetic patients and healthy controls. **BMC System Biology**, 2016. Disponível em: <https://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12918-015-0248-x>. Acesso em: 9 de abr. de 2022

MANGHWAR, H., LINDSEY, K., ZHANG, X. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. **Cell**, 2019. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/plant-science/fulltext/S1360-1385\(19\)30243-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1360138519302432%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/plant-science/fulltext/S1360-1385(19)30243-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1360138519302432%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 09 de abr. de 2022.

MARRAFFINI, A. L., SONTHEIMER, J. E. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. **National Library of Medicine**, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2928866/>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

MORENO, A. M., PALMER, N., ALEMÁN, F. et al. Immune-orthogonal orthologues of AAV capsids and of Cas9 circumvent the immune response to the administration of gene therapy. **Nature Biomedical Engineering**, v.3, p. 806-816, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41551-019-0431-2#citeas>. Acesso em: 05 de jun. de 2022.

MOSES, C., NUGENT, F., WARYAH, B. C., HARVEY, R. A. et al. Activating PTEN Tumor Suppressor Expression with the CRISPR/dCas9 System. **Cell**, v.14, p. 287-300, 2019. Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/nucleic-acids/fulltext/S2162-2531\(18\)30318-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2162253118303184%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/nucleic-acids/fulltext/S2162-2531(18)30318-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2162253118303184%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 03 de jun. de 2022.

NIDHI, S., ANAND, U., OLEKSAK, P., TRIPATHI, P. et al. Novel CRISPR–Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.7, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3327>. Acesso em: 10 de jun. de 2022.

NIU, Y., SHEN, B., CUI, Y. et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. **Cell**, 2014. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(14\)00079-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867414000798%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(14)00079-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867414000798%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 23 de abr. de 2022.

SEMENOVA, E., JORE, M. M., DATSENKO, A. K., SEVERINOV, K. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. **PNAS**, 2011. Disponível em: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1104144108?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acesso em: 28 de maio de 2022.

UDDIN, F., RUDIN, M. C., SEM, T. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. **Frontiers in Oncology**. 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01387/full>. Acesso em: 29 de maio de 2022.

WATERS, A. C., STRANDE, T. N., PRYOR, M. J. et al. The fidelity of the ligation step determines how ends are resolved during nonhomologous end joining. **Nature Communications**, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms5286>. Acesso em: 28 de maio de 2022.

WATSON, D. J., BAKER, A. T., BELL, P. B. et al. *Biologia Molecular do Gene*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788582712092/pages/recent>. Acesso em: 7 de maio de 2022.

YADAV, N., NARANG, J., CHHILLAR, K. A., RANA, S. J. CRISPR: A new paradigm of theranostics. **ScienceDirect**, v.33, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963420302045>. Acesso em: 10 de jun. de 2022.

YANG, Y., XU, J., GE, S., LAI, L. CRISPR/Cas: Advances, Limitations, and Applications for Precision Cancer Research. **Frontiers in Medicine**, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.649896/full>. Acesso em: 29 de maio de 2022.

ZHANG, C., QUAN, R., WANG, J. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing. **Oxford Academic**, v.27, n.2, p. 79-88, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article/27/R2/R79/4962527?login=false>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

ZHANG, D., HUSSIAN, A., MANGHWAR, H., XIE, K., XIE, S., ZHAO, S., LARKIN, M, R., QING, P., JIN, S., DING, F., Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective. **Wiley Online Library**, v.18, n.8, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.13383>. Acesso em: 28 de maio de 2022.

ZHANG, F. CRISPR-Cas9: Prospects and Challenges. **Human Gene Therapy**, v.26, n.7, p. 409-410, 2015. Disponível em: https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2015.29002.fzh?url_ver=Z39.882003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acesso em: 14 de jun. de 2022.