

# UTILIZAÇÃO DE CRISPR PARA TRATAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

## USE OF CRISPR TO TREAT CERVICAL CÂNCER

Glaucia Alves dos Santos Simões<sup>1</sup>, Poliane Camila de Oliveira<sup>1</sup>, Gabriele Caroline Dias Nascimento<sup>1</sup>, Camila Alves Fiuza<sup>1</sup>, Alessandra Hermógenes Gomes Tobias<sup>2</sup>, Cristina Aparecida de Jesus Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduandas do curso de Biomedicina do Centro Universitário Una

<sup>2</sup>Biomédica - Professora adjunta do Centro Universitário Una

<sup>3</sup>Bióloga - Professora adjunta do Centro Universitário Una

### RESUMO

**Introdução:** Os papiloma vírus humano (HPVs) 16 e 18, de alto risco oncogênico, são os dois principais agentes causadores do câncer do colo do útero, presente em mais de 70% dos diagnósticos tumorais. É possível encontrar cópias integradas do genoma do vírus no DNA da célula afetada em casos de lesões malignas, que retém a forma integrada dos oncogenes *E6* e *E7* doados pelo HPV. A proteína *E6* induz a degradação do supressor tumoral p53, enquanto a proteína *E7* desestabiliza a proteína retinoblastoma (Rb). **Objetivo:** Identificar as possibilidades do uso da técnica de edição genética CRISPR/Cas9 para o tratamento do câncer do colo do útero. **Metodologia:** Revisão bibliográfica realizada com base em periódicos nacionais e internacionais, como artigos científicos e acadêmicos, pesquisados nas seguintes bases de dados: Scielo, Ebsco, Pubmed, Google Acadêmico. **Resultados:** A CRISPR/Cas9 desempenha o papel de tesoura, sendo assim, capaz de causar a clivagem do DNA alvo, considerando o mecanismo de reparo celular passivo de erros, ocorrerá a formação de indels, que por sua vez formarão códons prematuros de parada ou decaimento mediado sem sentido nos genes alvo *E6* e *E7* que resultará na parada de expressão dos mesmos, ocasionando a perda de suas funções. **Conclusão:** O uso de ferramentas de modificação genética, como o CRISPR/Cas9, tem potencial de propiciar cura para lesões malignas do colo uterino, além de ter baixo custo, viabilidade e alta eficiência, se comparado aos métodos tradicionais de tratamento. Todos os estudos sobre o uso da técnica CRISPR/Cas9 presentes neste trabalho foram realizados InVitro, atualmente não existe previsão de estudos InVivo, portanto, apesar da técnica ter se mostrado muito promissora para o tratamento do câncer do colo do útero, a prevenção continua sendo a melhor opção.

**Palavras-Chave:** CRISPR/Cas9; Carcinogênese, HPV; Câncer do Colo do Útero.

### Abstract

**Introduction:** Human papillomaviruses (HPVs) 16 and 18, high oncogenic risk, are the two main causative agents of cervical cancer, present in more than 70% of tumor diagnoses. It is possible to find integrated copies of the virus genome in the DNA of the affected cell in cases of malignant lesions, which retain the integrated form of the *E6* and *E7* oncogenes donated by HPV. The *E6* protein induces p53 tumor suppressor

degradation, while the E7 protein destabilizes the retinoblastoma protein (Rb). **Objective:** To identify the possibilities of using the CRISPR/Cas9 gene editing technique for the treatment of cervical cancer. **Methodology:** Bibliographic review carried out based on national and international journals, such as scientific and academic articles, searched in the following databases: Scielo, Ebsco, Pubmed, Google Scholar. **Results:** CRISPR/Cas9 plays the role of scissors, thus being able to cause the cleavage of the target DNA, considering the mechanism of passive cellular error repair, the formation of indels will occur, which in turn will form premature stop codons or senseless mediated decay in the target genes E6 and E7 that will result in their expression stop, causing the loss of their functions. **Conclusion:** The use of genetic modification tools, such as CRISPR/Cas9, has the potential to provide a cure for malignant lesions of the uterine cervix, in addition to having low cost, feasibility and high efficiency compared to traditional treatment methods. All studies on the use of the CRISPR/Cas9 technique present in this work were carried out InVitro, currently there is no prediction of InVivo studies, therefore, although the technique has shown to be very promising for the treatment of cervical cancer, prevention remains a the best option.

**Key words:** CRISPR/Cas9; Carcinogenesis, HPV; Cervical Cancer.

## INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero (CCU) é o quarto tipo de câncer mais letal que atinge a população feminina no mundo, com cerca de 570 mil novos casos por ano, ele é caracterizado pela replicação desordenada de células que revestem a cérvix uterina. Tais alterações celulares acontecem inicialmente em um determinado local no epitélio cervical, com predomínio nas camadas superficiais, mas podem progredir para uma lesão invasora (INCA, 2021; SILVÉRIO et al., 2022).

HPVs oncogênicos 16 e 18, identificados em mais de 70% dos casos de CCU, encontram-se integrados nas células cervicais nos casos de lesões malignas. Durante a integração o gene *E2* perde sua função e deixa de reprimir a expressão dos genes *E6* e *E7* que são oncoproteínas altamente expressas nas células de CCU. Sabe-se que *E6* promove a degradação de p53, uma proteína supressora de tumor, e *E7* inibe a ação da proteína do retinoblastoma (pRB) que é responsável pela senescência celular, essas alterações levam a desregulação do ciclo celular e a oncogênese (FARIA, 2018).

No Brasil, os altos índices de incidência e mortalidade por CCU, evidenciam a importância da elaboração e implementação de políticas públicas voltadas à saúde da mulher com ações relativas ao controle dessa doença, mas apesar da difusão das medidas preventivas existentes, o CCU continua sendo um problema de saúde importante no país (BRASIL, 2013).

A tecnologia de edição de DNA através de *Clustered Regularly Interspaced*

*Short Palindromic Repeats-Cas9* (CRISPR/Cas9) pode ser utilizada para criar métodos de diagnósticos rápidos e de baixo custo, tendo um potencial inovador no diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas (BINNIE, 2021). A técnica CRISPR/Cas9 pode ser utilizada para aplicações no campo da medicina, genética, embriologia, bioinformática e patologia. Devido as facilidades de edição de sequências de DNA (comparado com as outras técnicas), o CRISPR/Cas9 é mais econômico, mais fácil de usar e pode ser usado para realizar modificação de genes específicos, inserções e substituição de bases (ALAGOZ, KHERAD, 2020).

Estudos recentes sugeriram que a modificação de CRISPR/Cas9 pode ajudar na investigação dos mecanismos dos tumores e nas terapias contra o câncer (ZHEN, 2017). Um dos resultados do uso da CRISPR para CCU está relacionado à supressão da expressão das proteínas *E6* e *E7* em um sítio específico de células em processo de oncogênese no colo do útero, causando a inibição do crescimento tumoral, devido ao fato de gerar um aumento nos níveis celulares de p53 e pRb, sendo o gene p53 responsável pela principal via de apoptose e pRb responsável por acelerar o processo de envelhecimento celular (SANTOS *et al.*, 2021). A endonuclease bacteriana guiada por RNA CRISPR/Cas9 pode ser reprogramada para atingir e destruir o gene *E6* ou *E7* em CCU por HPV, visando a parada do ciclo celular e ocasionando a morte de células cancerígenas (KENNEDY *et al.*, 2014).

Com base nas taxas de casos de CCU atuais, nas dificuldades que os programas de prevenção possuem e nos vários efeitos colaterais que os tratamentos causam, percebe-se que é de grande importância novos esforços de rastreamento e desenvolvimento de novos tratamentos para o CCU, pois mesmo com as estratégias existentes as taxas de mortalidade ainda continuam alta. Baseado neste contexto de dificuldade na prevenção e tratamento do CCU, a técnica CRISPR/Cas9 vem como uma nova e revolucionária perspectiva para o tratamento e cura do câncer do colo do útero. A técnica de CRISPR/Cas9 vem revolucionando a área da medicina no campo da biologia molecular (NOGUEIRA, MELO, 2012; CARLI *et al.*, 2017). Este artigo abordará mais uma possível atuação da técnica dentre suas vastas aplicações.

Dessa forma o objetivo do presente artigo é identificar as possibilidades do uso da técnica CRISPR/Cas9 no tratamento do CCU.

## **METODOLOGIA**

O presente artigo trata-se de uma revisão bibliográfica realizada com base em

periódicos nacionais e internacionais, como artigos científicos e acadêmicos. Foram realizadas pesquisas do tipo descritiva, cuja pergunta norteadora foi: “O CRISPR/Cas9 poderia ser utilizado para tratamento do câncer do colo do útero?”. Foram usados os seguintes descritores em saúde para as buscas: “CCU”, “HPV” e “CRISPR/Cas9 para tratamento do CCU”.

Pra que houvesse a seleção dos artigos usamos como critério de exclusão: artigos com estudos que não estavam dentro do contexto do tema proposto e como critério de inclusão: publicações relevantes para o tema e publicadas entre 2000 e 2022, e com isso obtvemos um total de 37 artigos que foram usados para a confecção do trabalho. A bases de dados utilizadas foram: Scielo, Ebsco, Pubmed e Google Acadêmico.

## **DESENVOLVIMENTO**

### **Epidemiologia do câncer do colo do útero (CCU)**

Em média 570 mil casos novos são registrados anualmente no mundo, sendo o CCU o terceiro tumor maligno mais comum na população feminina, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil, causando cerca de 311 mil óbitos por ano. No Brasil, em 2020, eram esperados 16.710 casos novos, com um risco elevado de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2019; IARC, 2020; INCA, 2022).

Com relação à mortalidade, é na região Norte que se mostram as maiores taxas do país, sendo a única com nítido crescimento. Em 2019, a taxa ajustada pela população mundial foi de 12,58 mortes por 100.000 mulheres, representando a primeira causa de óbito por câncer feminino nesta região. Nas regiões Nordeste com taxa de mortalidade de 6,66/100 mil, foi a segunda causa e Centro-Oeste, a terceira causa, com taxa de 6,32/100 mil. As regiões Sul e Sudeste tiveram as menores taxas (4,99/100 mil e 3,71/100 mil) representando a quinta e sexta posições, respectivamente, entre os óbitos por câncer em mulheres (Figura1)(INCA, 2021b).

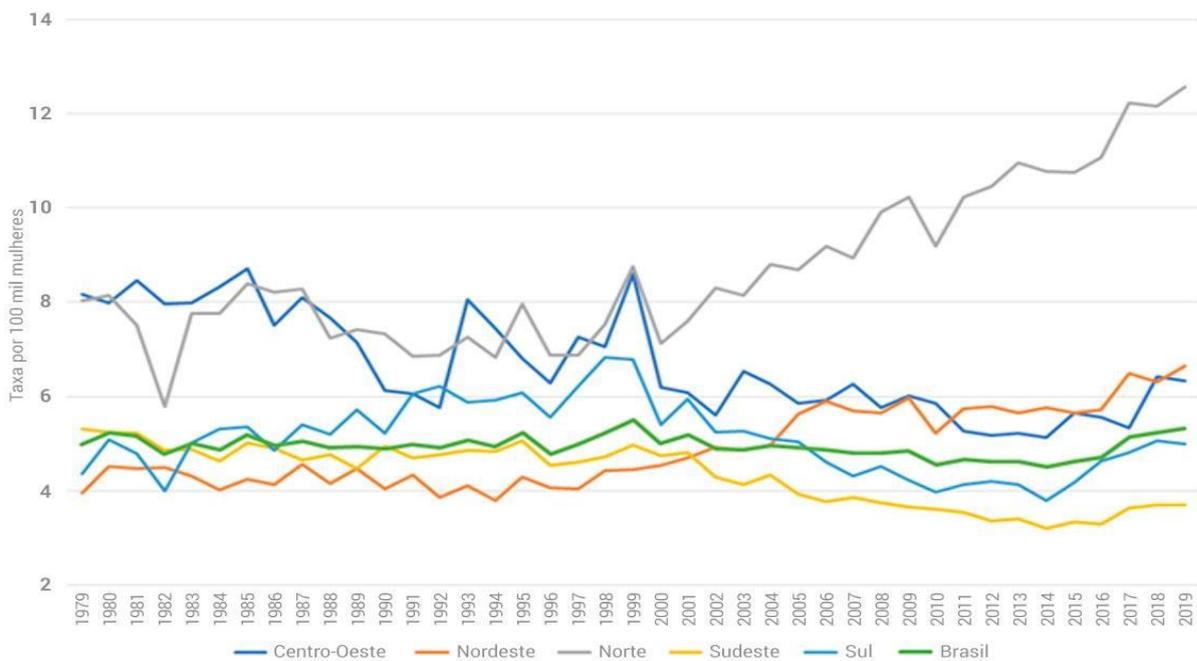


Figura 1. Taxas de mortalidade por câncer do colo do útero. Brasil e regiões, 1980 a 2019. Fonte: INCA, 2019.

O CCU é raro em mulheres de até 30 anos e sua maior incidência é na faixa etária de 45 a 50 anos. A mortalidade aumenta gradualmente a partir da quarta década de vida (INCA, 2021).

### Descrição gênica do HPV e o câncer do colo do útero (CCU)

Os HPVs pertencem a uma família extensa de vírus não envelopados de DNA, possuindo cinco diferentes gêneros, tendo o gênero alfa um papel crucial em especial na carcinogênese, cujos HPV 16 e 18, além do 31,33,52 e 58, são classificados como variantes de alto risco (SILVÉRIO *et al.*, 2022).

Os HPVs possuem oito genes: os precoces *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, e os denominados tardios: *L1* e *L2*. Tais genes podem ser conceituados de acordo com a sua manifestação no ciclo viral. *E1* e *E2* são responsáveis pela modulação da replicação e da transcrição, *L1* e *L2* estão relacionados aos fatores estruturais: formação do capsídeo, *E5*, *E6* e *E7* são responsáveis por modular o crescimento da célula e também a resposta imune. Estudos indicam que em 99% dos casos de CCU havia DNA do HPV associado, dados que se referem a tipos específicos do vírus (16 e 18). Em análises do RNA mensageiro (mRNA) do HPV foram identificadas atividades destes vírus, predominando a expressão de *E6* e *E7*, não só como indicadores da infecção, mas também como responsáveis pela progressão do câncer (COICOVEGA, OSORES, GAMBOA, 2018).

Nas células infectadas por HPV, a proteína E6 age induzindo a degradação proteossômica que depende da ubiquitinação de p53, derivada do gene que suprime tumores, o qual impossibilita a concentração de mutações devastadoras que podem levar ao desenvolvimento do câncer (WANG, 2018). A p53 é uma proteína produto do gene supressor de tumores que tem como principal função reparar o DNA danificado e ativar a morte celular programada (apoptose). Essa proteína é extremamente importante na proteção da integridade do genoma e na destruição de células com potencial oncogênico (COICO-VEGA *et al.*, 2018).

Os níveis quantitativos da proteína p53 em células com E6, é aproximadamente 2-3 vezes menor do que em células saudáveis e sua meia vida também diminui consideravelmente. Dessa forma a resposta à danos ocorridos no DNA não acontece e as mutações de DNA permanecem no genoma sem chances de reparação, sendo passadas de uma geração celular para a próxima. Dessa forma, além da falta de patrulha nos pontos de averiguação para danos no DNA em células cancerosas, essas células possuem também alta tendência a mutagênese (WANG *et al.*, 2018).

O inibidor de CDKp16INK4, a proteína supressora de tumores é o alvo de grande interesse de E7 para o processo de regulação do ciclo celular. E7 estimula a expressão de p16INK4A não só através da desintegração de pRb, mas também por cessamento da repressão epigenética por meio de KDM6B (PAL, KUNDU, 2020).

O HPV é capaz de penetrar no epitélio do colo uterino quando há presença de micro lesões, podendo infectar o mesmo, sendo que a persistência da infecção pode aumentar as chances de desenvolvimento de células neoplásicas, que quando não são detectadas de forma precoce, podem evoluir para lesões invasivas. A replicação viral ocorre em todas as camadas do epitélio, mas a maior predominância ocorre nas camadas mais superficiais, o que contribui com uma infecção prolongada, aumento da carga viral e possível integração do genoma viral no genoma celular causando assim o CCU (SILVÉRIO *et al.*, 2022).

A Figura 2 demonstra a evolução do cancer cervical pelo vírus do HPV, no primeiro momento da esquerda para direita podemos observar o epitélio cervical normal, no segundo momento já se observa uma infecção inicial do epitélio pelo vírus do HPV extracromossomal, pois ainda não há integração no cromossomo humano, já no último momento podemos observar uma expressão exacerbada de E6 e E7, e células já infectadas, com isso pode-se observar uma proliferação de células descontrolada (ROCHA, 2018).

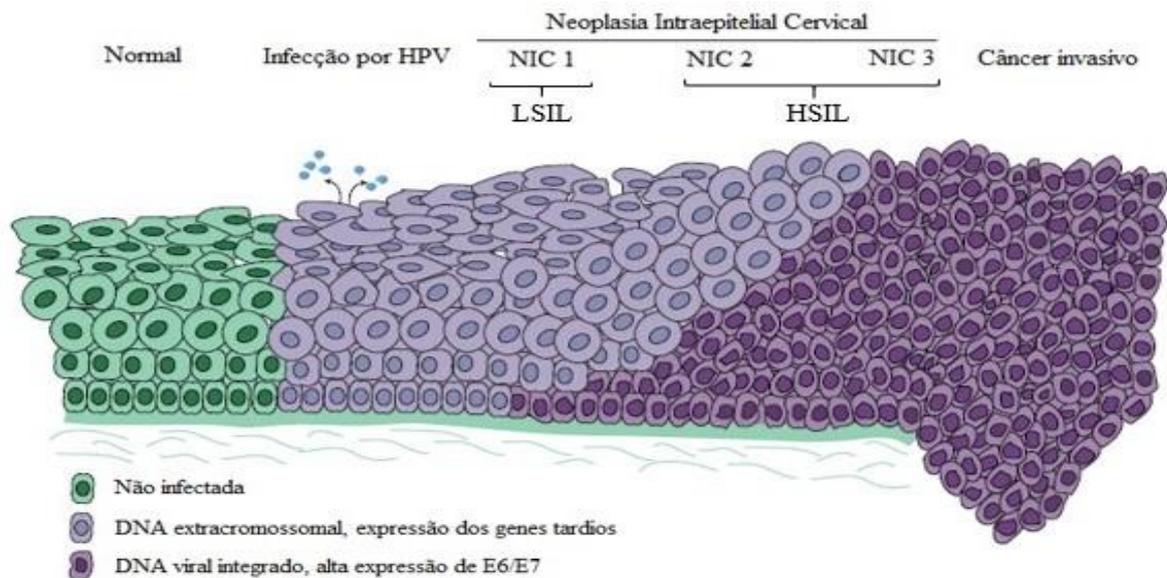


Figura 2: Progressão oncogênica da lesão cervical. Fonte: Rocha, 2018.

Os principais sintomas da infecção pelo HPV são: verrugas encontradas na região genital, peniana, cervical, anal e orofaríngea, tendem a ser flexíveis, de cor rosa ou cinza, úmidas, podem aumentar de tamanho e apresentar aparência peduncular. Nos homens o surgimento se dá abaixo do prepúcio, no corpo do pênis e reto ao passo que, nas mulheres, a localização ocorre na vulva, parede vaginal, cérvix e períneo. Após a infecção pelo vírus estes sintomas ocorrem após 1 a 6 meses, e alguns pacientes podem ser assintomáticos, apesar de alguns casos haver relatos de dor, incômodo, coceira e queimação. Geralmente o câncer cervical é assintomático nas fases iniciais, contudo em seu estágio mais avançado pode surgir sintomas como: sangramento vaginal irregular, dores na região pélvica, corrimento fétido e dores lombares quando há metástase avançada (SILVÉRIO *et al.*, 2022).

### Tratamento do câncer do colo do útero (CCU)

A prevenção primária do CCU se relaciona com a diminuição do risco de contágio pelo HPV, sabendo que a infecção se transmite por via sexual, por meio de abrasões microscópicas na mucosa ou na pele da região anogenital, o uso de preservativos durante a relação sexual protege parcialmente do contágio pelo HPV, que também pode ocorrer através do contato com a pele da região perineal, vulva, bolsa escrotal e perianal. Também fazem parte da prevenção primária a oferta da vacina contra o HPV. Atualmente o Ministério da Saúde disponibiliza a vacina tetravalente contra HPV para meninas de 9 a 14 anos e meninos de 11 a 14 anos de

idade. A vacina atua na proteção contra os tipos 6,11,16 e 18 do HPV, sendo que os tipos 6 e 11 causam verrugas genitais e os tipos 16 e 18 são os principais responsáveis pelos casos de CCU (INCA, 2022).

A prevenção secundária se baseia na detecção precoce de lesões pré-cancerosas, que é feita através do exame citopatológico, realizado prioritariamente entre as idades de 25 a 59 anos e com vida sexual ativa, se o resultado for negativo em dois exames anuais consecutivos, o intervalo para realização deve ser de três anos (RIBEIRO *et al.*, 2021).

O exame citopatológico de Papanicolau é um método simples, rápido, indolor e de fácil execução, que permite a detecção de alterações na cérvix uterina, a partir da descamação de células do epitélio. O exame é realizado em nível ambulatorial e tem se mostrado até hoje o método mais indicado para o rastreamento do CCU, por ser eficiente e efetivo para aplicação coletiva, além de ser de baixo custo. O exame é oferecido gratuitamente pelos municípios, estados e pelo governo federal através do Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Controle do CCU, que tem como objetivo a redução da morbidade e mortalidade para o referido câncer, suas consequências físicas, psíquicas e sociais na mulher brasileira (SOARES, SOUSA, FERREIRA, 2021).

Apesar do exame preventivo ser oferecido gratuitamente para a população, ainda existem parte da população feminina que nunca realizaram o exame, desconhecem ou não cumprem a periodicidade indicada para realização do exame, e o motivo para alguns desses casos podem estar relacionados com questões de âmbito individual, como medo e vergonha e também a questões referentes a gestão pública e/ ou profissionais de saúde, demonstrando uma dificuldade no funcionamento da rede de serviços de garantia da integralidade da atenção a saúde da mulher (LOPES, RIBEIRO, 2019).

O tratamento do CCU dependerá do estadiamento da doença, tamanho do tumor e fatores pessoais, como desejo da preservação da fertilidade. A radioterapia e cirurgia estão entre os tratamentos mais comuns do CCU, após a confirmação das lesões neoplásicas intraepiteliais, as Diretrizes Brasileiras para o rastreamento do CCU recomendam o tratamento excisional das lesões escamosas de alto grau, através da exérese da zona de transformação (EZT) por eletrocirurgia (INCA, 2021).

Os tratamentos utilizados para o CCU podem acarretar diversas complicações ginecológicas, dentre elas o surgimento de fístulas, estenose vaginal, infertilidade,

diminuição da lubrificação e da elasticidade vaginal, podem também causar mal estar físico, emocional e alterar a imagem corporal, impactando negativamente na qualidade de vida das mulheres acometidas (PEREIRA, 2020).

## CRISPR/Cas9

A técnica CRISPR-Cas9, ou “Conjunto de repetições palindrômicas curtas, agrupadas e regularmente interespaçadas”, é uma técnica que concilia biologia molecular e biotecnologia para aplicações em edição genômica e para reconhecer a seqüência alvo a ser modificada do DNA (HUPFFER, 2020).

A técnica foi desenvolvida através da descoberta do lócus CRISPR em procariontes. Segundo estudos realizados o lócus age como um sistema imune adaptativo de bactérias e arqueias através do reconhecimento e degradação do DNA de patógenos, além do armazenamento dessas informações em seu genoma para o impedimento de possíveis reinfecções. A partir dessa descoberta foi possível desenvolver a tecnologia de edição genética CRISPR, composta pela endonuclease CAS 9, que age como uma tesoura molecular, e por um RNA guia que direciona os cortes dessa tesoura, como mostra a Figura 3 (CARLI, 2017).

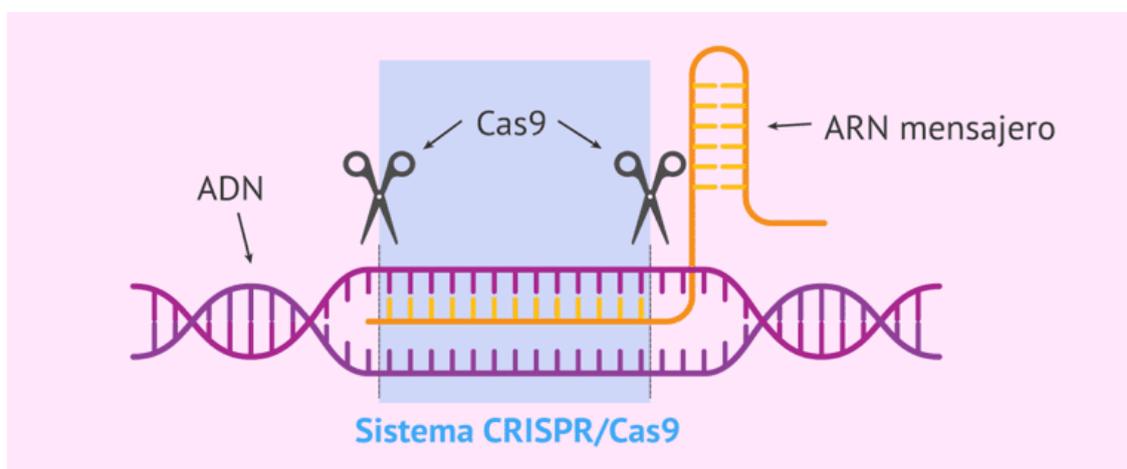


Figura 3: Sistema CRISPR/Cas9. Fonte: SILVA, 2021

## Funcionamento da CRISPR/CAS9

O sistema CRISPR/Cas9 é fundamentado no mecanismo de defesa bacteriano contra o vírus invasor, que ao identificar um DNA viral já conhecido, gera duas fitas de RNAs curtos, onde uma delas terá a seqüência correspondente a do vírus invasor (Figura 4). CRISPR/Cas9 necessita de sistemas endógenos de reparo e recombinação para concluir o desenvolvimento da clivagem, como introns de auto-emenda, nucleases de dedo de zinco e nucleases efetoras (AUGUSTA, 2017).

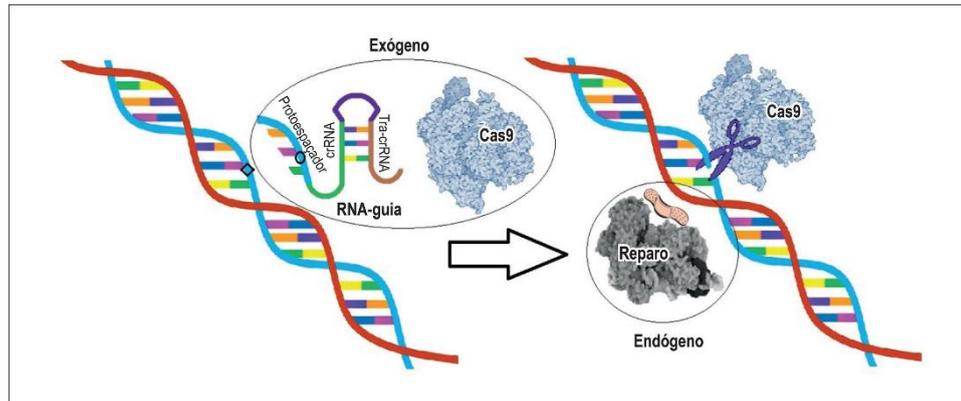


Figura 4: Sistema CRISPR/Cas9 - mecanismo de reconhecimento do alvo. Fonte: AREND et al., 2017

CRISPR/Cas9 age quando um bacteriófago penetra, mas não quebra a célula bacteriana, onde parte de seu DNA possa ser introduzido no genoma do hospedeiro, sendo alternado com sequências repetidas (AREND et al., 2017). As endonucleases Cas1 e Cas2 constituem um complexo que proporciona a clivagem de uma parte do DNA viral, e estes pedaços são levados e introduzidos no genoma bacteriano. No decorrer a transcrição este fragmento de DNA origina um RNA mensageiro ao qual várias moléculas de *tracrRNA* (trans ativador RNA) se conectam. Essa conexão ajuda a clivagem do RNA mensageiro gerar fragmento de *crRNA* (RNA CRISPR), este complexo *tracrRNA* e *crRNA* se relaciona a endonuclease Cas9 a qual é responsável por solicitar a clivagem de um DNA invasor (RAMOS, 2016).

O complexo de *tracrRNA* e *crRNA* é responsável por guiar a Cas9 até o DNA invasor. Ao se ligarem a sequência complementar presente no DNA viral e reconhecer o domínio PAM (protospacer adjacent motif), a endonuclease Cas9, cliva a dupla fita e assim impossibilita o avanço da infecção. Esse processo retrata a importância do mecanismo do sistema imune existente em bactérias (GUIMARÃES, 2016). O *crRNA* foi traçado como um RNA guia único (sgRNA) com duas características, a sequência de 20 nucleotídeos na extremidade 5' do sgRNA que determina o local alvo do DNA pelo pareamento Watson-Crick, e estrutura de cadeia dupla no lado 3' da sequência que se liga a Cas9, que fez com que criasse um sistema simples de dois componentes, no qual as mudanças na sequência guia do sgRNA podem ser utilizadas para programar CRISPR-Cas9 para completar a sequência do DNA de interesse, desde que seja próxima a um PAM. Na falta da PAM o DNA alvo não é reconhecido pela Cas9 mesmo que a sequência de nucleotídeos do sgRNA seja totalmente complementar (DOUDNA, 2014).

A imunidade adaptativa acontece em três etapas sendo a inserção de uma sequência curta do DNA invasor como uma sequência espaçadora, a transcrição do precursor crRNA que sofre maturação para gerar crRNAs individuais, cada um feito por uma parte de repetição, e a porção espaçadora de ataque invasor e clivagem administrada por crRNA de ácido nucléico por enzimas CAS em locais complementares à sequência espaçadora de crRNA (MAKAROVA *et al.*, 2011). Existem três tipos de sistemas CRISPR/Cas (I, II e III) que usam mecanismos moleculares diferentes para se ter reconhecimento e clivagem de ácido nucléico. O PAM exerce um papel necessário nas etapas de adaptação e interferência nos sistemas tipo I e tipo II (SHAH *et al.*, 2018).

Os sistemas tipo I e III são muito parecidos, sendo que suas interferências envolvem o direcionamento orientado por crRNA (complexo de proteínas ribonucléicas) e usam um grande complexo de proteínas Cas. No entanto o tipo II é mais certo para um crRNA duplo adicional, nomeado tracrRNA formando um complexo de DNA que requer apenas uma única proteína para reconhecimento e clivagem de DNA guiado por RNA (SANTOS *et al.*, 2018). Depois de elucidado o mecanismo pelo qual o sistema CRISPR/Cas9 atua em procaríotos, pesquisadores viram nesse sistema um alto potencial para ser usado na edição e manipulação gênica. Devido ao fato de os eucariotos não possuírem a maquinaria precisa para ligação do tracrRNA e crRNA, um gRNA (RNA guia) foi desenvolvido e direcionado para uma sequência alvo específica e então este é colado na célula alvo juntamente com a Cas9. Desta forma, o gRNA faz o reconhecimento da sequência presente no DNA alvo e libera que a cas9 clive o sítio de interesse, proporcionando a inserção da sequência esperada por meio de recombinação homóloga (CASTRIGNANO, 2017).

Para se realizar a inativação de um gene a técnica fica ainda mais fácil dispensando a necessidade de um DNA doador, mas envolvendo apenas a atuação do sistema CRISPR/Cas9, podendo gerar a clivagem em um sítio específico ou em mais regiões contando que tenha complementaridade com RNA guia. A introdução aleatória de mutações no DNA em consequência da maquinaria de reparação depois da clivagem da CRISPR/Cas9 modifica a matriz de tipos de células e organismos, já que várias das doenças que acometem seres humanos são de origem genética, e algumas atribuídas à ocorrência de mutação única no genoma. Por causa desses motivos, CRISPR/Cas9 passou a ser vista como um meio capaz de gerar o reparo de um gene mutado, causador de uma doença, eliminando a mutação no genoma e

evitando a transmissão da doença às próximas gerações (BERGEL, 2017).

### **CRISPR/Cas9 no tratamento do CCU**

A tumorigenese do CCU é iniciada pela expressão exacerbada de proteínas virais *E6* e *E7* quando o HPV se integra ao genoma humano, logo, se for possível a inibição da expressão destes genes, o processo de tumorigenese poderia ser impedido ou até mesmo regredido (BRYAN *et al.*, 2014).

Sabe-se que a perda da função *E6* em células de CCU induz a expressão de p53, além de fatores que induzem apoptose e parada do ciclo celular. De maneira semelhante, a perda de *E7* permite o aumento da expressão de Rb, levando à parada do ciclo celular e senescência (GOODWIN, DIMAIO, 2000). No trabalho conduzido por Bryan *et al.* em 2014, foi demonstrado que a utilização de combinações de Cas9/sgRNA são de fato capazes de inativar eficientemente a função da proteína *E6* e *E7* do HPV em células de carcinoma cervical transformadas por HPV-18, resultando em parada do ciclo celular e morte de células tumorais.

A expressão de uma endonuclease guiada por RNA Cas9 bacteriana, juntamente com RNAs de guia único (sgRNAs) específicos para *E6* ou *E7*, é capaz de induzir a clivagem do genoma do HPV, resultando na introdução de deleções inativadoras e mutações de inserção no gene *E6* ou *E7*. Isso resulta na indução de p53 ou Rb, levando à parada do ciclo celular e eventual morte celular. As células transformadas por HPV-16 e HPV-18 mostraram-se responsivas à clivagem de DNA específica do genoma de HPV. Esses dados fornecem uma prova de princípio para a idéia de que as combinações de Cas9/sgRNA entregues por vetor podem representar modalidades de tratamento eficazes para cânceres induzidos por HPV, levando à parada do ciclo e eventual morte celular (HSU PD, 2014).

A figura 5A demonstra níveis aumentados das oncoproteínas supressoras de tumor em células He-la (células que foram infectadas por HPV-18 com *E6* e *E7* integrados no genoma), *in vitro*, quando houve a clivagem por CRISPR/Cas9 com RNA mensageiro (sgRNA) para sítio específico de *E6*, na canaleta p53 e p21/16E6sgRNA1 o aumento da expressão de p53 e p21, se comparado as bandas da proteínas nas canelates controle Mock, Vetor e N.S.sgRNA, aumento este, que não ocorre na canaleta E7sgRNA1, referente ao controle que quantifica a expressão de Rb. A técnica utilizada foi Western blotting (técnica analítica bem estabelecida para detectar, analisar e quantificar proteínas) (KENNEDY *et al.*, 2014).

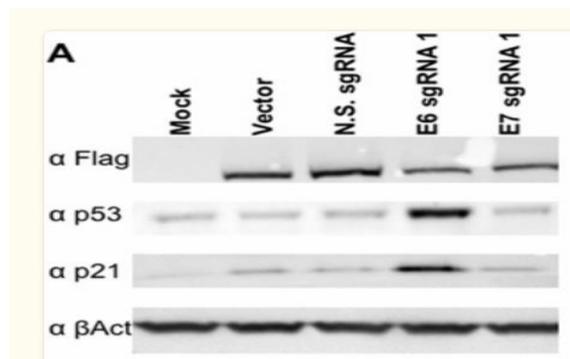


Figura 5 A - O filamento que expressa *E6*sgRNA1 apresenta bandas mais grossas indicando maior expressão de p53 e p21, se comparada as bandas de controle. Fonte: KENNEDY *et al.*, 2014.

Na figura 5B desses mesmo estudo de Kennedy *et al.* 2014, utilizando a técnica de Western Blotting, pode se observar um leve aumento da expressão da proteína Rb nas células transfectadas por CRISPR/Cas9 com *E7*sgRNA1, em sua respectiva canaleta.

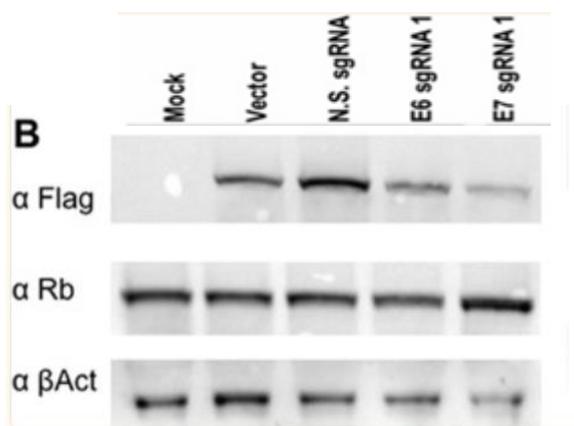


Figura 5 B: Teste por Western blotting mostrando leve aumento da expressão de pRb nas células HeLa *in vitro*, transfectada por Crispr/Cas9sgRNAespecificos para *E7*. Fonte: KENNEDY *et al.*, 2014

Conforme observado nas figuras acima, houve um aumento quantitativo das oncoproteínas, em células transfectadas com um vetor de expressão Cas9 e sgRNAs específicos de HPV-18, para genes *E6* e *E7*, o mecanismo de ação de CRISPR/Cas9 se mostra eficiente no processo de inativação dos mesmos. Para determinar se a expressão de combinações de Cas9/sgRNA específicas para HPV-18 *E6* ou *E7* de fato induziria a morte de células HeLa, foi refeito o experimento de transdução usando um título mais alto do vetor lentiviral (MOI de ~37) que se prediz transduzir quase todas as células HeLa em uma cultura. Após 10 dias em cultura, pode-se observar que as

células foram coradas com MTT, e a porcentagem de células factível foi determinada, na pesquisa realizada, mostrando que ambos os sgRNAs específicos de *E6* e *E7*, na presença de Cas9, induziram o desaparecimento quase completo da cultura decélulas HeLa transduzida. Portanto, a ruptura direcionada de HPV *E6* ou *E7* tem o potencial de induzir a eliminação específica de células transformadas por HPV (KENNEDY *et al.*, 2014).

### **Evidência molecular da edição de genes usando AAV-E6-CRISPR/Cas9**

Estudos mostram que o sistema CRISPR/Cas9 pode entrar nas células na forma de DNA, mRNA ou proteína. O DNA que codifica gRNA e Cas9 pode ser distribuído em células usando plasmídeos ou vetores virais (KOURANOVA *et al.*, 2016).

O sistema de vetores virais, com vírus adeno-associados (AAVs), foi utilizado em uma pesquisa feita por NOROOZI *et al.*, 2022, neste estudo foi utilizado o sistema AAV-E6-CRISPR/Cas9 para interromper o gene que codifica o oncogene E6 na linha celular HeLa positiva para HPV18. Demonstrando que a clivagem do oncogene HPV18-E6 aumentou a apoptose celular e diminuiu as taxas de proliferação celular, através da perda da função da oncoproteína E6, restaurando assim a expressão de p53. Como mostra na figura 6 abaixo: O nível de proteína p53 em células HeLa foi medido usando Western blotting no quinto dia após a transdução. O GAPDH foi usado como controle interno. O software ImageJ foi usado para medir as razões p53: GAPDH em células HeLa. O nível de expressão da proteína p53 foi significativamente aumentado em células infectadas com AAV-E6-CRISPR/Cas9 em comparação com os grupos de células controle e simulado (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). O nível de expressão de GAPDH foi usado para normalizar a intensidade da banda (Suplementar [S1](#)) (NOROOZI *et al.*, 2022).

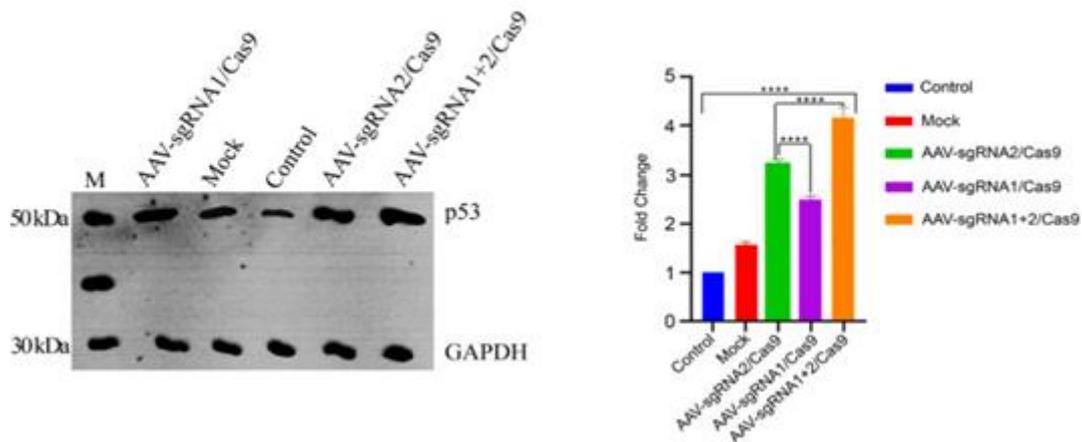


FIGURA 6: Evidencia molecular de edição genética em células HeLa. FONTE: NOROOZI *et al.*, 2022.

Com estes resultados pode-se vislumbrar que as modificações genéticas criam um amplo campo de pesquisa, bem como foi feito para oncoproteína *E6*, pode ser aplicado a *E7* que também é responsável pela CCU, e deve ser inativada, para que a Rb possa ser novamente expressada de forma a garantir controle de apoptose celular. Utilizando o sgRNA guia específico para clivagem do gene *E7* através da enzima Cas9, será possível a total recuperação das células afetadas posteriormente e a regeneração do tecido epitelial do colo uterino (HSU PD, 2014).

## CONCLUSÃO

Apesar de muitos esforços realizados em vários níveis de atenção à saúde, o CCU continua se configurando como um importante problema de saúde pública. A radioterapia e a cirurgia de remoção do órgão afetado, estão entre as terapias mais comuns. A técnica de edição genética CRISPR/Cas9 nos estudos revisados se mostrou muito eficiente para o tratamento do CCU, ela desempenha o papel de tesoura, sendo assim, capaz de causar a clivagem do DNA alvo, inserido pelo vírus do HPV no genoma a célula, a técnica permite a regulação das oncoproteínas e consequentemente a normalização do ciclo celular, pode se observar também uma redução no número de células tumorais uma vez que foram transfectadas por CRISPR/Ca9 induzindo assim a uma recuperação do tecido epitelial. CRISPR/Cas9 é considerada causadora de menos efeitos colaterais em comparação com os métodos convencionais, como a radioterapia e eficácia maior que a cirurgia, uma vez que ela age no DNA de células infectadas, sua eficiência no tratamento efetivo da eliminação das células cancerígenas se torna maior que as terapias convencionais, e pode oferecer cura persistente, além de baixo custo, viabilidade e alta eficácia, se

comparado aos tradicionais métodos de tratamento.

Uma vez que não há infecção pelo HPV é anulada a possibilidade do surgimento do carcinoma, o que ressalta a importância da conscientização populacional para a prevenção da doença, em todas as classes da população brasileira e mundial.

Todos os estudos sobre o uso da técnica CRISPR/Cas9 presente neste trabalho foram realizados InVitro, atualmente não existe uma previsão de estudos InVivo, portanto apesar da técnica ter se mostrado muito promissora para o tratamento do CCU, a prevenção continua sendo a melhor opção.

## REFERÊNCIAS

ALAGOZ M, Kherad N. **Advance Genome Editing Technologies In The Treatment Of Human Diseases: CRISPR Therapy (Review)**. Int J Mol Med. 2020 Aug;46(2):521-534. Doi: 10.3892/ijmm.2020.4609. Epub 2020 May 19. Pmid: 32467995; Pmcid: Pmc7307811. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7307811/>

AREND MC, Jessica Op, Melissa Mm. **O Sistema CRISPR/Cas9 E A Possibilidade De Edição Genômica Para A Cardiologia**. Arqbrascardiol. 2017; 108(1):81- 83 Disponível em : <https://www.scielo.br/j/abc/a/S7rhCRLnYjVmCDfTrdSYTDs/?lang=pt>

AUGUSTA GR, Gonçalves R De Map. **Terapia Gênica: Avanços, Desafios E Perspectivas**. Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Sp, Brasil. Doi: 10.1590/S1679-45082017rb4024. Einstein. 2017; 15(3):369-75

BERGEL S. Darío; **O Impacto Ético Das Novas Tecnologias De Edição Genética**. Rev. Bioét. (Impr.). 2017; 25(3):454- 61. Disponível em: [www.scielo.br/j/bioet/a/sdjql69BjztwzyMJ39rv63K/?format=pdf&lang=p](http://www.scielo.br/j/bioet/a/sdjql69BjztwzyMJ39rv63K/?format=pdf&lang=p)

BINNIEA, Fernandes e, Almeida-Lousada H, Demello Ra, Castelo-Brancop. **CRISPR-Based Strategies In Infectious Disease Diagnosis And Therapy**. Infection. 2021 Jun;49(3):377-385. Doi: 10.1007/S15010-020-01554-W. E pub 2021 jan 3. Pmid:33393066; Pmcid:Pmc7779109. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33393066>

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria De Atenção À Saúde. Departamento De Atenção Básica. **Controle Dos Cânceres Do Colo Do Útero E Da Mama** / Ministério Da Saúde, Secretaria De Atenção À Saúde, Departamento De Atenção Básica. – 2. Ed. – Brasília : Editora Do Ministério Da Saúde, 2013. 124 P.: Il. (Cadernos De Atenção Básica, N. 13) Isbn 978-85-334-1991-9 Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Controle\\_Canceres\\_Colo\\_Utero\\_2013.Pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Controle_Canceres_Colo_Utero_2013.Pdf)

BRYAN R. Cullen et al. **Inativação Do Gene E6 Ou E7 Do Papiloma vírus humano Em Células De Carcinoma Cervical Usando Uma Endonuclease bacteriana**

**Guiada Por Rna Crispr/Cas.** Diários asm. Revista De virologia vol.88,Nº20.2014.Disponível em: <https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/2510083/>

CARLI GJ, Pereira Tc,**A Revolucionária Técnica De Edição Genética “CRISPR”**, Genética Na Escola Vol 12 –N2 2017. Disponível em: [https://www.geneticanaescola.com/\\_files/ugd/B703be\\_701d94c7b7b1433686da128bbf3ebb8e.pdf](https://www.geneticanaescola.com/_files/ugd/B703be_701d94c7b7b1433686da128bbf3ebb8e.pdf)

CASTRIGNANO SB. **Enzimas Em Biologia Molecular.III. Tecnologia Crispr-Cas9. Núcleo De Doenças Respiratórias** - Centro De Virologia - Instituto Adolfo Lutz. Bolinst Adolfo Lutz. 2017; 27(U): Art.3. Disponível em: [www.ial.sp.gov.br](http://www.ial.sp.gov.br)

COICO-VEGA,M. M; Iglesias-Osores,S; Aguilar-Gamboa,F.R.**Detección De Oncoproteínas E6/E7: Una Alternativa Para Eltamizaje De Cáncer de Cérvix.** Revista Experiencia en Medicina Del Hospital Regional lambayeque, V.4, N.3,P.108-111,2018. Disponível Em: [https://rem-hr.lambayeque.gob.pe/translate.googleusercontent.com/s/translate\\_proxy?hl=es&\\_X\\_Tr\\_SI=Es&\\_X\\_Tr\\_TI=Pt&\\_X\\_Tr\\_HI=Pt-Br&\\_X\\_Tr\\_Pto=Sc](https://rem-hr.lambayeque.gob.pe/translate.googleusercontent.com/s/translate_proxy?hl=es&_X_Tr_SI=Es&_X_Tr_TI=Pt&_X_Tr_HI=Pt-Br&_X_Tr_Pto=Sc)

DOUDNA JÁ, Charpentiere.**The New Frontier Of Genome Engineering With CRISPR-Cas9.** Science .2014; 3469(213). Doi: 10.1126/Science.1258096

Editora Amplia, 2021.356p. Disponível em: <file:///C:/Users/Meu%20computador/Downloads/Crispr%20e%20virologia.pdf>

FARIA, Rúben Miguel Ribeiro. **Terapia Do Cancro Do Colo Do Útero.** 2018.Tese De Doutorado.Disponível em: <https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/9844>

GOODWIN Ec,Dimaiod.2000. **Repression of human papilloma virus oncogenes In Hela Cervical Carcinoma Cells Causes The Orderly reactivation Of Dormant Tumor Suppressor Pathways.** Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.97:12513–12518.10.1073/Pnas.97.23.12513.Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25100830/>

GUIMARÃES G M. **Uma Ferramenta Para Editar O DNA. Pesquisa Fapesp 240.** Fevereiro De 2016 [Acesso Em 14/07/2018]. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/02/19/uma-ferramenta-para-editar-o-dna/>

HOLANDA.Ribeiro,J.C.Et Al.**Uso do protocolo de saúde da mulher na prevenção Do câncer De Colo Do útero.**Revista baiana de enfermagem,[S.L.],V.35,P.1–11,2021.Doi10.18471/Rbe.V35.39014.

HSU PD, Lander Es, Zhang F. **Development And Applications Of Crispr-Cas9 For Genome Engineering.** Cell. 2014 Jun 5;157(6):1262-1278. Doi: 10.1016/J.Cell.2014.05.010. Pmid: 24906146; PMCID: Pmc4343198. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4343198/>

HUPFFER HM, Berwig Já,**A Tecnologia CRISPR-Cas 9: Da Sua Compreensão Aos Desafios Éticos, Jurídicos E De Governança.** Pensar Revista De Ciência Jurídicas, Fortaleza, V. 25, N. 3, P. 1-16, Jul./Set. 2020, Doi: 10.5020/2317-2150.2020.9722.Disponível Em: <https://periodicos.unifor.br/rpen/article/view/9722>

(IARC) INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **CANCERTODAY**. LYON: WHO, 2020. Disponível em: [www.iarc.who.int/cards\\_page/about-iarc](http://www.iarc.who.int/cards_page/about-iarc)

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Câncer do Colo De Útero, **Conceito e Magnitude**. Brasil: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-uterio/conceito-e-magnitude>

INCA, Instituto Nacional De Câncer. **Câncer Do Colo De Útero**. Brasil: Ministério da saúde, 25/06/2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-uterio/acoes-de-controlado-tratamento>

INCA, Instituto nacional de câncer. **Câncer do colo de Útero**. Brasil: Ministério Da saúde, 25 abr.2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/Tipos-De-Cancer/Cancer-Do-Colo-Do-Utero>

INCA. Estimativa 2020: **Incidência Do Câncer No Brasil**. Rio De Janeiro: Inca, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/medias/documentos/...>

INCA. **Atlas da mortalidade**. Rio de Janeiro: Inca, 2021b.1 Base de dados. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>

KENNEDY EM, Kornepatiav, Goldstein M, Bogerdhp, Poling Bc, Whisnantaw, Kastan Mb, Cullen Br. **Inactivation of the human papillomavirus E6 Or E7 gene In Cervical Carcinoma Cells by using A Bacterial Crispr/Cas Rna-Guided endonuclease**. Jvirol. 2014 Oct; 88(20):11965-72. Doi: 10.1128/Jvi.01879-14. Epub 2014 Aug 6. Pmid: 25100830; PMCID:

KOURANOVA E, Forbes K, Zhao G, Warren J, Bartels A, Wu Y, Cui X. CRISPRs for Optimal Targeting: **Delivery of CRISPR Components as DNA, RNA, and Protein into Cultured Cells and Single-Cell Embryos**. Hum Gene Ther. 2016 Jun; 27(6):464-75. doi: 10.1089/hum.2016.009. Epub 2016 May 12. PMID: 27094534; PMCID: PMC4931306.

LOPES, Viviane . A. S, Ribeiro, José M., **Fatores Limitadores E Facilitadores para O Controle Do Câncer De Colo De Útero: Uma Revisão De Literatura**. Ciênc.Saúde Coletiva 24 (9) • Set 2019 • Disponível Em: <https://doi.org/10.1590/1413-81232018249.32592017>

MAKAROVAM KSDH, Haft R, Barrangou S, Brouns E. Charpentierp. Horvath S, Moineau F, Mojic A, Wolfaf. Yakunin J. Van Der Oost, E. V. Koonin, **Evolution And Classification Of The CRISPR- Cas Systems**. Nat. Rev. Microbiol. 2011; 9:467–477. 10.1038/Nrmicro2577 pmid:2155286 doi: 10.1038/Nrmicro2577

NOGUEIRA -Rodrigues, A.; Melo, A. C. De. **Perspectivas No Tratamento Do Câncer Do Colo Do Útero**: Explorando O Bloqueio Da Sinalização Celular. **Revista Brasileira De Cancerologia**, [S. L.], V. 58, N. 3, P. 529–532, 2012. Doi: 10.32635/2176-9745.Rbc.2012v58n3.1412. Disponível em: <https://Rbc.Inca.Gov.Br/Index.Php/Revista/Article/View/1412>. Acesso Em: 19 Maio. 2022.

NOROOZI,Zahra,Etal.**Efeitos antiproliferativos da degradação baseada em crispr/Cas9 entregue por aav do gene hpv18-E6 em células hela**.Pubmedcentral.Fevereirode2022.Disponível em: <https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/35140292>

PAL,A;Kundu,R. **Human papilloma virus e6 and 7**:The cervical cancer hallmarks and targets For Therapy. *Frontiers In Microbiology*, P. 3116,2020.Disponível em:<https://Rem-Hrlamb-Gob-Pe.Translate.Pensar.Revista.De.Ciência.Jurídicas,Fortaleza,V.25,N.3,P.1-16,Jul./Set.2020,Doi:10.5020/2317-2150.2020.9722>.Disponível em: <https://Periodicos.Unifor.Br/Rpen/Article/View/9722>

PEREIRA,Marinar.L.,**Fisioterapia nas Complicações Ginecológicas Decorrentes do Tratamento do Câncer de Colo de Útero**,V. 21 N. 5 (2020): Fisioterapia Brasilv21n5. Disponível em: <https://Convergenceseditorial.Com.Br/Index.Php/Fisioterapiabrasil/Article/View/4095> Pmc4178730.Disponível em: <https://Pubmed.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/25100830/>

RAMOS, Rufino AD. Ramos. **CRISP/Cas9: Uma Ferramenta De Edição Genética Para Investigação E Novas Terapias**. Faculdade De Farmácia Da Universidade De Coimbra, 5 De Julho 2016 [ Acesso Em 28 De Set. 2018]. Disponível em: <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/42065/1/MONO-DAVID.pdf>

ROCHA, Natália Pereira, **Metaloproteínas de Matriz e Seus Moduladores Induzidos na Infecção pelo Hpv In Situ e In Vitro**, Rio De Janeiro, 2018. Disponível em:<https://Www.Arca.Fiocruz.Br/Handle/Icict/34717>

SANTOS SLF, Alves HHS, Prado Rms, Barros Kbnt. **Crispr Uma Nova Era Na Biologia Molecular**; *Revista Biotecnologia & Ciência*. 2016; 5(2):40-48. Disponível em:<https://Www.Revista.Ueg.Br/Index.Php/Biociencia/Article/View/5756>

SHAH S S. A. , S. Erdmann, F. J. M. Mojica, R. A. Garrett, **Protospacer Recognition Motifs: Mixed Identities And Functional Diversity**. *Rna Biol*. 2013; 10:891-899. 10.4161/Rna.23764pmid:23403393doi:10.4161/Rna.23764 [Acesso Dia 28 De Out. 2018] Disponível em: <https://Www.Tandfonline.Com/Doi/Full/10.4161/Rna.23764>.

SILVA PC, **As Repercussões Da Edição Genética Em Humanos A Partir Da Técnica CRISPR-Cas9**, *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo Do Conhecimento*issn: 2448-0959, 22/09/2021 Doi: 10.32749/Nucleodoconhecimento.Com.Br/Lei/Crispr-Cas9. Disponível em:<https://Www.Nucleodoconhecimento.Com.Br/Lei/Crispr-Cas9>

SILVÉRIO, Gabriel Matias Borges , Et Al., **Papillomavirus And The Relationship With Cervical Cancer**. *Papiloma Vírus Humano E A Relação Com O Câncer De Colo*

Uterino. Revista Brazilian Journal Of Development. Disponível em :  
<https://www.brazilianjournals.com/index.php/brjd/article/view/44988>

SOARES DO Nascimento, J.A.; Sousa Esilva, J.L.; Ferreira HONOSTÓRIO, K. S. **Fator De Risco Vírus Hpv Para Câncer Do Colo Do útero no Brasil: Revisão integrativa.** Revista científica de enfermagem-Recien, [S.L.], V.11, N.35, P.267–275, 2021. Doi. 10.24276/Rrecien2021.11.35.267-275. Disponível em:  
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=foh&an=154409497&lang=pt-br&site=ehost-live>. Acesso em: 5 maio. 2022.

WANG, X.; Huang, X.; Zhang, Y. **Involvement of human papilloma viruses in cervical cancer.** Frontiers in microbiology, P.2896, 2018. Disponível em:  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02896/full>.

ZHENS, L. X. Oncogenic human papilloma virus: **Application of CRISPR/Cas9 Therapeutic Strategies For Cervical Cancer.** Cellphysiolbiochem. 2017;44(6):2455-2466. Doi: 10.1159/000486168. Epub 2017 dec 18. Pmid:29268281. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29268281/>