

CRISPR/CAS9 COMO FERRAMENTA TERAPÊUTICA CONTRA O CÂNCER

Isabella Rocha Castelane¹; Orientador Prof. Luis Henrique Romano².

¹Graduada do Curso de Biomedicina, Centro Universitário Amparense-UNIFIA. ²Orientador e professor do Centro Universitário Amparense – UNIFIA.

RESUMO

A edição gênica se tornou um campo muito estudado nos últimos anos por sua capacidade de modificar o DNA permitindo a correção de doenças e criando terapias. Dessa forma, o CRISPR-Cas9 é a ferramenta mais utilizada neste campo de pesquisa, por ser relativamente mais simples e possuir precisão em sua atuação. Baseado no mecanismo de defesa do sistema imunológico da bactéria, o CRISPR-Cas9 tem a capacidade de reconhecer um DNA específico e inserir, deletar e/ou substituir um gene específico, sendo utilizado em diversos tipos de terapias, especialmente contra o câncer. Dentre suas aplicações pode ser utilizado no aprimoramento de células CAR-T, identificar genes que influenciam o desenvolvimento do tumor os suprimindo ou modificando.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9, câncer; células CAR-T; quebras de dupla fita (DSB); Cas9.

ABSTRACT

Gene editing has become a highly studied field in recent years due to its ability to modify DNA, allowing the correction of diseases and the development of new therapies. In this context, CRISPR-Cas9 is the most widely used tool in this area of research, as it is relative

simple and offers high precision in its action. Based on the bacterial immune defense mechanism, CRISPR-Cas9 has the ability to recognize a specific DNA sequence and insert, delete, and/or replace a target gene, being applied in several types of therapies, especially against cancer. Among its applications, it can be used to enhance CAR-T cells and to identify genes that influence tumor development, which can then be suppressed or modified.

Keywords: CRISPR/Cas9; cancer; CAR-T cells; double-strand breaks (DSB); Cas9.

INTRODUÇÃO

Os genes são segmentos de DNA específicos contendo informações sobre proteínas e RNAs não codificantes, porém alguns genes podem sofrer mutações alterando sua funcionalidade. Na natureza algumas bactérias contêm mecanismos de reparo de DNA que eliminam e reparam o DNA mutado, tais processos vêm sendo estudado e utilizado para o desenvolvimento de mecanismos de edição gênica (AZEVEDO, A. D. S.; 2024).

A edição gênica se tornou o principal foco da engenharia genética nos últimos anos, permitindo o uso desta tecnologia para modificar o genoma causando a inserção, deleção ou substituição de sequências de DNA (ZHU, Y.; 2022).

Dentre os mecanismos que geram o rompimento da fita dupla de DNA (DSB) para sua reparação, a descoberta de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) que atuam em conjunto com uma endonuclease Cas e um RNA guia se tornou a ferramenta mais promissora para a edição gênica (XUE, C.; GREENE, E. C.; 2021).

O CRISPR/Cas é um mecanismo de defesa do sistema imunológico procarionte permitindo proteção contra DNA de plasmídeos ou fagos. Durante um ataque, utilizando a endonuclease Cas, ocorre a clivagem do DNA viral e sua integração em seus genomas, dessa forma a bactéria tem a capacidade de identificar e eliminar o vírus em um próximo ataque (ALAGOZ, M.; KHERAD, N.; 2020).

Atualmente o sistema CRISPR/Cas pode ser dividido em duas classes, sendo a Classe 2 a mais simples, contendo apenas uma proteína que realiza o reconhecimento seguido da clivagem do DNA intercedido pelo RNA. Sendo assim, o Tipo II com a proteínas Cas 9 é o mais estudado (AZEEZ, S. S.; HAMAD, E. A.; 2024).

Dentre as suas vantagens perante as outras técnicas de edição gênica como a enzima de restrição Eco R1, Zinc Finger Nucleases (ZFNs) e Transcription Activator Like Effector Nucleases (TALENs), o CRISPR/Cas9 é um sistema simples, mais barato, eficiente e adaptável. Por conta disso, a tecnologia CRISPR/Cas9 se tornou o principal influenciador da engenharia genética, sendo foco de estudos para correção de doenças genéticas e até mesmo do câncer (AZEEZ, S. S.; HAMAD, E. A.; 2024). Este artigo foi realizado para evidenciar o potencial do sistema CRISPR/Cas9 na terapia gênica, especialmente no tratamento do câncer, demonstrando suas características, aplicações e desafios.

OBJETIVO

O presente artigo busca discorrer sobre o mecanismo de ação do CRISPR/Cas9 e sua aplicação em terapias oncológicas, e por meio disso reforçar a eficácia desta técnica e sua importância.

METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do artigo foi realizada uma revisão bibliográfica tanto do CRISPR/Cas9 quanto sua aplicação na terapia do câncer. A pesquisa foi feita na PubMed, Google Scholar e ScienceDirect, utilizando como palavras chave, CRISPR/Cas9, câncer, CAR-T, Cas9. Dentre todos os trabalhos disponíveis, os critérios de incorporação foram artigos que contribuirão para ensaios clínicos do CRISPR/Cas9 com intuito de comparação e especificação, incluindo artigos com data de publicação de 2002 a 2025 e relacionados a terapias oncológicas. Foram desconsideradas publicações que escapavam do tema alvo e de publicação anterior a 2001.

DESENVOLVIMENTO

A HISTÓRIA DO CRISPR/CAS

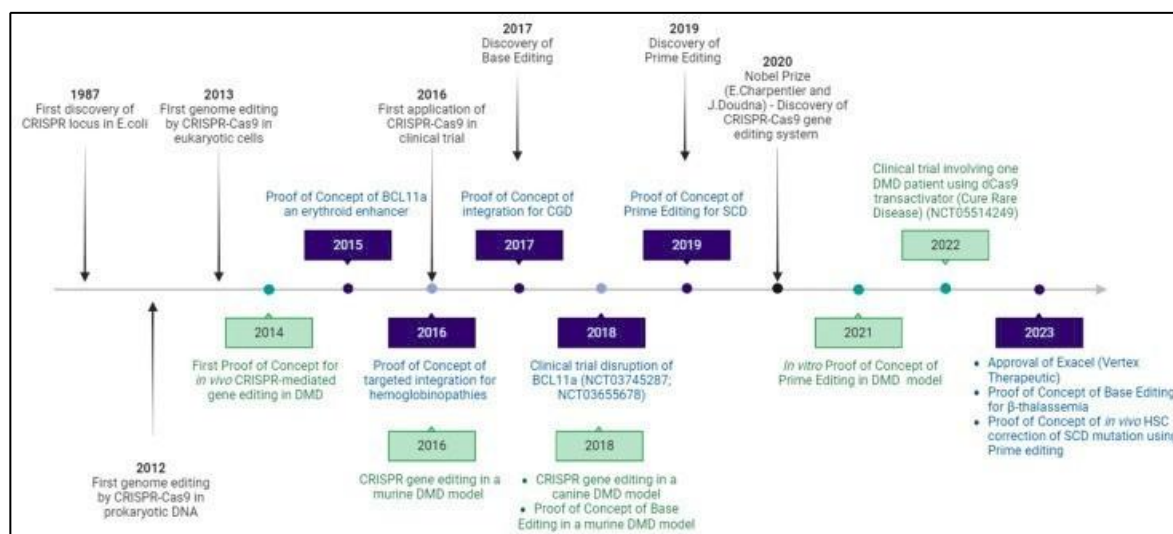
O primeiro locus CRISPR foi descoberto no ano de 1987 sendo identificadas no genoma da bactéria *Escherichia coli* identificando um grupo de sequências de repetições de bases de DNA separados por um segmento de DNA espaçador nomeados mais tardiamente como "espaçadores" (YIP, B. H.; 2020).

Em 1993, Francisco Mojica descobriu que ambos os genomas arqueais e bacterianos apresentavam estas sequências únicas. Ademais, no ano de 2002 uma publicação de Jansen, R.; et al (2002), revelou a descoberta de genes associadas às repetições de CRISPR, sendo denominados de Cas. Nesta mesma publicação foi colocado pela primeira vez a nomenclatura CRISPR.

No ano de 2005 Mojica e outros 2 laboratórios independentes afirmaram que os "espaçadores" são incorporados a partir de invasões anteriores à célula procarionte com papel de o proteger caso ocorra a reinfecção de bacteriófagos semelhantes, tendo esse processo como parte de seu sistema imunológico. Contudo, apenas em 2007 utilizando a bactéria do ácido láctico *Streptococcus thermophilus* foi comprovado a teoria de um sistema imunológico adaptativo (GOSTIMSKAYA, I; 2022).

Desta forma, em 2012, Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna utilizaram o sistema CRISPR/Cas 9, Tipo II da bactéria *Streptococcus pyogenes*, para realizar um experimento in vitro com DNA purificado podendo editar genes específicos de forma precisa por conta de sua eficiência em clivar segmentos de DNA com o auxílio de um RNA guia (sgRNA). A utilização desta tecnologia foi apenas utilizada em 2013 em células eucarióticas. A linha do tempo do CRISPR/Cas pode ser observada na Figura 1 (LAURENT, M. et al; 2024).

Figura 1 – Linha do tempo CRISPR/Cas



FONTE: (LAURENT, M.; et al; 2024)

Em 2016, no Hospital da Universidade de Sichuan, na China, ocorreu a primeira aplicação clínica do sistema CRISPR/Cas9 como terapia celular em humanos para o tratamento do câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC). As células T do paciente foram retiradas e utilizando o sistema CRISPR/Cas9 foi excluído o gene PD-1 que é uma proteína inibitória que limita a atividade das células T. Após isso as células são recolocadas no paciente ficando mais "ativas" contra o tumor, este estudo se demonstrou viável e seguro (He; 2020).

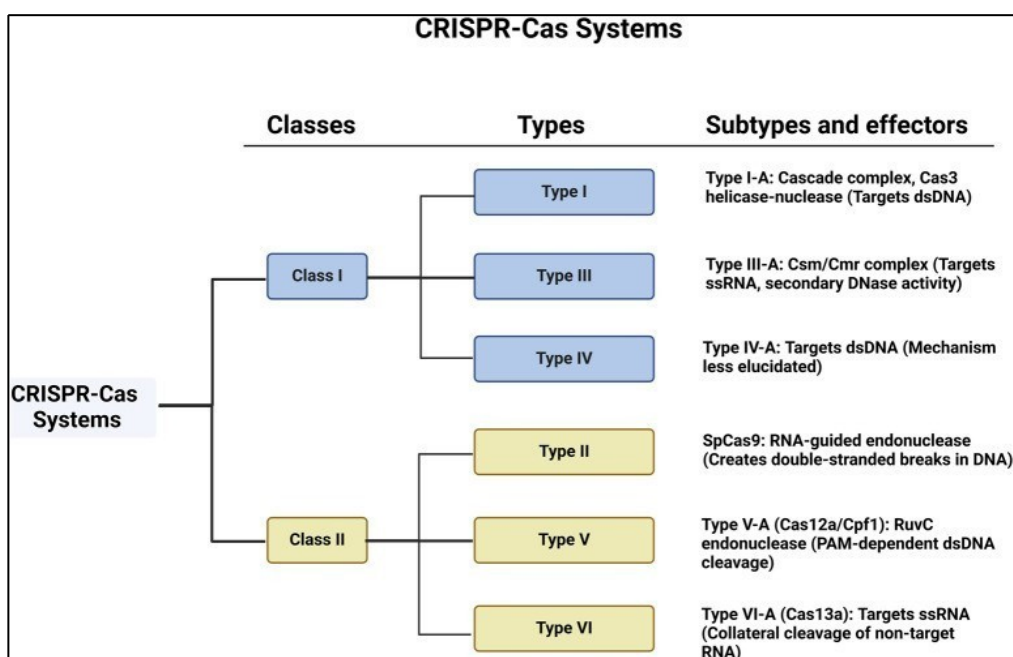
A partir deste evento diversos ensaios clínicos e pesquisas foram realizadas para o tratamento de doenças como Aids, doença falciforme, cânceres, beta-talassemia, Síndrome de Down, entre outros. Por fim, em 2020 as pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna receberam o Prêmio Nobel de Química por sua contribuição no campo da edição gênica (GUO, N. et al; 2022).

CLASSIFICAÇÃO CRISPR/CAS

O sistema CRISPR/CAS pode ser classificado em duas classes: 1 e 2, em que a primeira utiliza complexos multiprotéicos, enquanto a segunda classe é mais simples empregando apenas uma proteína efetora Cas. A classe 1 é subdividida em tipo, I, III, IV; já a classe 2 apresenta os tipos II, V e VI (JANIK, E. et al; 2020).

Cada tipo é caracterizado por distintas configurações dos complexos efetores, que apresentam proteínas exclusivas que os identificam. Referente a classe 1, os tipos I, III e IV respectivamente tem como proteínas específicas: o Cas3 + Complexo Cascade, Cas10 + Complexo Csm/Cmr e Complexo Csf. Dessa forma, dentre a classe 2, os tipos II, V e VI possuem respectivamente as proteínas: Cas 9, Cas 12 e Cas 13, como demonstrado na Figura 2 (AZEEZ, S. S.; HAMAD, E. A.; 2024).

Figura 2 – Classificação do CRISPR/CAS



FONTE: (AZEEZ, S. S.; HAMAD, E. A.; 2024).

Dentre os seis tipos há 33 subtipos atualmente reconhecidos, essa variação ocorre em seus genes e proteínas, permitindo diversas funções complexas no processo de defesa da célula, principalmente através de interações específicas com RNA e DNA (ZHU, Y.; 2022).

Essas proteínas possuem diversas funções, como atuar no módulo adaptativo onde ocorre a captura dos fragmentos de DNA do invasor, os integrando em seu DNA formando os "espaçadores" do locus CRISPR, parte importante para o sistema imune, tendo como proteínas principais o Cas1 e Cas2, e em casos específicos o Cas4 (He Y. et al; 2023).

Além disso, algumas proteínas podem atuar na etapa de expressão e processamento dos crRNAs, onde o pré-crRNA que foi transcrito a partir do locus CRISPR com os "espaçadores" é processado em pequenos pedaços denominados crRNAs. Dessa forma, cada um dos crRNAs pode guiar um Cas para um invasor específico. As principais proteínas envolvidas são o Cas6 e tracrRNA em conjunto com a enzima Rnase III no tipo II (GANGULY, C. et al; 2024).

Por fim, há algumas proteínas que realizam o módulo efetor da etapa interferência, ou ataque do invasor, sendo esta parte a resposta imune do sistema. Nesta etapa quando o invasor entra novamente em contato com a bactéria, a proteínas Cas destrói seu material genético. As proteínas envolvidas são o Cas3 em conjunto com o complexo Cascade, Cas9, Cas10, Cas12 e Cas 13 (He, Y. et al; 2023).

É importante destacar que o sistema CRISPR-Cas do tipo II, mediado pela endonuclease Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*, é o mais utilizado nas abordagens de edição genômica, sobretudo por sua estrutura relativamente simples e alta eficiência na geração de quebras de dupla fita (DSBs) no DNA alvo (OKOLI, A. et al; 2018).

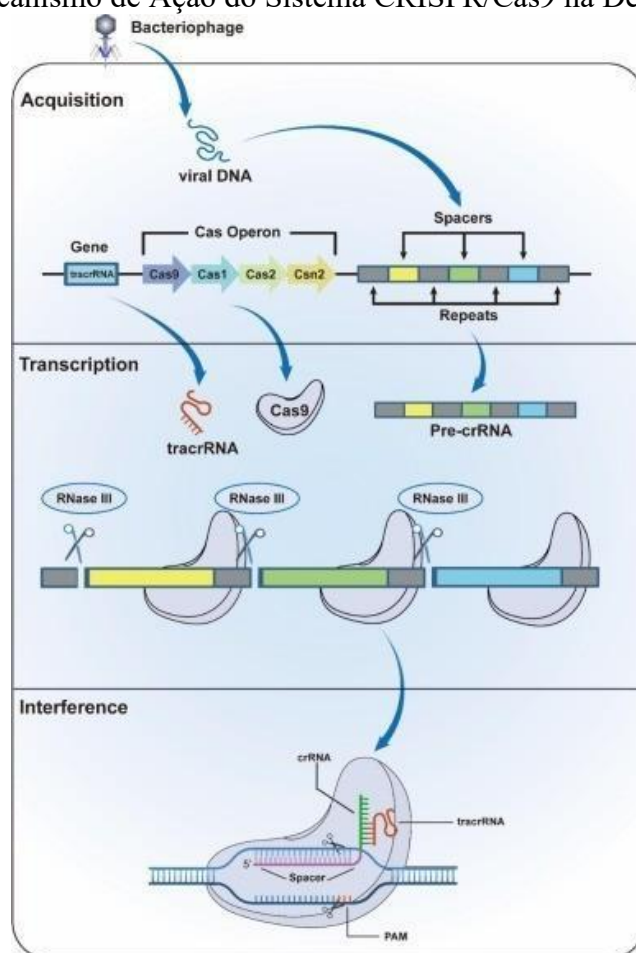
MECANISMO DE AÇÃO DO CRISPR/CAS9 BACTERIANO

O sistema CRISPR/Cas9 bacteriano possui três componentes principais: a proteína Cas9, o RNA guia CRISPR (crRNA) e o RNA transativador (tracrRNA), que atuam em

conjunto para orientar a Cas9 até o DNA invasor e promover sua clivagem. Como visto anteriormente, a imunidade adaptativa da bactéria requer 3 etapas: adaptação, expressão e interferência, como demonstrado na figura 3 (WU, Y. et al; 2025).

Na fase de aquisição fragmentos do DNA viral são reconhecidos pelo complexo Cas1–Cas2, onde ocorre uma seleção de um protospacer, pequeno fragmento do DNA viral, que contém uma sequência adjacente a um motivo PAM (Protospacer Adjacent Motif). Após ser capturado é integrado no locus CRISPR do genoma da bactéria de forma intercalada, entre duas repetições palindrômicas, formando os "espaçadores" (HRYHOROWICZ, M. et al; 2017).

Figura 3 – Mecanismo de Ação do Sistema CRISPR/Cas9 na Defesa Bacteriana



FONTE: (WU, Y; et al 2025).

Na fase da expressão ocorre a transcrição do locus CRISPR a partir da região líder, que

é uma sequência promotora/regulatória no locus CRISPR que inicia a transcrição do pré-crRNA e orienta a adição de novos espaçadores virais durante a resposta adaptativa. A transição resulta em uma fita longa de RNA denominada pré-crRNA, que se emparelha com o tracrRNA formando o duplexo RNA (ALAGOZ, M.; KHERAD, N.; 2020).

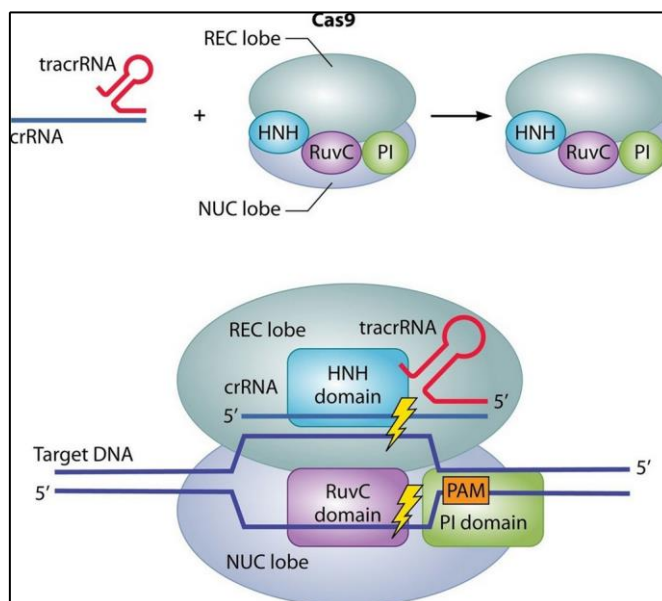
Em seguida, ocorre o processamento do duplexo RNA em crRNA maduro pela enzima RNase III em conjunto com a proteína Cas9. Com isso, cada crRNA maduro terá uma única sequência guia derivada de um espaçador e uma porção de sequência repetitiva. Após o processo, o tracrRNA continuará ligado ao crRNA maduro e se associará ao Cas9 formando um complexo ribonucleoproteico ativo (WU, Y. et al; 2025). Na fase de interferência, o complexo ribonucleoproteico ativo tem como função identificar e neutralizar o DNA invasor (DING, S. et al; 2023). A proteína efetora *Streptococcus pyogenes* Cas9 (spCas9) é uma parte essencial do sistema, sendo responsável por clivar o DNA-alvo de forma específica (PRASAD, K. et al.; 2021).

Esse processo ocorre por conta de dois importantes componentes do Cas9: o lobo de reconhecimento (REC) e o lobo nucleásico (NUC). O lobo REC possui uma longa α -hélice e três domínios estruturais (REC1, REC2 e REC3), responsáveis por reconhecer e interagir com o duplex RNA-DNA, atuando como uma região funcional que estabiliza e reorganiza o complexo antes da clivagem do DNA dependente da Cas9, garantindo a especificidade e eficiência do processo (KOVALEV, M. A.; DAVLETSHIN, A. I.; KARPOV, D. S.; 2024).

Por outro lado, o lobo NUC é formado pelos domínios PI (PAM-interagente), RuvC e HNH, tendo como função a clivagem do DNA. O domínio PI da SpCas9 é responsável pelo reconhecimento da sequência PAM (5'-NGG-3') no DNA-alvo, a qual é essencial para a ativação da enzima. Sendo que a enzima apenas realiza a clivagem se essa sequência estiver presente na fita oposta àquela reconhecida pelo RNA-guia, próxima ao local de clivagem (JANIK, E. et al; 2020).

Já os domínios RuvC e HNH atuam como nucleases: o RuvC corta a fita não complementar ao RNA guia, enquanto o HNH cliva a fita complementar, promovendo uma quebra de fita dupla altamente específica (SHAH, S. Z. et al; 2019).

Figura 4 – Processo da ação dos domínios REC e NUC



FONTE: (ISHINO, Y.; KRUPOVIC, M.; FORTERRE, P.; 2018).

Dessa forma, o mecanismo de defesa bacteriano mediado pelo sistema CRISPR/Cas9 pode ser sintetizado da seguinte forma, conforme ilustrado na Figura 4: o complexo RNA guia formado pelo crRNA e pelo tracrRNA, direciona o Cas9 até a sequência correta no DNA alvo. O Lobo REC, interage com o RNA guia e o lobo NUC contém os domínios HNH, RuvC e PI. Todo o complexo se liga ao DNA alvo quando encontra uma sequência complementar ao crRNA. A ligação só ocorre se houver uma sequência PAM, que é reconhecida pelo domínio PI. Após identificar a fita de DNA complementar ao RNA guia ocorre sua clivagem pelo HNH, enquanto o RuvC corta a fita oposta, ocorrendo, por fim, a quebra de fita dupla (DSB) no DNA alvo (ISHINO, Y.; KRUPOVIC, M.; FORTERRE, P.; 2018).

CRISPR/CAS9 NA EDIÇÃO GENÉTICA E MECANISMOS DE REPARO CELULAR

Por conta de sua capacidade de agir como uma tesoura gênica, gerando quebra de cadeia dupla de DNA (DSB) em locais específicos com grande precisão e possibilitar uma introdução de DNA doador, o sistema CRISPR/Cas9 se tornou o alvo da edição gênica em células eucarióticas (RICHARDSON, C. et al; 2023).

Diferente do sistema CRISPR/Cas9 bacteriano, no qual o RNA guia é constituído pelas

moléculas crRNA e o tracrRNA, a edição gênica em eucariotos faz uso de uma molécula quimérica denominada single guide RNA (sgRNA). Essa fusão foi importante para simplificar e garantir versatilidade para aplicação laboratorial, já que une os elementos necessários para recrutamento e ativação da endonuclease Cas9 (PRASAD, K. et al; 2021).

Dessa forma, para direcionar a Cas9 até um locus genômico específico, basta modificar a sequência de 20 nucleotídeos na região 5' do sgRNA, contanto que estejam adjacentes a um motivo PAM compatível (PRASAD, K. et al; 2021).

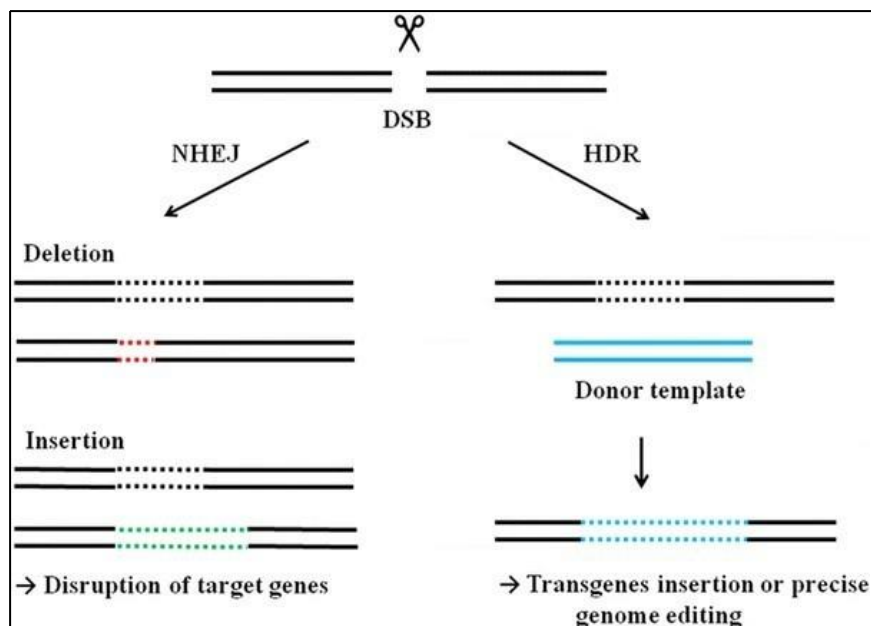
Durante sua atuação, o sgRNA guia a nuclease Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) até o núcleo da célula eucariótica, reconhecendo o motivo PAM específico, assim como ocorre no sistema bacteriano. Em seguida, a Cas9 realiza a clivagem da fita dupla do DNA, causando uma quebra de fita dupla (DSB) que desencadeia os mecanismos celulares de reparo do DNA, possibilitando a edição gênica (LIU, Z.; AL. et; 2023).

Para reparar os danos da quebra do DNA a célula eucarionte realiza mecanismos de reparo celular, sendo os mais utilizados o Non-Homologous End Joining (NHEJ) e Homology-Directed Repair (HDR), como demonstrado na Figura 5 (HRYHOROWICZ, M. et al; 2017).

Em células eucarióticas a união final não homóloga (NHEJ) é o principal mecanismo de reparo DSB, ocorrendo em qualquer fase do ciclo celular. Atuando sem um molde homólogo, esse processo consiste na religação das extremidades clivadas do DNA, sendo um mecanismo rápido, contudo mais aberto a falhas. Dessa forma, o NHEJ geralmente acarreta em deleções (indels) ou inserções, podendo ocasionar mutações que causam a interrupção da função do gene alvo. Por conta disso é uma via muito utilizada para gerar nocautes gênicos (gene knockout) (XU, X. et al; 2021).

Por outro lado, o reparo dirigido por homologia (HDR) utiliza de DNA doador que possui uma alteração desejada, ou seja um gene de interesse como molde para ser incorporado no local em que ocorreu a quebra do DNA com braços de homologia (YIP, B. H.; 2020).

Figura 5 – Mecanismo de reparo celular



FONTE: (HRYHOROWICZ, M. et al; 2017).

Funcionando apenas nas fases S e G2/M do ciclo celular, o HDR é menos eficiente que o NHEJ e depende da divisão celular ativa para sua atuação. Esse mecanismo garante a inserção (knocking) de genes desejados de forma precisa, a correção de mutações pontuais, marcação de epítomos de genes, entre outras modificações (YIP, B. H.; 2020).

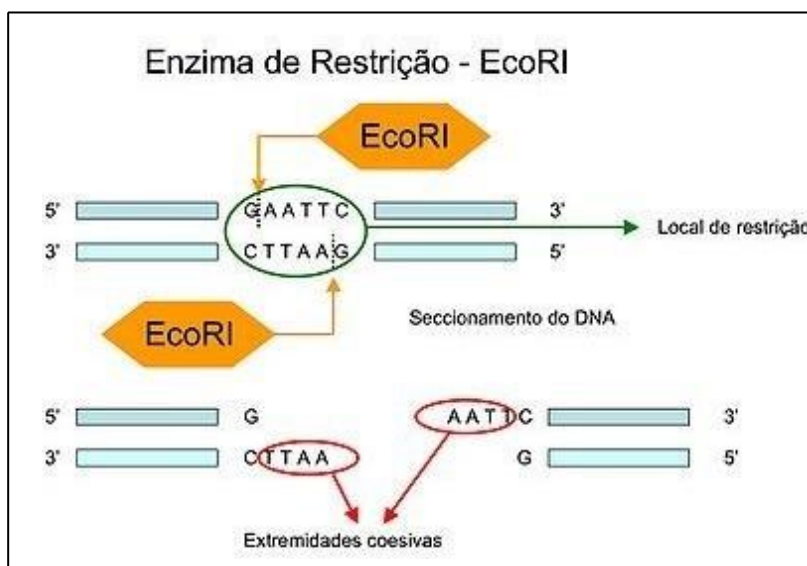
MÉTODOS DE EDIÇÃO GÊNICA

Antes da tecnologia CRISPR/Cas existiam outros métodos para manipulação do DNA visando a edição genômica, como a enzima de restrição EcoRI e nucleases quiméricas como a ZFNs (Zinc Finger Nucleases e TALENs (Transcription Activator Like Effector Nucleases) (HRYHOROWICZ, M. et al; 2017).

Enzimas de restrição bacterianas clivam sequências específicas de DNA, denominados sítios de restrição. A enzima EcoRI reconhece uma sequência de 6 pares de nucleotídeos do DNA 5'- GAATTC-3' e 3'-CTTAAG-5', caracterizados como palíndromo, ou seja, a sequência de um filamento é igual ao do complementar em polaridade inversa. Após a clivagem entre os nucleotídeos G e A, ocorre a formação de pontas adesivas, extremidades que podem acabar se conectando com bases complementares permitindo a formação de um

DNA recombinante (DUARTE, G. d. S.; SOARES, A. D. O.; 2022). Esse processo é demonstrado na Figura 6 (MOREIRA, C.; 2014).

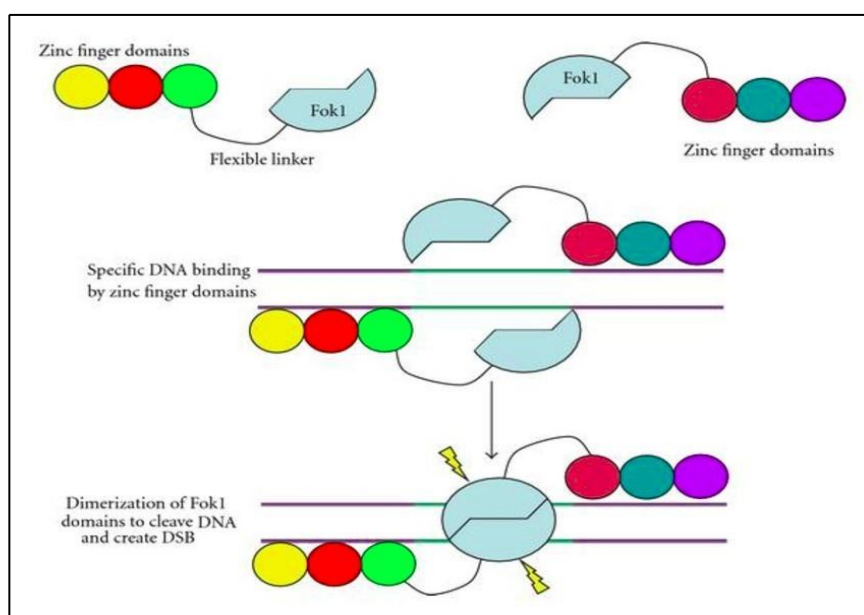
Figura 6 – Processo de clivagem da enzima de restrição Eco R1



FONTE: (MOREIRA, C.; 2014).

O ZFNs foram os primeiros métodos de induzir modificações no genoma, é uma nuclease artificial, formadas por diversas proteínas de dedo de zinco com uma nuclease bacteriana, geralmente a FokI que realiza a quebra na fita de DNA (DSB) em um local específico. Cada proteína reconhece uma sequência de 3 nucleotídeos de DNA, logo quanto mais número de proteínas mais específico será o ZFNs, dessa forma apresenta grande versalidade. O processo de clivagem necessita de duas ZFNs, onde as duas FokI se dimerizam - se unem - e realizam o DSB funcionando como proteínas de fusão, visto na Figura 7 (PAPAIOANNOU, I.; SIMONS, J. P.; OWEN, J. S.; 2012).

Figura 7 – Mecanismo de ação das nucleases ZFNs para edição genética



FONTE: (PAPAIOANNOU, I.; SIMONS, J. P.; OWEN, J. S.; 2012).

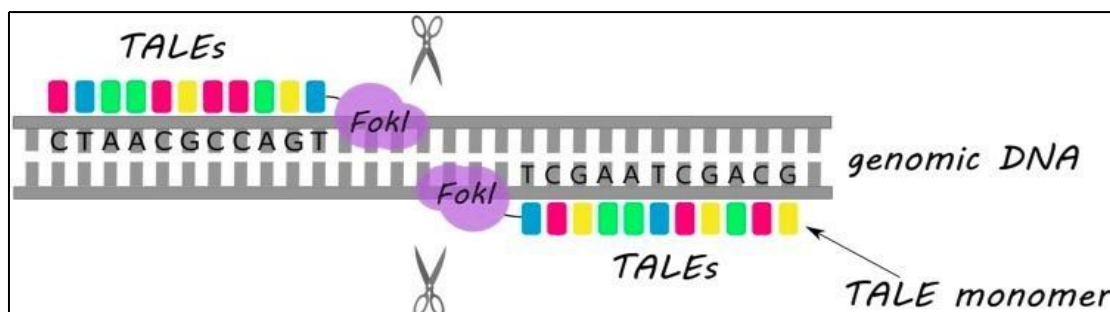
A tecnologia TALENs foi criada com base em proteínas TAL effector (TALE) advindas das bactérias *Xanthomonas* para reconhecer a sequência desejada. Assim como o ZFNs, possui uma nuclease FokI que se dimeriza para gerar a clivagem fundida a um domínio de ligação ao DNA. Cada segmento TALE é composto de 33 a 35 aminoácidos que unidos formam um monômero. Diferente do ZFNs, cada monômero reconhece apenas um nucleotídeo específico, conferindo maior precisão e especificidade que seu anterior (AKRAM, F. et al.; 2023).

Com isso, ao combinar diversos segmentos os TALENs reconhecem sequências maiores de DNA, aumentando sua precisão. A demonstração do processo é demonstrado na Figura 8 (ZYCH, A. O.; BAJOR, M.; ZAGOZDZON, R.; 2018)

Embora os três tipos de ferramentas apresentem suas vantagens, quando comparado ao sistema CRISPR-Cas há algumas desvantagens. Os ZFNs é uma nuclease complexa podendo gerar efeitos fora do alvo, semelhante os TALENs que são mais caros para construir seus vetores, possuindo riscos de mutações indesejadas (JANIK, E. et al; 2020). Por fim, o EcoRI

possui pouca flexibilidade limitando a edição genômica (DUARTE, G. d. S.; SOARES, A. D. O.; 2022). A comparação entre todas as tecnologias pode ser vista na Tabela 1.

Figura 8 – Mecanismo de ação das nucleases TALENs para edição genética



FONTE: (ZYCH, A. O.; BAJOR, M.; ZAGOZDZON, R. ; 2018).

Tabela 1 – Comparação entre métodos de edição gênica

Característica	ZFNs	TALENs	EcoRI	CRISPR-Cas9
Tipo	Nuclease proteica	Nuclease proteica	Enzima de restrição	Sistema RNA proteína
Mecanismo Clivagem	Domínio de dedo de zinco reconhece	Domínio TAL reconhece	Reconhece sequência GAATTC	RNA guia direciona Cas9
Especificidade	Moderada	Alta	Muito alta	Alta, possível off-target
Complexidade	Alta	Moderada	Baixa	Baixa
Vantagens	Específico se bem projetado	Modular, menor off-target	Simples, confiável	Fácil, rápido, versátil
Limitações	Difícil de projetar, caro	Construção laboriosa	Só corta sequência exata	Possível off-target, PAM necessário

FONTE: Autoria própria.

CRISPR/CAS9 EM IMUNOTERAPIA CONTRA CÂNCER

A imunoterapia associada a engenharia genética se tornou uma das abordagens mais promissoras no tratamento do câncer, pois utiliza o próprio sistema imunológico do paciente para identificar e eliminar seletivamente as células cancerígenas (WANG, S.-W. et al; 2022).

As células T desempenham um papel central na defesa do organismo produzindo citocinas inflamatórias (IL-2, IFN- γ , TNF- α) e moléculas citotóxicas que promovem a morte de células-alvo. Por outro lado, células tumorais desenvolvem estratégias para inibir a resposta imunológica explorando checkpoints imunológicos, para inibir a ativação das células T, reduzindo sua capacidade de eliminar o tumor (ALLEMAILEM, K. S. et al; 2023).

Dentre as aplicações da tecnologia CRISPR-Cas9, destaca-se a edição genética de células T e CAR-T, tema explorado em detalhe na seção seguinte. De forma complementar, essa ferramenta também permite a correção de mutações oncológicas em células tumorais. Por exemplo, a restauração do gene TP53 em células de câncer de pulmão aumentou a apoptose e reduziu o crescimento tumoral, enquanto a interrupção de PD-1 em modelos murinos fortaleceu a resposta imune antitumoral e diminuiu a progressão do tumor (SHAMJETSABAM, N. D. et al; 2024).

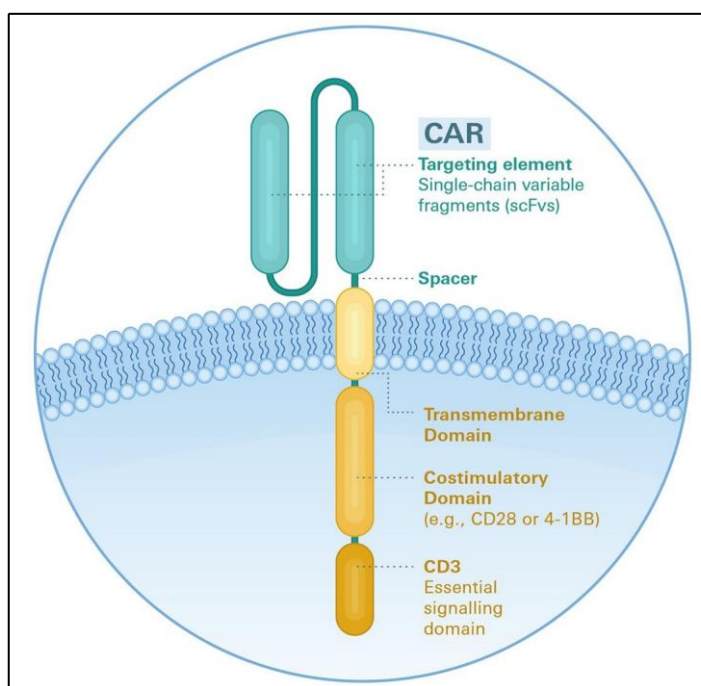
CÉLULAS CAR-T E CRISPR/CAS9

A terapia com células de antígeno quimérico (CAR-T) utiliza os linfócitos T geneticamente modificados para reconhecer e eliminar células tumorais. Essa tecnologia baseia-se na introdução de receptores de antígeno quimérico (CARs) — proteínas recombinantes expressas na superfície das células T — capazes de reconhecer antígenos tumorais de forma independente do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), conferindo especificidade e alta potência antitumoral (TAO, R. et al; 2024).

De acordo com Tao et al. (2024), foram registrados mais de 200 relacionados à terapia com células CAR-T em 2023. O CARs é composto por um fragmento variável de cadeia única (scFv), que reconhece antígenos específicos dos tumores, ligado a domínios transmembrana e regiões intracelulares de sinalização e coestimulação, promovendo a ativação e proliferação

das células T (AMIRI, M. et al; 2024). A figura 9 demonstra sua estrutura (HUDECEK LAB, UNIVERSITÄTSKLINIKUM WÜRZBURG; 2025).

Figura 9 – Estrutura das células de antígeno quimérico (CAR-T)



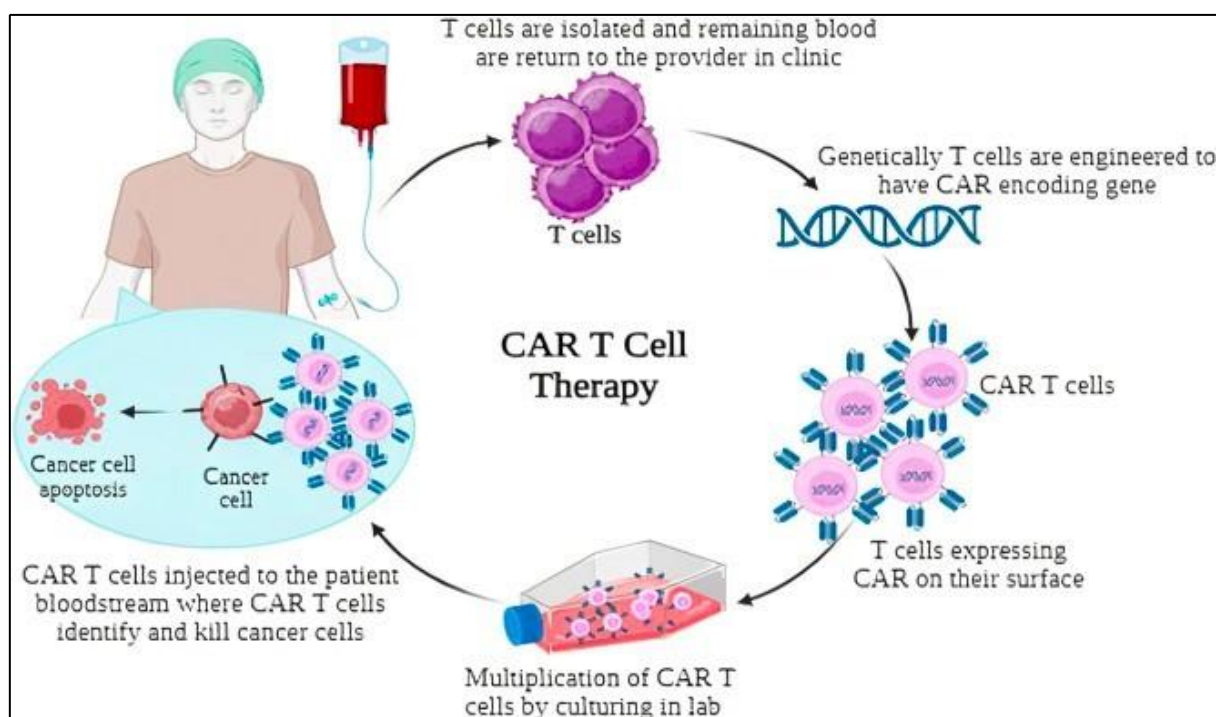
FONTE: (HUDECEK LAB, UNIVERSITÄTSKLINIKUM WÜRZBURG; 2025).

O mecanismo de ação envolve o reconhecimento do antígeno-alvo pelo CAR, o que ativa vias de sinalização intracelular capazes de induzir citotoxicidade, liberação de citocinas e morte das células tumorais, de forma independente do MHC, ou seja, sem a necessidade de apresentação antigênica pelas moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade, como ocorre nas células T convencionais (WANG, S.-W. et al; 2022).

O processo da terapia com células CAR-T se inicia coletando o sangue do paciente para isolar as células T, enquanto os demais componentes sanguíneos são devolvidos ao corpo. Essas células T são então modificadas geneticamente em laboratório para expressar receptores de antígeno quimérico (CARs), ocorrendo sua proliferação logo em seguida para garantir a eficácia terapêutica. Finalmente, as células CAR-T18 são reinfundidas no paciente por via intravenosa, circulando pelo sistema identificando e destruindo as células malignas

específicas, como demonstrado na Figura 10 (SHAMJETSABAM, N. D. et al; 2024).

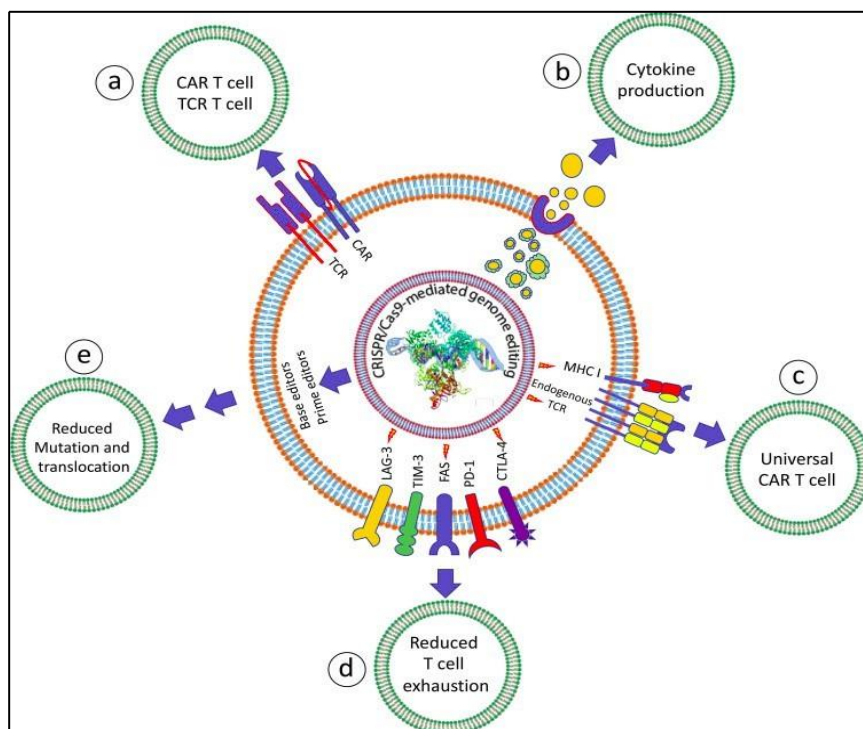
Figura 10 – Esquema do Processo de Terapia com Células CAR-T para Tratamento do Câncer



FONTE: (SHAMJETSABAM, N. D. et al; 2024).

Atualmente, a tecnologia CRISPR/Cas9 exerce papel fundamental na edição genética multiplex em células CAR-T, permitindo: a remoção do TCR endógeno para reduzir reações adversas; o nocaute de genes que promovem exaustão celular; o aumento da produção de citocinas para melhorar a ativação imune; e a criação de células CAR-T universais (“off-the shelf”) para uso em múltiplos pacientes. A Figura 11 ilustra de forma esquemática esses principais mecanismos, que colaboram para aprimorar a eficácia, segurança e aplicabilidade das terapias CAR-T baseadas em edição genética (ALLEMAILEM, K. S. et al; 2023).

Figura 11 – Representação esquemática dos principais mecanismos de edição genética mediada por CRISPR/Cas9 em células CAR-T para imunoterapia contra o câncer



FONTE: (ALLEMAILEM, K. S. et al; 2023).

Apesar da eficácia em neoplasias hematológicas, a terapia CAR-T enfrenta limitações, como alto custo e complexidade da produção autóloga, resistência tumoral e toxicidades, especialmente a síndrome de liberação de citocinas (CRS). A exaustão celular, o tráfego ineficiente e o microambiente tumoral imunossupressor dificultam ainda mais o tratamento de tumores sólidos (AMIRI, M. et al; 2024).

Estratégias futuras para a terapia CAR-T incluem otimização dos CARs, edição genética via CRISPR, terapias combinadas, desenvolvimento de células alogênicas “off-the-shelf” e modificações que aumentam a resistência ao microambiente tumoral e regulam a liberação de citocinas, visando maior eficácia e segurança clínica (BAGHINI, S. S.; AL. et al; 2022).

INIBIÇÃO DE CHECKPOINTS IMUNOLÓGICOS EM CÉLULAS CAR-T VIA CRISPR/CAS9

Os checkpoints imunológicos são proteínas que funcionam como “freios” do sistema imunológico, prevenindo autoimunidade e hiperatividade das células T; exemplos incluem PD-1, CTLA-4, LAG-3 e TIM-3. Células tumorais podem explorar esses freios para escapar da destruição, causando exaustão e diminuição da citotoxicidade das células T. Este efeito também é gerado pelo fator imunossupressor TGF- β que favorece a progressão tumoral, especialmente em tumores sólidos (DIMITRI, A.; HERBST, F.; FRAIETTA, J. A.; 2022).

Além disso, a interação Fas/FasL pode induzir morte celular programada (AICD) em células CAR-T ativadas. Dessa forma, a eficácia e a persistência antitumoral das células CAR-T podem ser aumentadas por meio da edição genética via CRISPR/Cas9, incluindo knock-out de genes inibitórios, Fas e TGF- β (AZANGOU-KHYAVY, M.; et al; 2020).

Em 2016, no Hospital Geral do PLA, China, foi realizado o primeiro ensaio clínico de fase I em humanos, utilizando CRISPR-Cas9 para editar a proteína PD-1 em células CAR-T de pacientes com câncer de pulmão avançado. Confirmou a segurança e viabilidade das células T editadas, com poucos efeitos adversos e baixa edição fora do alvo; contudo, a eficácia antitumoral foi limitada, necessitando de métodos de edição mais eficientes (LU, Y. et al; 2020).

Com o objetivo de aumentar a longevidade e o desempenho das células T projetadas, Stadtmayer et al. (2020) realizaram o estudo clínico NCT03399448 em que removiam o TCR endógeno, o modificando para expressar um TCR específico para os antígenos tumorais NY-ESO-1 e LAGE-1, e desativavam o checkpoint imunológico PD-1 (PDCD-1) utilizando o CRISPR/Cas9 em três pacientes com câncer refratário. O tratamento foi aceitável, com poucos efeitos colaterais e liberação de citocinas, as células T permaneceram na circulação por 3 a 9 meses.

Dois pacientes apresentaram redução tumoral e redução dos antígenos-alvo, enquanto um teve resposta parcial de redução em 50% da massa tumoral. Ocorreu efeitos fora do alvo devido a junções não-homólogas (NHEJ), mas, de modo geral, a edição de checkpoints

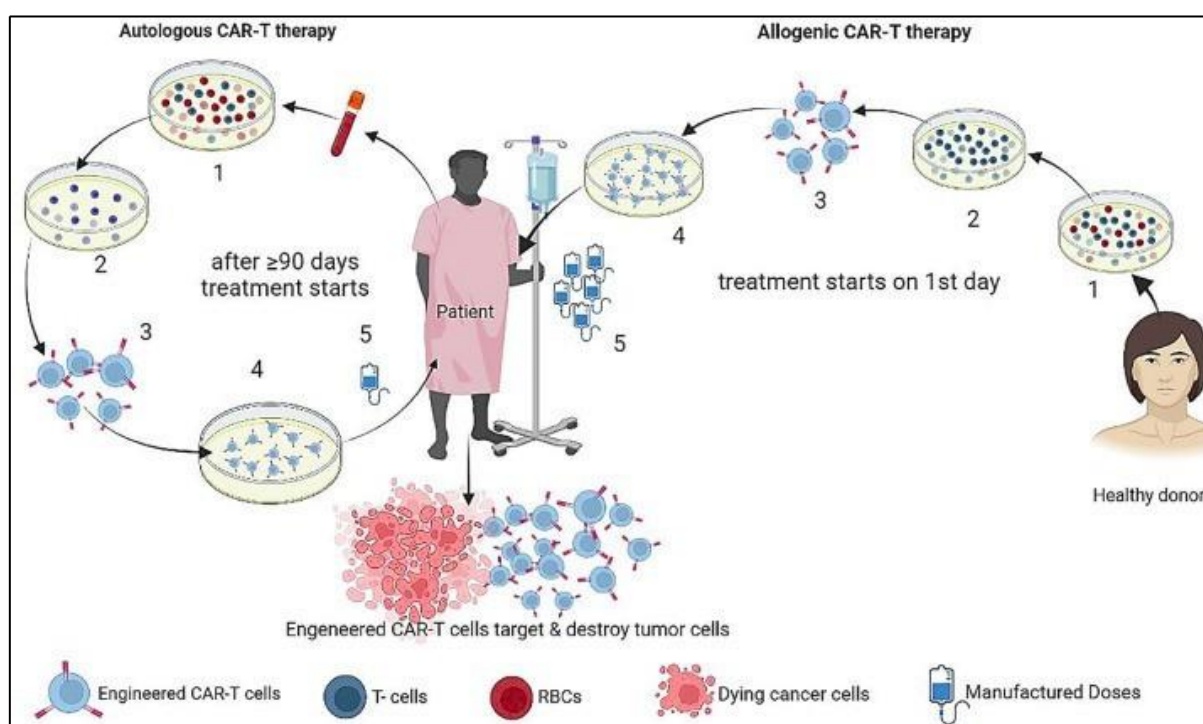
imunológicos mostrou-se segura e potencialmente eficaz (STADTMAUER, E. A. et al; 2020)

AUXÍLIO NO DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS CAR-T UNIVERSAIS

Atualmente a maioria das pesquisas de terapias clínicas utilizam as células CAR-T autólogas providas das células T do próprio paciente, apresentando como vantagem a baixa rejeição e evita doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD), em que as células do doador atacam o paciente (TAO, R. et al; 2024).

Contudo, também apresentam desvantagens como seu longo período de produção, custo elevado e qualidade celular variável, podendo ser visualizado na Figura 12 (KHAN, A.; SARKAR, E.; 2022).

Figura 12 – Tempo de atuação das células CAR-T autólogas e alogênicas



FONTE: (KHAN, A.; SARKAR, E.; 2022).

Dessa forma, houve a necessidade de desenvolver uma célula CAR-T universal, denominada alogênica, a partir de um doador saudável. Neste modelo as células T serão editadas e multiplicadas para uso de diversos pacientes, solucionando ambas as desvantagens,

como demonstrado na Figura (DING, S. et al; 2023). No entanto, o modelo apresenta risco de reações imunes bidirecionais, como doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD) e a resposta do hospedeiro contra o enxerto (HvGR), onde o paciente destrói as células do doador. A comparação entre os dois tipos de células CAR-T é demonstrado na Tabela 2 (DING, S. et al., 2023).

Tabela 2 – Comparação de células CAR-T autólogas e alogênicas

Característica	Terapia Autóloga CART-Célula	Terapia Alogênica CAR-T Célula
Definição	As próprias células T do paciente	Doador T células
Imunocompatibilidade	Alto	Moderado/baixo
Tempo de Preparação	Mais tempo	Mais curto
Custo	Mais alto	Mais baixo
Riscos GvHD	Baixo	Moderado/Alto
Atraso do tratamento	Possível	Menos
Indicações	A maioria dos tratamentos	Casos específicos
Eficácia	Variável	Mais alto
Custo Eficácia	Moderado	Mais alto

FONTE: (DING, S. et al., 2023).

Para superar as complicações associadas às células CAR-T alogênicas, diversos estudos exploraram o uso da tecnologia CRISPR/Cas9 para promover edições gênicas estratégicas. As principais modificações incluem a remoção dos genes do receptor de célula T (TCR, TRAC/TRBC), prevenindo a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD); a deleção da β 2-microglobulina, responsável pela expressão de HLA classe I, evitando a rejeição imunológica pelo paciente; e o nocaute do gene PD-1, que aumenta a persistência e a atividade antitumoral das células (AMIRI, M. et al; 2024).

Um exemplo notável é o estudo de Ren et al. (2017), que aplicou a edição simultânea desses genes para gerar células CAR-T universais a partir de células T alogênicas, demonstrando eficácia antitumoral equivalente às células autólogas e menor risco de GVHD.

Em modelos pré-clínicos murinos, os resultados mostraram alta eficiência da edição, baixa alorreatividade e ausência de GVHD. Além de diminuir a exaustão das células T modificadas pela exclusão do PD-1. Com esses resultados foi viabilizado a produção de células CAR-T universais. No entanto, algumas limitações permanecem, incluindo efeitos fora do alvo do CRISPR, ativação de células NK devido à ausência de HLA-I, e a necessidade de validação de segurança e eficácia em ensaios clínicos humanos (DING, S. et al; 2023).

Um estudo mais recente desenvolveu células CAR-T alogênicas para o uso em diversos pacientes. Em 2021, a CRISPR Therapeutics publicou resultados preliminares 25 do ensaio clínico de Fase 1 CARBON (NCT04035434), que verificou a eficácia da terapia CAR-T alogênica CTX110 em pacientes adultos com linfomas de células B CD19+ recidivantes ou refratários (KHAN, A.; SARKAR, E.; 2022).

Dos 30 pacientes incluídos no estudo, apenas 26 receberam o tratamento e foram acompanhados, demonstrando que o CTX110 foi bem tolerado em todos os níveis de dose, sem ocorrência de doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) ou outras reações significativas (THERAPEUTICS, C.; 2021).

Em pacientes que receberam nível de dose maior ou igual a 100×10^6 células CAR+, a taxa de resposta global (ORR) foi de 58% e a taxa de resposta completa (CR) foi de 38% na análise intent-to-treat; em análise modificada (mITT), a ORR foi de 61%. Entre os indivíduos

com linfoma difuso de grandes células B (LBCL), 21% alcançaram resposta completa aos seis meses, com duração máxima da resposta superior a 18 meses. Esses resultados indicam a segurança, viabilidade e eficácia promissora do uso de células CAR-T alogênicas derivadas de doadores saudáveis (THERAPEUTICS, C.; 2021).

Outra vertente para produção de CAR-T universais foi proposta por Iriguchi et al. (2021) que utilizou células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) capazes de desempenhar funções típicas das células T, com expansão de aproximadamente 200 vezes, indicando alta capacidade proliferativa. Essa vantagem permite produção padronizada em larga escala, edição genética precoce (como inserção de CARs ou deleção de genes imunorregulatórios e redução de riscos de rejeição e GVHD, mostrando potencial para gerar células CAR-T universais mais seguras e eficazes.

Essa abordagem, portanto, representa uma alternativa de suprimento contínuo e padronizado de células CAR-T, capaz de superar as limitações logísticas das terapias autólogas (IRIGUCHI, S. et al; 2021).

FERRAMENTAS DO CRISPR/CAS9 NO CÂNCER

Existem diferentes modelos de CRISPR/Cas9 sendo utilizados para triagens funcionais em células T e modelos tumorais, permitindo identificar genes que afetam a proliferação das células cancerígenas, assim como a persistência, a exaustão e a eficácia citotóxica das células CAR-T, auxiliando no desenvolvimento de terapias anticâncer (WU, Y. et al; 2025).

Dessa forma, o CRISPRi, CRISPRa e CRISPRKO são ferramentas de descoberta de novos alvos e mecanismos de resistência, auxiliando nas edições de CRISPR/Cas9 ou tecnologias de prime editing, que consistem em correções genéticas de alta precisão sem causar quebras de fita dupla no DNA (JANIK, E. et al; 2020).

Triagens: CRISPRko, CRISPRi E CRISPRa

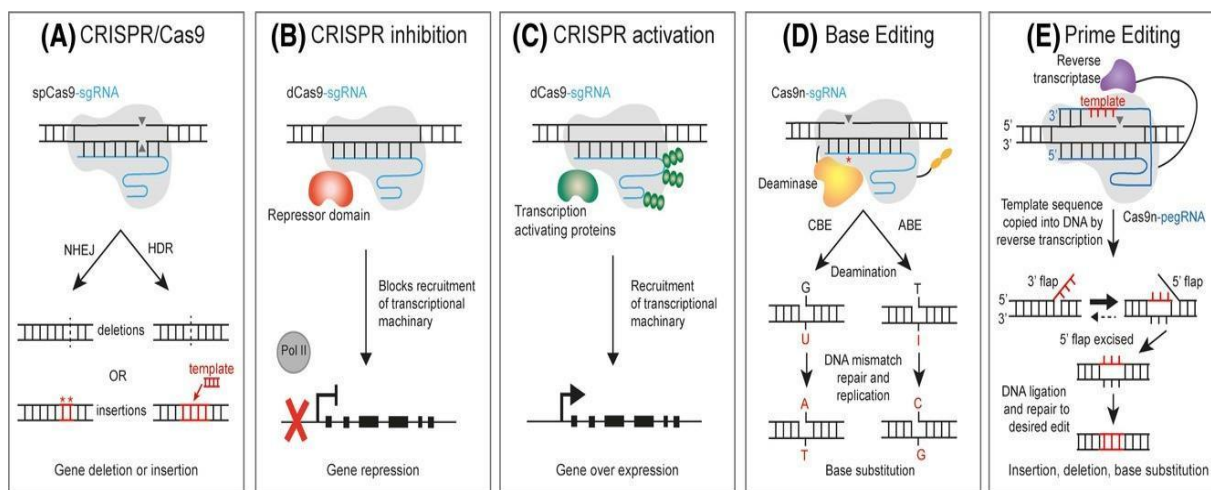
O CRISPRko utiliza a proteína Cas9 para causar uma quebra de fita dupla (DSB) causando uma mutação permanente, bloqueando o reparo por NHEJ. Esta técnica é útil para

identificar genes supressores de tumor, contudo por conta do knockout completo pode não reproduzir a segmentação terapêutica corretamente, dificultando os estudos (DING, S. et al; 2023).

Em seu estudo, Wang et al. (2021) utilizou CRISPRko in vivo em modelos de câncer de mama triplo-negativo (TNBC), os resultados implicaram que a deleção da E3 ubiquitina ligase Cop1 reduziu a liberação de quimiocinas associadas a macrófagos, diminuiu a infiltração de macrófagos tumorais, fortalecendo a resposta à imunoterapia baseada em checkpoint inhibitors e aumentando a imunidade antitumoral.

Para reduzir as desvantagens do CRISPRko, o CRISPRi utiliza a enzima dCas9 (dead Cas9), uma forma modificada do Cas9 que se conectar ao DNA alvo mas não realiza a clivagem. Essa enzima é unida ao domínio repressor de transcrição KRAB (Krüppel-associated box), formando um complexo que gera a supressão reversível da expressão gênica, por conta disso que esse método é denominado interferência. A diferença entre as ferramentas é demonstrada na Figura 13 (POTTS, M. A. et al; 2020).

Figura 13 – Diferenças entre as ferramentas de CRISPR/Cas9



FONTE: (POTTS, M. A. et al; 2020).

Este evento ocorre quando bloqueia o início da transcrição ao se ligar à região promotora do gene, ou quando ocorre o recrutamento de enzimas modificadoras de histonas pelo domínio KRAB, que condensam a cromatina do DNA a tornando incapaz de realizar a transcrição mesmo sem estar ligada ao complexo dCas9-KRAB (ZHOU, H. et al; 2024).

Um estudo pré-clínico realizado por Yoshida et al. (2018) utilizou a ferramenta CRISPRi direcionada ao promotor de Δ Np63, uma isoforma do gene TP63 que possui alta expressão em carcinomas de células escamosas (SCC) de pulmão e esôfago. Em seus resultados foi observado a redução da expressão de Δ Np63 in vitro, aumentando a apoptose das células tumorais. Em modelos in vivo em camundongos, houve a redução do desenvolvimento tumoral, contudo ainda há alguns desafios neste método como efeitos fora do alvo e dificuldade de entrega do sistema.

Diferente do CRISPRi, a ativação por CRISPRa utiliza o dCas9 se ligando a domínios ativadores de transcrição se conectando ao potencializador do gene alvo onde aumenta o fator de transcrição e a proteína. As versões mais utilizadas desta ferramenta são o SunTag, SAM ou VPR, permitindo identificar genes ou oncôgenes que geram resistência a drogas, além de ocasionar a superexpressão de genes para induzir resposta do sistema imune contra as células tumorais, simulando efeitos terapêuticos (DING, S. et al; 2023).

Desse modo, o estudo de Wang et al; (2019) utiliza da versão dCas9-SAM para aumentar a expressão de antígenos tumorais ativando genes endógenos de células de câncer de mama triplo-negativo (TNBC). Potencializando seu reconhecimento pelo sistema imunológico e estimulando a ação das células T CD8⁺. Os resultados mostraram que a entrega intratumoral de AAV-CRISPRa promoveu regressão tumoral, assim como um efeito “abscopal”, ou seja, efeitos anti-tumorais em outros locais.

As triagens CRISPR podem ocorrer in vitro ou in vivo, ou seja, em células laboratorialmente ou em organismos. As triagens in vitro apresentam a vantagem de controle em suas análises e produção em larga escala, enquanto a in vivo oferece informações importantes sobre a ação dos genes (WU, Y. et al; 2025).

Edição CRISPR Prime Editing (PE)

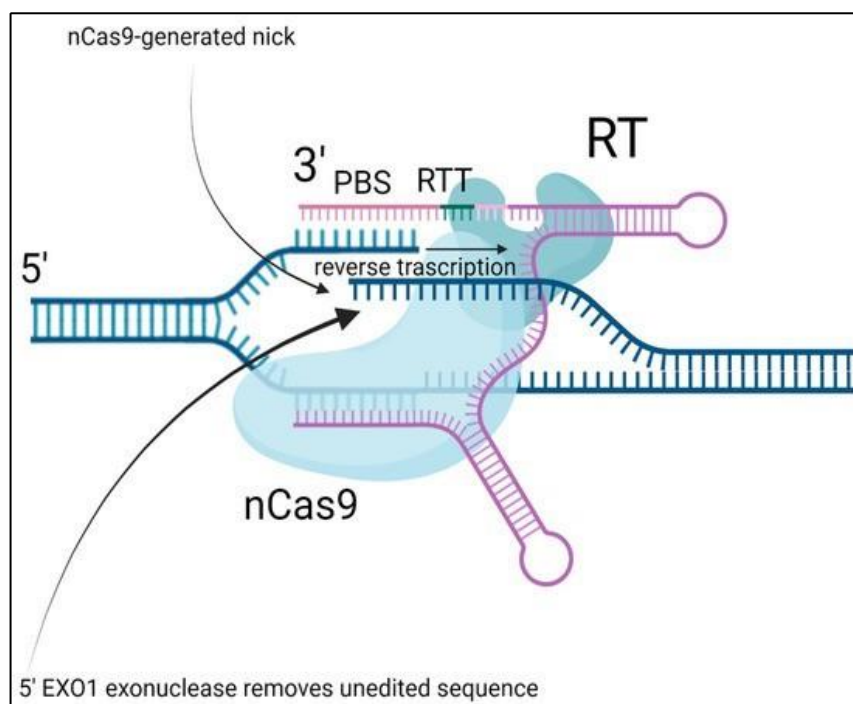
O sistema CRISPR/Cas9 possui limitações em seu método de edição gênica, pois suas quebras de fita dupla (DSBs) podem gerar mutações indesejadas, como inserção, deleção ou inversões de genes causado majoritariamente pela via de reparo NHEJ (MENTANI, A.; MARESCA, M.; SHIRIAEVA, A.; 2025).

Para superar essas limitações, Anzalone et al. (2019) desenvolveram o prime editing (PE) que consiste em um método de edição do genoma sem causar a DSB, gerando modificações precisas. É formado pelo Cas nikase (nCas9), uma versão modificada do Cas9 realizando quebra de fita simples, pela transcriptase reversa (RT), enzima que produz DNA a partir de um molde de RNA, e pegRNA, com função de guiar até o alvo e fornecer o molde para a edição específica.

Dentre as três versões do prime editing, o PE3 é a mais moderna e utilizada, pois seu mecanismo de ação consiste em o pegRNA guiar o nCas9-RT até o DNA alvo, onde uma das fitas é nickada, ou seja, ela é clivada, permitindo que o pegRNA sirva de molde para a edição de forma precisa. Após isso, um segundo RNA guia opcional gera uma nick na fita complementar ocasionando o reparo natural da célula e aumentando a eficiência da edição (PETROVA, I. O.; SMIRNIKHINA, S. A.; 2025).

Dessa forma, os nicks garantem maior precisão e redução de efeitos fora do alvo por conta de clivar apenas uma fita de DNA, como demonstrado na Figura 14 (PETROVA, I. O.; SMIRNIKHINA, S. A. 2025).

Figura 14 – Mecanismo de ação do Prime Editing



FONTE: (PETROVA, I. O.; SMIRNIKHINA, S. A.; 2025).

Dentre suas atuações, O prime editing é uma ferramenta preciosa para o tratamento do câncer, permitindo a modelagem de genes de relacionados à doença, a correção de mutações oncogênicas e a restauração de genes supressores de tumor (SEN, D.; et al; 2023).

Um estudo aplicou esta técnica com o intuito de utilizar o PE para corrigir mutações do KRAS, um gene oncogênico que atua na proliferação celular desenfreada. O objetivo era produzir pegRNAs universais para corrigir 12 mutações dos genes KRAS G12/G13, responsáveis por aproximadamente 94% das mutações KRAS em tumores humanos, na maioria em câncer pancreático e colorretal (JANG, G.; KWEON, J.; KIM, Y.; 2023).

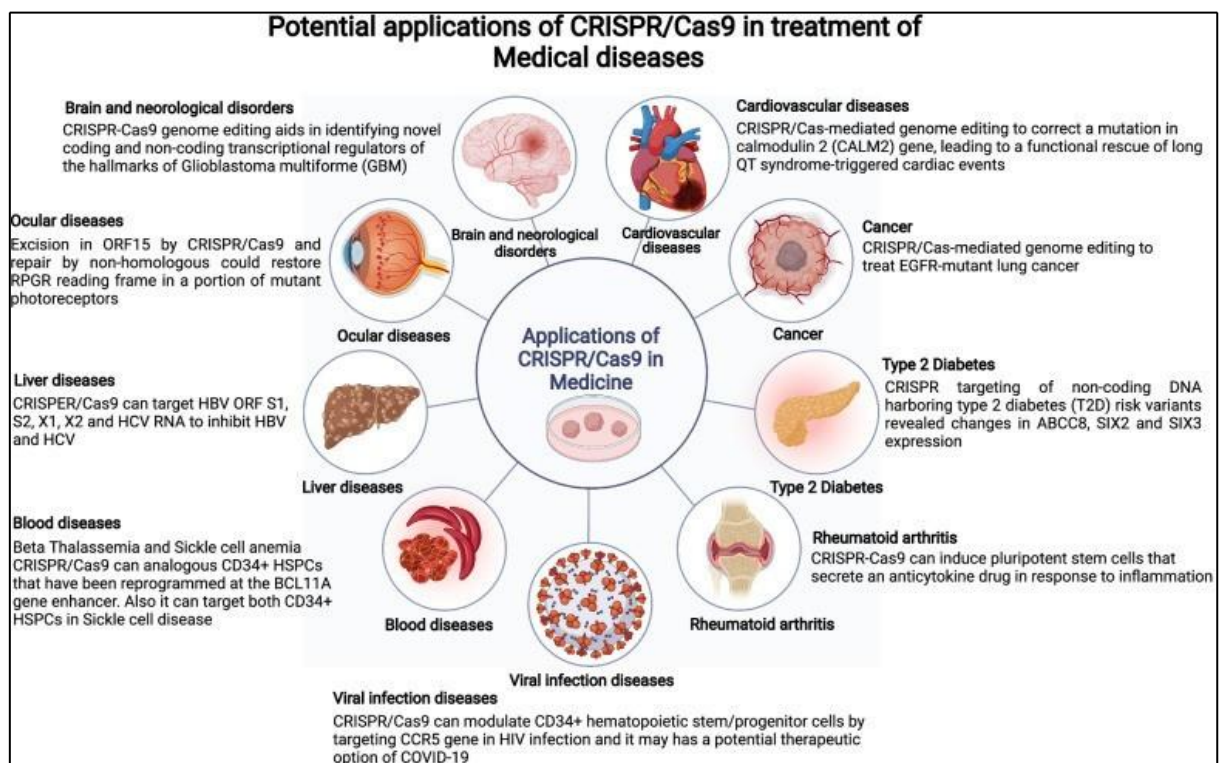
Inicialmente, foi utilizado células humanas embrionárias do rim HEK293T/17 para testar as 12 mutações, o pegRNA universal demonstrou êxito em os corrigir. Em seguida, a estratégia foi validada em três linhas tumorais humanas com mutações KRAS naturais. Os resultados evidenciaram uma menor eficiência do que no modelo artificial, e surgiram possíveis efeitos fora do alvo, indicando que mais estudos, especialmente in vivo, são

necessários antes da aplicação clínica (JANG, G.; KWEON, J.; KIM, Y.; 2023).

APLICAÇÃO DO CRISPR/CAS9 EM DOENÇAS NÃO CANCEROSAS

Além do câncer, a tecnologia CRISPR/Cas9 pode ser utilizada no tratamento de diversas doenças. Atualmente, estudos indicam esse meio para a correção de mutações causadoras de doenças hereditárias, como a distrofias musculares, anemia falciforme e beta-talassemia dependente de transfusão, assim como a inativação de genes associados a infecções virais, incluindo HIV e hepatite B, como demonstrado na Figura 15 (RASUL, M. F. et al; 2022).

Figura 15 – Aplicações do CRISPR/Cas9 em doenças



FONTE: (RASUL, M. F. et al; 2022).

Anemia falciforme (SCD) e Beta-talassemia dependente de transfusão (TDT)

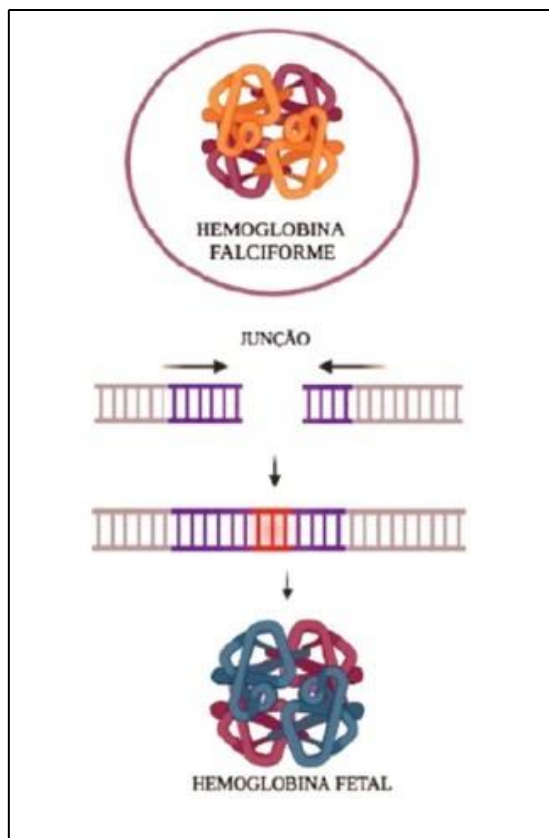
Causadas pela mutação de um gene, as doenças falciforme (SCD) e beta-talassemia são consideradas doenças monogênicas graves em que há a mutação no gene da beta globina (HBB) responsável pela síntese da hemoglobina adulta (HbA), que quando mutado passa a produzir a hemoglobina alterada (HbS) (PEREIRA, B. N. S. S.; AGUIAR, M. M.; 2025).

Em 2019 nos Estados Unidos, ocorreu a primeira aplicação clínica em humanos utilizando o sistema CRISPR/Cas9 como uma forma de terapia para doença falciforme com a paciente Victoria Gray, sendo tratada pela versão inicial da terapia chamada CTX001, nomeada como Casgevy. As empresas Vertex Pharmaceuticals e CRISPR Therapeutics receberam aprovações regulatórias para comercializar o tratamento nos EUA e Reino Unido (VERTEX PHARMACEUTICALS AND CRISPR THERAPEUTICS; 2023).

Publicado por Frangoul et al. (2020), a terapia CTX001 atua na edição do gene BCL11A que reprime a hemoglobina fetal (HbF), pela hemoglobina adulta (HbA), sendo um processo natural após o desenvolvimento infantil. Contudo, indivíduos com doença falciforme (SCD) ou beta-talassemia dependente de transfusão (TDT), a síntese da hemoglobina é alterada.

Utilizando o sistema CRISPR/Cas9 e o mecanismo de reparo por junção de extremidades não homóloga (NHEJ), ocorre a deleção da região regulatória do gene BCL11A. Desse modo, o HbF começa a ser produzido novamente reduzindo os níveis de HbS no sangue e atenuando os sintomas da doença (FRANGOUL, H. et al; 2020). O processo pode ser demonstrado na Figura 16 (PEREIRA, B. N. S. S.; AGUIAR, M. M.; 2025).

Figura 16 – Deleção do Gene BCL11A via NHEJ para Reativação da Hemoglobina Fetal



FONTE: (PEREIRA, B. N. S.; AGUIAR, M. M.; 2025).

Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

O uso do sistema CRISPR/Cas9 tem se mostrado promissor para o tratamento de infecções virais. O HIV é um retrovírus que insere DNA viral no DNA das células do hospedeiro, especialmente linfócitos T CD4+, causando a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A expressão do gene HIV-1 é provocado pelas repetições terminais longas (LTRs), que participam da inserção do DNA retroviral no DNA hospedeiro. Com isso, mutações do LTRs podem causar a clivagem do DNA do HIV-1, bloqueando sua expressão, essa técnica se denomina excisão proviral (BAGHINI, S. S.; AL. et al; 2022).

Em 2013, Ebina et al. (2013) utilizaram o CRISPR/Cas9 para clivar as regiões LTRs do HIV-1 criando sgRNA específicos para elas. Em 2015, seguindo a mesma técnica de excisão proviral Zhu et al. (2015) criaram 10 guia de RNA (gRNA) para as regiões de LTR, o gene pol e tat/rev, sendo capazes de induzir o DSB no genoma do HIV integrados nas células JLat10.6, uma célula de linfoma T (Jurkat). Essa técnica se mostrou eficaz atingindo tanto em vírus ativos quanto latentes, o que indicaria que o DNA viral inacessível aos medicamentos antirretrovirais. Contudo, por ser realizada em uma linha celular clonada, não se sabe o comportamento em células humanas com provírus naturais em seus loci.

Em comparação, em 2017, o laboratório de Yin et al. (2017) utilizou a versão saCas9 para editar as regiões LTR e Gag / Pol, realizando primeiramente in vitro para avaliar a eficiência da técnica e depois in vivo em três tipos de camundongos administrando os vetores AAV. Foi verificada uma excisão parcial do DNA proviral, demonstrando que esse modelo é funcional tanto em cultura de células quanto em modelos animais, representando um passo promissor para estratégias de eliminação do provírus do HIV.

Este último trabalho foi essencial para a criação da EBT-101 da empresa Excision BioTherapeutics, que utiliza vetores AAV para realizar a excisão proviral do DNA do HIV pelo sistema CRISPR/Cas9 (GUO, N. et al; 2022).

O ensaio clínico fase 1/2 foi realizado nos EUA em 2022, o primeiro participante humano recebeu o tratamento em julho do mesmo ano. Em 2023 a empresa publicou dados interinos da coorte inicial composta de 3 participantes, indicando ausência de toxicidade que limitasse a dose ou efeitos adversos graves. Em maio de 2024, a empresa anunciou que o ensaio atendeu ao endpoint primário de segurança e ao endpoint secundário de imunogenicidade e biodistribuição (LETCHUMANAN, P.; DAS, K. T.; 2025).

DISCUSSÃO

O uso da tecnologia CRISPR/Cas9 na terapia contra o câncer tornou-se um dos principais focos da edição gênica. Os resultados clínicos e experimentais das aplicações do

CRISPR/Cas9 em células CAR-T vistos anteriormente comprovam que esse sistema possui viabilidade e segurança, causando maior resistência antitumoral (AZEED, S. S.; HAMAD, E. A.; 2024).

Entretanto, apesar do CRISPR/Cas9 ser uma das tecnologias de edição gênica mais utilizadas atualmente, ela ainda apresenta limitações e desafios especialmente em aplicações in vivo. Os principais problemas deste modelo são os efeitos fora do alvo e desafios de entrega (GUO, N. et al; 2022).

Os efeitos fora do alvo podem ocorrer por conta da interação do Cas9 em regiões genômicas semelhantes aos sítio-avo, baixa especificidade do sgRNA e tempo prolongado da expressão do Cas9. Este desafio é muito preocupante em ensaios clínicos e aplicações terapêuticas, sendo necessário a criação de estratégias para detecção e mitigação das mutações (HRYHOROWICZ, M. et al; 2017).

Dentre as estratégias podemos citar: desenvolvimento de um design específico do sgRNA que reconhece sequências-alvo exclusivas com poucos número de regiões homólogas; utilizar variantes do Cas9 spCas9-HF1 que fragilizam a interação entre o DNA e o Cas9 reduzindo as clivagens fora do alvo; e utilização de editores primários (PEs) que não requerem um DNA molde e não causam a DSB (GUO, N. et al; 2022).

A Tabela 3 apresenta um panorama geral de ensaios clínicos recentes utilizando células CAR-T editadas por CRISPR/Cas9 em diferentes tipos de câncer, incluindo inovações em checkpoints imunológicos e estratégias de edição genética (KHAN, A.; SARKAR, E.; 2022); (TAO, R. et al; 2024).

Tabela 3 – Ensaios clínicos de células CAR-T com edição CRISPR/Cas9 em diferentes tipos de câncer

Tipo de câncer	Alvo / CAR-T	Inovação / Resultados do CRISPR	Fase de Desenvolvimento	Ensaio Clínico – Identificação
Câncer epitelial gastrointestinal metastático	Inibição do ponto de controlo intracelular	CISH (inibição) – primeira edição intracelular em humanos, segura e viável	Fase - 1/2	NCT04426 669
Mieloma múltiplo, melanoma, sarcoma sinovial, lipossarcoma mixoide/célula redonda	NY-ESO-1 redirecionado autólogo CAR-T	TCR, PD-1 (nocaute), NYESO (knock-in); bem tolerada, efeitos mínimos	Fase - 1	NCT03399 448
Câncer de esôfago	CAR-T autólogo	PD-1 (nocaute); tratamento bem tolerado sem eventos adversos inesperados	Concluído	NCT03081 715

Pulmão de células não-pequenas metastáticas	CAR-T autólogo	PD-1 (nocaute); aplicação clínica geralmente segura e viável	Fase - 1 concluída	NCT02793 856
Tumor sólido	α PD1-MSLNCAR-T	CAR-T bloqueando PD1 diretamente; inovador para tumores sólidos	Fase inicial 1	NCT05373 147
Malignidades hematológicas linfoides	Células CAR-T com alvo duplo CD20/CD22	CAR-T com alvo duplo reduz risco de escape tumoral	Fase inicial 1	NCT04283 006
Cânceres CD44v6-positivos	Células CD44v6 CAR-T	Ensaio em fase 2; segurança em tumores sólidos	Fase 2	NCT04427 449
BCL	CD19 específico CAR-T	HPK-1 (nocaute) – edição de gene visando maior eficácia	Fase-1	NCT04037 566

FONTE: ADAPTADO DE (KHAN, A.; SARKAR, E.; 2022); (TAO, R. et al;2024).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tecnologia CRISPR/Cas9 se tornou uma das ferramentas mais utilizadas na edição gênica, considerada uma técnica de alta precisão e grande variedade de aplicações, especialmente quando direcionada em terapias contra o câncer. Dentre seus meios de terapias, a utilização de células CAR-T e células T possibilitam a correção de mutações oncológicas, inibição dos checkpoints imunológicos e desenvolvimento de células imunoterapêuticas mais eficazes e seguras.

Apesar do seu grande potencial, a integração clínica do CRISPR/Cas9 ainda enfrenta limitações consideráveis que interferem em sua eficácia e segurança, como efeitos fora do alvo e desafios nos métodos de entrega in vivo.

Neste contexto, variantes do CRISPR/Cas9 como o CRISPRko, CRISPRi, CRISPRa e especialmente o prime editing, permite ampliar a precisão e correção genética, reduzindo mutações indesejadas. Assim, o desenvolvimento contínuo dessas ferramentas permitem que o CRISPR/Cas9 se consolide como um dos marcos da biotecnologia moderna, aumentando seu futuro nas terapias gênicas.

REFERÊNCIAS

AKRAM, F. et al. An insight into modern targeted genome-editing technologies with a special focus on crispr/cas9 and its applications. *Molecular Biotechnology*, Springer, v. 65, n. 2, p. 227–242, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12033-022-00501-4>>.

ALAGOZ, M.; KHERAD, N. Advance genome editing technologies in the treatment of human diseases: Crispr therapy (review). *International Journal of Molecular Medicine*, v. 46, n. 2, p. 521–534, 2020.

ALLEMAILEM, K. S. et al. Innovative strategies of reprogramming immune system cells by tarAplicação: silenciamento de $\Delta Np63$ reduz crescimento tumoral e aumenta apoptose em SCC. *getting crispr/cas9-based genome-editing tools: A new era of cancer management*.

International Journal of Nanomedicine, v. 18, p. 5531–5559, September 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/IJN.S424872>>.

AMIRI, M. et al. Optimizing cancer treatment: the synergistic potential of car-t cell therapy and crispr/cas9. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1462697, November 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1462697>>.

ANZALONE, A. V. et al. Search-and-replace genome editing without double-strandbreaks or donor dna. *Nature*, v. 576, p. 149–157, 2019.

AZANGOU-KHYAVY, M.; et al. Crispr/cas: From tumor gene editing to to cell-based immunotherapy of cancer. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 2062, sep 2020.

AZEEZ, S. S.; HAMAD, E. A. Advances in crispr-cas technology and its applications: revolutionising precision medicine. *Frontiers in Genome Editing*, v. 6, p. 1509924, 12 2024. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11669675/>>.

AZEVEDO, A. D. S. Edição genética: a modificação de células germinais para prevenção de doenças hereditárias = Gene Editing: The Modification of Germ Cells for the Prevention of Hereditary Diseases. Dissertação (Dissertação de Mestrado) — Universidade de Coimbra, Faculdade de Direito, Coimbra, mar. 2024. Orientador: André Gonçalo Dias Pereira. Disponível em: <<https://hdl.handle.net/10316/114963>>.

BAGHINI, S. S.; AL. et. Aplicação crispr/cas9 em terapia do câncer: uma ferramenta pioneira de edição de genoma. *Letras de Biologia Celular e Molecular*, v. 27, n. 1, p. 35, 2022.

DIMITRI, A.; HERBST, F.; FRAIETTA, J. A. Engineering the next-generation of car t-cells with crispr-cas9 gene editing. *Molecular Cancer*, v. 21, n. 1, p. 78, March 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12943-022-01559-z>>.

DING, S. et al. Crispr/cas9-mediated genome editing in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 22, p. 16325, 2023.

DUARTE, G. d. S.; SOARES, A. D. O. Enzimas de restrição: uma revisão bibliográfica. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2022. Acesso em: 26 out. 2025.

Disponível em: <<https://ime.events/iii-conbrasau/pdf/7404>>.

EBINA, H. et al. Harnessing the crispr/cas9 system to disrupt latent hiv-1 provirus. Scientific Reports, v. 3, p. 2510, 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep02510>>.

FRANGOUL, H. et al. Crispr-cas9 gene editing for sickle cell disease and beta-thalassemia. New England Journal of Medicine, v. 384, n. 3, p. 252–260, 2020. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2031054>>.

GANGULY, C. et al. Unity among the diverse rna-guided crispr-cas interference mechanisms. Journal of Biological Chemistry, v. 300, n. 6, p. 107295, 2024.

GOSTIMSKAYA, I. Crispr–cas9: a history of its discovery and ethical considerations of its use in genome editing. Publishing, v. 87, n. 8, p. 777–788, 08 2022.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9377665/>>.

GUO, N. et al. The power and the promise of crispr/cas9 genome editing for clinical application with gene therapy. Journal of Advanced Research, v. 40, p. 135–152, 2022.

HE, S. The first human trial of crispr-based cell therapy clears safety concerns as new treatment for late-stage lung cancer. Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 5, n. 1, p. 168, ago. 2020.

HE, Y. et al. The CRISPR/Cas system: A customizable toolbox for molecular detection. Genes, v. 14, n. 4, p. 850, 2023.

HRYHOROWICZ, M. et al. Crispr/cas9 immune system as a tool for genome engineering. Archives of Immunology and Therapy Experimental, v. 65, p. 233–240, 2017. HUDECEK LAB, UNIVERSITÄTSKLINIKUM WÜRZBURG. CAR Technology: Chimeric

antigen receptor (CAR) modified T cells. 2025. <https://www.ukw.de/en/portal/researchhudecek-lab/car-technology/>. Acesso em: 03 nov. 2025.

IRIGUCHI, S. et al. A clinically applicable and scalable method to regenerate t-cells from ipscs for off-the-shelf t-cell immunotherapy. Nature Communications, v. 12, p. 430, 2021.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7814014/>>.

ISHINO, Y.; KRUPOVIC, M.; FORTERRE, P. History of crispr-cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of Bacteriology*, v. 200, n. 7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jb00580-17>>.

JANG, G.; KWEON, J.; KIM, Y. Crispr edição privilegiada para correção não restrita de variantes kras oncogênicas. *Communications Biology*, v. 6, n. 1, p. 681, 2023. Acesso em: 5 nov. 2025. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10313713/>>.

JANIK, E. et al. Various aspects of a gene editing system—crispr—cas9. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 24, p. 9604, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms21249604>>.

JANSEN, R. et al. Identification of genes that are associated with dna repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 1565–1575, 2002.

KHAN, A.; SARKAR, E. O crispr/cas9 incentivou a imunoterapia com células car-t relatando resultados clínicos eficientes e seguros para o câncer. *Tratamento do Câncer e Comunicações de Pesquisa*, v. 33, p. 100641, 2022.

KOVALEV, M. A.; DAVLETSHIN, A. I.; KARPOV, D. S. Engineering cas9: next generation of genomic editors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer, v. 108, p. 209, 2024. Published: 14 February 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-024-13056-y>>.

LAURENT, M. et al. Crispr-based gene therapies: From preclinical to clinical treatments. *Cells*, v. 13, n. 10, p. 800, 2024. Publicado em 8 de maio de 2024.

LETCHUMANAN, P.; DAS, K. T. The role of genetic diversity, epigenetic regulation, and sex-based differences in hiv cure research: a comprehensive review. *Epigenetics & Chromatin*, v. 18, n. 1, p. 1, 2025.

LIU, Z.; AL. et. Avanços recentes e aplicações do crispr-cas9 na imunoterapia contra o câncer. *Molecular Cancer*, v. 22, n. 1, p. 35, fev. 2023. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1186/s12943-023-01738-6>>.

LU, Y. et al. Safety and feasibility of crispr-edited t cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. Nature Medicine, 2020. Disponível em:

<https://www.chenliulab.org/pub/safety.pdf?utm_source=chatgpt.com>.

MENTANI, A.; MARESCA, M.; SHIRIAEVA, A. Prime editing: Mechanistic insights and dna repair modulation. Cells, v. 14, n. 4, p. 277, 2025.

MOREIRA, C. Enzima de restrição. Revista Ciência Elementar, v. 2, n. 2, p. 033, 2014.

OKOLI, A. et al. Crispr/cas9-advancing orthopoxvirus genome editing for vaccine and vector development. Viruses, MDPI, v. 10, n. 1, p. 50, 1 2018. Disponível em:

<<https://www.mdpi.com/1999-4915/10/1/50>>.

PAPAIIOANNOU, I.; SIMONS, J. P.; OWEN, J. S. Targeted in situ gene correction of dysfunctional apoe alleles to produce atheroprotective plasma apoe3 protein. Cardiology Research and Practice, v. 2012, p. 16, 2012.

PEREIRA, B. N. S. S.; AGUIAR, M. M. Análise da técnica de edição genética crispr/cas9 como alternativa de tratamento para anemia falciforme. Visão Acadêmica, v. 26, n. 2, p. 1–10, 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.5380/acd.v26i2.99610>>.

PETROVA, I. O.; SMIRNIKHINA, S. A. Prime editing in dividing and quiescent cells. International Journal of Molecular Sciences, v. 26, n. 8, p. 3596, 2025.

POTTS, M. A. et al. Critical cancer vulnerabilities identified by unbiased crispr/cas9 screens inform on efficient cancer immunotherapy. European Journal of Immunology, v. 50, n. 12, p. 1871–1884, 2020. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.202048712>>.

PRASAD, K. et al. Crispr/cas-based gene editing: marking a new era in medical science. Molecular Biology Reports, v. 48, n. 5, p. 4879–4895, 2021.

RASUL, M. F. et al. Strategies to overcome the main challenges of the use of crispr/cas9 as a replacement for cancer therapy. *Molecular Cancer*, v. 21, p. 64, mar 2022.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8892709/>>.

REN, J. et al. Multiplex genome editing to generate universal car t cells resistant to pd1 inhibition. *Clinical Cancer Research*, v. 23, n. 9, p. 2255–2266, 2017.

RICHARDSON, C. et al. Novos avanços em técnicas precisas de edição de genes mediadas pelo crispr/cas. *Modelos e Mecanismos de Doenças*, v. 16, n. 2, p. dmm049874, 2023.

SEN, D.; et al. Edição prime: uma ferramenta emergente no tratamento do

cânce

r. *Biotecnologia Molecular*, v. 65, n. 4, p. 509–520, 2023.

SHAH, S. Z. et al. Advances in research on genome editing crispr-cas9 technology. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC*, v. 31, n. 1, p. 108–122, 2019. Disponível em:

<<https://jamc.ayubmed.edu.pk/index.php/jamc/article/view/5239/2084>>.

SHAMJETSABAM, N. D. et al. Crispr/cas9: an overview of recent developments and applications in cancer research. *International Journal of Surgery (London, England)*, v. 110, n. 10, p. 6198–6213, October 2024. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1097/JS9.0000000000001081>>.

STADTMAUER, E. A. et al. Crispr-engineered t cells in patients with refractory cancer. *Science*, v. 367, n. 6481, p. eaba7365, 2020.

TAO, R. et al. Revolutionizing cancer treatment: enhancing car-t cell therapy with crispr/cas9 gene editing technology. *Frontiers in Immunology, Frontiers Media S.A.*, v. 15, p. 1354825, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1354825>>.

THERAPEUTICS, C. CRISPR Therapeutics Reports Positive Results from its Phase 1 CARBON Trial of CTX110 in Relapsed or Refractory CD19 B-Cell Malignancies. 2021.

Acesso em: 03 nov. 2025. Disponível em: <<https://crisprtx.com/about-us/press-releases-and-presentations/>>

VERTEX PHARMACEUTICALS AND CRISPR THERAPEUTICS. Vertex and CRISPR Therapeutics announce authorization of first CRISPR gene-editing therapy. 2023. Acesso em: 28 out. 2025. Disponível em: <<https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/vertex-and-crispr-therapeutics-announce-authorization-first>>.

WANG, G. et al. A ativação multiplexada de genes endógenos por crispra provoca potente imunidade antitumoral. *Nature Immunology*, v. 20, p. 1494–1505, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41590-019-05004>>.

WANG, S.-W. et al. Current applications and future perspective of crispr/cas9 gene editing in cancer. *Molecular Cancer*, v. 21, n. 1, p. 57, February 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12943-022-01518-8>>.

WANG, X. et al. In vivo crispr screens identify the e3 ligase cop1 as a modulator of macrophage infiltration and cancer immunotherapy target. *Cell*, v. 184, n. 21, p. 5357–5374.e22, Oct 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34582788/>>.

WU, Y. et al. Exploring synthetic lethality in cancer therapy: Crispr-cas9 technology offers new hope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, v. 1880, n. 4, p. 189370, 2025. ISSN 0304-419X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X2500112X>>.

XU, X. et al. Nanotechnology-based delivery of crispr/cas9 for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 176, p. 113891, 2021.

XUE, C.; GREENE, E. C. Dna repair pathway choices in crispr-cas9-mediated genome editing. *Trends in Genetics*, v. 37, n. 7, p. 639–656, jul. 2021.

YIN, C. et al. In vivo excision of hiv-1 provirus by sacas9 and multiplex single-guide rnas. Molecular Therapy, v. 25, n. 7, p. 1781–1788, 2017. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4359768/>>.

YIP, B. H. Recent advances in crispr/cas9 delivery strategies. Biomolecules, MDPI, v. 10, n. 6, p. 839, 04 2020. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7356196/>>.

YOSHIDA, M. et al. Development of an integrated crispr targeting Δ np63 for treatment of squamous cell carcinoma. Oncotarget, v. 9, n. 49, p. 29220–29232, 2018.

ZHOU, H. et al. Genome-scale crispr-cas9 screening in stem cells: theories, applications and challenges. Stem Cell Research & Therapy, v. 15, n. 1, p. 218, Jul 2024. Disponível em:

<<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11264826/#Sec8>>.

ZHU, W. et al. The crispr/cas9 system inactivates latent hiv-1 proviral dna. Retrovirology, v. 12, p. 22, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12977-015-0150-z>>.

ZHU, Y. Advances in crispr/cas9. BioMed Research International, v. 2022, n. 1, p. 1–11, set. 2022.

ZYCH, A. O.; BAJOR, M.; ZAGOZDZON, R. Application of genome editing techniques in immunology. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, v. 66, n. 4, p. 289–298, 2018.