

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

RELAÇÃO ENTRE A ANÁLISE IN SÍLICO E A TECNOLOGIA CRISPR/SISTEMA CAS PARA INVESTIGAR A FUNÇÃO DO GENE TP53:

Relationship between in silico analysis and crispr technology/cas system to investigate the function of the tp53 gene.

Mateus Barroso Nogueira Zanela¹
Anabele Azevedo Lima Barbastefano²

RESUMO

Avanços tecnológicos na área da genética e tecnologias computacionais promoveram grandes avanços no tratamento de doenças genéticas decorrentes de mutações, onde técnicas de terapia gênica poderiam ser utilizadas com mais precisão e eficácia. Sendo assim, foi realizada uma revisão sistemática, buscando expor a utilização das linguagens de programação presentes na bioinformática para a exploração e análise da interação de diferentes genes como o gene TP53 (Gene Supressor de Tumor) com a tecnologia CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas Regularmente Espaçadas)/ Sistema CAS (Endonuclease Associada a CRISPR) e suas variantes. A tecnologia CRISPR/ Sistema CAS é uma metodologia que causa mutações no gene TP53 mutado para torná-lo selvagem, assim tornando-o funcional novamente permitindo a célula afetada pela mutação da P53 acessar o mecanismo de apoptose da célula, matando as células neoplásicas. Entretanto, se faz necessário realizar mais pesquisas sobre a nova tecnologia, pois grandes quantidades de dados são geradas sendo necessário o desenvolvimento de softwares mais capazes de realizar o processamento destes dados, além de ser necessário realizar mais pesquisas sobre os efeitos colaterais que envolvem as endonucleases CAS.

Palavras-chave: Bioinformática, CRISPR/CAS, Linguagem de Programa, TP53, CAS9 e CAS13.

ABSTRACT

Technological advances in the area of genetics and computational technologies have promoted major advances in the treatment of genetic diseases resulting from mutations, where gene therapy techniques could be used with more precision and effectiveness. Therefore, a systematic review was carried out, seeking to expose the use of programming languages present in bioinformatics for the exploration and analysis of the interaction of different genes such as the TP53 (Tumor Suppressor Gene) gene with the CRISPR technology (Clustered Regularly Spaced Short Palindromic Repeats)/CAS System (CRISPR-Associated Endonuclease) and its variants. CRISPR technology/ CAS System is a methodology that causes mutations in the mutated TP53 gene to make it wild-type, thus making it functional again, allowing the cell affected by the P53 mutation to access the cell's apoptosis mechanism, killing neoplastic cells. However, it is necessary to carry out more research on the new technology, as large amounts of data are generated and it is necessary to develop software that is more capable of processing this data, in addition to the need to carry out more research on the side effects involving endonucleases CAS.

Keywords: Bioinformatics, CRISPR/CAS, Program language, TP53, CAS9 e CAS13.

¹Graduando do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – CEUB.

²Doutora em Patologia Molecular. Professora do Centro Universitário de Brasília – CEUB.

1 INTRODUÇÃO

Com o advento de grandes investimentos na área da genética, ao longo das últimas décadas, diversos ramos emergiram, dentre eles, a bioinformática, que seria a junção da tecnologia da informação com a genética. Ao sequenciar o genoma da espécie humana, gera-se grandes quantidades de dados que somente são interpretados por profissionais da área de bioinformática, capacitados a analisar genoma, com o auxílio de linguagens de programação e de diversos algoritmos (NANJALA, et al, 2023).

Com isso, além da emergência da bioinformática outras áreas que envolvem a genética se desenvolveram, e assim foi possível a descoberta de novas tecnologias, principalmente no âmbito da biologia molecular. Por conta disso, descobriram-se moléculas capazes de manipular o código genético, bem como a sua edição, como exemplo cita-se a CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas Regularmente Espaçadas)/ Sistema CAS (Endonuclease Associada a CRISPR), sendo ela uma endonuclease guiada por RNA (Ácido Ribonucleico), que tem como alvo sequências de DNA (Ácido Desoxirribonucleico) específicas, determinadas por meio do pareamento de bases da endonuclease com o material genético alvo sendo ele DNA ou o RNA (MANGHWAR, et al, 2019).

Assim sendo, inicialmente a CRISPR/ Sistema CAS foi identificada como um mecanismo de proteção contra bacteriófagos e plasmídeos invasores em procaríotos, este mecanismo possui uma endonuclease chamada de CAS, que se liga a um pequeno RNA crispr (crRNA) e se associa a um DNA ou RNA viral, a qual após o pareamento entre as fitas, a endonuclease CAS cliva o material genético, sendo ele DNA ou RNA a depender do tipo de CAS utilizada (HUSSEIN, et al, 2023).

Desta forma, podemos utilizar as proteínas CRISPR/ Sistema CAS como uma terapia para tratar doenças genéticas, como em mutações no gene TP53 (Gene Supressor de Tumor). Assim sendo, as mutações no gene TP53 são frequentemente associadas a vários tipos de câncer, sendo a região do domínio central de ligação ao DNA o local onde ocorrem a maioria das mutações responsáveis pela inativação deste gene (DNEHOWER, et al, 2019).

Logo, por conta de mutações no gene TP53 o seu transcrito é muitas vezes associado de 50-60% dos cânceres humanos, onde 90% destas mutações são classificadas como *missense* (produz outro aminoácido) ocorrendo em aproximadamente em 190 códons do gene. Consequentemente, por haver mutações do tipo *missense* a troca de aminoácidos formando uma proteína diferente provocando a perda da função da p53 e, portanto, permitindo com que a célula em uma situação de estresse se transforme em uma célula cancerosa (BAUGH, et al, 2018).

Portanto, ao utilizarmos a CRISPR/CAS9, poderia-se tornar um gene TP53 mutante disfuncional em um gene TP53 selvagem e com total funcionalidade por meio da recombinação homóloga, que levaria a expressão normal da proteína p53. Em vista disso, estudos computacionais formaram um quadro estatístico Estratégia CRISPR Computacional (CCS) que mapeia de forma precisa fragmentos de DNA que possuem regiões de realce crítico (CERs) dependentes de p53, projeto este que facilita a triagem CRISPR para identificar regiões genômicas alvo, e utilizar a CRISPR/CAS9 para a edição de bases (BE's) e para edição de *primers* (PEs) que permitem a correção precisa de um *locus* genômico alvo sem deletar o gene, corrigindo mutações *missense* no TP53 como um terapia anticâncer (MIRGAYAZOVA, et al, 2020).

Entretanto, pelo fato da natureza da CRISPR/ Sistema CAS causar perturbações genéticas programadas em múltiplos locais do genoma, sua utilização proporcionou grandes avanços no ramo da genômica funcional, sendo este processo responsável por criar uma grande quantidade de dados, sendo necessários diversos passos para a análise e tratamento destes dados gerados pela CRISPR/ Sistema CAS desde o sequenciamento até o controle de qualidade dos dados gerados, e todos estes dados correlacionados com ferramentas de bioinformática que utilizam softwares especializados para realizar o tratamento dos dados gerados (TRIVEDI, RAMESH, WHEELDON, 2023).

Sendo assim, a tecnologia CRISPR, necessita de softwares e de linguagens de programação que abarque múltiplos formatos de arquivos e de bancos de dados, onde, em muitos casos, estarão em formato de texto ou em linguagem binária. Ressalta-se que o formato de texto é o mais utilizado pelos profissionais, por conta de sua capacidade de fornecer informação de fácil acesso e por ser editado facilmente, sem a necessidade do *software* original, vale a citação de algumas destas linguagens utilizadas neste meio como o *Python*, *C* ou *C++* (GONNELLA, 2022).

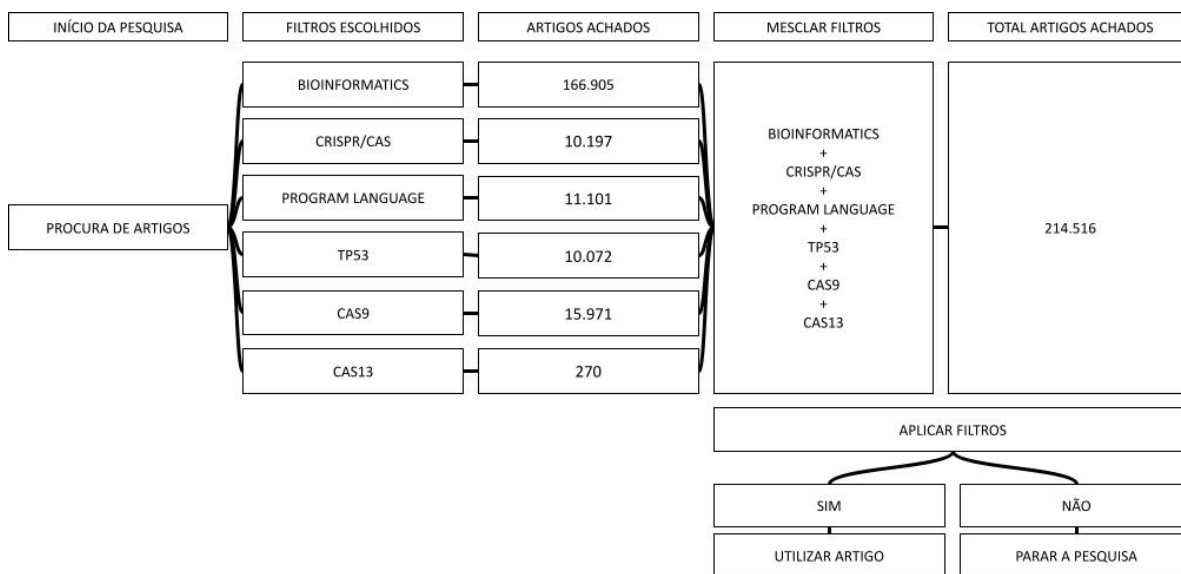
Posto isso, é fundamental realizar uma revisão sistemática da literatura, que permita comparar trabalhos anteriores relacionados com o tema discutido. A análise de estudos anteriores é essencial para posicionar a seguinte pesquisa no contexto acadêmico e justificar a importância da abordagem sobre a relevância no tratamento de neoplasias utilizando a tecnologia CRISPR/ Sistema CAS e ferramentas de bioinformática para a exploração de dados e, assim, auxiliar na investigação da função do gene TP53 e de seu transcrito para então obter-se um tratamento mais preciso e menos danoso aos enfermos afetados por neoplasias decorrentes da mutação do gene. Pois, a edição de genes proporciona a capacidade de alterar sequências genômicas, normalmente causando alterações no DNA; como inserções, deleções e substituições de sequências, sendo a tecnologia CRISPR/ Sistema CAS, a ferramenta RNA-guiada mais proeminente para a edição de moléculas de DNA, por conta de sua especificidade e efetividade, possuindo grande potencial para o tratamento de doenças humanas, especialmente distúrbios genéticos e câncer (MIRGAYAZOVA, et al, 2020).

Diante do exposto, o presente estudo abordou a utilização das linguagens de programação presentes na bioinformática para a exploração e análise da tecnologia CRISPR/ Sistema CAS demonstrando a utilização da bioinformática para o tratamento do gene TP53 e suas variantes.

2 MÉTODO

O método deste estudo é do tipo de revisão narrativa de periódicos científicos disponíveis em plataformas *online da Scientific Electronic Library Online (SciELO)*, *National Library of Medicine (PubMed)*, Google acadêmico e a Biblioteca integrada do CEUB, buscando textos nos idiomas português e inglês nos anos de 2013 a 2023, porém, com preferência nos anos de 2018 a 2023, utilizando as palavras chaves de Bioinformatics, CRISPR/CAS, Program language, TP53, CAS9 e CAS13, sendo encontrados 214.516 artigos, destes foram utilizados 31 artigos para a escrita do trabalho em questão (Figura 01).

Figura 01 – Fluxograma da escolha de artigos



Fonte: (ZANELA, 2023).

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Bioinformática

Somente durante a última década conseguiu-se observar algum desenvolvimento nas áreas que abrangem a genômica. Por conta do seu recente desenvolvimento, a genômica era muito dependente dos desenvolvimentos de métodos capazes de sequenciar quantidades massivas de sequências curtas e paralelas de DNA, onde a leitura de uma dessas sequências pode conter de 50 a 150 pares de bases. Essa tarefa gera expressivas quantidades de dados, tendo o objetivo principal a descoberta e registro de regiões genômicas e suas funções biológicas. Contudo, a quantidade imensurável de protocolos experimentais acompanhados de *pipelines* (série de dados automatizados executados em sequência) desenvolvidos com o intuito de otimizar os recursos de alto rendimento das NGS (*Next Generation-sequencing*, sequenciamentos de nova-geração), visando monitorar uma ampla variedade de fenótipos moleculares, os quais espelham uma notável diversidade de funções genômicas (GUIGO, HOON, 2018).

Sendo assim, as NGS atuais viabilizam a caracterização epigenômica, genômica e transcriptômica para cada tecido. Com isso, a partir da obtenção de ácidos nucleicos de um tecido alvo, como, por exemplo, de células tumorais, sendo as amostras de ácidos nucleicos, DNA e RNA, obtidas por meio de biópsia, são direcionadas para bibliotecas específicas, para a construção de protocolos, e para plataformas de sequenciamento, os dados brutos são pré-processados e mandados para *pipelines* específicas para a extração de informações não triviais, como vias de sinalização-ativadas/inativadas ou a identificação de variantes clinicamente acionáveis (CANZONERI, LACUNZA, ABBA, 2019).

Sabendo disso, existem mais de 3 milhões de pares de bases no exoma (fração do genoma que codifica os genes) humano, que estão distribuídos em 180.000 exons (Sequências de bases transcritas e traduzidas). Um pequeno projeto contendo todo o exoma humano geraria *terabytes* de dados brutos, o que torna as plataformas de NGS, que utilizam a genômica e bioinformática, como disciplinas que exigem abordagens de *Big Data* (Figura 02).

Contudo, apesar dos avanços tecnológicos que vêm tornando os estudos de NGS mais acessíveis, observa-se o grande desafio de como lidar com estes grandes volumes de dados produzidos (CANZONERI, LACUNZA, ABBA, 2019).

Figura 02 - Fluxos de trabalho de bioinformática para análise de dados de NGS (Exoma-Seq à esquerda e RNA-seq à direita).



Fonte: adaptado de (CANZONERI, LACUNZA, ABBA, 2019).

Com isso, apesar de existirem técnicas para realizar o sequenciamento de material genético, como o método de Sanger, as NGS conseguem realizar a enzimologia e aquisição de dados realizando estas tarefas em passo a passo e de forma organizada, assim gerando uma grande quantidade de modelos simultâneos, sendo que esta capacidade aprimorada de geração de dados resultou em mudanças significativas nas técnicas de sequenciamento de DNA. Assim, muitas das plataformas comerciais utilizam as NGS com base no conceito de SBS (Sequencing by Synthesis, Síntese por Sequenciamento), fragmentação por cisalhamento físico, geração de uma biblioteca de sequenciamento e a amplificação do molde em virtude

da hibridização da do fragmento da biblioteca para oligonucleotídeos (MCCOMBIE, MCPHERSON e MARDIS, 2019).

3.2 Terapia gênica com base em moléculas CRISPR/ Sistema CAS

Com a descoberta da CRISPR/ Sistema CAS, o campo da biologia molecular conseguiu grandes avanços ao utilizar a molécula pertencente ao sistema imune adaptativo de seres procariotos como uma ferramenta capaz de editar o genoma. Sendo assim, a CRISPR possui a função da memória genômica de patógenos invasores, sendo essa memória utilizada pelas proteínas CAS como endonucleases guias para analisar um material genético invasor e desativá-lo introduzindo a quebra de fita dupla (LINO, et al, 2018).

Assim como outros mecanismos defensivos biológicos, as CRISPR/ Sistema CAS presentes nos grupos Archaea e bactéria mostram uma grande diversidade de sequências de proteínas CAS diferentes (Tabela 01). Com isso, foram realizados dois estudos anteriores, publicadas na *Nature Reviews Microbiology*, em 2011 e 2015 respectivamente, onde utilizaram da comparação das composições genéticas das diferentes CRISPR/ Sistemas CAS e a arquitetura dos *loci* com agrupamento baseado em similaridade de sequência e análises filogenéticas de proteínas CAS conservadas. Sendo que, a classificação de 2015 relatou 5 tipos e 16 subtipos e uma maior divisão das diferentes CRISPR/ Sistemas CAS em duas classes (MAKAROVA, et al, 2019).

Tabela 01 - Tipos diferentes de moléculas CRISPR/ Sistema CAS

Classe	Tipo	Proteína Efetora	Alvo
Classe 1 CRISPR/ Sistema CAS	Tipo I	Complexo multi-subunidades (Exclusivo para a proteína CAS3)	DNA fita simples, pode demonstrar efeitos colaterais
	Tipo III	Complexo multi-subunidades (Exclusivo para a proteína CAS10)	DNA/RNA
	Tipo IV	Complexo multi-subunidades (Exclusivo para a proteína Csd1)	Desconhecido
Classe 2 CRISPR/ Sistema CAS	Tipo II	CAS9	DNA fita dupla
	Tipo V	CAS12	DNA fita dupla, em fitas simples de DNA pode demonstrar efeitos colaterais
		CAS14	DNA fita simples, pode demonstrar efeitos colaterais
	Tipo VI	CAS13	RNA fita simples, pode demonstrar efeitos colaterais

Fonte: adaptado de (KOSTYUSHEVA, et al, 2022).

Desta forma, moléculas CRISPR/ Sistema CAS de classe 1 incluem 3 variações de moléculas, sendo elas: tipo I, tipo III e tipo IV. Essas moléculas são caracterizadas por múltiplas proteínas efetoras, compartilhando um efetor em cascata, que é composto por um complexo de proteínas CAS em conjunto com moléculas de crRNA. Este complexo é responsável por

reconhecer o motivo adjacente ao protoespaçador (protospacer adjacent motif, PAM), também desenrolando o DNA alvo e, assim, permitindo a interação do crRNA e o DNA alvo, referindo-se a CAS3 como a responsável pela clivagem da fita de DNA não ligada ao complexo; enquanto as moléculas de classe 2 incluem moléculas CRISPR/ Sistema CAS do tipo II e menos comumente do tipo V e do tipo VI, cada uma dispendo de proteínas efetoras únicas, e, com isso, possuindo uma organização menos complexa ao formar uma proteína grande, multidomínio e multifuncional (KOSTYUSHEVA, et al, 2022).

Com isso, a endonuclease CAS9 foi primeiramente encontrada em bactérias do gênero *E. coli* (*Escherichia coli*) e posteriormente em outros gêneros de bactérias, sendo a CAS9 classificada como de classe 2, tipo II, sendo que, portanto, proteínas CAS9 tem como alvo sequências específicas de DNA, sendo a proteínas CAS do tipo II de *Streptococcus pyogenes* (SpCAS9), comumente utilizada para clivar o DNA orientado por RNA em células de mamíferos, sendo sua especificidade de ligação determinada pela PAM, que forma um híbrido DNA-sgRNA, onde a interação dos dois domínios de nuclease induzem a quebra de dupla fita (DSB) na fita alvo (ZHAN, et al, 2019).

Entretanto, em contraponto com outras proteínas do sistema CAS de classe 2 como a CAS9 e a CAS12 que interagem e clivam moléculas de DNA, a proteína CAS do tipo VI, conhecida como CAS13, e responsável por realizar a interação e clivagem de moléculas de RNA, por conta de que proteínas CAS13 possuem dois domínios endoRNase de Nucleotídeo Ligante de Eucariotos Superiores e Procariotos (HEPN), que promovem a clivagem precisa do RNA tendo a preferência por locais alvos com o motivo de sítio adjacente ao proteoespaçador (PFS), sendo as proteínas CAS13a, CAS13b e CAS13c algumas proteínas pertencentes à família de proteínas CAS13, onde a CAS13a pode ser adaptadas para a detecção de ácidos nucleicos assim como para a redução e rastreamento de RNA em células de mamíferos e plantas (COX, et al, 2017).

Assim sendo, as moléculas CRISPR/ Sistema CAS foram observadas em diversas bactérias diferentes onde possuíam algumas diferenças, onde proteínas CAS do tipo 2, denominada de CAS9 possuem dois domínios de nuclease, His-Asn-His (HNH), nuclease esta que cliva a fita alvo de DNA, e uma nuclease semelhante a RuvC (Fator de Utilidade de Recombinação) onde se divide em subdomínios RuvC-I, RuvC-II e RuvC-III que clivam a fita não alvo, porém, antes da clivagem do DNA a CAS9 forma um complexo de ribonucleoproteína com os RNAs, crRNA que reconhece o DNA alvo e o tracrRNA (crRNA transitivado) que se hibridiza com o crRNA que forma um sgRNA (RNA guia único) quimérico que possui um parte constante que forma a estrutura de ligação com a CAS9 e a extremidade 5'-end, que possui 20 nucleotídeos complementares a fita de DNA alvo, que forma a ligação e provocando a clivagem do DNA (JANIK, et al, 2020).

CRISPR do tipo IV naturalmente possui uma nuclease que tem como alvo um RNA sendo ela conhecida como CAS13 ou C2C2, CAS13b, CAS13c, CAS13d, CAS13x e CAS13y, onde todas precisam de dois domínios conservados de HEPN que irão mediar a degradação da fita simples de RNA, sendo que, o sítio PFS, estrutura secundária do RNA e a região inicial do crRNA são essenciais para o funcionamento da nuclease. Contudo, em contrapartida da CAS9 a CAS13 não causa variações permanentes no código genético, sendo necessário trazer efetores exógenos para alcançar ou manter a eficácia terapêutica, porém a manipulação de RNA é adaptável em quantidade e reversível com o tempo e que as terapias voltadas para o RNA são mais focadas no sintomas das doenças (TANG, et al, 2021).

3.3 Características do gene TP53

Durante o cotidiano, a proteína p53 transcrita do gene TP53 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000017.11?report=genbank&from=7668421&to=7687490&strand=true (Fonte: NCBI, NC_000017.11)], atua como um supressor de tumor. Com isso, em situações fisiológicas normais, a expressão da proteína p53 se mantém em um nível baixo nos tecidos por meio de regulação negativa. Numerosas substâncias endógenas e exógenas podem estressar a célula e ativar a p53, e com isso desencadeando uma série de respostas celulares responsáveis pela manutenção da homeostase do organismo. A ativação da p53 é de extrema importância para a sobrevivência de células saudáveis, protegendo-as da tumorigênese (HU, et al, 2021).

Entretanto, o gene TP53 é conhecido como um gene supressor tumoral, que por sua vez gera um transcrito chamado de p53, que recebe o apelido de 'guardião do genoma'. Sendo, o TP53 um dos genes mais repetidamente mutados [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ026210.1> (Fonte: NCBI, JQ026210.1)] em todos os tipos de cânceres humanos que leva consigo um prognóstico adverso com respostas subótimas às terapias convencionais. A resposta a terapias convencionais como a quimioterapia citotóxica dependentes da presença da p53 intacta, devem induzir a apoptose na célula neoplásica, no entanto, cânceres com mutações presentes no gene TP53 respondem mal a quimioterapia citotóxica (DAVER, et al, 2022).

O gene TP53 é o gene mais frequentemente mutado do genoma, cerca de 50% dos cânceres possuem essa mutação, onde algumas destas mutações levam a perda total da proteína p53. Muitas destas mutações são classificadas como *missense*, onde apenas um aminoácido é substituído, causando uma perda de função da proteína, que ocorre por conta da mudança da conformidade da proteína p53 deixando a célula inapta para ativar a apoptose. O gene TP53 mutado pode coexistir com as outras proteínas p53 selvagens presentes no início da transformação da célula normal em uma célula neoplásica, porém com o avanço da doença o gene mutado impede a molécula selvagem de exercer sua função de supressão tumoral. Também existe a mutação de ganho de função, fazendo com que a proteína adquira funções que não são dela (WANG, STRASSER e KELLY, 2022).

Sendo assim, uma característica comum de muitas células neoplásicas é o status mutacional do gene TP53, sendo presente em quase metade dos casos de malignidades humanas abrigando uma forma mutada do gene TP53, com isso, tornando-o um importante alvo terapêutico para o tratamento de câncer, possuindo uma distribuição de mutações por toda a sequência sendo mais frequente no domínio de ligação ao DNA. Portanto o direcionamento de mutações no TP53 representa uma estratégia terapêutica em potencial, trazendo novamente a funcionalidade da proteína e causando a morte celular e levando a regressão tumoral. Entretanto, para este processo deve haver toda a substituição do locus TP53 mutado que mede aproximadamente 20,5 kb de comprimento, sendo isso somente possível utilizando cortes específicos proporcionados pela tecnologia CRISPR/CAS9 (tabela 02) que pode substituir eficientemente um fragmento genômico tão grande quanto 65 kb de comprimento (SERGIU, et al, 2018).

Tabela 02 - Pontos de corte da endonuclease CAS9 presentes no gene TP53 mutado

Pontos de corte da CAS9										
Rank	Sequência alvo	Localização genômica	Sentido	Porcentagem de CG (%)	Auto Complementariedade	MM 0	MM 1	MM 2	MM 3	Eficiência
1	TCTGAAGCGC TCACGCCACG G	seq:996	Negativo	65	0	1	0	0	0	56.30
2	CGCTATCTGAG CAGCGCTCATG G	seq:534	Negativo	60	3	1	0	0	0	43.15
3	CCCCGGACGA TATTGAACAAT GG	seq:137	Positivo	50	0	1	0	0	1	60.82
4	GTGCTCGCTTA GTGCTCCCTGG G	seq:900	Negativo	60	0	0	0	0	1	41.31
5	CCCCTTGCCGT CCCAAGCAATG G	seq:99	Positivo	65	4	1	0	0	2	46.55
6	GGCAGCTACG GTTCCGTCTG GG	seq:313	Positivo	60	3	1	0	0	2	39.14
7	TCGACGCTAG GATCTGACTGC GG	seq:10	Negativo	55	2	1	0	0	3	77.66
8	TATCTGAGCAG CGCTCATGGTG G	seq:531	Negativo	55	2	1	0	0	3	61.99
9	GTTGATTCCAC ACCCCGCCCG G	seq:439	Positivo	65	0	1	0	0	3	57.34
10	TCCATTGCTTG GGACGGCAAG GG	seq:100	Negativo	55	3	1	0	0	3	54.32

Fonte: (CHOPCHOP, 2023).

3.4 Sistematização de estudos relacionados a edição de genomas

Em células de mamíferos, a tecnologia CRISPR foi inicialmente usado para se aproveitar dos mecanismos de reparo de DNA naturais, para assim provocar uma edição gênica por meio da Junção de Extremidades Não Homólogas (NHEJ), e pelo Reparo Direcionado por Homologia (HDR). Assim sendo, as NHEJ são frequentemente usadas para formação de inserções e deleções propensas a erros (indels), já as HDR, são mais utilizadas para fins terapêuticos por

conta de sua alta precisão de edição genética. Em modelos pré-clínicos terapias à base de CRISPR têm sido utilizadas para aproveitar a inativação (Knockout) (Tabela 03) genética para várias finalidades incluindo para o tratamento de câncer, sendo outras estratégias utilizadas: redução da expressão gênica (knockdown), repressão gênica local, ativação CRISPR, silenciamento ou ativação prolongada de genes alvo, regulação de genes alvo e loss-of-function (perda de função) (Tabela 03) (CHAVEZ, et al, 2023).

Tabela 03 - Análise comparativa dos diferentes artigos ao realizarem edição gênica com auxílio de endonucleases Cas, os tipos de estratégias utilizadas e suas diferentes conclusões em comparação com o tema exposto.

Nome do artigo	Endonuclease Cas utilizada	Tipo de estratégia utilizada	Conclusão do artigo
Targeting DNA repair with combined inhibition of NHEJ and MMEJ induces synthetic lethality in TP53-mutant cancers.	CAS9	knockout (inativação)	Identificação e inibição de genes responsáveis pelo reparo de DNA conhecida como Junção de Extremidades não Homólogas (NHEJ), aumentando a sensibilidade a novobiocina, que por sua vez causa a morte de células cancerígenas, sendo a mutação do gene TP53 responsável por aumentar biomarcadores que podem ser utilizados para utilizar esta técnica (PATTERSON-FORTIN, et al, 2022).
EGFR suppresses p53 function by promoting p53 binding to DNA-PKcs: a noncanonical regulatory axis between EGFR and wild-type p53 in glioblastoma.	CAS9	Knockout (Inativação)	Inibição do Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) dependente de P53 e Subunidade catalítica da DNA dependente de proteínas cinase (DNA-PKcs) por meio da CRISPR/CAS9, assim permitindo a interação da P53 e da DNA-PKcs (DING, et al, 2022).
Functional interrogation of DNA damage response Variants with base editing screens.	CAS9	Knockout (Inativação)	Identificação de mutações na resposta ao dano ao DNA (DDR) utilizando a tecnologia CRISPR/Sistema CAS, sendo identificados e catalogados com o auxílio de programas de linguagem de computador, chamado de R, mais de 2.000 RNA's guias de fita simples que por sua vez geram mais de 86 variantes de DDR que podem afetar a P53 (CUELLA-MARTIN, et al, 2021).

Targeting mitochondrial structure sensitizes acute myeloid leukemia to Venetoclax treatment.	CAS9	Loss-of-function (perda de função)	Utilização da tecnologia CRISPR/CAS9 para forçar uma perda de função de blastos de AML (Leucemia mieloide aguda) cujo principal objetivo, sendo a degradação da P53, causando um aumento da concentração de P53 selvagem, em detrimento do acúmulo da P53 mutada, assim causando a morte celular das células neoplásicas (CHEN, et al, 2019).
GIN54 suppresses ferroptosis by antagonizing p53 acetylation with Snail.	CAS9	Knockout (Inativação)	Inibição de GINS4 por meio de CRISPR/CAS9, causando assim uma indução das fases G1, G1/S, S e G2/M causando uma ferroptose em células nesses estágios de divisão celular, pois o GINS4 suprime a P53, antagonizando a acetilação por meio da P53 (CHEN, et al, 2023).

Fonte: (ZANELA, 2023).

A abordagem de inativação de partes específicas do gene TP53, através da técnica de knockout (inativação), representa uma estratégia favorável no tratamento de neoplasias decorrentes de mutações do gene TP53. A utilização desta estratégia com o intuito de inativação de fatores de resistência a medicamentos de células neoplásicas, em conjunto com com estas drogas antes ineficazes, demonstra ser uma estratégia bastante utilizada. Porém, este método de tratamento demanda mais estudos por conta da toxicidade gerada pelos medicamentos nos pacientes e pelos efeitos adversos das CAS presentes na tecnologia CRISPR/ Sistema CAS.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É de suma importância enfatizar que a procura e desenvolvimento de novos métodos de tratamento e diagnóstico sejam desenvolvidos, pois assim como nesta tecnologia as enfermidades que afetam a vida e o bem estar da população mundial vem crescendo cada vez mais, e a criação de tecnologias como a CRISPR/ Sistema CAS para o tratamento de doenças que afetam nossos genes estão se mostrando uma grande ferramenta para que seja possível enfrentar uma das moléstias que assombram a humanidade a séculos como o câncer. Há diversas estratégias que podem ser utilizadas com a tecnologia CRISPR/ Sistema CAS, e sua utilização com as linguagens de programação vem tornando esta técnica cada vez mais precisa, seja na hora de descobrir o gene defeituoso ou a produção da CRISPR que irá atingir o gene alvo.

Entretanto, ainda há uma série de desafios a serem superados, antes que essas técnicas possam ser efetivamente usadas para o tratamento de neoplasias. Dentre esses desafios podem elencar a falta de capacidade computacional, que gera quantidades enormes de dados, por conta do tamanho dos genes humanos, fazendo-se necessário o desenvolvimento de programas e softwares mais potentes que sejam capazes de resistir às

quantidades gigantes de dados que são inseridos. Porém, há necessidade de pesquisas sobre as CAS utilizadas na tecnologia CRISPR, onde é relatada a presença de reações adversas no organismo afetado por essas enzimas, visando torná-las ainda mais seguras para o uso no tratamento de pacientes, afetados pelas mutações do gene TP53.

Portanto, apesar de ser uma técnica com grande potencial, ainda são necessários mais estudos para o aprimoramento das tecnologias apresentadas sendo elas a tecnologia CRISPR/Sistema CAS, além dos softwares e programas de computador, para que então sejam viáveis de serem usados para o tratamento de pacientes, portadoras de mutações no gene TP53, presentes em alguma neoplasia.

Assim, destacando o papel do profissional biomédico por conta de suas habilidades técnicas para a realização destas pesquisas, tanto no ramo computacional para quanto no ramo laboratorial, aprofundando nossos conhecimentos sobre as demais técnicas de CRISPR/Sistema CAS, e no desenvolvimento de softwares mais sofisticados que consigam aguentar a demanda gigantesca de dados produzidos pelas NGS.

REFERÊNCIAS

BAUGH, E. H; KE, H; LEVINE, A. J; BONNEAU, R. A e CHAN, C. S. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers?. **Cell Death & Differentiation**. Estados Unidos da América, v. 25, n. 1, p. 154-160. Jan. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cdd2017180>. Acesso em: 25/08/2023.

CANZONERI, R; LACUNZA, E e ABBA, M. C. Genomics and bioinformatics as pillars of precision medicine in oncology. **Medicina**. Argentina, v. 79, n. 6, p. 587-592. 2019. Disponível em: <https://www.medicinabuenosaires.com/PMID/31864231.pdf>. Acesso em: 10/08/2023.

CHAVEZ, M; CHEN, X; FINN, P. B e QI, L. S. Advances in CRISPR therapeutics. **Nature reviews nephrology**. Estados Unidos da América, v. 19, n. 1, p. 9-22. Out. 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41581-022-00636-2>. Acesso em: 15/11/2023.

CHEN, L; CAI, Q; YANG, R; WANG, H; LING, H; LI, T; NA, L; WANG, Z; SUN, J; TAO, T; SHI, Y; CAO, Y; WANG, X; XIAO, D; LIU, S. e TAO, Y. GINS4 suppresses ferroptosis by antagonizing p53 acetylation with Snail. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Estados Unidos da América, v. 120 n. 15, p. 1-12. Nov/Fev. 2023. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2219585120>. Acesso em: 05/11/2023.

CHEN, X; GLYTSOU, C; ZHOU, H; NARANG, S; REYNA, D. E; LOPEZ, A; SAKELLAROPOULOS, T; GONG, Y; KLOETGEN, A; YAP, Y. S; WANG, E; GAVATHIOTIS, E; TSIRIGOS, A; TIBES, R. e AIFANTIS, I. Targeting mitochondrial structure sensitizes acute myeloid leukemia to Venetoclax treatment. **CANCER DISCOVERY**. Estados Unidos da América, v. 9, n.7, p. 890-909. Jul. 2019. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/9/7/890/41983/Targeting-Mitochondrial-Structure-Sensitizes-Acute>. Acesso em: 05/11/2023.

CHOPCHOP - CRISPR/Cas9 Online Predictor. Disponível em: <http://chopchop.cbu.uib.no/>. Acesso em: 26/08/2023.

COX, D. B. T; GOOTENBERG, J. S; ABUDAYYEH, O. O; FRANKLIN, B; KELLNER, M. J; JOUNG, J. e

ZHANG, F. RNA editing with CRISPR-Cas13. **Science**. Estados Unidos da América, v. 358, n. 6366, p. 1019-1027. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aag0180>. Acesso em: 13/09/2023.

CUELLA-MARTIN, R; HAYWARD, S. B; FAN, X; CHEN, X; HUANG, J; TAGLIALATELA, A; LEUZZI, G; ZHAO, J; RABADAN, R; LU, C; SHEN, Y. e CICCIA, A. Functional interrogation of DNA damage response variants with base editing screens. **CELL**. Estados Unidos da América, v. 184, n. 4, p. 1081-1097. Fev. 2021. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(21\)000842?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867421000842%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(21)000842?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867421000842%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 05/11/2023.

DAVER, N. G; MAITI, A; KADIA, T. M; VYAS, P; MAJETI, R; WEI, A. H; GARCIA-MANERO, G; CRADDOCK, C; SALLMAN, D. A. e KANTARJIAN, H. M. TP53-Mutated Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: Biology, Current Therapy, and Future Directions. **Cancer Discovery**. Austrália, Estados Unidos da América, Inglaterra, v. 12, n. 11, p. 2516-2529. Nov. 2022. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/12/11/2516/710008/TP53-Mutated-Myelodysplastic-Syndrome-and-Acute>. Acesso em: 25/08/2022.

DING, J; LI, X; KHAN, S; ZHANG, C; GAO, F; SEN, S; WASYLISHEN, A. R; ZHAO, Y; LOZANO, G; KOUL, D e YUNG, W. K. A. EGFR suppresses p53 function by promoting p53 binding to DNA-PKcs: a noncanonical regulatory axis between EGFR and wild-type p53 in glioblastoma. **Neuro-Oncology**. Estados Unidos da América, v. 24, n. 10, p. 1712-1725. Out. 2022. Disponível em: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/24/10/1712/6574563>. Acesso em: 05/11/2023.

DONEHOWER, L. A; SOUSSI, T; KORKUT, A; LIU, Y; SCHULTZ, A; CARDENAS, M; LI, X; BABUR, O; HSU, T; LICHTARGE, O; WEINSTEIN, J; AKBANI, R e WHEELER, D. A. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in the Cancer Genome Atlas. **Cell Reports**. Estados Unidos da América, França, Suécia, v. 28, n. 5, p. 1370-1384. Jul. 2019. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(19\)30885-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS221112471930885X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(19)30885-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS221112471930885X%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 24/08/2023.

GenBank. Sequência Normal do Cromossomo 17 - Homo sapiens. NCBI Reference Sequence: NC_000017.11. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000017.11?report=genbank&from=7668421&to=7687490&strand=true. Acesso em: 4 de setembro de 2023.

GenBank. Sequência Mutada do Gene TP53 - Homo sapiens (humano). Número de Acesso GenBank: JQ026210.1. Mutação: Deleção c.792_796del5 no mRNA da proteína supressora de tumor P53. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ026210.1>. Acesso em: 4 de setembro de 2023.

GONNELLA, G. TextFormats: Simplifying the definition and parsing of text formats in bioinformatics. **PLoS ONE**. Alemanha, v. 17, n. 5, p. 1-17. Mai. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9135226/>. Acesso em: 28/07/2023.

GUIGO, R e de HOON; M. Recent advances In functional genome analysis. **F1000 Research**. Espanha, Japão, v. 1, p. 1-10. 2018. Disponível em: https://f1000research.s3.amazonaws.com/manuscripts/16639/af65f308-185e-4e75-bfcf-b9509e787602_15274__roderic_guigo.pdf?doi=10.12688/f1000research.15274.1&numberOfBrowsableCollections=103&numberOfBrowsableInstitutionalCollections=4&numberOfBrowsableGateways=53. Acesso em: 10/08/2023.

HU, J; CAO, J; TOPATANA, W; JUENGPANICH, S; Li, S; ZHANG, B; SHEN, J; CAI, L; CAI, X e CHEN, M. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. **Journal of Hematology & Oncology**. China, v. 14, n. 1. Set. 2021. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-021-01169-0>. Acesso em: 25/08/2023.

HUSSEIN, M; MOLINA, M. A.; BERKHOUT, B e HERRERA-CARRILLO, E. A CRISPR-Cas Cure for HIV/AIDS. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 24, n. 2, p. 2-15. Dez-Jan. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/2/1563>. Acesso em: 27/07/2023.

JANIK, E; NIEMCEWICZ, M; CEREMUGA, M; KRZOWSKI, L; SALUK-BIJAK, J e BIJAK, M. Various Aspects of a Gene Editing System-CRISPR-CAS9. **International Journal of Molecular Sciences**. Polônia, v. 21, n. 24. Nov/Dez. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9604>. Acesso em: 21/03/2023.

KOSTYUSHEVA, A; BREZGIN, S; BABIN, Y; VASILYEVA, I; GLEBE, D; KOSTYUSHEV, D. e CHULANOV, V. CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases. **Methods**. Rússia e Alemanha, v. 203, n. 1, p. 431-446. Jul. 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202321000992?via%3Dihub>. Acesso em: 09/09/2023.

LINO, C. A; HARPER, J. C; CARNEY, J. P; TIMLIN, J. A. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. **Drug Delivery**. Estados Unidos da América, v. 25, n. 1, p. 1234-1257. Fev/Mai. 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/10717544.2018.1474964?needAccess=true&role=button>. Acesso em: 21/08/2023.

MANGHWAR, H; LINDSEY, K; ZHANG, X e JIN, S. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. **Trends in plant Science**. China, v. 24, n. 12, p. 1102-1125. Dez. 2019. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1360-1385%2819%2930243-2>. Acesso em: 03/08/2023.

MAKAROVA, K. S; WOLF, Y. I; IRANZO, J; SHMAKOV, S. A; ALKHNABASHI, O. S; BROUNS, S. J. J; CHARPENTIER, E; CHENG, D; HAFT, D. H; HORVATH, P; MOINEAU, S; MOJICA, F. J. M; SCOTT, D; SHAH, S. A; SIKSNYS, V; TERNS, M. P; VENCLOVAS, Č; WHITE, M. F; YAKUNIN, A. F; YAN, W; ZHANG, F; GARRETT, R. A; BACKOFEN, R; OOST, J. V. D; BARRANGOU, R. e KOONIN, E. V. Evolutionary classification of CRISPR-CAS systems: a burst of class 2 and derived variants. **Nature Reviews Microbiology**. Estados Unidos da América, Alemanha, Holanda, França,

Canadá, Espanha, Dinamarca, Lituânia, Reino Unido, v. 18, n. 2, p. 67-83. Dez. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0299-x>. Acesso em: 08/09/2023.

MCCOMBIE, W. R; MCPHERSON, J. D; MARDIS, E. R. Next-Generation Sequencing Technologies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. Estados Unidos da América, v. 9, n. 11, p. 1-9. Ago. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6824406/>. Acesso em: 13/08/2023.

MIRGAYAZOVA, R; KHADIULINA, R; CHASOV, V; MINGALEEVA, R; MIFTAKHOVA, R; RISVANOV, A e BULATOV. E. Therapeutic Editing of the TP53 Gene: is CRISPR/CAS9 an Option?. **Genes (Basel)**. Rússia, v. 11, n. 6. Jun. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/11/6/704>. Acesso em: 25/08/2023.

NANJALA, R; NYASIMI, F; MASIGA, D e KIBET, C. K. A mentorship and incubation program using project-based learning to build a professional bioinformatics pipeline in Kenya. **PLoS Comput Biol**. Estados Unidos da América, v. 19, n. 3, p. 1-13. Mar. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9980751/>. Acesso em: 27/07/2023.

PATTERSON-FORTIN, J; BOSE, A; TSAI, W; GROCHALA, C; NGUYEN, H; ZHOU, J; PARMAR, K; LAZARO, J; LIU, J; MCGUEEN, K; SHAPIRO, G; KOZONO, D. e D'ANDREA, A. Targeting DNA repair with combined inhibition of NHEJ and MMEJ induces synthetic lethality in TP53-mutant cancers. **CANCER RESEARCH**. Estados Unidos da América. v. 82, n. 20, p. 3815-3829. out. 2022. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/82/20/3815/709634/Targeting-DNA-Repair-with-Combined-Inhibition-of>. Acesso em: 05/11/2022.

SERGIU, C; DIANA, G; AMIN, H e IOANA; B. Restoring the p53 “guardian” phenotype in p53-deficient tumor cells with CRISPR/Cas9. **Trends in Biotechnology**. Romênia e Reino Unido, v. 36, n. 7, p. 653-660. jul/jan. 2018. Disponível em: <https://spiral.imperial.ac.uk/bitstream/10044/1/58377/6/Accepted%20Manuscript-%20Trends%20in%20Biotechnology.pdf>. Acesso em: 02/11/2023.

TANG, T; HAN, Y; WANG, Y; HUANG, H e QIAN, P. Programmable System of Cas13-Mediated RNA Modification and its Biological and Biomedical Applications. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. China, v. 9. Jul. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.677587/full>. Acesso em: 23/08/2023.

TRIVEDI, V; RAMESH, A e WHEELDON, I. Analyzing CRISPR screens in non-conventional microbes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Estados Unidos da América, v. 50, n.1, p. 1-8. Dez. 2023. Disponível em: <https://academic.oup.com/jimb/article/50/1/kuad006/7079136>. Acesso em: 28/07/2023.

WANG, Z; STRASSER, A; KELLY, G. L. Should mutant TP53 be targeted for cancer therapy?. **Cell Death & Differentiation**. Austrália, v. 29, n. 5, p. 911-920. Mar. 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41418-022-00962-9>. Acesso em: 31/08/2023.

ZHAN, T; RINDTORFF, N; BETGE, J; EBERT, M. P e BOUTROS, M. CRISPR/CAS9 for cancer research and therapy. **Seminars in Cancer Biology**. Alemanha, v. 55, n. 1, p. 106-119. Abr. 2019. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X17302742?via%3Dihub>.
Acesso em: 09/09/2023.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora que se disponibilizou para me orientar durante esse trabalho, ao meu professor da matéria de TCC, que também fornece direcionamentos extremamente importantes para a confecção do presente trabalho, assim como também gostaria de agradecer ao meu pai, que desde quando era pequeno me incentivou a correr atrás de meus sonhos não importa o quão difícil ele possa parecer ser, a minha mãe por sempre me mostrar como é a realidade, e em meus amigos que sempre me ajudaram a pôr minha cabeça no lugar, mesmo nos momentos mais difíceis, gostaria de agradecer a todos por fazerem parte da minha vida, e gostaria de dizer que vou levar todas essas memórias, que irei levar por toda a minha vida.