



**CURSO DE MEDICINA**

**MARIA CLARA MOYSÉS DE SIQUEIRA**

**A UTILIZAÇÃO DA TECNOLOGIA CRISPR NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE  
COLO DE ÚTERO EM ESTUDOS *IN VIVO*: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

**SALVADOR - BA**

**2024**

**MARIA CLARA MOYSÉS DE SIQUEIRA**

**A UTILIZAÇÃO DA TECNOLOGIA CRISPR NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE  
COLO DE ÚTERO EM ESTUDOS *IN VIVO*: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para aprovação no 4º ano de Medicina.

Orientador(a): Rogério Grimaldi Sampaio

**SALVADOR**

**2024**

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de colo de útero é uma das neoplasias mais prevalentes e mortais no mundo. Diante da dificuldade no tratamento da doença com as terapias tradicionais, torna-se imperativa a busca por novas alternativas que apresentem alta eficácia e baixa toxicidade. A terapia gênica oncológica é um caminho promissor devido aos avanços dos estudos neste campo e as boas experiências com as mais modernas ferramentas de edição gênica, como o CRISPR-Cas9. **Objetivo:** Verificar, a partir da literatura científica, como a tecnologia CRISPR-Cas9 contribui para o desenvolvimento de tratamentos contra o câncer de colo uterino suprimindo as proteínas virais E6 e E7. **Metodologia:** O presente estudo é uma revisão sistemática, sem meta análise, que tomou como referência o protocolo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews), em que utilizou-se as bases de dados PubMed/MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), EMBASE (Excerpta Medica Database) e a biblioteca eletrônica SciELO (Scientific Electronic Library Online), com a seguinte estratégia de busca: ('crispr'/exp OR crispr) AND ('cervical cancer'/exp OR 'cervical cancer') AND ('treatment'/exp OR treatment). As variáveis do estudo são CRISPR; CRISPR-Cas9; Gene editing; Cervical Cancer; Treatment; Therapy; Human Papilloma Virus; *in vivo*; E6/E7 protein. Foram aceitos artigos publicados entre 2014 e 2023 sobre experimentos *in vivo*. Os dados foram apresentados de forma descritiva, utilizando-se de tabelas e quadros. **Resultados:** Após aplicação dos descritores nas bases de pesquisas, foram encontrados 219 artigos dos quais 13 estavam elegíveis após utilizar os critérios de inclusão estabelecidos para compor esta revisão. Todos os estudos *in vivo* analisados apresentaram desfechos positivos para o uso de terapias associadas ao CRISPR-Cas para a supressão de E6 e E7. Alguns dos efeitos terapêuticos encontrados foram a diminuição do crescimento tumoral, preservação e estimulação do sistema imune, baixa toxicidade para fígado, baço, coração, rins e pulmões, e inibição da implantação de sítios metastáticos após a administração de quimioterápicos em consonância com tratamento mediado por CRISPR-Cas9. **Conclusão:** A revisão sistemática verificou que o uso de CRISPR-Cas9 apresenta um grande potencial futuro para mediar o tratamento de neoplasias cervicais por apresentar expressividade na supressão de oncogenes, tamanho tumoral, baixa toxicidade e diminuição da incidência de metástases em camundongos. Contudo, as pesquisas ainda estão centralizadas em um polo do mundo com baixa variação étnica, além de apresentar-se apenas disponíveis com animais, não sendo testada ainda em humanos. Necessita, portanto, aumentar o número de estudos para viabilizar a inserção desta terapia como auxiliar no arsenal terapêutico anti-câncer de colo uterino.

**Palavras-chave:** *Cervical cancer. CRISPR. Gene editing. Human papillomavirus. E6/E7 protein. Treatment.*

## ABSTRACT

**Introduction:** Cervical cancer is one of the most prevalent and deadly neoplasms in the world. Given the difficulty in treating the disease with traditional therapies, it is imperative to search for new alternatives that present high efficacy and low toxicity. Oncological gene therapy is a promising path due to advances in studies in this field and good experiences with the most modern gene editing tools, such as CRISPR-Cas9. **Objective:** Verify, based on scientific literature, how CRISPR-Cas9 technology contributes to the development of treatments against cervical cancer by suppressing the viral proteins E6 and E7. **Methodology:** The present study is a systematic review, without meta-analysis, which took as a reference the PRISMA protocol (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews), in which PubMed/MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), EMBASE (Excerpta Medica Database) and the electronic library SciELO (Scientific Electronic Library Online) databases were used, with the following search strategy: ('crispr'/exp OR crispr) AND ('cervical cancer'/exp OR 'cervical cancer') AND ('treatment'/exp OR treatment). The study variables are CRISPR; CRISPR-Cas9; Gene editing; Cervical Cancer; Treatment; Therapy; Human Papilloma Virus; *in vivo*; E6/E7 protein. Articles published between 2014 and 2023 about *in vivo* experiments were accepted. The data were presented in a descriptive way, using tables and charts. **Results:** After applying the descriptors in the search databases, 219 articles were found, 13 of which were eligible after using the inclusion criteria established to compose this review. All *in vivo* studies analyzed showed positive outcomes for the use of therapies associated with CRISPR-Cas for the suppression of E6 and E7. Some of the therapeutic effects found were the reduction of tumor growth, preservation and stimulation of the immune system, low toxicity to the liver, spleen, heart, kidneys and lungs, and inhibition of the implantation of metastatic sites after the administration of chemotherapy drugs in line with treatment mediated by CRISPR-Cas9. **Conclusion:** This systematic review understood that the use of CRISPR-Cas9 has great future potential to mediate the treatment of cervical neoplasms due to its significant suppression of oncogenes, tumor size, low toxicity and reduced incidence of metastases in mice. However, research is still centered in a part of the world with low ethnic variation, in addition to being only available with animals and not yet being tested on humans. Therefore, it is necessary to increase the number of studies to enable the inclusion of this therapy as an aid in the anti-cervical cancer therapeutic arsenal.

**Key-words:** Cervical cancer. CRISPR. Gene editing. Human papillomavirus. E6/E7 protein. Treatment.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
2.1 Geral	7
2.2 Específicos	7
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>8</b>
3.1 O câncer de colo de útero	8
3.2 O CRISPR	11
3.3 Aplicação do CRISPR na busca por novos tratamentos para o câncer	11
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>13</b>
4.1 Desenho de estudo	13
4.2 Critérios de elegibilidade	13
4.3 Fontes de informação	13
4.4 Estratégia de pesquisa	13
4.5 Processo de coleta de dados	14
4.6 Variáveis	14
4.7 Risco de viés	14
4.8 Síntese de dados	14
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
5.1 Identificação e seleção dos artigos	15
5.2 Caracterização dos artigos	16
5.3 Avaliação do risco de viés	17
5.4 Principais achados	17
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>20</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>26</b>
<b>APÊNDICE A – Quadro 3</b>	<b>29</b>
<b>APÊNDICE B – Quadro 3 (continuação)</b>	<b>30</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020. Dentre os tipos de câncer, o mais comum em 23 países é o câncer de colo de útero.<sup>1</sup> No Brasil, esta neoplasia maligna é o terceiro tipo de câncer mais incidente em mulheres, excluídos os tumores de pele não melanoma.<sup>2</sup> No quesito mortalidade, pelos dados do Atlas de Mortalidade do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2020, a taxa ajustada para o Brasil (5 óbitos/100 mil mulheres) ficou levemente acima da taxa ajustada mundial (4,6 óbitos/100 mil mulheres).<sup>3</sup> Diante de tais dados, fica clara a dimensão do problema que o câncer de colo de útero representa para a saúde das mulheres.

Apesar do conhecimento já existente sobre os fatores de risco e fisiopatologia da doença, o controle e tratamento do câncer cervical ainda é um desafio. Isto porque muitos casos são diagnosticados quando a lesão precursora já se encontra em estado avançado. Quando a neoplasia está em alto grau de invasão epitelial, o tratamento torna-se mais complexo, pois aumenta a possibilidade de metástase. A histerectomia total, cirurgia em que todo o útero é retirado, costuma ser a principal opção para garantir maior sobrevida para a paciente.<sup>1,4</sup>

O CRISPR significa *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente inter espaçadas) e foi identificado após as pesquisadoras *Emmanuelle Charpentier* e *Jennifer Doudna* estudarem o sistema imune de bactérias *Streptococcus*. Sua descoberta foi um grande marco da ciência, uma vez que o CRISPR-Cas9 é uma “tesoura gênica” capaz de cortar e alterar sequências do DNA, usada pelas bactérias como proteção contra vírus. Graças a esta ferramenta, é possível fazer edições programadas no genoma de quase todos os tipos de células. Por sua importância, a revelação do CRISPR rendeu às pesquisadoras um prêmio Nobel de Química em 2020.<sup>5</sup>

A tecnologia CRISPR-Cas9 é utilizada por pesquisadores para elucidar a função de diferentes genes e sua relevância na história natural das doenças. Um exemplo é a criação de plantas geneticamente modificadas para resistir à seca em locais áridos.<sup>5</sup> Em medicina, o CRISPR tem um papel importante no estudo do genoma humano,

atuando na terapia gênica e dos tratamentos oncológicos. Em laboratórios, a ferramenta é utilizada na criação de modelos que simulam as células lesadas, possibilitando a busca por novas drogas e terapias capazes de causar a remissão do câncer, além de contribuir para o desenvolvimento de imunoterapias mais eficientes e menos citotóxicas.<sup>6-8</sup>

Em razão do potencial apresentado pelo CRISPR-cas9 para o desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer, é útil ampliar sua aplicação para o estudo de terapias contra o câncer cervical. Como muitas pacientes recebem o diagnóstico em estágios avançados da doença, os tratamentos clássicos por cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia apresentam constantemente baixa eficácia.<sup>1</sup> Dessa forma, o desenvolvimento de uma nova terapia carrega o potencial de melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência das mulheres do Brasil e do mundo.

Diante o exposto, observando as possibilidades do uso da técnica CRISPR no desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer de colo de útero e considerando a limitada produção científica na área da terapia gênica oncológica, se mostra necessário avaliar as informações disponíveis na literatura científica atual e verificar se os resultados apontam para a viabilidade de uma intervenção por terapia gênica que seja mais custo efetiva e com maior probabilidade de remissão da doença para os pacientes oncológicos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Verificar como a tecnologia CRISPR-Cas9 contribui para o desenvolvimento de tratamentos contra o câncer de colo uterino a partir da literatura científica.

### **2.2 Específicos**

- Identificar as aplicações da técnica CRISPR nas pesquisas médicas de tratamento contra o câncer de colo de útero e sua relação com as proteínas virais E6/E7;
- Averiguar os resultados dos estudos com CRISPR-Cas9 na elaboração dos tratamentos;
- Verificar os principais os tratamentos disponíveis para o câncer de colo de útero;
- Descrever as barreiras encontradas na utilização terapêutica da técnica CRISPR em humanos.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O câncer de colo de útero

O câncer de colo uterino é o terceiro tumor maligno mais comum no Brasil e nos Estados Unidos.<sup>1,4</sup> Pelos dados da OMS, o câncer de colo uterino é mais prevalente em mulheres de países pobres ou em desenvolvimento, como os da África, América do Sul e Central. Para o Brasil, a letalidade da doença apresenta índices diferentes entre as regiões.<sup>3</sup> Sabe-se que um importante fator para o melhor prognóstico da doença é a detecção precoce por meio do exame preventivo.<sup>4</sup> Logo, infere-se que as diferentes taxas de letalidade por região do mundo, incluindo do Brasil, representam a discrepância entre os acessos à saúde entre as localidades. Além disso, apontam na direção da necessidade do desenvolvimento de tratamentos eficazes para tumores avançados, haja visto o alto intervalo de tempo que existe entre o desenvolvimento inicial do processo tumoral e o diagnóstico.

Primeiramente, é preciso entender a região anatômica do colo do útero. Com aproximadamente 2,5 cm de comprimento, o colo uterino constitui o terço inferior do útero. De formato cilíndrico, o colo pode ser dividido em duas porções: a supravaginal e a vaginal. A porção supravaginal é, anteriormente, separada da bexiga urinária e, posteriormente, separada do reto. As relações anatômicas entre essas regiões são importantes porque são locais com alta adesão de implantação metastática devido à contiguidade. No centro da porção vaginal se situa o óstio do útero.<sup>9</sup> É nesta área que se localiza a junção escamocolunar (JEC), o ponto onde o epitélio escamoso da ectocérvice se encontra com o epitélio colunar da endocérvice, principal alvo da infecção pelo papilomavírus humano (HPV).<sup>10</sup>

A infecção pelo HPV constitui a principal causa de câncer de colo uterino. O HPV é um vírus DNA pequeno, não envelopado, com filamento duplo e protegido por capsídeo.<sup>4</sup> Com base nas sequências de DNA, os HPVs são classificados em tipos e agrupados de acordo com seu risco oncogênico. Há aproximadamente 15 tipos de HPV de alto risco identificados, mas apenas dois deles, os tipos HPV-16 e HPV-17, são responsáveis por até 70% dos casos de câncer cervical. As cepas de alto risco oncogênico aumentam a probabilidade de carcinoma em células escamosas de outros órgãos além do útero, como pênis, vagina, vulva, ânus, tonsilas palatinas e outros

pontos da orofaringe. Por sua vez, os HPVs de baixo risco costumam cursar com verrugas genitais e perianais conhecidas como condilomas.<sup>10</sup> A principal via de transmissão do HPV é a sexual, seja por contato genitogenital ou genito-oral, e, portanto, uma das mais efetivas formas de prevenção é o uso de preservativos nas relações.<sup>4,10</sup>

As infecções por HPV são extremamente comuns e a maioria dos indivíduos sexualmente ativos são infectados no início da atividade sexual. No entanto, a maioria dos casos de infecção por HPV é transitória e assintomática, sem provocar alterações teciduais e sendo eliminada pela resposta imunológica dos hospedeiros no intervalo de alguns meses. Os HPVs de alto risco são aqueles com maior probabilidade de estabelecer uma infecção persistente, sobretudo em indivíduos imunossuprimidos, que são suscetíveis a evoluir com o papilomavírus por mais tempo no organismo.<sup>4,10</sup>

O HPV tem uma predileção por infectar células escamosas metaplásicas imaturas encontradas na junção escamocolunar, abundantemente encontradas no colo uterino. Uma vez infectada, as células sofrem a ação das proteínas virais E6 e E7 cuja função é interferir na atividade das proteínas supressoras de tumores. A proteína viral E6 age ligando-se à proteína supressora de tumores p53 e promovendo sua degradação pelo proteassomo, além de aumentar a expressão de telomerase para induzir uma imortalização celular. Em consonância, a proteína E7 liga-se à forma ativa da proteína de supressão tumoral RB, induzindo sua degradação por via do proteassomo, e também inibe as proteínas p21 e p27, que possuem importante função na regulação do ciclo celular.<sup>4,10</sup> O resultado da soma destes efeitos é o aumento da taxa de proliferação celular e conseqüente risco de desenvolvimento de neoplasia.

Uma vez que as condições para a instalação e progressão das lesões por HPV estão estabelecidas, é possível observar e avaliar sua evolução ao longo do tempo. Para tal, foram criados sistemas de classificação para lesões precursoras cervicais escamosas, sendo os mais conhecidos o da Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) e o da Lesão Intraepitelial Escamosa (SIL). O SIL é o sistema mais recente e utilizado por ser adaptado às possibilidades de conduta para a paciente, que são observação ou tratamento cirúrgico. Dessa forma, o SIL classifica as lesões em dois níveis: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau ou lesão intraepitelial escamosa de alto grau.<sup>10</sup> O esfregaço de Papanicolau é um importante método de rastreamento que permite a

avaliação e classificação histológica do tecido cervical. Portanto, o Papanicolau teve relevância na redução da incidência e mortalidade do câncer de colo uterino.<sup>11</sup>

O câncer de colo de útero possui três categorias por subtipo histológico reconhecidas pela OMS: o carcinoma de células escamosas (70% a 80%), o adenocarcinoma (15% a 20%) e, os mais raros, adenoescamoso, neuroendócrino e o indiferenciado. Para o estadiamento dos carcinomas, a classificação TNM e da *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) são as mais utilizadas. Essas classificações avaliam o tamanho tumoral, envolvimento da vagina ou paramétrio, extensão para bexiga ou reto e presença de metástases à distância. Exames de imagem são úteis para descrições acuradas da morfologia das lesões neoplásicas, entre elas pode-se citar a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a tomografia por emissão de pósitron (PET).<sup>11,12</sup>

Para os casos de estadiamento baixo, em que o carcinoma *in situ* tem menos de 0,7mm de comprimento e não há invasão do espaço linfático-vascular (LSVI), uma conização ou traquelectomia simples pode ser indicado para a paciente que deseja manter a fertilidade. Para as mulheres que não desejam manter a fertilidade, é aconselhado fazer a histerectomia simples, cirurgia de remoção do útero e colo do útero, preservando as estruturas vizinhas. Para pacientes com FIGO em estágios mais avançados e que não desejem manter a fertilidade, o padrão é fazer a histerectomia radical com dissecação das cadeias de linfonodos bilaterais. Alguns estudos estão comprovando as vantagens da quimioterapia neoadjuvante para diminuir o tamanho do tumor antes da cirurgia, mas ainda há um percentual de pacientes que são impossibilitadas de fazer o procedimento devido à citotoxicidade ou falha terapêutica. No entanto, a quimiorradioterapia em tumores localmente avançados é o tratamento padrão há praticamente duas décadas.<sup>11</sup> No caso dos pacientes com doença metastática, o prognóstico costuma ser ruim e a terapia preconizada é a quimioterapia paliativa com cisplatina para aliviar sintomas e melhorar a qualidade de vida. Este tratamento, entretanto, apresenta uma baixa taxa de resposta e curta sobrevida livre de progressão.<sup>11,12</sup>

### 3.2 O CRISPR

O início da identificação da ferramenta gênica CRISPR se deu em 1987, quando pesquisadores perceberam a presença de repetições de 29 nucleotídeos não relacionados em bactérias *Escherichia coli*, interrompidas por sequências de nucleotídeos sem repetição (*spacers*).<sup>13</sup>

Com o passar dos anos, outros estudos identificaram as mesmas repetições em diferentes bactérias. Em 2012, a técnica de CRISPR-Cas9 foi utilizada pela primeira vez com o objetivo de editar o genoma humano após modificarem um pequeno RNA guia (sgRNA) para programar a especificidade do CRISPR.<sup>13</sup>

Diferente das técnicas predecessoras, como a *Zinc-Finger Nucleases* (ZFN) e a *Transcription Activator-like Effector Nucleases* (TALEN), a CRISPR-Cas9 é mais flexível e eficiente por causa do seu emparelhamento de bases simples e preciso entre sgRNA e DNA alvo.<sup>13</sup> Nas bactérias, o CRISPR funciona como defesa contra vírus ao identificar o DNA viral e clivar o DNA exógeno do endógeno bacteriano. Por isso, as pesquisas na área da terapia gênica buscam utilizar o CRISPR para atacar lócus gênicos específicos de doenças ou condições debilitantes. Uma forma encontrada é a de induzir a perda de função de um gene ao fazer a proteína Cas9 introduzir *double-stranded breaks* (DSB) no DNA para induzir mutações por meio do reparo de DNA com base em conexões terminais não homólogas (NHEJ). No entanto, esta técnica não é aplicável a todos os cenários.<sup>14</sup> Assim, é fundamental que estudos com a ferramenta CRISPR-Cas9 identifiquem as limitações da aplicabilidade de seus resultados.

### 3.3 Aplicação do CRISPR na busca por novos tratamentos para o câncer

O CRISPR-Cas9 está sendo muito utilizado em pesquisas para tratamento do câncer por esta ser uma doença multifatorial e complexa de base genômica.<sup>7,8,14,15,16</sup> Em laboratório, os sistemas CRISPR são capazes de produzir modelos de células cancerígenas, providenciando um meio para identificar e testar determinantes genéticos da doença e alvos terapêuticos. Também está sendo bastante utilizado no campo da imunoterapia, ao aumentar a potência do tratamento enquanto diminui a toxicidade e os custos de manufatura. É possível desenvolver testes diagnósticos

usando o CRISPR para detectar números discretos de células cancerígenas ou com mutações raras em amostras clínicas, ou até terapias que introduzem o CRISPR-Cas9 em tumores para inibir o crescimento.<sup>7</sup>

Para o caso do câncer de colo de útero, é muito interessante a possibilidade de combater a infecção por vírus carcinogênico com o CRISPR-Cas9. Devido a sua origem como sistema de defesa contra vírus em bactérias, é imaginável o uso da ferramenta no combate ao HPV, vírus da hepatite B, hepatite C e Epstein Barr para prevenir o desenvolvimento de neoplasias. Utilizando o Cas9 associado ao sgRNA específico do genoma viral, os oncogenes virais podem ser editados diretamente e/ou eliminados, bem como os genes necessários para a manutenção e replicação viral. O resultado esperado com esse processo é a supressão da expressão do oncogene viral e indução das células cancerígenas à apoptose.<sup>14,16</sup>

Diante do exposto, ao considerar as potenciais aplicações da técnica CRISPR no desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer de colo de útero e diante da escassez de pesquisa científica na área da terapia gênica oncológica, torna-se imperativo analisar as informações atualmente disponíveis nos bancos de dados. Tal análise visa verificar se os resultados indicam a viabilidade de uma intervenção por terapia gênica que seja mais eficiente em termos de custos e apresente uma probabilidade superior de induzir remissão da doença em pacientes oncológicos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Desenho de estudo

Trata-se de uma revisão sistemática da literatura sem meta-análise que utilizou o protocolo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews*) como referência na elaboração.<sup>17,18</sup>

### 4.2 Critérios de elegibilidade

Os critérios de inclusão para os artigos são o tipo de estudo (serão aceitos ensaios *in vivo*), período de publicação entre 2014 e 2023, e idioma original inglês, português ou espanhol. Os critérios de exclusão são estudos com desenho do tipo revisão (revisão sistemática, revisão narrativa entre outros) e artigos que não atenderem a no mínimo 60% dos critérios preconizados pelas ferramentas utilizadas para o risco de viés.

### 4.3 Fontes de informação

Os dados analisados neste trabalho são secundários. As bases de pesquisa utilizadas para o desenvolvimento deste projeto foram o PubMed/MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*), Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), EMBASE (*Excerpta Medica Database*) e a biblioteca eletrônica SciELO (*Scientific Eletronic Library Online*).

### 4.4 Estratégia de pesquisa

A estratégia de pesquisa utilizada foi a PICO (População; Intervenção; Controle; Outcome), sendo: P – Pacientes com câncer de colo de útero; I – Tratamentos desenvolvidos com a tecnologia CRISPR; C – não se aplica; O – Remissão do câncer ou melhora na sobrevida. A pergunta respondida com o estudo foi “como a tecnologia CRISPR contribui para o desenvolvimento de tratamentos contra o câncer de colo uterino”. No campo de busca das bases de pesquisa, a ordem de descritores colocada para encontrar os artigos foi (‘crispr’/exp OR crispr) AND (‘cervical cancer’/exp OR

‘cervical cancer’) AND (‘treatment’/exp OR treatment). Artigos presentes em “artigos relacionados” na base de dados PubMed também foram considerados para a inclusão.

#### **4.5 Processo de coleta de dados**

Os dados foram coletados por dois revisores, que aplicaram a estratégia de busca nas diferentes bases de dados e excluíram os artigos repetidos encontrados ou os que não atenderam os critérios de inclusão. Posteriormente, os artigos selecionados durante a pesquisa foram confrontados.

#### **4.6 Variáveis**

As variáveis do estudo foram CRISPR; CRISPR-Cas9; Gene editing; Cervical Cancer; Treatment; Therapy; Human Papilloma Virus; *in vivo*; E6/E7 protein. Entre as variáveis de desfecho, serão analisadas remissão do câncer e morte.

#### **4.7 Risco de viés**

A análise do risco de viés metodológico foi feita por meio da ferramenta e escala MICRO (*Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively*).<sup>19</sup>

#### **4.8 Síntese de dados**

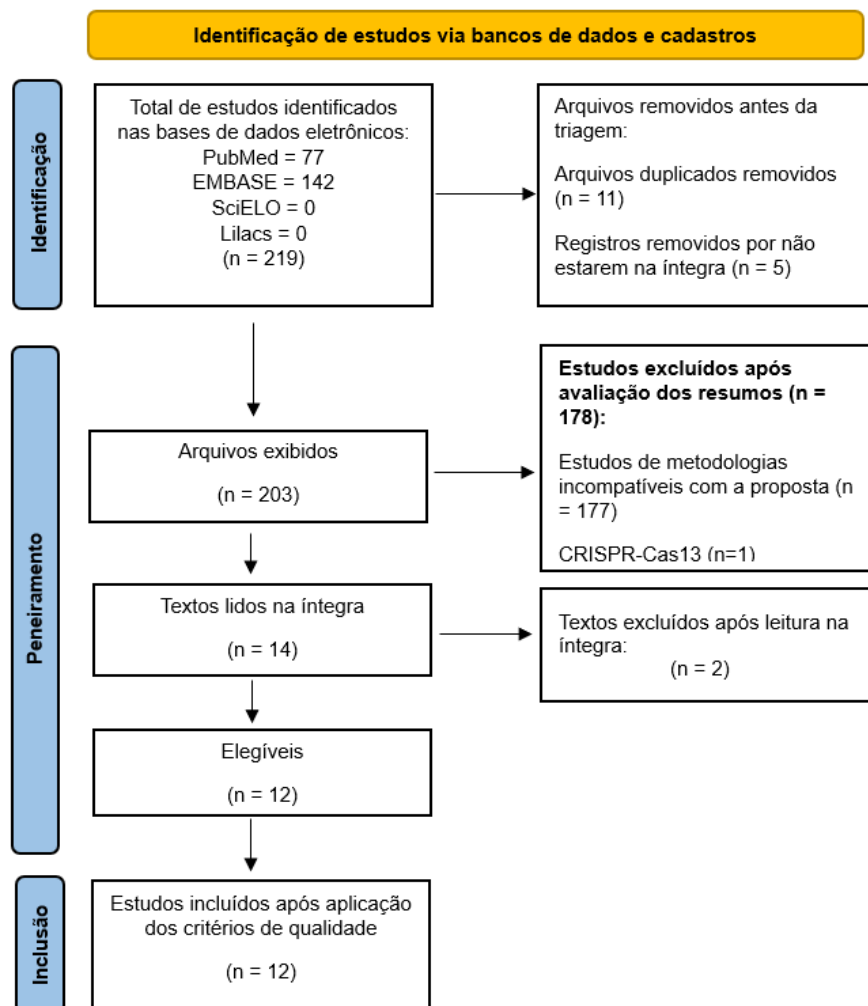
Os dados foram apresentados de forma descritiva, utilizando-se tabelas e quadros. A quantidade de artigos selecionada não permitiu a apresentação dos resultados em forma de números absolutos, percentuais e média (desvio padrão).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificação e seleção dos estudos

Após a aplicação da estratégia de busca com os descritores estabelecidos na metodologia durante os anos de 2023 e 2024, bem como o rastreamento dos artigos publicados em inglês, português ou espanhol, foram identificados 219 artigos. Após aplicação dos critérios de inclusão e avaliação do risco de viés metodológico, a amostra desta revisão sistemática foi composta por 12 artigos. Vide etapas percorridas para elegibilidade na Figura 1.

**Figura 1** – Fluxograma do processo de seleção dos estudos elegíveis.





## 5.2 Caracterização dos artigos

Como exposto no Quadro 1, 10 (dez) dos artigos selecionados foram publicados nos últimos cinco anos. É relevante também destacar que onze dos doze artigos foram produzidos na China. Os outros dois artigos são provenientes do Japão e da Austrália.

**Quadro 1** – Caracterização dos artigos selecionados para a construção da revisão. Salvador, BA, 2023.

Base de dados	Local	Autores/Ano	Título	Avaliação risco viés (%)
PUBMED	Japão	Yoshida (2019) <sup>21</sup>	CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6	87,5
PUBMED	China	Zhen (2019) <sup>22</sup>	Synergistic antitumor effect on cervical cancer by rational combination of PD1 blockade and CRISPR-Cas9-mediated HPV knockout	87,5
PUBMED	China	Ling (2023) <sup>23</sup>	Gene Targeting of HPV18 E6 and E7 Synchronously by Nonviral Transfection of CRISPR/Cas9 System in Cervical Cancer	100
PUBMED	China	Gao (2019) <sup>24</sup>	Hyperbranched poly ( $\beta$ -amino ester) based polyplex nanoparticles for delivery of CRISPR/Cas9 system and treatment of HPV infection associated cervical cancer	100
PUBMED	China	Li (2021) <sup>25</sup>	CRISPR/Cas9 nanoeditor of double knockout large fragments of E6 and E7 oncogenes for reversing drugs resistance in cervical cancer	100
PUBMED	China	Ling (2020) <sup>26</sup>	Gene targeting of HPV18 E6 and E7 synchronously by non-viral transfection of CRISPR/Cas9 system in cervical cancer	75
PUBMED	China	Xiong (2021) <sup>27</sup>	E7-Targeted nanotherapeutics for key HPV afflicted cervical lesions by employing CRISPR/Cas9 and Poly (Beta-Amino Ester)	87,5
PUBMED	China	Zhen (2014) <sup>28</sup>	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9	87,5
PUBMED	China	Zhu (2018) <sup>29</sup>	Nanoparticles based on Poly ( $\beta$ -Amino Ester) and HPV16-Targeting CRISPR/shRNA as potential drugs for HPV16-Related cervical malignancy	87,5
PUBMED	China	Gao (2022) <sup>30</sup>	The application of CRISPR/Cas9 system in cervical carcinogenesis	100

PUBMED	China	Zhen (2016) <sup>31</sup>	In vitro and in vivo synergistic therapeutic effect of cisplatin with human papillomavirus16 E6/E7 CRISPR/Cas9 on cervical cancer cell line	87,5
PUBMED	Australia	Jubair (2021) <sup>32</sup>	CRISPR/Cas9-loaded stealth liposomes effectively cleared established HPV16-driven tumors in syngeneic mice	100

### 5.3 Avaliação do risco de viés

A escala MICRO (*Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively*) foi escolhida por ser a ferramenta mais adequada para análise do risco de viés no presente trabalho, pois trata-se de uma investigação microbiológica. Todos os artigos selecionados ficaram acima do limite de 60% preconizado pelos pesquisadores. É possível verificar o risco dos estudos no Quadro 3 (Apêndices A e B).

### 5.4 Principais achados

Como pode ser observado no Quadro 2 abaixo, todos os estudos realizaram experimentos *in vivo* e *in vitro* concomitantemente. Apresentaram resultados positivos em ambas as modalidades experimentais. *Yoshida*<sup>21</sup>, *Zhen*<sup>22,28</sup>, *Ling*<sup>26</sup>, protagonizaram estudos com o intuito de suprimir a ação dos dois oncogenes principais do HPV, E6 e E7 e concluíram que a supressão desses dois oncogenes podem indicar aumento de P53, como consequência da supressão desses genes.

*Jubair*<sup>32</sup>, por sua vez, concluiu que a supressão apenas de E7 pode eliminar tumores em camundongos saudáveis, haja vista que E7 é um oncogene mais ativo na permissividade da implantação tumoral que E6.

*L<sup>25</sup>* constatou nas análises do estudo realizado que na supressão dos oncogenes há uma diminuição da resistência do tumor às medicações antineoplásicas.

Outro resultado importante apresentado é a baixa citotoxicidade que autores como *Jubair* aponta e que é reiterado por *Gao*.<sup>24,30,32</sup> Esses autores estudaram a ação da terapia sobre órgãos processadores de metabólitos como o fígado e que tem função na homeostase celular sanguínea, como o baço.

Por fim, *Zhen*<sup>31</sup> conclui que o uso de terapias supressoras de oncogenes é útil na inibição da implantação de transplantes metastáticos, inibindo a progressão da gravidade da neoplasia.

**Quadro 2 - Método, objetivos e principais resultados dos artigos selecionados. Salvador, BA, 2023.**

<b>Autores/Ano</b>	<b>Método</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Resultados</b>
Yoshida (2019) <sup>21</sup>	Estudo <i>in vivo</i>	Desenvolver terapia com o CRISPR-Cas9, visando bloquear E6	A menor expressão de E6 induziu diminuição de crescimento tumoral e consequente aumento de p53.
Zhen (2019) <sup>22</sup>	Estudo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Bloqueio da via PDL-1 para supressão de oncogenes E6 e E7	Aumento da população de células T CD8+ e CD4+ e células dendríticas.
Ling (2023) <sup>23</sup>	Estudo <i>in vivo</i>	Transfecção com lipossomas de CRISPR-Cas9 para supressão de E6 e E7	Diminuição de atividade tumoral. Aumento da população de células do sistema imune.
Gao (2019) <sup>24</sup>	Estudo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Aplicar a ferramenta CRISPR-Cas9 direcionado ao HPV16 E7 em pacientes clínicos	Diminuição da atividade tumoral. Baixa toxicidade terapêutica. Reconhece limitações do meio, como pH vaginal, e aponta necessidade de estudos complementares.
Li (2021) <sup>25</sup>	Estudo <i>in vivo</i>	Eliminação de E6 e E7 através de nanoeditor genético	Diminuiu a tolerância medicamentosa das células tumorais.
Ling (2020) <sup>26</sup>	Estudo <i>in vivo</i>	Desenhar um sistema com CRISPR-Cas9 capaz de suprimir expressão de E6 e E7	Induziu a apoptose de células tumorais. Aumento da expressão de p53 e p21. Admite possibilidade do uso da terapia mediada por CRISPR-Cas no futuro.
Xiong (2021) <sup>27</sup>	Estudo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Desenvolvimento de nanopartículas recombinantes com a ferramenta CRISPR-Cas	Reverteu o fenótipo maligno do tumor. Diminuição do crescimento tumoral.
Zhen (2014) <sup>28</sup>	Estudo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Supressão de E6 e E7 por nanoedição gênica para HPV 16	Diminuiu a capacidade de proliferação celular. Aumento de p53 e p21.
Zhu (2018) <sup>29</sup>	Estudo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Redução de E7 através de edições baseadas em nanopartículas	Reversão de fenótipo maligno tumoral. Baixa toxicidade para fígado e baço.
Gao (2022) <sup>30</sup>	Estudo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Transfecção de plasmídeo para inibição de E7 em HPV 16	Inibiu crescimento tumoral. Estimulou apoptose.
Zhen (2016) <sup>31</sup>	Estudo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Transfecção de plasmídeo para supressão de E6 e E7	Induz à apoptose. Inibiu metástases.
Jubair (2021) <sup>32</sup>	Estudo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Transfecção de lipossomas com CRISPR-Cas direcionados a E7	Eliminou tumores em camundongos imunocompetentes. Sem toxicidade para fígado e baço.

## 6 DISCUSSÃO

Como demonstrado no quadro 1, dez dos doze artigos foram publicados entre 2019 e 2023, o que coincide com o período em que o Nobel de Química foi recebido pelas pesquisadoras *Emmanuelle Charpentier* e *Jennifer Doudna*, responsáveis por revelar a tecnologia CRISPR.<sup>5</sup>

O presente estudo teve como principal objetivo demonstrar a importância do CRISPR/Cas9 para o desenvolvimento de novas terapias para o controle do câncer de colo de útero. Para tal, o CRISPR/Cas9 dos estudos analisados visou inibir a síntese de dois oncogenes importantes para a supressão de proteínas celulares antitumorais, E6 e E7.

100% dos estudos encontrados nas bases de dados eleitas para esta apontaram que a supressão de oncogenes pode ter respostas significativas no tratamento de neoplasias cervicais.

E6 e E7 são oncogenes que permitem a perpetuação de células com potencial oncológico porque atuam diretamente em mecanismos celulares que inibem o crescimento tumoral. Enquanto E6 trabalha estimulando a degradação de p53, E7 inibe a proteína supressora tumoral, pRb. Em ambos os casos, estas oncoproteínas têm efeitos sinérgicos que permitem a instalação e proliferação celular anormal, permitindo o surgimento de neoplasias cervicais.<sup>4,10,33</sup>

A utilização de CRISPR/Cas9 apresentou potencial em suprimir os genes E6 e E7.<sup>33,34</sup> A utilização de E6-CRISPR/Cas9 em células infectadas inibiu a expressão desses genes oito vezes mais, quando comparado a um grupo controle negativo.<sup>31,35</sup> Além disso, é interessante notar que a associação de CRISPR/Cas9 com terapia quimioterápica, como o CDDP, apresentou resultado satisfatório em alguns estudos.<sup>31</sup> Isso porque, tais estudos demonstraram que a combinação entre CRISPR/Cas9 e CDDP apresentou uma alta especificidade para células acometidas pelo vírus do HPV, pois comprometeram gravemente a viabilidade celular das células de linhagem de câncer de colo cervical, em comparação com células sem acometimento tumoral.<sup>31</sup> Mais do que isso, outros estudos apontam que, além da especificidade ao

atingir células cancerígenas, a mediação por CRISPR/Cas9 tem importante especificidade para células pré-cancerígenas.<sup>30</sup>

A implantação de sítios metastáticos foi inibida, após a associação de CRISPR/Cas9 e quimioterápicos.<sup>31</sup> Segundo o estudo de Zhen<sup>31</sup> (2016), ao indicar apenas o tratamento com CDDP para camundongos a expressão de núcleos atípicos visualizados nas lâminas de biópsias pulmonares eram maiores do que quando havia a associação do quimioterápico com a tecnologia de edição gênica.<sup>31</sup> Não foi possível identificar em outras pesquisas selecionadas pela metodologia desta revisão algo que corrobora ativamente com esta ideia, sendo necessários mais estudos posteriormente que demonstrem a confiabilidade desse dado, que compreende a ação do CRISPR/Cas9 não apenas como um poderoso inibidor de crescimento tumoral, mas também como um inibidor de implantação de sítios metastáticos, o que agrega, conseqüentemente, em alargamento das possibilidades terapêuticas de pacientes oncológicos.

Além disso, outros estudos apontaram que, outras terapias mediadas por CRISPR/Cas9, como por exemplo a terapia de transferência de Células T apresentou como efeito o aumento de células CD 8+, com reversão importante do microambiente tumoral.<sup>23</sup> A melhora do controle tumoral mediada por células do sistema imunológico parece ser um dado relevante para o aprofundamento de pesquisas posteriores. Isso porque, além do aumento de células CD 8+, outros autores documentaram um aumento de células dendríticas, células T, e células CD 4+, ao passo que demonstraram a transição de um microambiente tumoral imunossuprimido para um ambiente estimulador do sistema imune.<sup>22,23</sup>

Dessa maneira, entende-se que o sistema CRISPR/Cas9 trabalha concomitantemente suprimindo a expressão de genes potencialmente oncogênicos, ao mesmo tempo que, ao ser utilizado em sinergia com outras terapias oncológicas, pode apresentar um estímulo à conservação e progressão das reservas imunológicas do organismo.<sup>22,23</sup>

Associado a isso, há uma grande preocupação ao desenvolver terapias antitumorais na citotoxicidade apresentada pelas drogas ao serem administradas ao paciente. Um estudo mostrou que após a administração de polímeros associados a nanopartículas e CRISPR/Cas9 na coxa de camundongos houve diferença significativa no

crescimento celular das células tumorais cervicais, em contraste com a baixa taxa de apoptose do fígado e do baço, além de uma alta viabilidade celular nestes órgãos após 72 horas de administração do modelo de edição gênica.<sup>29</sup> Isso leva à conclusão de que houve uma redução do metabolismo tumoral cervical, apesar de haver uma baixa taxa de lesão hepática e esplênica.<sup>29,32,27</sup> Outros estudos, por sua vez, ampliaram esta análise ao apontar que a administração de terapias associadas ao direcionamento do CRISPR/Cas9 apresentaram resultados com baixa citotoxicidade não só em fígado e em baço, como também em coração, rins e pulmões, além de haver estabilidade no peso de camundongos.<sup>25</sup> Esses efeitos maximizados são relevantes porque, ao que tudo indica, a administração de quimioterápicos associados à tecnologia CRISPR/Cas9 têm efeito deletério sobre a resistência celular a medicações anti-tumorais.<sup>25</sup>

A supressão da expressão de E6 e E7, mediada por CRISPR/Cas9, aponta para uma consequente elevação das concentrações plasmáticas de p53 e pRb.<sup>26,28,30</sup>

Neste contexto, foi comprovado por um estudo que o volume tumoral não só diminuiu no período pós-tratamento com auxílio do CRISPR/Cas9, como também houve uma lentificação do crescimento tumoral.<sup>30</sup> O mesmo estudo demonstrou que parte deste resultado foi expresso devido a um aumento na concentração intracelular de Caspases-3.<sup>30</sup>

Associado a isso, estudos apontaram a diminuição do fenótipo tumoral maligno, bem como a diminuição do volume tumoral em camundongos.<sup>27,29,30</sup> Além disso, demonstrou-se que com o prolongamento do tratamento sobre camundongos foi possível reverter a NIC (*Neoplasia Intraepitelial Cervical*) de camundongos, que passou a assemelhar-se com um epitélio saudável em lâminas coradas com HE.<sup>30</sup>

A supressão de E7 e E6 simultaneamente no mesmo hospedeiro vivo apresentou dentro dos estudos uma unanimidade dos autores quanto a uma resposta positiva para a viabilidade da supressão dessas proteínas no tratamento de neoplasias cervicais. Contudo, um artigo se diferenciou dos demais ao apontar a viabilidade do tratamento partindo apenas da supressão de apenas um dos dois oncogenes, E6.<sup>21</sup>

O crescimento tumoral, em células em que foram administrados supressores de E6 em doses concentradas, mediados por CRISPR/Cas9, apresentou significativa diminuição em comparação com os administrados com doses consideradas não

concentradas. Após 42 dias, percebeu-se que os volumes tumorais eram de  $114\pm 60$  e  $817\pm 114$  mm<sup>3</sup>, em camundongos em que foram administradas doses concentradas e não concentradas, respectivamente, de supressores de E6. Assim como em estudos anteriores, os camundongos utilizados neste estudo não apresentaram diferença significativa de peso corporal ao final do experimento.<sup>21</sup>

Assim, os resultados apontam que, tanto isoladamente quanto em conjunto, a supressão dos oncogenes podem ser a chave para uma nova terapia de alta eficácia, baixa toxicidade e boa resposta imunológica para o tratamento cervical em humanos nos próximos anos.

Este estudo apresentou algumas limitações a serem consideradas. Entre elas, a ausência de ensaios clínicos em seres humanos, havendo um predomínio na literatura em estudos *in vitro* e *in vivo*, apresentando como hospedeiros, geralmente, roedores. Por um lado, pode ser justificado pelo fato de os estudos ainda se apresentarem em uma fase relativamente recente dos seus desenvolvimentos. Contudo, por não apresentarem uma aplicação em humanos é inviável realizar análises assertivas para a utilização deste recurso tecnológico na espécie humana.<sup>34</sup>

Associado a isso, o organismo humano apresenta peculiaridades que são distintas em camundongos. Alguns estudos apontaram, por exemplo, a microbiota vaginal, o pH ou ainda interações citológicas exclusivas em humanos que podem mitigar os efeitos da terapia em humanos, a despeito dos seus resultados otimizados em animais.<sup>21,22</sup> Desta maneira, é necessário investir em estudos a ponto de permitir que tais tecnologias sejam aplicadas em mulheres e, assim, testar a viabilidade real desta terapia no combate à neoplasia cervical no gênero humano.

Outra limitação deste estudo é que o conteúdo obtido a partir dos resultados dos artigos que compuseram a amostra não possibilitou a apresentação dos resultados de forma descritiva em números absolutos, percentuais e média (desvio padrão).

É interessante notar que nas pesquisas há um predomínio do desenvolvimento destas ferramentas em países orientais. Todos os estudos são orientais, enquanto que 10, dos 12 são chineses. Apresenta-se, assim, uma concentração deste conhecimento em uma região específica do mundo, com uma população característica de uma região. Faz-se necessário, contudo, que os estudos se espalhem por outras regiões do mundo a fim de que os testes possam ser realizados em populações que



apresentem mulheres de diferentes etnias, recursos econômicos e acessos diferentes à saúde a fim de viabilizar mais precocemente as tecnologias desenvolvidas para as mais variadas populações femininas do planeta que são acometidas por neoplasias de colo.

Além disso, a terapia gênica ainda está nas suas primeiras décadas de desenvolvimento no mundo. Logo, diversos mecanismos podem ser utilizados de maneira inadequada que podem gerar problemas maiores para os pacientes. Entre esses problemas, pode-se citar mutações acidentais causadas por edições gênicas mal parametrizadas, bem como recorte ativo de genes importantes para a expressão de proteínas de alto valor biológico e que possuem funções ativas importantes tanto em meio intracelular como em meio extracelular. Dessa maneira, a expansão das técnicas para seres humanos precisa cumprir rituais e liturgias que respeitem a bioética e que não ameacem a integridade da saúde dos pacientes pesquisados e o público-alvo da terapia desenvolvida.

## 7 CONCLUSÃO

Através desta revisão sistemática foi possível verificar como a tecnologia CRISPR-Cas9 contribui para o desenvolvimento de tratamentos contra o câncer de colo uterino. Assim, foi identificado que a supressão dos oncogenes E6 e E7 mediadas por CRISPR/Cas9 apresenta um grande potencial de ser utilizado nas próximas décadas como tecnologia auxiliar no tratamento oncológico de neoplasias de colo uterino. Identificou-se que a técnica utilizada apresentou em modelo animal diminuição real de volume tumoral, sem apresentar perda ponderal significativa associada. Além disso, outros estudos apontaram uma conservação do sistema imunológico, com otimização do número de CD 8+, CD 4+, células T e células dendríticas.

Mais do que isso, alguns estudos apontaram que houve reversão do fenótipo maligno da neoplasia em animais e em outro estudo foi possível perceber uma diminuição da taxa de implantação de sítios metastáticos em foco pulmonar.

Em consonância, identificou-se que, ao ser utilizado em sinergia com tratamento quimioterápico, a supressão de oncogenes E6 e E7 mediada por CRISPR demonstrou uma diminuição da resistência tumoral aos medicamentos, bem como uma especificidade de atuação em células malignas e pré-cancerígenas.

Por fim, foi apontado na literatura pesquisada uma baixa toxicidade em fígado, baço, pulmões, coração e rins, ao ser utilizada a técnica mediada por CRISPR na supressão dos oncogenes pesquisados.

Faz-se necessário, portanto, que haja um incentivo na produção de pesquisas associadas ao tema ao redor do mundo a fim de viabilizar uma terapia gênica eficiente no combate ao câncer cervical em humanos.

## REFERÊNCIAS

1. Weltgesundheitsorganisation, Weltgesundheitsorganisation Special Programme of Research D and RT in HR. WHO Guideline for Screening and Treatment of Cervical Pre-Cancer Lesions for Cervical Cancer Prevention. n.d.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. [Acesso em: 12 maio 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/ptbr/assuntos/cancer/numeros/estimativa>.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Atlas da mortalidade. Rio de Janeiro: INCA, 2020. [Acesso em: 12 maio 2023] Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>.
4. Deborah K. Armstrong. Cânceres ginecológicos. In: Goldman, Lee, eds. Goldman Cecil Medicina. 26 ed. Rio de Janeiro: GEN; 2022. p 1458-1466.
5. Charpentier E. The Nobel Prize in Chemistry 2020 Popular Science Background Genetic Scissors: A Tool for Rewriting the Code of Life. 2020.
6. Liu Z, Liao Z, Chen Y, et al. Research on CRISPR/System in Major Cancers and Its Potential in Cancer Treatments. *Clinical and Translational Oncology* 2021;23(3):425–433; doi: 10.1007/s12094-020-02450-3.
7. Yin H, Xue W, Anderson DG. CRISPR–Cas: A Tool for Cancer Research and Therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16(5):281–295; doi: 10.1038/s41571-019-0166-8.
8. Katti A, Diaz BJ, Caragine CM, et al. CRISPR in Cancer Biology and Therapy. *Nat Rev Cancer* 2022;22(5):259–279; doi: 10.1038/s41568-022-00441-w.
9. Moore, K., Dalley, A. Anatomia orientada para a clínica. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2022.
10. Kumar, V., Abbas, A. Robbins & Cotran, patologia: bases patológicas das doenças. 9ed. Rio de Janeiro: GEN; 2021.
11. Marth C, Landoni F, Mahner S, et al. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2017;28:iv72–iv83; doi: 10.1093/annonc/mdx220.
12. Cibula D, Pötter R, Planchamp F, et al. The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology guidelines for the management of patients with cervical cancer. *Radiotherapy and Oncology* 2018;127(3):404–416; doi: 10.1016/j.radonc.2018.03.003.
13. Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 System: A New-Fangled Dawn in Gene Editing. *Life Sci* 2019;232; doi: 10.1016/j.lfs.2019.116636.

14. Chen M, Mao A, Xu M, et al. CRISPR-Cas9 for Cancer Therapy: Opportunities and Challenges. *Cancer Lett* 2019;447:48–55; doi: 10.1016/j.canlet.2019.01.017.
15. Zhang M, Eshraghian EA, Jammal O Al, et al. CRISPR Technology: The Engine That Drives Cancer Therapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2021;133; doi: 10.1016/j.biopha.2020.111007.
16. Randall LM, Walker AJ, Jia AY, et al. Expanding Our Impact in Cervical Cancer Treatment: Novel Immunotherapies, Radiation Innovations, and Consideration of Rare Histologies. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 2021;(41):252–263; doi: 10.1200/edbk\_320411.
17. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP, et al. The PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies That Evaluate Health Care Interventions: Explanation and Elaboration [Internet]. Available from: [www.annals.org](http://www.annals.org)
18. Saenger ALF, Caldas CP, Motta LB. Cross-cultural adaptation of the PRISMA-7 instrument for use in Brazil: Evaluation of conceptual, item, and semantic equivalences. *Cad Saude Publica*. 2016;32(9).
19. Turner P, Fox-Lewis A, Shrestha P, Dance DAB, Wangrangsimakul T, Cusack TP, et al. Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO): A framework for the reporting and interpretation of clinical microbiology data. *BMC Med*. 2019 Mar 29;17(1)
20. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. O comunicado do PRISMA 2020: uma diretriz atualizada para relatórios de revisões sistemáticas. *BMJ* 2021;372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71
21. Yoshihara T, Saga Y, Urabe M, et al. CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6. *Oncol Lett* 2019;17(2):2197–2206; doi: 10.3892/ol.2018.9815.
22. Zhen S, Lu J, Liu YH, et al. Synergistic antitumor effect on cervical cancer by rational combination of PD1 blockade and CRISPR-Cas9-mediated HPV knockout. *Cancer Gene Ther* 2020;27(3–4):168–178; doi: 10.1038/s41417-019-0131-9.
23. Ling K, Dou Y, Yang N, et al. Genome editing mRNA nanotherapies inhibit cervical cancer progression and regulate the immunosuppressive microenvironment for adoptive T-cell therapy. *J Control Release*. 2023; 360:496-513. ISSN 0168-3659. doi:10.1016/j.jconrel.2023.07.007.
24. Gao X, Jin Z, Tan X, et al. Hyperbranched poly( $\beta$ -amino ester) based polyplex nanoparticles for delivery of CRISPR/Cas9 system and treatment of HPV infection associated cervical cancer. *Journal of Controlled Release* 2020;321:654–668; doi: 10.1016/j.jconrel.2020.02.045.
25. Li X, Guo M, Hou B, et al. CRISPR/Cas9 nanoeditor of double knockout large fragments of E6 and E7 oncogenes for reversing drugs resistance in cervical cancer. *J Nanobiotechnology* 2021;19(1); doi: 10.1186/s12951-021-00970-w.

26. Ling K, Yang L, Yang N, et al. Gene Targeting of HPV18 E6 and E7 Synchronously by Nonviral Transfection of CRISPR/Cas9 System in Cervical Cancer. *Hum Gene Ther* 2020;31(5–6):297–308; doi: 10.1089/hum.2019.246.
27. Xiong J, Tan S, Yu L, et al. E7-targeted nanotherapeutics for key hpv afflicted cervical lesions by employing crispr/ cas9 and poly (Beta-amino ester). *Int J Nanomedicine* 2021;16:7609–7622; doi: 10.2147/IJN.S335277.
28. Zhen S, Hua L, Takahashi Y, et al. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;450(4):1422–1426; doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.014.
29. Zhu D, Shen H, Tan S, et al. Nanoparticles Based on Poly ( $\beta$ -Amino Ester) and HPV16-Targeting CRISPR/shRNA as Potential Drugs for HPV16-Related Cervical Malignancy. *Molecular Therapy* 2018;26(10):2443–2455; doi: 10.1016/j.ymthe.2018.07.019.
30. Gao C, Wu P, Yu L, et al. The application of CRISPR/Cas9 system in cervical carcinogenesis. *Cancer Gene Ther* 2022;29(5):466–474; doi: 10.1038/s41417-021-00366-w.
31. Zhen S, Lu JJ, Wang LJ, et al. In vitro and in vivo synergistic therapeutic effect of cisplatin with human papillomavirus16 E6/E7 CRISPR/CAS9 on cervical cancer cell line. *Transl Oncol* 2016;9(6):498–504; doi: 10.1016/j.tranon.2016.10.002.
32. Jubair L, Lam AK, Fallaha S, et al. CRISPR/Cas9-loaded stealth liposomes effectively cleared established HPV16-driven tumours in syngeneic mice. *PLoS One* 2021;16(1 January); doi: 10.1371/journal.pone.0223288.
33. Kennedy EM, Kornepati AVR, Goldstein M, et al. Inactivation of the Human Papillomavirus E6 or E7 Gene in Cervical Carcinoma Cells by Using a Bacterial CRISPR/Cas RNA-Guided Endonuclease. *J Virol* 2014;88(20):11965–11972; doi: 10.1128/jvi.01879-14.
34. Khairkhah N, Bolhassani A, Najafipour R. Current and Future Direction in Treatment of HPV-Related Cervical Disease. *J Mol Med* 2022;100(6):829–845; doi: 10.1007/s00109-022-02199-y.
35. Zhen S, Li X. Oncogenic Human Papillomavirus: Application of CRISPR/Cas9 Therapeutic Strategies for Cervical Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018;44(6):2455–2466; doi: 10.1159/000486168.

## Apêndice A

Quadro 3 – MICRO framework

Autores Itens Avaliados	Yoshiba, <i>et al</i> <sup>21</sup>				Zhen, <i>et al</i> <sup>22</sup>				Ling, <i>et al</i> <sup>23</sup>				Gao, <i>et al</i> <sup>24</sup>				Li, <i>et al</i> <sup>25</sup>				Ling, <i>et al</i> <sup>26</sup>				Xiong, <i>et al</i> <sup>27</sup>			
	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP
1. Specimen types	S				S				S				S				S				S							
2. Sampling period	NA				NA				NA				NA				NA				NA							
3. Sampling strategy	NA				NA				NA				NA				NA				NA							
4. Target organisms	S				S				S				S				S				S							
5. Geographical setting	NA				NA				NA				NA				NA				NA							
6. Clinical setting	S				S				S				S				S				S							
7. Specimen processing	S				S				S				S				S				S							
8. Target organism identification	S				S				S				S				S				S							
9. Antimicrobial susceptibility testing	S				S				S				S				S				S							
10. Additional tests performed to identify resistance mechanisms	S				S				S				S				S				N				S			
11. Antimicrobial resistance definitions	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA			
12. External quality assurance	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA			
13. Accreditation	NA				NA				NA				NA				NA				NA				NA			
14. Duplicate and sequential isolates	N				N				S				S				S				N				N			

## Apêndice B

**Quadro 3 – MICRO framework (continuação)**

Autores Itens Avaliados	Zhen, <i>et al</i> <sup>28</sup>				Zhu, <i>et al</i> <sup>29</sup>				Gao, <i>et al</i> <sup>31</sup>				Zhen, <i>et al</i> <sup>32</sup>				Jubair D, <i>et al</i> <sup>33</sup>			
	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP	S	N	I	NP
1. Specimen types	S				S				S				S				S			
2. Sampling period	NA				NA				NA				NA				NA			
3. Sampling strategy	NA				NA				NA				NA				NA			
4. Target organisms	S				S				S				S				S			
5. Geographical setting	NA				NA				NA				NA				NA			
6. Clinical setting	S				S				S				S				S			
7. Specimen processing	S				S				S				S				S			
8. Target organism identification	S				S				S				S				S			
9. Antimicrobial susceptibility testing	S				S				S				S				S			
10. Additional tests performed to identify resistance mechanisms	S				S				S				N				S			
11. Antimicrobial resistance definitions	NA				NA				NA				NA				NA			
12. External quality assurance	NA				NA				NA				NA				NA			
13. Accreditation	NA				NA				NA				NA				NA			
14. Duplicate and sequential isolates	N				N				S				S				S			

