INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

TECNOLOGIA DE EDIÇÃO GENÉTICA CRISPR/CAS NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DOS CARCINOMAS DA CABEÇA E DO PESCOÇO CAUSADOS POR HPV - REVISÃO SISTEMÁTICA

Trabalho submetido por
Filipa Coimbra Marques
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2022

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

TECNOLOGIA DE EDIÇÃO GENÉTICA CRISPR/CAS NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DOS CARCINOMAS DA CABEÇA E DO PESCOÇO CAUSADOS POR HPV - REVISÃO SISTEMÁTICA

Trabalho submetido por
Filipa Coimbra Marques
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Nuno Taveira

setembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Um especial agradecimento ao Prof. Doutor Nuno Taveira por ter tornado possível a concretização deste trabalho. Durante estes últimos meses, mostrou-se sempre disponível e foi exemplar como orientador. Agradeço sobretudo a sua dedicação e paciência, que se revelam em cada palavra deste projeto. Um obrigado não chega.

Rita, Patrícia, Daniela e Inês, obrigada por me terem acompanhado numa das fases mais importantes e também críticas da minha vida. Sem vocês não teria construído os melhores momentos da minha vida. Obrigada por alinharem sempre nas minhas ideias e por fazerem delas os melhores planos e as mais bonitas memórias. Convosco fui e sou feliz e farei os impossíveis para que nunca nos separemos. Levar-vos-ei para a Holanda no coração.

A ti João, agradeço-te pelo teu apoio incondicional. Obrigada por teres permanecido mesmo nos momentos mais difíceis e me teres dado a conhecer os sentimentos de equilíbrio e estabilidade. Contigo aprendo diariamente a ser uma pessoa melhor e mais feliz. Obrigada por quereres fazer parte desta nova etapa da minha vida que aí se avizinha, sei que contigo tudo se tornará um pouco mais fácil.

E para a pessoa mais importante da minha vida, Pai, a ti te dedico este trabalho, pois é fruto de tudo aquilo que me ensinaste e de todos os princípios que me transmitiste. Aquilo que hoje sou, devo-te a ti. Nunca senti necessidade de te dizer pessoalmente, pois é algo que creio que saibas e que está intrínseco na nossa relação, mas és a pessoa que mais admiro e à qual mais faço referência. Sei que estes últimos anos foram extremamente difíceis para ti, talvez mais que para mim, e, por isso, agradeço-te por nunca teres desistido e por teres colocado o meu bem-estar e conforto acima de tudo. Obrigada por fomentares os meus sonhos e por me teres dado todas oportunidades para que eu os pudesse desenvolver sem limitações. Serei sempre a tua miúda.

RESUMO

Introdução: Tem sido registado um aumento da incidência dos cancros da cabeça e pescoço positivos para o Papiloma vírus (HPV), em países desenvolvidos, na população mais jovem. Estes tipos de cancros são tratados com recurso a métodos convencionais, comprometendo significativamente a qualidade de vida dos pacientes. A terapia de edição genética focada na inativação do HPV pode contribuir para a prevenção e terapêutica deste tipo de cancros. Neste trabalho reviu-se de forma crítica os estudos mais recentes relativos à aplicação da tecnologia de edição genética CRISPR/Cas na prevenção e tratamento dos cancros HPV-positivos, incluindo os da cabeça e pescoço. **Metodologia:** A pesquisa de publicações relevantes baseou-se nos critérios PRISMA e foi realizada essencialmente na base de dados PubMed. Foram incluídos estudos publicados entre 2018 e 2022 que reportem o uso de CRISPR/Cas como método de edição genética para tratar carcinomas HPV-positivos. **Resultados e discussão:** Foram identificados inicialmente 199 artigos e após a remoção de duplicados restaram 107 artigos para análise. Após uma rigorosa triagem, obtiveram-se 25 estudos, dos quais 24 descrevem estudos feitos *in vitro* e apresentaram efeitos significativos na indução da apoptose, redução da viabilidade celular e/ou inibição da proliferação celular e 18, descrevem estudos feitos em animais e demonstraram redução do tamanho tumoral sem evidência de reações tóxicas ao nível dos órgãos vitais. A heterogeneidade dos estudos dificultou a interpretação dos dados e o facto de a maioria dos estudos se realizar em linhas de células de carcinoma cervical, não permite extrapolar os resultados para outros tipos de carcinoma. **Conclusão:** O CRISPR/Cas, de forma geral, mostrou ser uma ferramenta eficaz e específica para prevenir e tratar carcinomas HPV-positivos. Contudo, são necessários mais estudos em modelos animais mais semelhantes ao homem, por exemplo primatas não humanos, para se perceber se esta ferramenta pode ser aplicada com segurança em humanos.

Palavras-chave: CRISPR/Cas; edição genética; papilomavírus humano (HPV); cancro da cabeça e pescoço

ABSTRACT

Introduction: In the younger population there has been registered an increase in the incidence of head and neck cancers positive for Papillomavirus (HPV) in developed countries. These types of cancers are treated with conventional methods, significantly compromising patients' quality of life. Gene editing therapy focused on HPV inactivation can contribute to the prevention and treatment of these cancers. In this work, the most recent studies which report the application of CRISPR/Cas as a gene editing tool for the prevention and treatment of HPV-positive cancers, including head and neck cancers, were critically reviewed. **Methodology:** The search of relevant publications was based on PRISMA criteria and was carried out essentially on PubMed database. Studies published between 2018 and 2022 that report CRISPR/Cas as a gene editing method to treat HPV-positive carcinomas were included. **Results and discussion:** Initially, 199 articles were identified, and 107 articles remained for analysis after removing duplicates. After a rigorous screening, 25 studies were obtained, where 24 describe studies carried out in vitro and showed significant effects on inducing apoptosis, reducing cell viability and/or inhibiting cell proliferation and where 18 describe studies carried out in animals and demonstrated a reduction in tumour size without evidence of toxic reactions on vital organs. The heterogeneity of the studies was a limitation for data interpretation and the fact that most studies were carried out in cervical carcinoma cell lines does not allow to extrapolate the result to other types of carcinomas. **Conclusion:** CRISPR/Cas, in general, proved to be an effective and specific tool to prevent and treat HPV-positive carcinomas. However, further studies in animal models more similar to humans are needed, for example non-human primates, to understand whether this tool can be safely applied to humans.

Keywords: CRISPR/Cas; genetic edition; human papillomavirus (HPV); head and neck cancer

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO 15

1. Cancro da cabeça e pescoço 15

1.1. Tipos e subtipos 15

1.2. Etiologia e fatores de risco associados 15

1.3. Epidemiologia 17

2. Cancros da cabeça e pescoço causados pela infeção por HPV 20

2.1. Genoma e mecanismos de carcinogénese 20

3. Diagnóstico do cancro da cabeça e pescoço HPV-positivo 22

4. Prevenção e tratamento do cancro da cabeça e pescoço HPV-positivo 24

4.1. Vacinação contra o HPV 24

4.2. Tratamentos convencionais 25

4.3. Tratamentos por edição genética 27

4.4. Tratamento com recurso à tecnologia CRISPR/Cas 29

II. MATERIAIS E MÉTODOS 35

III. RESULTADOS 39

IV. DISCUSSÃO 65

V. CONCLUSÃO 69

VI. REFERÊNCIAS 71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparação da incidência dos carcinomas da orofaringe HPV-positivos entre o sexo feminino e masculino e entre a Europa e Portugal (estimativas de 2020) 18

Figura 2. Representação esquemático do genoma do Papilomavírus Humano 16..... 20

Figura 3. Representação esquemática dos sistemas de edição genética ZFNs, TALENs e CRISPR/Cas com respetivas endonucleases 28

Figura 4. Funcionamento normal do sistema CRISPR/Cas9 em estirpes bacterianas.... 31

Figura 5. *Flowchart* da seleção dos artigos 40

Figura 6. *Traffic Light Plot* do risco de viès dos estudos *in vitro*..... 60

Figura 7. *Summary Plot* do risco de viès dos estudos *in vitro*..... 61

Figura 8. *Traffic Light Plot* do risco de viès dos estudos *in vivo* 62

Figura 9. *Summary Plot* do risco de viès dos estudos *in vitro*..... 63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Critérios PICO e questão da pesquisa..... 35

Tabela 2. Resultados dos estudos incluídos..... 41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. PRISMA *checklist*.....

Anexo 2. PRISMA *abstracts checklist* .....

Anexo 3. Ferramenta SYRCLE's para avaliação do risco de viés em estudos em animais

Anexo 4. Critérios de avaliação do risco de viés em estudos em animais .....

Anexo 5. Ferramenta para avaliação do risco de viés *in vitro* (*version 2*) .....

Anexo 6. Critérios de avaliação do risco de viés em estudos *in vitro* .....

LISTA DE ACRÓNIMOS

CCP: Cancro da cabeça e pescoço

CCE: Carcinoma de células escamosas

HPV: Papilomavírus humano

ADN: Ácido desoxirribonucleico

LCR: Região longa de controlo

HPVAr: Papilomavírus humano de alto risco

pRB: Proteína de retinoblastoma

TNM: tumor, nódulo metástase (do Sistema internacional de classificação de tumores malignos)

VLP: Partícula pseudoviral (do inglês *Virus like particles*)

TLMS: Microcirurgia transoral a laser

TORS: Cirurgia robótica transoral

ARN: Ácido ribonucleico

mARN: Ácido ribonucleico mensageiro

ARNi: Ácido ribonucleico de interferência

siARN: Ácido ribonucleico pequeno de interferência

sgARN: Ácido ribonucleico guia pequeno (do inglês S*hort guide* RNA)

shARN: do inglês *Short hairpin Ribonucleic acid*

ZFN: Nuclease de dedo de zinco (do inglês *Zinc-finger nucleases*)

TALENs: do inglês *Transcription activator-like endonucleases*

CRISPR: Repetições palindrómicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (do inglês *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*)

Cas: Proteínas associadas ao CRISPR (do inglês CRISPR-associated proteins)

gARN: Ácido ribonucleico guia

spCas9: endonuclease Cas9 de *Streptococcus pyogenes*

pré-crARN: precursor crARN

tracrARN: do inglês *Trans-activating* CRISPR RNA

PAM: Motivos adjacentes aos protoespaçadores (do inglês *Protospacer Adjacent Motif)*

AAV: Vírus associado aos adenovírus

HCAdV: Adenovírus de alta capacidade

PBAE: Polímero de beta-amino éster

NPS: Nanopartículas

KO: do inglês *Knockout*

GKCR: do inglês *Gene Knockout Chain Reaction*

PRISMA: do inglês *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*

PICO: População; intervenção; comparação; resultado

E: do inglês *Early*

L: do inglês *Late*

I. INTRODUÇÃO

1. Cancro da cabeça e pescoço

1.1. Tipos e subtipos

Os cancros da cabeça e pescoço (CCPs), originam-se numa taxa superior a 90% a partir das células escamosas que revestem as superfícies mucosas da cabeça e pescoço (Shaikh et al., 2017). Por este motivo, estes cancros muitas vezes são designados de carcinomas de células escamosas (CCEs) da cabeça e pescoço. Contudo, apesar de incomuns, os cancros da cabeça e pescoço podem também surgir noutras estruturas anatómicas como nas glândulas salivares, nos seios perinasais e nos músculos ou nervos da região (Chow, 2020; Son et al., 2017).

Segundo Chow (2020), os carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço podem formar-se na:

- Cavidade oral, abrangendo a zona dos lábios, mucosa oral, dois terços anteriores da língua, pavimento da boca, palato duro, gengiva e trígono retromolar, adquirindo especificamente a denominação de cancro oral ou carcinoma oral de células escamosas.
- Faringe, que compreende a nasofaringe, orofaringe, sendo que nesta segunda região, onde se incluem o palato mole, terço posterior da língua, amígdalas e úvula, os cancros designam-se por carcinomas de células escamosas da orofaringe, e finalmente a hipofaringe.
- Laringe, intitulando-se de carcinoma de células escamosas da laringe, que inclui a laringe supraglótica, glótica e subglótica.

Relativamente aos carcinomas não escamosos, estes podem localizar-se na cavidade nasal, nas glândulas salivares major e minor ou ainda nos seios perinasais, nomeadamente os seios maxilares, frontais, esfenoidais e células etmoidais, perfazendo 8% a 10% dos carcinomas de cabeça e pescoço (Anderson et al., 2021; Chow, 2020; Son et al., 2017).

1.2. Etiologia e fatores de risco associados

Apesar da prevalência e incidência dos carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço variarem entre países e regiões, existe uma relação etiológica comum, uma vez

que estes tipos de cancros, na sua generalidade, têm sido associados à exposição de agentes carcinogénicos derivados do tabaco e ingestão excessiva de álcool, principalmente quando consumidos em simultâneo. O tabagismo, a ingestão superior a 3 bebidas alcoólicas diárias, sobretudo em indivíduos com metabolismo lento do etanol, baixos níveis educacional e socioeconómico têm sido descritos como os principais fatores de risco comportamentais (Boras et al., 2019; Hashibe et al., 2009; Hashim et al., 2019; Johnson et al., 2020).

Em relação ao carcinoma oral de células escamosas, acrescem outros fatores de risco como o consumo de noz de areca, má higiene oral e ainda a presença de leucoplasia e eritroplasia (Anderson et al., 2021).

Outro fator de risco do carcinoma oral de células escamosas é a infeção persistente desencadeada por estirpes oncogénicas de Papilomavírus Humano (HPV), como o HPV-16 e em menor expressividade o HPV-18 (Adams et al., 2014; Boras et al., 2019; Johnson et al., 2020).

Similarmente a outros tipos de cancro, a suscetibilidade genética e seus polimorfismos, bem como a exposição ocupacional e residencial, desempenham um papel importante no risco de desenvolvimento de cancro da cabeça e pescoço. Por este motivo, é possível estabelecer uma relação entre a incidência familiar de cancro e o risco de CCP, não só devido à predisposição genética inerente, mas também devido à influência dos hábitos e condições ambientais partilhados (Boras et al., 2019).

Face aos fatores etiológicos existentes, é assim possível classificar os carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço em dois subgrupos moleculares: os HPV-positivos, constituindo 25% do total de CCEs da cabeça e pescoço, que são desencadeados pela infeção do HPV de alto risco (HPVAr) e os HPV-negativos, que não possuem etiologia viral. Contrariamente aos CCEs da cabeça e pescoço HPV-negativos que incidem sobretudo na população mais velha, os CCEs da cabeça e pescoço HPV-positivos incidem sobre a população mais jovem, a qual é caracterizada por menor tempo de consumo de álcool e tabaco e menos comorbilidades. O prognóstico dos CCEs da cabeça e pescoço HPV-positivos, mais propriamente dos carcinomas de células escamosas da orofaringe, é muitas vezes mais favorável do que o

dos cancros da cabeça e pescoço HPV-negativos, pois a resposta aos tratamentos de quimioterapia e radioterapia é melhor (Bortnik, 2019; Chow, 2020; van Harten et al., 2019; Johnson et al., 2020).

1.3. Epidemiologia

De acordo com os dados mais recentemente publicados pela *World Health Organization International Agency for Research on Cancer* (IARC) (2020), o CCP ocupa o sétimo lugar do ranking de cancros mais prevalentes a nível mundial, com uma taxa de incidência anual de aproximadamente 900 mil novos casos (Sung et al., 2021).

Embora a maioria destes casos seja resultado da elevada incidência de cancro da cavidade oral, o carcinoma de células escamosas da orofaringe, nas últimas décadas, tem contribuído para o aumento do número de novos casos, sobretudo nos países desenvolvidos. Nesta categoria estão incluídos países como os Estados Unidos da América, Nova Zelândia, algumas partes da Ásia oriental e meridional e ainda alguns países europeus, incluindo Portugal. (Calander et al., 2021; IARC, 2020; Lechner et al., 2022; Sung et al., 2021; Valente de Sousa, et al., 2021; Wu et al., 2021).

Uma vez que se tem vindo a registar um declínio no consumo ativo de tabaco e bebidas alcoólicas nestes países, a infeção pelo HPV, surge como possível fator justificativo para o acréscimo de casos registados, sobretudo nos mais jovens. O comportamento sexual e os hábitos de risco associados à sua prática estão na origem da rápida disseminação da infeção pelo HPV, onde o número elevado de parceiros sexuais ao longo da vida, um início precoce da atividade sexual ou a opção por sexo oral, parecem ser fatores de risco para a predisposição da infeção como também para a possibilidade de desenvolvimento de malignidades como o carcinoma de células escamosas da orofaringe (Lechner et al., 2022; Valente de Sousa, et al., 2021).

Esta associação pode refletir parcialmente uma discrepância de género, uma vez que os homens são mais propensos, relativamente às mulheres, em relatar maior número de parceiros sexuais. Para além do maior número de parceiros sexuais, a maior incidência do carcinoma de células escamosas da orofaringe HPV-positivo no sexo masculino parece refletir diferenças em ambas suscetibilidade e transmissibilidade da infeção através das atividades sexuais (Lechner et al., 2022). Isto porque, tem-se registado uma

maior prevalência da infeção pelo HPV em homens homossexuais que em mulheres homossexuais, onde os primeiros perfazem 60% das infeções transmitidas por via anal e mostram uma frequência na contração da infeção oral pelo HPV16 seis vezes superior comparativamente às mulheres (Garutti et al., 2018). Contudo, um ligeiro aumento da incidência do carcinoma de células escamosas da orofaringe HPV-positivo em mulheres caucasianas tem sido registado em alguns países, como os Estados Unidos da América. Tal pode explicar a atual aproximação da prevalência em ambos os géneros, corroborada por uma recente meta-análise que inclui dados de 12 estudos e conclui que a prevalência do carcinoma de células escamosas da orofaringe HPV-positivos de um modo geral foi aproximadamente 45% e com distribuição semelhante entre homens e mulheres (Lechner et al., 2022; Mariz et al., 2020).

Contrariamente, em Portugal a incidência do carcinoma de células escamosas da orofaringe HPV-positivo é discrepante entre géneros. De acordo com dados estimados do ICO/IARC *Information Centre on HPV and Cancer* (*HPV Information Centre*) (2022) numa taxa populacional de 100 mil indivíduos portugueses, 7,44 homens apresentam CCE da orofaringe HPV-positivo e apenas 0,39 das mulheres apresentam esta patologia. À escala europeia o valor registado no sexo masculino é superior à média (6,23 por 100 mil indivíduos), mas em mulheres os números portugueses são inferiores à média europeia (1,73 por 100 mil indivíduos) (Figura 1).

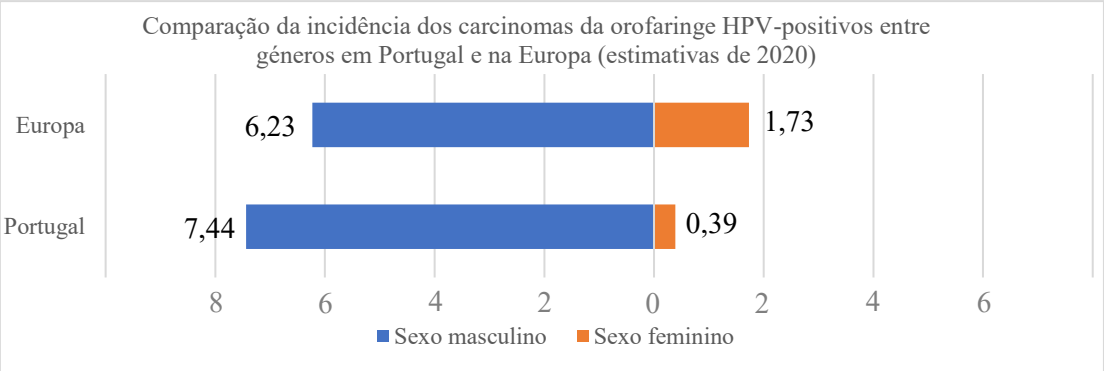

Figura 1. Comparação da incidência dos carcinomas da orofaringe HPV-positivos entre o sexo feminino e masculino e entre a Europa e Portugal por 100 mil indivíduos (estimativas de 2020). Adaptado de: "*Human Papillomavirus and Related Diseases in Europe*", ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer, (2021).

A diferente adoção de comportamentos de risco entre homens e mulheres, a respeito tanto dos carcinomas de células escamosas da orofaringe HPV-negativos como dos HPV-positivos poderá estar na origem desta divergência, sendo que os hábitos tabágicos e alcoólicos são conhecidos por ter maior influência no subtipo HPV negativo e os hábitos sexuais no subtipo HPV positivo. Contudo, apesar de os mecanismos por detrás desta associação serem ainda desconhecidos, julga-se que o tabagismo induz um efeito imunossupressor e pró-inflamatório, aumentando o risco de incidência e persistência da infeção pelo HPV na orofaringe (American Cancer Society, 2021; Garutti et al, 2018).

De acordo com o Inquérito Nacional de Saúde, realizado pelo Instituto Nacional de Estatística (2020), em 2019, a percentagem de mulheres com idade superior a 15 anos que referiram nunca ter fumado (75,3%) excedia largamente a percentagem de homens nesta mesma condição (44,8%). No que toca à ingestão de bebidas alcoólicas, 40,3% dos homens revela estabelecer este hábito diariamente, enquanto mais de metade das mulheres confessou apenas efetuá-lo mensalmente ou até de forma ocasional. Apesar dos resultados refletirem um aumento mais evidente no sexo feminino relativamente a 2014, estes consumos continuam a ter maior expressão na população masculina.

Relativamente aos hábitos sexuais, os homens portugueses revelam iniciar atividade sexual em idades mais precoces e mais frequentemente não utilizam qualquer tipo de método contracetivo, sugerindo um elevado risco para a contração de infeções sexualmente transmissíveis, como o HPV (Reis et al., 2012). Um estudo realizado pela equipa do Grupo de Investigação em Sexualidade Humana do Centro de Psicologia da Universidade do Porto e mais tarde publicado por Nobre *et al.* (2022), revela ainda que a população masculina portuguesa tende a praticar relações com vários parceiros numa percentagem quase três vezes superior (7,2%) relativamente à população feminina (2,6%). Sabe-se ainda que a prevalência da infeção por HPV de alto risco para o desenvolvimento de lesões cancerígenas é baixa em homens que não pratiquem sexo oral (<2,5%). Por este motivo, os homens, não exclusivamente de nacionalidade portuguesa, que iniciem atividade sexual precocemente, que tenham relações, sobretudo sexo oral, com vários parceiros e que revelem preferência homossexual, tendem a estar mais predispostos ao risco de contração do HPV. Porém, a maior predominância da infeção oral pelo HPV no sexo masculino, não parece ser facilmente explicada apenas

através dos hábitos sexuais distintos, sugerindo diferenças de género durante a exposição a cofatores (Garutti et al, 2018).

2. Cancros da cabeça e pescoço causados pela infeção por HPV

2.1. Genoma e mecanismos de carcinogénese

Os Papilomavírus Humano (HPVs) pertencem a um grupo heterogéneo da família *Papillomaviridae*, sendo constituídos por uma cápside icosaédrica sem invólucro lipídico e por ADN circular de cadeia dupla. O genoma é composto por aproximadamente 8 000 pares de base e caracterizado por uma região codificante precoce ou genes precoces (E1, E2, E4-E7), uma região codificante tardia ou genes tardios (L1 e L2), uma região longa de controlo (LCR) e uma região variável não codificante (entre E5 e L2) (Figura 2) (Ehrke-Schulz et al., 2020; Fitzpatrick et al., 2020; Garutti et al., 2018). Os genes precoces codificam proteínas responsáveis pela replicação do ADN viral, transcrição e pela transformação oncogénica, no entanto estes genes não são capazes de sintetizar ADN polimerases virais, pelo que a replicação e manutenção do ciclo de vida do HPV, depende por completo das células hospedeiras. Já os genes tardios são responsáveis pela produção das proteínas da cápside (Chabeda et al., 2018; Inturi & Jemth, 2021).

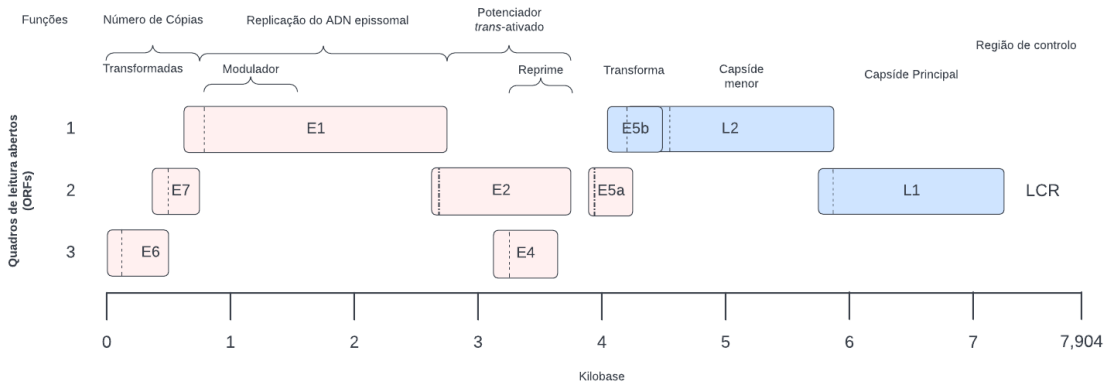

Figura 2. Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano 16. O ADN é normalmente uma molécula circular de dupla-fita, mas na figura está demostrado de forma linear. A figura mostra as estruturas de leitura aberta iniciais de E1 a E7, que regulam a replicação e transcrição e as estruturas de leitura aberta tardias de L1, L2 responsáveis pela síntese dos componentes da cápside. Adaptado de: "*Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 26/E"*, Brooks et al., (2012).

Atualmente, conhecem-se cerca de 200 genótipos de HPV, estando categorizados de acordo com a sua estrutura genética, tropismo da mucosa e risco de carcinogénese, dando origem à classificação definida em 2012 pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) que reúne os principais subtipos (Ehrke-Schulz et al., 2020; Fitzpatrick et al., 2020; Garutti, 2018):

- Grupo 1: Alto risco para o desenvolvimento de carcinomas (HPVAr) (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59);
- Grupo 2A: Risco provável (HPV 68);
- Grupo 2B: Risco possível (HPV 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 87);
- Grupo 3: Não carcinogénico (HPV 6, 11, 42, 43, 44, 54, 55)

O HPV infeta inicialmente as células do estrato basal do epitélio, através de pontos anatomicamente acessíveis como microlesões da pele, órgãos genitais e áreas da orofaringe. As proteínas da cápside, denominadas pelos genes que as codificam, L1 e L2, ligam-se aos recetores das células epiteliais do hospedeiro, nomeadamente ao proteoglicano de sulfato de heparano (HSPG) e à integrina α6 (CD49f), induzindo a entrada do vírus na célula hospedeira por endocitose. Após a penetração, ocorre a descapsidação do HPV, ou seja, a desagregação e abertura da cápside, com libertação do genoma no núcleo da célula infetada, onde é transcrito e replicado (Bortnik, 2019; Chabeda et al., 2018).

As proteínas precoces são expressas primeiramente, regulando não só o ciclo de vida da célula hospedeira e replicação do genoma viral, como também as proteínas L1 e L2, consoante a diferenciação celular. A maturação dos vírus recém produzidos, decorre após a diferenciação terminal das células epiteliais e a sua libertação coincide com a eliminação natural das células senescentes no final do seu ciclo de vida (Chabeda et al., 2018).

O HPV pode permanecer nas células hospedeiras na forma epissomal, ou seja, na sua forma circular ou na forma integrada. No primeiro caso, mais frequente, o genoma do HPV não é incorporado no ADN celular e mantém-se em pequenas quantidades, replicando-se apenas quando a célula também se replica, sem causar alterações teciduais

durante vários anos. Já na sua forma integrada, desencadeada pelos HPV de alto risco, o ADN do HPV é integrado no ADN da célula, onde se permanece ativo e disponível à replicação e transcrição, podendo induzir a neoplasia (Chabeda et al., 2018; Primo & Primo, 2019).

Numa carcinogénese tipicamente ocasionada por um HPVAr, o genoma viral é integrado no ADN cromossomal do hospedeiro e a sequência E2 é inativada durante a linearização do genoma. Visto que a proteína E2 tem como função reprimir a síntese das oncoproteínas E6 e E7, a inativação da E2 permite a expressão continuada dos respetivos proto-oncogenes. Por forma a aumentar o seu potencial infecioso, o HPV, como todos os outros vírus, sequestra os recursos e ferramentas de replicação do hospedeiro. Para tal, recorre ao sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) e à oncoproteína E7, que ao direcionar a proteína retinobalstoma (pRb) para a degradação e libertar os fatores de transcrição da família E2F, permite a transição da célula hospedeira para a fase S (ultrapassando o *checkpoint* G1-S) com subsequente replicação sucessiva do seu genoma. A disrupção da função da pRb por E7 induz um feedback positivo da proteína $p16^{INK4A}$, sendo a deteção da expressão desta proteína utilizada para distinguir os carcinomas de células escamosas da orofaringe HPV-positivos dos HPV-negativos. Por outro lado, com o objetivo de prevenir a apoptose da célula, devido à sua entrada precoce em fase S, a proteína E6 induz a degradação da proteína reguladora da apoptose (p53) e ativa a telomerase, conferindo vida celular prolongada (Bortnik, 2019; Chabeda et al., 2018; Inturi & Jemth, 2021; Johnson et al., 2020; Jubair & McMillan, 2017).

Assim, após o bloqueio de E2, as oncoproteínas E6 e E7 interrompem a regulação do ciclo celular e promovem a vida prolongada da célula hospedeira, viabilizando a instabilidade genómica e o possível desenvolvimento de cancro. Uma vez que a replicação viral se trata do propósito final do HPV e que este só pode ser alcançado através de uma replicação descontrolada, podemos deduzir que a carcinogénese se trata de um efeito acidental da infeção pelo HPV (Bortnik, 2019; Chabeda et al., 2018).

3. Diagnóstico do cancro da cabeça e pescoço HPV-positivo

Para a realização de um correto diagnóstico de cancro é considerado pertinente compreendê-lo, ou seja, conhecer o seu estádio de desenvolvimento e de que forma

compromete, ou não, os restantes órgãos do corpo. Para tal, a União para Controlo Internacional de Cancro (UICC) elaborou um sistema internacional de classificação de tumores malignos, designado TNM (tumor, gânglio, metástase), onde se incluem os CCEs da cabeça e pescoço, para uniformizar o seu registo e auxiliar a determinação do tratamento mais adequado (Chow, 2020).

Geralmente, os estádios iniciais (I e II) envolvem tumores de pequenas dimensões sem envolvimento proeminente dos nódulos linfáticos. Já os estádios posteriores (III e IV) são caracterizados por doença localmente avançada e invasão das estruturas vizinhas ou número aumentado dos nódulos linfáticos envolvidos, com disseminação metastática distante, definindo o estádio IV (Chow, 2020).

O carcinoma de células escamosas da orofaringe manifesta-se mais comumente como uma massa cervical ou dor de garganta, no entanto, pode vir acompanhado de disfagia, massa visível, sensação de caroço na garganta, odinofagia ou otalgia. A maioria dos pacientes exibe pequenos tumores primários, T1 ou T2 (de acordo com a classificação TMN), e metástases nodais, podendo ser facilmente confundidos com outras condições benignas comuns, como refluxo laringofaríngeo ou *globus* faríngeo. Deste modo, qualquer massa cervical assintomática detetada, deve, idealmente, ser avaliada por meio de ultrassonografia confirmatória e citologia aspirativa (Lechner et al., 2022).

A base da língua e o complexo amigdalino compreendem 96% das localizações anatómicas dos carcinomas de células escamosas da orofaringe. Todavia, um subconjunto de pacientes com CCE da cabeça e pescoço apenas apresentará linfadenopatia cervical, tendo-se registado um aumento da incidência destes carcinomas de origem desconhecida, muito provavelmente devido ao crescimento dos carcinomas de células escamosas da orofaringe HPV-positivos (Lechner et al., 2022).

Assim, o estadiamento do carcinoma de células escamosas da orofaringe requer uma avaliação robusta do *status* do HPV, por forma a discriminar com precisão os carcinomas de células escamosas da orofaringe HPV-positivos dos HPV-negativos. Este envolve hibridização *in situ* (PCR *in situ*) ou técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a determinação do ADN do HPV ou a carga viral, respetivamente, ou então testes imuno-histoquímicos para a deteção da expressão de

p16, um marcador substituto para a positividade do HPV (Chow, 2020; Lechner et al., 2022).

4. Prevenção e tratamento do cancro da cabeça e pescoço HPV-positivo

4.1. Vacinação contra o HPV

O combate da infeção pelo HPV e do futuro desenvolvimento de carcinomas associados pode passar pela sua prevenção. A presença de anticorpos anti-HPV remete a infeção anterior e está associada a um risco reduzido de reinfeção pelo mesmo vírus, em particular para o tipo 16, sugerindo a possibilidade de imunidade natural após infeção.
No entanto, ainda são desconhecidas a extensão e duração dessa defesa e, por outro lado, muitas mulheres não desenvolvem anticorpos como consequência da infeção, tornando a reinfeção com o mesmo genótipo largamente provável. Portanto, a ação de uma vacina aparenta ser muito mais rápida e eficaz relativamente a uma imunidade adquirida naturalmente (Garutti et al., 2018).

Atualmente, estão disponíveis em Portugal três vacinas, a Cervarix®, bivalente, contra os subtipos de HPV 16 e 18; a Gardasil®, quadrivalente, contra os subtipos 6, 11, 16 e 18 e finalmente a Gardasil 9®, nonavalente, contra os subtipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Todas são obtidas através da tecnologia recombinante e são compostas por partículas idênticas a vírus-VLP (*vírus like particles*). Estas partículas são sintetizadas a partir da clonagem do gene principal da proteína da cápside L1, pertencente a vários genótipos de HPV e expressas em vetores (SPG, 2017).

A vacina contra o HPV apresenta eficácia profilática, pois impede a infeção pelo genótipo para o qual foi administrada, no entanto, não tem eficácia terapêutica. Quando aplicada em indivíduos não expostos o potencial preventivo da vacina é superior. Contudo, em indivíduos previamente expostos, as vacinas demonstraram eficácia na prevenção de uma nova ativação e infeção pelos genótipos presentes no seu conteúdo (SPG, 2017).

Até ao momento, Portugal apresenta a maior taxa de cobertura vacinal contra o HPV em mulheres a nível europeu (cerca de 94%), tendo-se verificado, desde a introdução da vacina, valores de cobertura vacinal superiores a 85% para as várias coortes abrangidas. Visto que estratégias de recrutamento vacinal mais extensas, como o caso de Portugal,

têm demonstrado uma redução na incidência e prevalência do HPV superior comparativamente a estratégias mais restritas, será expectável uma diminuição significativa da incidência da infeção pelos quatro tipos de HPV vacinais e de carcinomas associados à sua infeção a nível nacional (Garutti et al., 2018; SPG, 2017).

A extensão da vacinação contra o HPV ao sexo masculino tem sido um tema ultimamente questionado, uma vez que os estudos até agora realizados enfatizam o papel da prevenção nas infeções femininas associadas ao HPV e não em tumores, da mesma causa, existentes em ambos os sexos. Estima-se que a vacinação masculina para a prevenção do cancro cervical, apenas se torna custo-efetiva, caso a taxa de vacinação feminina seja inferior a 75%. Contudo, a sua aplicação é justificável quando se pretende eliminar o reservatório masculino de infeção, por forma a prevenir doenças relacionadas com a homossexualidade, como também reduzir a incidência dos tumores do ânus e orofaringe HPV-positivos. Posto isto, a vacinação é atualmente recomendada em ambos os géneros, sendo que em 2009 a FDA aprovou a utilização da vacina quadrivalente na prevenção de lesões benignas e pré-invasivas em rapazes e homens até aos 26 anos (Garutti et al., 2018; SPG, 2017).

4.2. Tratamentos convencionais

Fora do ambiente experimental dos ensaios clínicos, o tratamento padronizado para os CCEs da cabeça e pescoço HPV-positivos não difere daquele utilizado para outros carcinomas, abrangendo a cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou a sua combinação (Bortnik, 2019).

Aproximadamente 30 a 40% dos pacientes é diagnosticado em estágios iniciais da doença, necessitando apenas de remoção cirúrgica das lesões oncogénicas e/ou radioterapia. A cirurgia ou radioterapia providenciam controlo oncológico semelhante e melhores taxas de sobrevida a longo prazo numa percentagem compreendida entre 70 e 90% em pacientes nesta condição. A escolha do tratamento, cirurgia ou radioterapia depende do acesso anatómico, e deve minimizar a morbidade inerente e preservar a função (Chow, 2020).

Todavia, a maioria dos pacientes (mais de 60%) é diagnosticada com carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço HPV-negativos e HPV-positivos em estágio avançado sem que exista uma lesão pré-maligna antecedente clinicamente evidente. Nestes pacientes, as massas tumorais são caracterizadas por invasão local marcada e/ou evidência de metástases para os nódulos linfáticos regionais. A doença localmente avançada está frequentemente associada a uma percentagem elevada de recorrência (15 a 40%), bem como ao desenvolvimento de metástases à distância, agravando o prognóstico a curto e longo prazo (taxa de sobrevivência aos 5 anos é inferior a 50%) (Bortnik, 2019; Chow, 2020; Johnson et al., 2020).

Independentemente do estádio da doença, os efeitos tóxicos dos tratamentos de primeira linha, sobretudo aqueles associados à radioterapia, acarretam grandes repercussões na qualidade de vida dos pacientes. Ainda que alguns dos efeitos possam ter caráter transitório, como úlceras, mucosite, disgeusia, dermatite, alopecia, e eritema cutâneo existem outros de maior gravidade responsáveis por causar danos irreversíveis. Dentro desta categoria, incluem-se fibrose, disfunção na deglutição, xerostomia, ototoxicidade (com perda permanente da audição) e complicações dentárias, sendo a mais referida na literatura a osteorradionecrose desencadeada pela radioterapia de cabeça e pescoço (Bortnik, 2019; Chow 2020; Regezi et al., 2008).

Uma vez que os pacientes com carcinoma de células escamosas da orofaringe HPV-positivo, mesmo que localmente avançado, exibem taxas de sobrevivência a longo prazo até 80%, tem-se atribuído um maior destaque à atenuação das terapias no sentido de reduzir a morbidade e melhorar a qualidade de vida sem afetar os resultados oncológicos (Bortnik, 2019; Chow, 2020). Para tal, algumas terapias à base de platina têm sido substituídas por anticorpos monoclonais, quimioterapia de indução seguida de radioterapia de baixa dosagem entre outros métodos que recorrem a doses mais baixas de quimioterapia e/ou radioterapia, com o intuito de melhorar a qualidade de vida sem comprometer os *outcomes* (Bortnik, 2019).

No caso de pacientes com doença em estádio inicial, o tratamento cirúrgico excisional tem sido substituído por técnicas menos invasivas como a microcirurgia transoral a laser (TLMS) e cirurgia robótica transoral (TORS). Caso estas não sejam tecnicamente viáveis, devido a um diâmetro do tumor primário acentuado, ao acesso trans oral

dificultado ou à presença de doença nodal bilateral avançada, a radioterapia primária e a quimiorradioterapia tornam-se os tratamentos preferenciais (Lechner et al., 2022).

Embora o prognóstico associado ao carcinoma de células escamosas da orofaringe HPV-positivo seja favorável, 10 a 25% dos pacientes desenvolverão recorrência da doença, a maioria dentro de 2 anos e alguns até 5 anos após o diagnóstico inicial. Assim, é crucial desenvolver um protocolo de monitorização robusto e eficaz para estes pacientes com possibilidade de recidiva (Lechner et al., 2022).

4.3. Tratamentos por edição genética

Apesar da eficácia profilática das vacinas, estas não têm capacidade para tratar infeções e carcinomas pré-estabelecidos, nem fornecem proteção contra todos os genótipos do HPV. Por outro lado, as opções atuais de tratamento para cancros HPV-positivos são limitadas e nos últimos 20 anos não têm sido introduzidos novos medicamentos que melhorem a taxa de sobrevivência aos 5 anos. Adicionalmente, as estratégias terapêuticas atuais têm impacto negativo significativo na qualidade de vida dos pacientes, pois são pouco seletivas e afetam igualmente os tecidos malignos e benignos (Jubair & McMillan, 2017).

Deste modo, tem surgido grande interesse por estratégias com efeitos inibitórios do crescimento tumoral, a partir do silenciamento dos oncogenes do HPV. A maioria dos estudos publicados nesta matéria referem-se ao uso de ARN interferência (ARNi). Os siARN suprimem seletivamente a expressão de genes endógenos de mamíferos e de genes virais (Bortnik, 2019; Shaikh et al., 2017).

Quando aplicados ao HPV, os siARN podem silenciar os oncogenes E6 e E7, restaurando a acumulação das proteínas supressoras de tumores p53 e pRb e restabelecendo os níveis de apoptose (Bortnik, 2019; Shaikh et al., 2017). Apesar de pouco explorado em CCEs da cabeça e pescoço HPV-positivos, no estudo de Shaikh *et al.* (2018), os siARN demonstraram elevada eficácia na supressão de E7 (aproximadamente 60-80%) 48 horas após transfeção em linhas de células de CCE da cabeça e pescoço, induzindo uma perda significativa na viabilidade celular e redução na formação de colónias, dada a suspensão da proliferação celular durante três semanas.

Contudo, a terapêutica baseada em siARNs apresenta várias limitações, nomeadamente, entrega não específica, ou seja, em todas as células e não somente nas células tumorais, efeitos *off-target*, ou seja, efeitos noutros genes, e supressão apenas temporária da expressão dos oncogenes, pelo que se tem dado primazia a mecanismos de edição genética permanente para o tratamento clínico de pacientes (Bortnik, 2019).

Outras ferramentas de edição genética incluem *Zinc-Finger Nucleases* (ZFNs), *Transcription Activator-Like Endonucleases* (TALENs) e *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat* (CRISPR) associado a endonucleases (Cas) (Aghamiri et al; 2020; Bortnik, 2019; Cui et al., 2021). Ambos ZFNs e TALENs são proteínas fusionadas contendo endonucleases FokI como parte da sua quimera, no entanto ZFNs apresenta um domínio *zinc finger* enquanto TALENs um domínio TAL (*transcription activator-like*). Por outro lado, o CRISPR atua numa sequência de ADN específica, por meio de uma molécula de ARN guia (gARN) acoplada a uma endonuclease Cas, formando uma rotura da cadeia dupla do ADN (Figura 3) (Aghamiri et al., 2020; Bortnik, 2019).

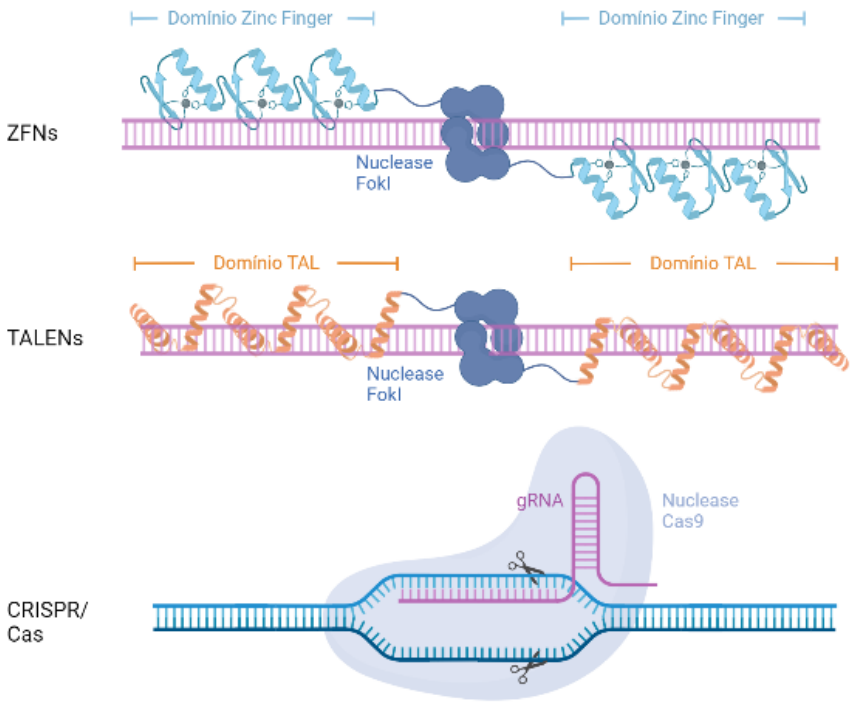

Figura 3. Representação esquemática dos sistemas de edição genética ZFNs, TALENs e CRISPR/Cas com respetivas endonucleases. Criado em BioRender.com

Embora todos os tipos exibam eficiência de edição equiparável, os sistemas ZFNs e TALENs envolvem uma tecnologia extremamente complexa e difícil de reproduzir, pois exigem uma reformulação completa para cada nova sequência alvo. Os TALENs ainda apresentam a desvantagem de serem partículas de grandes dimensões, comprometendo o processo de entrega e os ZFN, por outro lado, são propensos a apresentar uma baixa especificidade, dependência pelo tipo de célula e por fim, clivagem extensa de *off-targets* (Aghamiri et al., 2020; Bortnik, 2019; Cui et al., 2021).

Em contrapartida, CRISPR é um sistema relativamente pequeno. Dada a simplicidade e flexibilidade da tecnologia envolvida, o complexo CRISPR acoplado à endonuclease Cas, apenas requer a alteração do ARN guia, podendo ainda atuar em multiplex, ou seja, em múltiplos genes em simultâneo, utilizando vários ARN guia cada um deles dirigido a um gene diferente (Aghamiri et al., 2020; Bortnik, 2019; Chen et al., 2019).

4.4. Tratamento com recurso à tecnologia CRISPR/Cas

CRISPR, assim designado em 2002, trata-se de um conjunto de sequências repetitivas, descobertas acidentalmente, em 1987, durante uma análise genética da bactéria *Escherichia coli.* (Jangam & Talreja, 2020). Anos mais tarde, constatou-se que estas sequências repetitivas estavam presentes em todas as bactérias *Archaea*, sendo um mecanismo de defesa desenvolvido contra bacteriófagos (Jangam & Talreja, 2020).

Tal como mencionado anteriormente, o sistema de edição genética baseado no CRISPR funciona juntamente com a endonuclease Cas, formando o complexo CRISPR/Cas. Dos três sistemas CRISPR/Cas atualmente conhecidos, o Tipo II, encontrado na bactéria *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) é o mais comumente utilizado nos estudos que envolvem a manipulação de genes, sendo Cas9 responsável pelo reconhecimento e clivagem de ambas as cadeias de ADN exógeno em locais específicos. (Bortnik, 2019; Jubair & McMillan, 2017; Valavanidis, 2020)

Contudo, uma nova enzima Cas encontrada na bactéria *Leptotrichia shahii* (LshCas13a) foi descoberta e contrariamente a Cas9, esta reconhece e cliva ARN de cadeia simples, o que pode resultar num reconhecimento mais específico e eficiente (Chen, 2020).

Tendo em conta o funcionamento do sistema CRISPR/Cas9 habitual, quando uma bactéria é invadida por um bacteriófago desconhecido, enzimas Cas (Cas1 e Cas2) incorporam pequenos segmentos do genoma viral incluindo-os sobre a forma de espaçadores no *locus* CRISPR do genoma bacteriano. Isto confere imunidade adaptativa à bactéria, quando ocorrem invasões subsequentes. Assim, durante uma reinfeção provocada pelo mesmo bacteriófago, o *locus* CRISPR é transcrito em pré-ARN CRISPR (pré-crARN), que juntamente com o ARN CRISPR de ativação em trans (tracrARN) origina um ARN guia (gARN), responsável por conduzir Cas9 para junto do ADN viral. O gARN ao complementar-se com a sequência alvo, por sua vez, delimitada por sequências PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), constituídas por 2-6 pares de base, promove a clivagem de ambas as cadeias de ADN pela proteína Cas9 (Figura 4) (Barbour et al., 2021; Valavanidis, 2020).

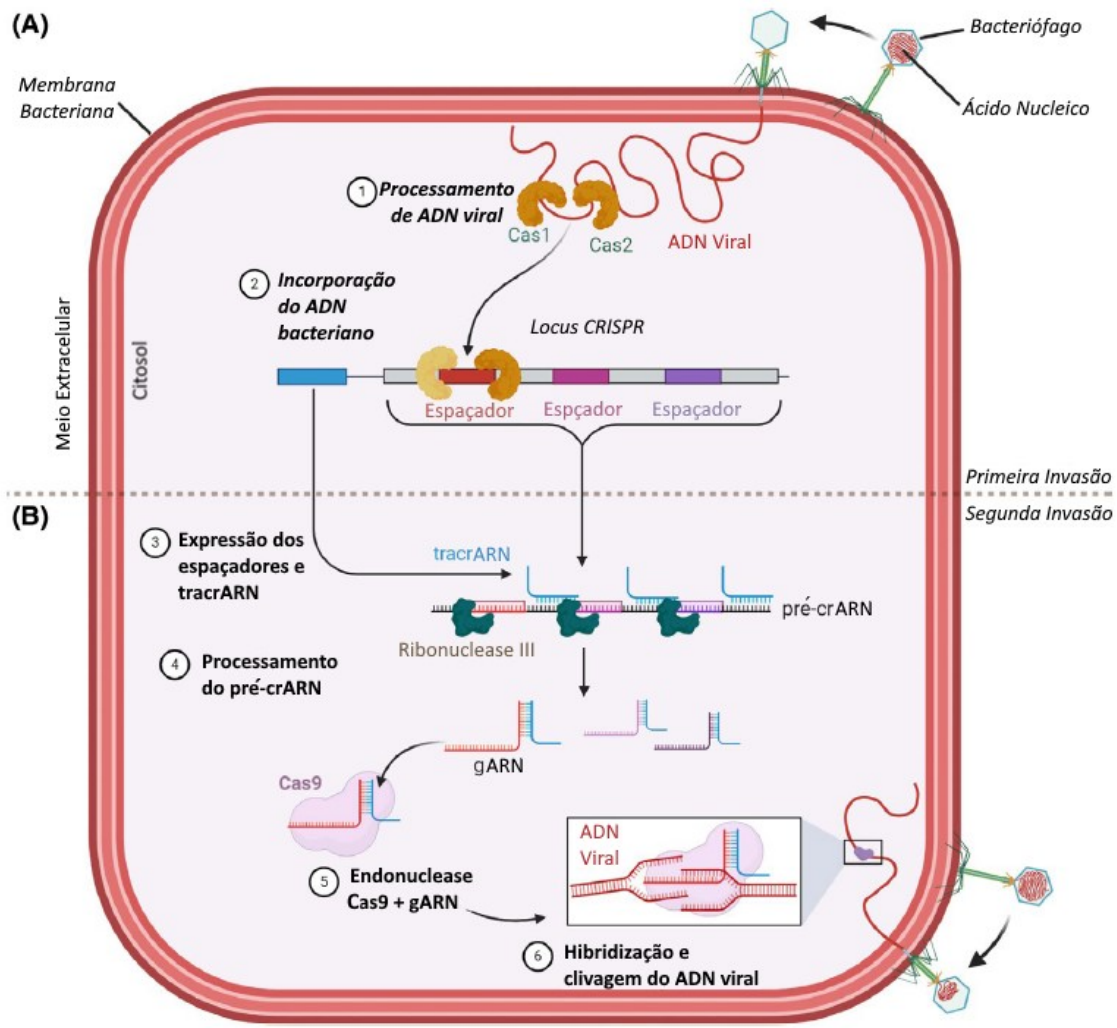

Figura 4. Funcionamento normal do sistema CRISPR/Cas9 em estirpes bacterianas. Nota: A - Infeção primária de uma bactéria por um bacteriófago; B - Reinfeção por um mesmo bacteriófago. Abreviaturas: gARN-ARN guia; pré-cr ARN – pré-ARN CRISPR; tracrARN – ARN CRISPR com ativação *trans*. Adapatado de: "*The role of CRISPR-Cas in advacing precision periodontics*", Barbour *et al.* (2020).

Após várias experimentações, constatou-se que ao manipular a sequência nucleotídica de um gARN, o sistema Cas9 artificial poderia ser programado de forma a reconhecer e clivar qualquer sequência de ADN alvo. Deste modo, o sistema CRISPR/Cas tornou-se uma ferramenta de edição genética chave que tem sido modificada por forma a permitir aos investigadores localizar, ativar ou ainda silenciar genes de interesse (Hongbao & Young, 2017).

Segundo de Buhr & Lebbink (2018), o sistema CRISPR/Cas9 tem sido aplicado no tratamento dos cancros HPV-positivos, através da supressão dos oncogenes integrados E6 e E7, induzindo assim a apoptose celular *in vitro* e uma redução significativa do

crescimento tumoral *in vivo*. Embora o número de estudos *in vivo* seja limitado, esta ferramenta tem-se revelado uma abordagem promissora no tratamento de CCEs da cabeça e pescoço HPV-positivos, no entanto, existem várias limitações que impedem uma tradução rápida do sistema para o ambiente clínico (Bortnik, 2019; de Buhr & Lebbink, 2018; Shaikh et al., 2017).

Um dos desafios mais críticos para a aplicação bem-sucedida do CRISPR/Cas9 *in vivo* é a sua entrega precisa e eficiente às células alvo. O tipo de célula, bem como a sua localização anatómica são fatores que influenciam de forma significativa a escolha do veículo para entrega e potencial eficácia terapêutica. Para o combate de infeções virais em células circulantes, como linfócitos B e T, é necessário um sistema de entrega sistémica, porém, este aumenta o risco de edição indesejada em células não infetadas. Estes efeitos podem ser limitados caso sejam utilizados promotores específicos de cada tecido capazes de conduzir Cas9 para as células que contenham a infeção viral, permitindo a expressão do sistema CRISPR/Cas9 nos genes das células alvo (de Buhr & Lebbink, 2018).

Para ultrapassar esta realidade, várias estratégias de entrega baseadas em vetores virais ou não virais têm sido testadas, por forma a garantir sucesso terapêutico de CRISPR/Cas9. Ambos os meios viral e não viral têm sido desenvolvidos em simultâneo, mostrando eficácia em estudos pré-clínicos e clínicos (Aghamiri et al., 2020).

Os sistemas de entrega viral, onde se incluem os retrovírus, vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), alfa vírus, herpes vírus, adenovírus, vírus associados aos adenovírus (AAV) e lentivírus, evidenciam níveis de transdução e expressão transgénica elevados (Aghamiri et al., 2020; Chabeda et al., 2018). Contudo, para além de ser um processo demorado e de grande complexidade, apresenta limitações na inserção de sequências e ainda pode induzir o desenvolvimento de cancro e desencadear uma resposta imunitária intensa (Aghamiri et al., 2020). No contexto da engenharia genética, os adenovírus, adenovírus associados e lentivírus têm sido os sistemas mais adotados, tendo sofrido alterações específicas para a entrega bem-sucedida do CRISPR/Cas9 (Aghamiri et al., 2020).

Embora os sistemas lentivirais sejam adequados para estudos *in vitro*, ao abrigarem transgenes extensos, produzem baixos títulos virais, comprometendo a integração do seu genoma nas células-alvo. Portanto, a maioria dos estudos concentra-se no sistema de entrega de AAV não integrado, que, contrariamente aos lentivírus, produzem altos títulos, sendo ainda considerado um sistema relativamente seguro, induzindo respostas imunes moderadas (Aghamiri et al., 2020; de Buhr & Lebbink, 2018).

Contudo, literatura recente tem levantado questões quanto à segurança dos AAVs, uma vez que têm sido associados a episódios de hepatite viral fulminante em crianças. Suspeita-se que determinados cofatores como uma infeção ou coinfecção prévia pelo SARS-CoV-2 (ou outro vírus), a falta de exposição a infeções virais durante a pandemia ou eventualmente a exposição ambiental ou de um medicamento, possam estar envolvidos no agravamento das infeções por adenovírus ou no desencadeamento de respostas imunes intensas (Mahase, 2022).

Por outro lado, a capacidade de armazenamento dos AAVs é bastante limitada, requerendo a diminuição do tamanho do gene SpCas9 (Aghamiri et al., 2020; de Buhr & Lebbink, 2018).

Os sistemas de entrega não viral e entrega física incluem a microinjeção, eletroporação, entrega lipídica e entrega através de polímeros. Apesar da sua baixa eficiência, o que poderá restringir a sua aplicação *in vivo*, os vetores não virais dispõem de uma grande variedade de produtos químicos disponíveis, capacidade de funcionalização e direcionamento e ainda facilidade de produção (Aghamiri et al., 2020).

Grande parte dos estudos *in vitro*, recorre aos sistemas de entrega lipídica, nomeadamente, à Lipofetamina, a qual tem permitido obter taxas de supressão em células infetadas com HPV e apoptose consideráveis. Contudo, os investigadores têm investido mais no desenvolvimento dos sistemas de entrega à base de nano polímeros lipoproteícos de que são exemplo os polímeros de β-amino ésteres (PBAEs), que têm mostrado resultados promissores *in vitro* e *in vivo* (Aghamiri et al., 2020).

Em 2021 foram publicadas duas revisões, as quais reúnem artigos que exploram a utilização de tecnologias de edição genética, incluindo CRISPR/Cas, em vários vírus, sendo que uma aprofunda mais a sua aplicação em cancros HPV-positivos. Contudo, estas revisões apenas incluíram estudos que incidem sobre o cancro cervical HPV-positivo e não descrevem pormenorizadamente os resultados obtidos para cada estudo. Desse modo, tendo em conta a escassez de evidência que reúna de forma criteriosa os estudos que avaliem a *performance* do CRISPR/Cas no tratamento de todo o tipo de cancros HPV-positivos, propusemo-nos a realizar a presente revisão.

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do sistema CRISPR/Cas no tratamento de cancros HPV-positivos, incidindo nos que envolvem a região da cabeça e pescoço, com o intuito de obter recomendações devidamente fundamentadas para o potencial desenvolvimento de ensaios clínicos neste âmbito. Para isso fez-se uma revisão sistemática de todos os artigos publicados em língua inglesa entre 2018 e 2022 sobre este tema.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Protocolo

O protocolo da presente revisão sistemática não se encontra registado no "PROSPERO data-base", uma vez que a extração de dados já tinha sido iniciada previamente ao registo. Foram seguidas as recomendações PRISMA para revisões sistemáticas (Anexo 1) (disponíveis em: "*The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews*" Page et al, (2021)).

A questão PICO inicial, à qual este estudo pretende responder, apresenta-se na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios PICO e questão da pesquisa

P	I	C	O
Population or Problem	*Intervention or Exposure*	*Comparison*	*Outcome*
Cancros da cabeça e pescoço (e cervicais) HPV-positivos	CRISPR *in vitro*/*in vivo*	Com/sem outra intervenção (terapêutica convencional ou outros tipos de de sistemas de edição genética)	Redução da viabilidade/proliferação e/ou aumento da apoptose celulares (*in vitro*) Redução do crescimento tumoral (*in vivo*)
Será o sistema CRISPR/Cas eficaz no aumento da apoptose celular e/ou redução da viabilidade/proliferação celulares *in vitro* e do crescimento tumoral *in vivo* em cancros da cabeça e pescoço HPV-positivos?"			

Nota: Disponível em: https://libguides.murdoch.edu.au/systematic/PICO

A pesquisa bibliográfica foi conduzida nas bases de dados eletrónicas PubMed e Biblioteca Virtual em Saúde durante o período de 25 de novembro de 2021 até 28 de fevereiro de 2022, recorrendo às palavras chave "CRISPR", "CRISPR/Cas", "HPV" e "*Head and neck cancer*". Foram ainda recolhidos estudos, considerados relevantes, através da consulta das referências bibliográficas dos estudos incluídos e também recorrendo à plataforma *Connected Papers*.

Critérios de inclusão

- Estudos originais publicados entre janeiro de 2018 até 28 de fevereiro de 2022 que recorram ao CRISPR/Cas para tratamento de carcinomas HPV-positivos
- Estudos em inglês
- Estudos que incluam carcinomas HPV-positivos, independentemente da sua localização anatómica
- Estudos que avaliam como possíveis alvos outros genes, que não E6 e E7
- Estudos que apresentem grupos de controlo sem intervenção e/ou com outros tipos de intervenções que não o CRISPR/Cas
- Estudos *in vitro* e *in vivo*

Critérios de exclusão

- Estudos que recorram ao sistema CRISPR/Cas para deteção do HPV
- Estudos onde o CRISPR/Cas é utilizado para analisar a relação de determinados genes com carcinomas HPV-positivos (ou seja, não é avaliado o potencial terapêutico do CRISPR/Cas)
- Estudos que não apresentem como resultados a viabilidade celular e/ou proliferação celular ou apoptose (*in vitro*) e tamanho tumoral (em animais)
- Estudos que constituam revisões narrativas, revisões sistemáticas e meta-análises
- Estudos disponíveis em 2017 publicados em 2018
- Estudos publicados antes de janeiro de 2018

A pesquisa e análise dos estudos foram efetuadas de modo independente por dois investigadores, Filipa Marques (FM) e Patrícia Lopes (PL), consultando um terceiro membro, Rita Serôdio (RS), em caso de discordância.

Recorreu-se à plataforma Rayaan (Ouzzani et al., 2016), por forma a eliminar duplicados e gerir as referências a selecionar.

Após uma pesquisa inicial, analisaram-se numa primeira instância os títulos e resumos dos artigos encontrados, sendo posteriormente excluídos aqueles que não se enquadravam nos critérios de inclusão. Caso o resumo indiciasse o preenchimento dos critérios estebelecidos, procedia-se ao exame integral do texto dos respetivos artigos, para inclusão definitiva. Esta triagem foi conduzida pelos três revisores (FM, PL e RS) de forma independente e incluída num diagrama PRISMA (Figura 5). Assim, foi comparada e analisada a informação recolhida por forma a constituir a presente revisão.

Protocolo de recolha de dados

Para cada estudo incluído na presente revisão foram recolhidas as seguintes informações: 1) Tipo de carcinoma, mediante da sua localização anatómica; 2) Genótipo de HPV; 3) Gene alvo que se pretendeu suprimir; 4) Endonuclease Cas utilizada; 5) Veículo de entrega/processo de transfeção utilizado no fornecimento do CRISPR/Cas às células; 6) Descrição e caracterização dos modelos *in vitro*/*in vivo* (fonte e tipo de célula, modelo *in vivo*); 7) Resultados: efeitos na viabilidade celular/taxa de apoptose e no tamanho tumoral;

Apresentação dos dados recolhidos

As informações recolhidas de cada estudo foram organizadas numa tabela (Tabela 2), de acordo com as 7 categorias indicadas no protocolo de recolha de dados.

Para cada estudo incluído foi elaborada uma síntese individual dos resultados recorrendo à direção dos efeitos e valores P.

Risco de viés dos artigos incluídos

A análise do risco de viés baseou-se na guideline SYRCLE's (Hooijmans et al., 2014), para os estudos *in vivo*, sendo constituída por 10 questões, como consta em anexo. Já para os estudos *in vitro*, recorreu-se ao *Quality assessment tool for in vitro studies* (*version* 2) (Cramond et al., 2016), composto por 17 questões, agrupadas em sete domínios (D1, D2, D3, D4, D5 , D6 e D7) (Anexo 3). Recorrendo à ferramenta *Robvis tool* (McGuiness & Higgins, 2021) foram elaborados dois gráficos, um para os estudos

in vitro e outro para os *in vivo*, como demonstram as figuras 6.,7., 8. e 9., respetivamente, por forma a compilar a informação recolhida e a avaliar os artigos entre alto, moderado ou baixo risco de viés.

Conflitos de interesse

O autor declara a inexistência de conflitos de interesse e financiadores para a realização do presente trabalho

III. RESULTADOS

A pesquisa realizada de forma independente por parte dos três elementos, permitiu a identificação de 199 referências. Após a remoção dos duplicados e estudos inelegíveis, foram selecionadas 107 referências, descartando revisões narrativas, revisões sistemáticas, meta-análises e estudos *in vitro*/*in vivo* em curso e não publicados. Foram selecionados 49 artigos para análise integral de cada texto. Destes, foram excluídos 24 estudos e incluídos 25 de acordo com os critérios de elegibilidade (Figura 5). Dentro da amostra final foram identificados 19 estudos *in vivo*, sendo que todos eles, à exceção de um, apresentavam uma componente *in vitro*.

Os 58 estudos excluídos não avaliavam a capacidade do CRISPR/Cas no tratamento do cancro desencadeado pelo HPV.

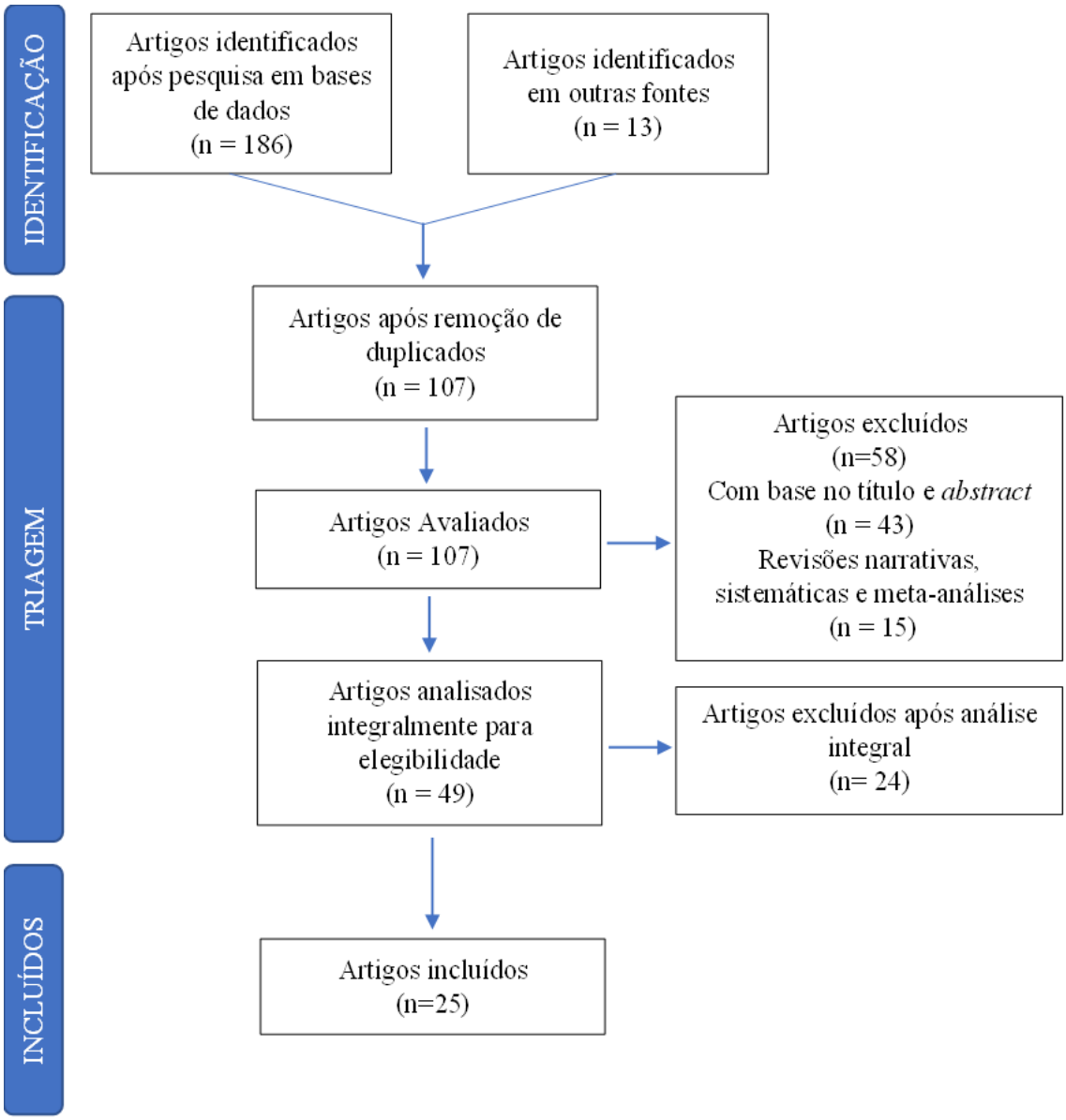

Figura 5. Flowchart da seleção dos artigos. Adaptado de "*The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews*", Page et al." (2021).

Com base nos critérios de seleção, foi possível reunir 25 estudos que avaliam a capacidade terapêutica do sistema CRISPR/Cas no tratamento de carcinomas HPV-positivos. Os resultados apresentados em cada artigo estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos estudos incluídos

Carcinoma	HPV alvo	Gene alvo	Cas	Veículo de entrega/ processo de transfeção	Modelo in vitro/ in vivo	Resultados	Referências
CCP	16	E6 E7	Cas 9	Lipofetamina 2000, *FuGENE* 6, Oligofetamina e Eletroporação	UMSCC1(SCC 1), UDSCC2, (SSC2), UMSCC104 (SCC104)	Redução de ≈50% da viabilidade celular em SSC2	Bortnik, 2019
CO	16 18	E6 E7	Cas 9	*FuGENE6* Lipofetamina 2000 em *OptiMEM*	HeLa UDSCC2 (SCC2), UMSCC104 (SCC104), UMSCC1 (SCC1), FaDu, 562 Detroit	Redução da viabilidade celular Restauração da resposta cGAS-STING	Bortnik et al., 2020
CCP	16	PIM1	Cas 9	Lentivírus recombinante	FaDu, SCC-4, SCC-9, SCC-15, CAL 27, Detroit 562 e SCC-25 (HPV-negativo); UM-SCC-47, UM-SCC-104, UPCI:SCC090, UD-SCC2, HMS001 (HPV-positivo)	Redução da proliferação celular em ≈58%	Broutian et al., 2020
CC	16 18	E6 E7	Cas 13a	Reagente ADN *X-tremeGene HP* Vetor lentiviral (*in vivo*)	SiHa HeLa C33A Modelo BALB/c rato fêmea *nude*	Diminuição da viabilidade celular Aumento da taxa de apoptose Peso e volume inferiores (*in vivo*)	Chen et al., 2020

Nota: CCP: Cancro da cabeça e pescoço; CO: Cancro da Orofaringe; CC: Cancro cervical; UMSCC1: células escamosas com carcinoma do pavimento da boca HPV-negativo; UDSSC2: células escamosas com carcinoma da hipofaringe HPV16-positvo; UMSCC104: células escamosas com carcinoma do pavimento da boca HPV16-positivo; SiHa, Caski, Hela, C33A: Linhas de células de carcinoma cervical; FaDu, SCC-4, SCC-9, SCC-15, CAL 27, Detroit 562 e SCC-25, UM-SCC-47, UM-SCC-104, UPCI:SCC090, UD-SCC2 e HMS001: Linhas de células de carcinoma da cabeça e pescoço; Modelo BALB/c: Rato imunodeficiente que deriva de uma linha com uma mutação genética que causa a ausência de timo, logo a incapacidade de produção de células T

Continuação da Tabela 2.

Carcinoma	HPV alvo	Gene alvo	Cas	Veículo de entrega/ processo de transfeção	Modelo in vitro/ in vivo	Resultados	Referências
CC	16	E6	Cas 9	Reagente *Fusion* E498b Vírus pseudotipo	SiHa, HEK-293FT Modelo BALB/c rato fêmea *nude*	Menor capacidade de proliferação e migração Diminuição no crescimento tumoral (*in vivo*)	Cheng et al., 2018
CC	16 18	E6	Cas 9	HCAdVs	SiHa, CaSki, Hela A549	Aumento da indução da apoptose Diminuição da proliferação	Ehrke-Schulz et al., 2020
CC	16 18	E7	Cas 9	Reagente ADN *X-tremeGene HP* NPs -hPPCs PBAE	SiHa HeLa Modelo BALB/c rato fêmea *nude*	Inibição do crescimento celular Diminuição do peso e volume do tumor (*in vivo*)	Gao et al., 2020
CC	16	E7	Cas 9	Reagente ADN *X-tremeGene HP* Reagente *TurboFect (in vivo)*	SiHa, HeLa, C33A, S12 Modelo BALB/c rato *nude* Rato FVB.Cg-Tg (KRT-HPV16)wt1Dh (K14-HPV16) fêmea	Aumento da apoptose celular Inibição do crescimento celular Diminuição do tamanho do tumor (*in vivo*)	Gao et al., 2022
CA	16	E6 E7	Cas 9	Método de precipitação de ADN - cálcio fosfato AAV (*in vivo*)	293T, SiHa, Xenoenxerto derivado de paciente com cancro anal Modelo CB17-Prkdc^{SCID}/J rato	Diminuição do volume tumoral (em duas vezes)	Hsu et al., 2018

Nota: CA: Cancro anal; CC: Cancro cervical; HCAdVs: Vetores adenovirais de alta capacidade; NPs: Nanopartículas; PBAE: polímeros de β-amino éster; hPPCs: polímeros radmíficados, sintetizados a partir de polímeros amida amina de geração 0 (PAMAM-G0) e PBAE; HCAdVs: Adenovírus de alta capacidade; AAV: Vetor associado a adenovírus; SiHa, Caski, Hela, S12 C33A: Linhas de células de carcinoma cervical; HEK-293FT: Linhas de células de rim embrionário humano; A549: Linha celular de carcinoma do pulmão; Modelo BALB/c *nude*: Rato imunodeficiente que deriva de uma linha com uma mutação genética que causa a ausência de timo, logo a incapacidade de produção de células T; FVB.Cg-Tg (KRT-HPV16)wt1Dh (K14-HPV16): Rato transgénico; CB17-Prkdc^{SCID}/J (NOD/SCID): Rato sem células T e B funcionais (com sistema imunitário deficiente)

Continuação da Tabela 2.

Carcinoma	HPV alvo	Gene alvo	Cas	Veículo de entrega/ processo de transfeção	Modelo in vitro/ in vivo	Resultados	Referências
CC	18	E6 E7	Cas 9	Reagente *Turbofect*	HeLa (CCL-2)	Indução da senescência celular Proliferação e crescimento celular não confluentes	Inturi & Jemth, 2020
CC	16 18	E6 E7	Cas 9 FokI-dCas9	Lipofetamina 3000 Lipossomas pegilados (*in vivo*)	SiHa, CaSki, HEK-293T, Jurkat, HeLa-FLAG16E7MYC Modelo Rag1 rato	Diminuição da proliferação celular Cas9 foi mais eficiente que FokI-dCas9 Eliminação do tumor e prolongamento da sobrevivência *(in vivo*)	Jubair et al., 2019
CC	16	E7	Cas 9	Lipofetamina 3000 Lipossomas pegilados (*in vivo*)	CaSki, C33A, HeLa, Jurkat e TC1 Modelo C57BL/6J de ratos	Redução da proliferação celular Eliminação do tumor com prolongamento da sobrevivência (*in vivo*)	Jubair et al., 2021
CC	18	E7	Cas 9	PEI, Lipofetamina 2000 Micelas PPO-NMe3	HeLa Modelo BALB/c rato fêmea *nude*	Inibição da proliferação celular Diminuição da viabilidade celular Menor volume tumoral (*in vivo*)	Lao et al., 2018
CC	16 18	CD71 (E6)	Cas 9	Lipofetamina 3000	C33A, C4-1, CaSki e SiHa Modelo BALB/c rato *nude* Modelo de rato NOD/SCID	Inibição da formação de esferóides e do comportamento tumoral *in vitro* e *in vivo* Aumento da sensibilidade celular ao tratamento radioativo	Leung et al., 2019

Nota: CC: Cancro cervical; SiHa, Caski, Hela, C33A, C4-1: Linhas de células de carcinoma cervical; TC1: Linhas de células epiteliais do pulmão primárias de ratos C57BL/6; HEK-293FT: Linhas de células de rim embrionário humano; Jurkat: Linhas de células derivada de linfócitos T imortalizados; PEI: Polietilenimina ramificada; Modelo BALB/c *nude*: Rato imunodeficiente que deriva de uma linha com uma mutação genética que causa a ausência de timo, logo a incapacidade de produção de células T; Modelo CB17-Prkdc^{SCID}/J (NOD/SCID): rato sem células T e B funcionais (com sistema imunitário deficiente); Modelo C57BL/6J: ratos resistentes a convulsões audiogénicas, com baixa densidade óssea e perda auditiva progressiva

Continuação da Tabela 2.

Carcinoma	HPV alvo	Gene alvo	Cas	Veículo de entrega/ processo de transfeção	Modelo in vitro/ in vivo	Resultados	Referências
CG CU	16 18	E6	Cas 13a	Lipofetamina 2000	Linhas de células de queratinócitos humanos isolados a partir de prepúcio neonatal	Redução da proliferação celular Indução da apoptose	Li et al., 2020
CC	18	E6 E7	Cas 9	Lipofetamina 3000 Lipossomas *(in vivo)*	HeLa, SiHa Modelo BALB/c rato *nude*	Indução da apoptose Inibição da proliferação celular Tamanho e peso tumoral inferiores (*in vivo*)	Ling et al., 2020
CC	18	E6	Cas 9	AAV, *pHelper*, PEI	HeLa, HEK-293T	Indução da apoptose Diminuição da proliferação celular	Noroozi et al., 2022
CC	18	E6 β-MLL5	Cas 9	Reagente *Transfectimine*	HeLa, HEK-293T	Diminuição da viabilidade celular Aumento da taxa de apoptose, potenciando os efeitos apoptóticos da cisplatina	Pirouzfar et al., 2020
CC	18	E6 E7	Cas 9 (via *GKCR)*	Reagente *X-tremeGENE HP ADN*	HeLa, HEK-293T	Inibição da proliferação e motilidade celular Método GKCR produziu uma % superior de indel	Tian et al., 2022

Nota: CC: Cancro cervical; HPV: CG: Carcinoma ginecológico; CU: Carcinoma urológico; β-MLL5: isoforma β da linhagem mista de leucemia 5; GKCR: *Gene Knockout Chain Reaction* AAV: Vetor associado a adenovírus; PEI: Polietilenimina ramificada; SiHa, Hela, CaSki,: Linhas de células de carcinoma cervical; HEK-293FT: Linhas de células de rim embrionário humano; S12: Linhas de células de queratinócito humano cervical imortal; Modelo BALB/c *nude*: Rato imunodeficiente que deriva de uma linha com uma mutação genética que causa a ausência de timo, logo a incapacidade de produção de células T; Modelo C57BL/6J: ratos resistentes a convulsões audiogénicas, com baixa densidade óssea e perda auditiva progressiva

Continuação da Tabela 2.

Carcinoma	HPV alvo	Gene alvo	Cas	Veículo de entrega/ processo de transfeção	Modelo in vitro/ in vivo	Resultados	Referências
CC	16	E7	Cas 9	NPs com PBAE546	SiHa, HeLa, CaSki, HEK-293T, S12 Modelo C57BL/6J de ratos Modelo BALB/c rato *nude*	Redução da viabilidade celular Inibição do crescimento tumoral, com redução do volume tumoral	Xiong et al., 2021
CC	18	E6	Cas 9	Lipofetamina *LTX*, Reagente *Plus* AAV (*in vivo*)	HeLa, HCS-2, SKG-I, HEK-293T Modelo BALB/c rato *nude*	Indução da apoptose Diminuição da viabilidade celular Inibição do crescimento tumoral, com menor tamanho tumoral (*in vivo*)	Yoshiba et al., 2019
CC	16	E6 E7	Cas 9	Lipofetamina 2000 Eletroporação (*in vivo*)	SiHa, C33A Modelo SCID rato	Indução da apoptose Inibição da viabilidade celular Supressão do crescimento tumoral Aumento da sobrevivência	Zhen et al., 2020
CC	18	E6 E7	Cas 9	Lipofetamina 2000 Nano-lipossomas (*in vitro e in vivo*)	SiHa, Caski e C33A Modelo C57BL/6 rato Modelo BALB/c rato fêmea *nude*	Aumento da apoptose celular Diminuição da viabilidade celular Diminuição do volume tumoral (*in vivo*)	Zhen et al., 2020

Nota: CC: Cancro cervical; CDK7: Ciclina depente da cinase 7; AAV: Vetor associado a adenovírus; NPs: Nanopartículas; PBAE546: polímeros de β-amino éster 456; SiHa, Hela, C33A, HCS-2, SKG-I :Linhas de células de carcinoma cervical; HEK-293FT: Linhas de células de rim embrionário humano; S12: Linhas de células de queratinócito humano cervical imortal; Modelo BALB/c *nude*: Rato imunodeficiente que deriva de uma linha com uma mutação genética que causa a ausência de timo, logo a incapacidade de produção de células T; C57BL/6J: ratos resistentes a convulsões audiogénicas, com baixa densidade óssea e perda auditiva progressiva

Continuação da Tabela 2.

Carcinoma	HPV alvo	Gene alvo	Cas	Veículo de entrega/ processo de transfeção	Modelo in vitro/ in vivo	Resultados	Referências
CC	16 18	CDK 7	Cas 9	Lipofetamina 3000 Entrega com lentivírus e *Polybrene*	HeLa, SiHa, C33A, HEK-293T	Inibição da proliferação celular	Zhong et al., 2019
CC	16	E7	Cas 9	NPs com PBAE	SiHa, HeLa, CaSki, HEK-293T, S12 Modelo BALB/c rato *nude* Modelo C57BL/6 rato	Diminuição da viabilidade celular Crescimento tumoral mais lento Volume tumoral inferior	Zhu et al., 2018

Nota: CC: Cancro cervical; CDK7: Ciclina depente da cinase 7; AAV: Vetor associado a adenovírus; NPs: Nanopartículas; PBAE: polímeros de β-amino éster; SiHa, Hela, HCS-2, SKG-I C33A :Linhas de células de carcinoma cervical; HEK-293FT: Linhas de células de rim embrionário humano; S12: Linhas de células de queratinócito humano cervical imortal; Modelo BALB/c *nude*: Rato imunodeficiente que deriva de uma linha com uma mutação genética que causa a ausência de timo, logo a incapacidade de produção de células T; C57BL/6J: ratos resistentes a convulsões audiogénicas, com baixa densidade óssea e perda auditiva progressiva

No estudo de Bortnik (2019) (Tabela 2) observou-se uma redução significativa da viabilidade celular de SCC2 (carcinoma de células escamosas da hipofaringe positivo para o HPV16) após a supressão da expressão da proteína E7 de HPV16 com CRISPR/Cas9 e gARNE7 usando os 3 tipos de reagentes de transfeção lipídica, após 24h, em proporções de 2:1 e 3:1 de reagente ($P<0,001$ para o *Lipofetamina 2000*; $P<0,0001$ para o *Oligofetamina*; $P<0,05$ para o *FuGENE*). Contudo, a viabilidade celular foi recuperada às 48h. Apesar de se ter verificado uma redução da viabilidade celular, esta diferença não foi significativa em comparação com os grupos controlo (Cas9, Cas9+gARN18E7). A transfeção através de eletroporação não resultou numa alteração significativa da viabilidade celular. Já em células tratadas com plasmídeo e *FuGENE* contendo gARN direcionado para ambos oncogenes E6 e E7, observou-se uma redução de ≈50% da viabilidade celular comparativamente aos controlos e grupo experimental com supressão de E7 (sem supressão de E6), às 24h ($P<0,001$), 48h ($P<0,0001$) e 72h ($P<0,001$).

Bortnik *et al.* (2020) (Tabela 2) mostraram novamente que a supressão de E7 de HPV16 não foi suficiente para induzir uma taxa apoptose significativa em células SCC2 (carcinoma de células escamosas da hipofaringe positivo para o HPV16) comparativamente às células controlo transfetadas com pCas9 e pCas9-18E7. Contudo, a inativação de E6 e E7 resultou na perda de ≈50% da viabilidade celular às 48h mantendo esta tendência às 72h (P<0,0001). Os autores também pretenderam verificar o papel do oncogene E7 na via cGAS-STING (um mecanismo de defesa anti-viral inato que estimula os genes interferão através da enzima GMP-AMP cíclico sintase) em linhas de células de carcinoma da orofaringe positivo para o HPV, uma vez que este gene tem mostrado uma forte inibição desta via em carcinomas cervical e da cabeça e pescoço, por forma a permitir a replicação ativa do HPV (Lau et al., 2015; Luo et al., 2020). Bortnik *et al.* (2020) mostraram que o silenciamento do oncogene E7 restaurou a ativação da via de sinalização cGas-STING mediada por CTADN (ativador da via) em células HeLa, células escamosas com carcinoma da orofaringe HPV+ e células escamosas com carcinoma da orofaringe HPV com aumento da proporção de mARN IFNβ (interferão beta) face aos níveis de mARN, comparativamente ao grupo controlo.

No estudo de Broutian *et al.* (2020) (Tabela 2), o *knockout* de PIM1 (indutor tumoral pertencente à família de cinases PIM altamente expresso em carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço, que regula a apoptose e a progressão do ciclo celular), recorrendo a CRISPR/Cas9, em subclones de células de carcinoma da base da língua positiva para HPV16 (UPCI:SCC090) induziu uma redução de 70 a 100% na expressão da proteína PIM1, correlacionando-se com uma diminuição nas taxas de proliferação celular. Uma redução quase completa da expressão de PIM1 no clone C11 foi associada a uma redução da taxa de proliferação em ≈58% comparativamente às células de controlo. Após a passagem em série dos clones com supressão de PIM1, foi observada uma recuperação gradual da expressão da proteína PIM1 acompanhada por uma taxa de proliferação acelerada, revelando novamente uma associação entre os níveis de expressão de PIM1 e as taxas de proliferação dos clones celulares.

Dada a evidência indicar uma maior eficiência por parte do sistema CRISPR/Cas13a, Chen *et al.* (2020) (Tabela 2), quiseram verificar se esta hipótese se aplicava à supressão de E6 e E7 em células de cancro cervical HPV-positivas. No seu estudo, os autores

desenharam 12 tracrARN (ARCN CRISPR com ativação em trans), três para cada oncoproteína (E6 e E7) e para cada genótipo HPV (HPV16 e HPV18). Comparado aos grupos de controlo, a utilização de CRISPR/Cas13a direcionado aos genes E6 e E7 de HPV16/18, induziu uma redução nos níveis de expressão de E6 e E7 nas linhas celulares de carcinoma cervical SiHa (HPV16+) e HeLa (HPV18+), bem como um aumento da expressão de p53 e da proteína de retinoblastoma (pRB), respetivamente. Relativamente à viabilidade celular, ocorreu uma diminuição significativa da proliferação celular (SiHa ($P<0,05$; $P<0,01$; $P<0,0001$); HeLa ($P<0,001$)), durante 96h, em comparação com células controlo (C33A). Comparativamente aos 7,3% registados no grupo de controlo, as taxas de apoptose de dois grupos com supressão de E6 de HPV16 (16E6CR2 e 16E6CR3) em SiHa foram significativamente superiores (23% e 22,7%, respetivamente) ($P<0,0001$), os outros grupos experimentais (16E6CR1, 16E7CR1, 16E7CR2 e 16E7CR3) aumentaram ≈13,5%-15% no mesmo grupo de células ($P<0,001$). Os seis grupos tratados com CRISPR/Cas13a com crARN direcionado a E7 de HPV18 em células HeLa demonstraram um aumento extremamente significativo das taxas de apoptose (23,7%-28,7%) ($P<0,0001$). Em ratos fêmea BALB/c *nude* injetados com células de carcinoma cervical SiHa e HeLa, o peso e volume dos tumores do grupo injetado com SiHa e CRISPR/Cas13 com 16E6CR1 foram significativamente inferiores aos do grupo injetado com SiHa-vetor sem tracrARN ($P<0,05$). Em contraste o peso e volume dos tumores do grupo de ratos injetados com células HeLa e crARN direcionado a E6 de HPV16 (16E6CR1) tratados por CRISPR/Cas13a não mostraram uma diferença significativa quando comparados ao grupo HeLa-vetor sem tracrARN, mostrando especificidade e eficiência do sistema.

Cheng *et al.* (2018) (Tabela 2) mostraram que os níveis de mARN de E6 no grupo experimental de células SiHa transfetado com CRISPR/Cas9 para inativar a expressão de E6 (Cas9+E6-gARN) foram significativamente inferiores aos registados nos grupos controlo ($P<0,01$). Neste mesmo grupo verificou-se uma diminuição na migração celular através do ensaio de migração *Transwell* ($P<0,01$). *In vivo*, ratos *nude* inoculados com células SiHa transfetadas com Cas9+E6-gARN mostraram uma menor tumorigenicidade, demonstrando uma diferença significativa quando comparados a outros grupos ($P<0,01$). Observou-se ainda no grupo de ratos experimental injetados com plasmídeo pseudotipo carregado com CRISPR/Cas9 direcionado a HPV16 E6 uma

diminuição significativa do crescimento tumoral (0.27±0.05 g) comparativamente ao grupo de controlo (0.87±0.15 g) (P<0.01).

No estudo de Ehrke-Schulz *et al.* (2020) (Tabela 2) as linhas de células de carcinoma cervical tratadas com CRISPR-HCAdV direcionado para E6 mostraram uma redução da viabilidade celular, comparativamente aos grupos de controlo. As células SiHa mostraram uma redução significativa de 85,4% (P<0,0005), já Caski e HeLa demonstraram uma redução de 29,6% e 33,7%, respetivamente. Apesar de se verificar uma tendência na redução da viabilidade celular, os valores obtidos em Caski e HeLa não foram estatisticamente significativos, quando comparados com o grupo de controlo transduzido com ΔE1-ΔE3-AdV5 (vetor adenoviral de primeira geração com exclusão de E1 e E3 e com capacidade de replicação em células cancerígenas HPV-positivas). A transdução com CRISPR-HCAdV direcionado a E6 inibiu a proliferação celular em linhas SiHa, Caski e HeLa (com maior destaque na última linha celular), com número de células viáveis significativamente diferente ao fim de três (P<0,0005), quatro (P<0,005) e três (P<0,0005) dias após a transdução (respetivamente), quando comparado ao grupo de controlo não tratado. A transdução com ΔE1-ΔE3-AdV5 também induziu uma redução significativa na viabilidade celular, no entanto esta só foi notória em SiHa (P<0,005) e Caski (P<0,0005) ao fim de seis dias e com valores menos pronunciados. Em contraste, células A549 HPV-negativas não foram praticamente afetadas pelo tratamento com CRISPR-HCadV específico para HPV E6. Os resultados sugerem que a inibição da proliferação de células tumorais com CRISPR-HCAdV direcionado a E6 é específica para células de carcinoma cervical HPV-positivas e que ΔE1-ΔE3-AdV5 atua por meio de um mecanismo distinto possivelmente condicional à replicação de células tumorais. Relativamente aos níveis de p53, houve um aumento significativo de 1,6 e 1,3 vezes em SiHa e Caski (P<0,05), já nas HeLa não foi registado este aumento. A ativação da Caspase 3 (essencial para o processo de apoptose) foi significativamente superior em SiHa (7,12x) (P<0,0005), Caski (2,19x) (P<0,005) e HeLa (1,49x) (P<0,005).

Gao *et al.* (2020) (Tabela 2), utilizaram polímeros ramificados (hPPC) sintetizados a partir de polímeros amida-amina de geração 0 (PAMAM-G0) e polímeros de β-amino éster (PBAE), com o intuito de analisar a sua capacidade em entregar o sistema CRISPR/Cas9 com plasmídeo recombinado direcionado ao oncogene E7 de HPV16.

O seu estudo mostrou que o crescimento de células SiHa positivas para HPV16 foi significativamente inibido à medida que a concentração de PBAE ou hPPC (com plasmídeo 16E7t1, ou seja, carregado com sgARN para E7 de HPV16) aumentava (razão da massa aumentou). Todos os vetores (hPPC1, hPPC2 e PBAE) com plasmídeo 16E7t1 ou 18E7t2 (sgARN para HPV18-E7) incorporados em nanopartículas mostraram uma forte redução na viabilidade celular em linhas SiHa, onde a 1 μg/mL foi detetada uma redução de aproximadamente 30%, 50% e 30%, para PBAE, hPPC1 e hPPC2, respetivamente, quando comparado aos controlos não tratados. Similarmente, em linhas HeLa positivas para HPV18 foi também observada uma forte redução da viabilidade celular: o efeito de inibição das NPs constituídas por hPPC1-18E7t2 aumentou em função da sua concentração, resultando numa redução da viabilidade celular muito pronunciada (60%) em células HeLa a uma concentração relativamente baixa (1 μg/mL). Com PBAE e hPPC2, esta redução foi de 20% e 30%, para a mesma concentração de NPs. A uma concentração inferior a 25 μL/mL, ambos os polímeros sozinhos e os polímeros hPPCs/PBAE-GFP juntamente com as NPs, mostraram baixa citotoxicidade, sendo que o grupo equivalente com plasmídeos direcionados aos genes alvo (hPPCs/PBAE-*therapeutic plasmids polyplex*) exibiram uma inibição significativa do crescimento das células cancerígenas. Em ratos *nude* com tumores induzidos pela inoculação de células SiHa, todos os grupos veiculados com NPs com hPPCs ou PBAE (com plasmídeo 16E7t1) inibiram significativamente o crescimento tumoral, especialmente o grupo com hPPC1, onde o volume foi significativamente reduzido. As taxas de inibição tumoral de NPs com PBAE, hPPC1 e hPPC2 foram de 85,0%, 90,3% e 80,5%, respetivamente. O peso do tumor dos grupos experimentais constituídos por ratos *nude* (injetados com PBAE ou hPPC1/2 com plasmídeo 16E7t1) foram significativamente menores quando comparado ao grupo de controlo ($P<0,05$), mas não significativos entre si. No que toca ao volume tumoral, foi demonstrada uma redução significativa ($P<0,01$) entre os mesmos grupos e o grupo de controlo, sendo que o grupo com hPPC1 demonstrou maior eficácia ($P<0,05$) comparativamente a PBAE e hPPC2. Não foram encontradas alterações patológicas significativas nas secções fixadas com hematoxilina-eosina do coração, fígado, baço, pulmões e rins de cada grupo.

Gao *et al.* (2022) demonstraram um aumento significativo das taxas de apoptose nas células SiHa e S12 positivas para o HPV16 tratadas com CRISPR/Cas9 direcionado para E7 ($P<0,001$). CRISPR/Cas9 mostrou uma diferença significativa na percentagem

de apoptose quando comparado com TALEN (P<0,05), no entanto esta diferença não foi verificada entre CRISPR e ZFN. Em células HeLa e C33A (controlos positivo para HPV18 e HPV-, respetivamente) não foram observadas alterações na taxa de apoptose. Relativamente ao crescimento celular, nas linhas SiHa e S12, o mesmo foi inibido por 4 dias. Contudo, não se registaram diferenças significativas no crescimento celular entre os grupos tratados com CRISPR/Cas9 e grupos controlo nas linhas celulares C33A e HeLa. Foi ainda realizado o ensaio de formação de colónias, por forma a investigar se existiam efeitos negativos do CRISPR/Cas9 em células HPV-positivas, tendo sido demonstrado uma redução significativa da formação do número de colónias de células SiHa e S12 (transfetadas com Cas9 e gARN) comparativamente ao grupo controlo, após duas semanas, tendo-se também obtido resultados similares para os grupos tratados com TALEN e ZFN. Em ratos imunossuprimidos, verificou-se que ao longo de 24 dias o tamanho dos tumores dos grupos tratados com gARN-E7-1+Cas9/ gARN-E7-2+Cas9 apresentavam um tamanho significativamente inferior, tendo crescido mais lentamente quando comparado aos grupos de controlo (vazio e com vetor vazio). Registou-se uma diferença estatística entre o tamanho dos tumores entre o grupo gARN-E7-1 e o grupo com o vetor vazio. Comparativamente aos grupos de controlo, os grupos tratados com CRISPR/Cas9 tiveram uma maior expressão de Caspase 3 e menor de HPV E7, chegando a expressão da oncoproteína a ser praticamente nula ao 24º dia. O grupo tratado com gARN E7-1+Cas9 houve reversão do fenótipo maligno do epitélio cervical gradualmente, com forma nuclear normal e epitélio bem diferenciado. O tratamento não induziu qualquer alteração morfológica significativa nos grupos de controlo e experimental.

No estudo *in vivo* de Hsu *et al.* (2018), os ratos imunossuprimidos com xenoenxerto de cancro anal positivo para HPV16 foram injetados com vetor adenoviral (AAV) com capacidade de expressão de Cas9 e um sgARN direcionado para os genes E6 e E7 de HPV16, o qual induziu uma diminuição superior a duas vezes no volume tumoral, quando comparado aos tumores preparados com o controlo, 2 semanas após o início do tratamento. Esta diminuição foi estatisticamente significativa (P < 0,01).

Inturi & Jemth (2020) demonstraram que a inativação específica dos genes E6 e E7 de HPV18, através da expressão de Cas9 com gARN veiculados por meio do vetor PX459 em células de carcinoma cervical HeLa positivas para o HPV18, resultou numa

melhoria da atividade lisossomal β-galactosidase (comparativamente ao grupo controlo), induziu alterações na morfologia celular e aumentou a área de superfície do núcleo e da própria célula, consistindo num fenótipo tipo de senescência. As células tratadas não só não foram capazes de formar colónias como também não se proliferaram nem cresceram de forma confluente. Esta inativação permitiu ainda a recuperação dos níveis de p53 e pRb (proteína de retinoblastoma) através da ativação da via de sinalização p21, promovendo a senescência.

Jubair *et al.* (2019) pretenderam estudar a viabilidade de uma variante Cas9 mais específica, FokI-dCas9, na supressão dos genes E6 e E7 do HPV16 e HPV18. Quando comparado à variante normal Cas9 WT, FokI-dCas9 reduziu de forma semelhante o número de colónias, sendo que ambas as variantes inibiram significativamente a proliferação celular de células de carcinoma cervical Caski (HPV16+) e HeLa (HPV18+). Contudo o Cas9 WT mostrou-se mais eficiente que a variante estudada. Em ratos, o silenciamento do gene E7 de HPV16 com Cas9 WT interrompeu o crescimento dos tumores induzidos por células de carcinoma cervical CasKi e, no 77º dia, 4/5 dos ratos não apresentavam evidência tumoral. Com o xenoenxerto de células HeLa infetadas com HPV18, mais agressivo, foi necessário um tratamento com várias doses, para obter resultados satisfatórios. O grupo #1 recebeu 3 injeções nos, 8º, 10º e 12º dias, abrandando o crescimento tumoral, no entanto detetou-se uma reversão deste padrão tendo o tumor alcançado um volume de 1000 mm^3 no final do ensaio. Por outro lado, o grupo #2 recebeu 7 injeções até ao 28º dia com total inibição do crescimento tumoral com presença de nódulos residuais no final do ensaio. Deste modo, o tratamento com 3 doses prolongou significativamente a sobrevida dos ratos livres de cancro por 12 dias (39,6 dias para E7 de HPV18 #1 versus 27,6 dias para o grupo controlo, $P<0,001$), enquanto o tratamento com sete doses eliminou totalmente o cancro (46 dias para E7 de HPV18 #2 versus 27,6 dias para grupo controlo, $P<0,001$). Verificou-se ainda um aumento significativo ($P<0,001$) do número de células apoptóticas nos tecidos tratados com Cas9 WT comparativamente às secções do tumor não tratadas.

Jubair *et al.* (2021), estudaram a eficácia dos lipossomas pegilados como vetor de veiculação de plasmídeos contendo Cas9 direcionado para E7 de HPV16. Observou-se uma redução significativa da proliferação celular e no número de colónias ($P<0,001$) no grupo com gARN direcionado a E7, sendo este efeito específico unicamente para as

linhas positivas para o HPV, TC1 e CasKi, pois não se verificou esta redução ao nível de C33A (HPV-). Nos estudos em ratos imunocompetentes, tal como verificado no experimento anterior, o tratamento com uma dose ofereceu um bom controlo do crescimento tumoral (comparado aos grupos controlo), no entanto a supressão do crescimento não foi mantida, com alcance de 1000 mm^3 ao 36º dia. O segundo grupo, o qual continuou a receber o tratamento com Cas9 com inativação para E7, mostrou uma completa inibição até ao final do experimento com eliminação total dos tumores. Todos os ratos que receberam doses continuadas sobreviveram até ao 40º dia, já o grupo de controlo faleceu por volta do 23º dia e o grupo que recebeu a injeção até ao 22º dia faleceu próximo do final. Foram observadas alterações apoptóticas e degenerativas, mas nenhuma evidência de inflamação significativa no tecido tumoral foi detetada. Ou seja, a inativação de E7 com CRISPR/Cas9, induz apoptose em células-alvo, sem que esta seja devido a uma resposta imune exacerbada.

No estudo de Lao *et al.* (2018), o *knockout* do oncogene E7 de HPV18 recorrendo ao sistema CRISPR/Cas9 inibiu tanto a atividade proteossomal (envolvida na degradação do supressor tumoral pRb através da regulação de E7) como a proliferação celular. 72h pós-transfeção, a atividade proteossomal foi reduzida em 31,9% e 25,7% nas células tratadas com dois gARNs distintos direcionados a E7, E71 e E72, respetivamente ($P<0,05$). Do mesmo modo, ambos os grupos tratados com gARNs E71 e E72 cresceram mais lentamente, atingindo uma viabilidade celular de 68,1% e 73,1% quando comparado ao grupo controlo ($P<0,01$). Em ratos fêmea *nude,* Cas9 veiculado a partir de micelas com gARN direcionado a E7 (E71 e E72) atrasou eficientemente o crescimento do tumor, enquanto o grupo tratado exclusivamente com a micela ou Cas9 (sem gARN) não mostrou qualquer inibição significativa do tumor ($P<0,05$). No 31º dia, os tumores dos grupos E71 e E72 atingiram apenas 38,2% ± 3,99 e 36,2% ± 9,42 do volume tumoral do grupo controlo com Cas9. Não foram ainda observadas perdas de peso significativas e toxicidade dos órgãos dos ratos tratados.

Leung *et al.* (2019), aplicaram o sistema CRISPR/Cas9 para suprimir o gene CD71 em células de cancro cervical positivas para o HPV16 com uma população abundante de $CD71^+$. Foram obtidos os clones F99 e J76, os quais exibiam uma redução exponencial da expressão de CD71 (devido à transfeção de Cas9 com gARN direcionado a CD71). Nestes clones o número de esferoides formados foi significativamente menor

relativamente aos formados pelas células SiHa parentais (F99 P=0,0016; J76 P=0,0193). Relativamente à tumorigenicidade *in vitro* o número de colónias formadas pelos clones F99 (P=0,0254) e J76 (P=0,0111) foi significativamente menor relativamente ao grupo de células parentais. No experimento de xenoenxertos em ratos, observou-se a formação de xenoenxertos em todos os ratos que receberam a injeção de células SiHa parentais, enquanto não se formaram quaisquer xenoenxertos nos ratos injetados com clones F99. Adicionalmente, as taxas de sobrevida dos clones F99 e J76 foram muito inferiores após exposição a radiação, não tendo estes sobrevivido quando expostos a tratamentos de radiação de 4 Gy ou 6 Gy, comparativamente às células parentais, indicando que a supressão do gene CD71 aumenta a sensibilidade aos tratamentos de radiação.

Li *et al.* (2020) mostraram uma redução da capacidade de proliferação de queratinócitos humanos em 14±1,8% (P<0,01) quando transfetados com CRISPR/Cas13a direcionado a E6 de HPV16 e HPV18 recorrendo a Lipofetamina e, uma fluorescência azul forte ao nível do núcleo revelando características apoptóticas nas células, quando fixadas com *Hoechst-33258*. Estas células ainda mostraram um aumento dos níveis de caspase 3 (80,2±3,2%; P<0,05), sendo que nos grupos transfetados com plasmídeo vazio não foi induzida apoptose.

No estudo de Ling *et al.* (2020), a supressão dos oncogenes E6 e E7 de HPV18 (E6E7-KO) com recurso a CRISPR/Cas9 exibiu níveis de apoptose aumentados em linhas celulares HeLa comparativamente ao grupo controlo (P<0,05). Por outro lado, as células SiHa não revelaram diferenças significativas. No que toca à proliferação celular, os resultados mostraram que as células HeLa com supressão de E6 e E7 de HPV18 cresceram mais lentamente e o seu número diminuiu de forma acentuada, enquanto as células não tratadas se desenvolveram rapidamente (P<0,01). *In vitro*, ainda foram analisados os níveis de expressão de mARN de E6 e E7, os quais mostraram valores significativamente menores nas células HeLa com E6E7-KO comparativamente ao controlo (P<0,001). Em contraste, nas células SiHa esta diferença na expressão de mARN de E6 e E7 não foi significativa. Como esperado, os níveis de p21 e p53 aumentaram de forma síncrona nos grupos de células HeLa com a supressão de E6 e E7, comparativamente ao controlo não tratado. Nos ensaios em ratos *nude* inoculados com células de carcinoma cervical HeLa (por forma a induzir o tumor, verificou-se um tamanho e peso tumoral significativamente inferiores nos grupos experimentais

(tratados com Cas9 direcionada a E6 e E7) quando comparado ao controlo (P<0,01), sendo que entre estes, o grupo de alta dosagem apresentou uma diminuição ligeira e um crescimento mais lento (não significativa estatisticamente) relativamente aos de dosagem média e baixa. Ao longo do tratamento não foram detetadas alterações significativas no peso nem evidência toxicidade ao nível dos órgãos dos ratos entre os vários grupos. Desta forma, o grupo E6E7-KO inibiu o crescimento tumoral sem toxicidade lipídica *in vivo*.

Noroozi *et al.* (2022), mostraram um aumento significativo da taxa de apoptose das células de carcinoma cervical HeLa (positivas para o HPV18) devido à inativação de E6 por Cas9 com diferentes gARN (P<0,0001). 27,3% das células infetadas com sgARN-1 e 32,4% das células infetadas com sgARN-2 encontravam-se numa fase precoce de apoptose. Relativamente ao total de células apoptóticas no primeiro grupo foi atingida uma percentagem de 31,74% e no segundo 38,74%. No grupo que recebeu ambos sgARNs 1 e 2, os valores foram de 49,3% para apoptose precoce e 53,03% para total de células em apoptose. De entre todos os grupos que receberam o tratamento, aquele que mostrou uma maior redução na proliferação celular foi o grupo transduzido com ambos sgARN-1 e 2 veiculado por um vetor adenoviral, com 31,42% 120h após transdução (P<0,0001). No mesmo ponto de tempo, a percentagem da proliferação celular em células transduzidas com sgARN-1 e sgARN-2 foi de 43,3% e 39,15%, respetivamente.

A expressão dos genes E6 e E7 em células de cancro cervical é regulada pela isoforma beta da linhagem mista de leucemia 5 (β-MLL5), por isso Piroufzar *et al.* (2020), quiseram verificar se este gene MLL5 poderia ser um possível alvo na contenção da replicação viral de HPV18, recorrendo a CRISPR/Cas9. Os resultados mostraram que a inativação por meio de CRISPR/Cas9 dos genes MLL5 e E6 mostrou uma redução substancial da expressão dos respetivos mARNs nas células HeLa (HPV18+) transfetadas com CRISPR/Cas9, comparativamente aos controlos (P<0,05). Relativamente à concentração de p53, quando comparados ao grupo de controlo, ambos os grupos experimentais mostraram um aumento significativo dos níveis de p53 (P=0,05), sem, no entanto, mostrar diferenças entre si (P=0,433). Foi observada uma redução significativa da viabilidade celular em células HeLa com os genes MLL5 e E6 suprimidos, comparativamente ao grupo de controlo não tratado (P<0,001). Quando acoplados à cisplatina, os grupos com supressão de MLL5 e E6 apresentaram uma

percentagem inferior significativa quando comparados ao grupo com tratamento único com cisplatina (P<0,001). Os grupos com supressão de E6 e MLL5 ainda demonstraram um aumento significativo da taxa de apoptose comparativamente ao grupo de controlo (P=0,019), sendo que em junção com a cisplatina, ambos os grupos demonstram uma percentagem notoriamente superior ao controlo e ao grupo tratado exclusivamente com cisplatina (P<0,001).

Tian *et al.* (2022), exploraram a possibilidade de a técnica *Gene Knockout Chain Reaction* (GKCR) trazer melhorias relativamente à eficiência de edição recorrendo ao CRISPR/Cas9. Este método envolve um plasmídeo que para além de conter os genes que codificam Cas9 e um ARN guia (presentes num sistema CRISPR normal), apresenta mais 23 pares de base de reconhecimento, onde estão incorporadas as bases do motivo protoespaçador adjacente (PAM), (também incluído num sistema normal). Comparativamente às células HeLa (HPV18+) transfetadas com CRISPR/Cas9 normal (sem as 23 pares de base adicionais) (controlo) (7,93%) e ao grupo de células HeLa transfetadas com os dois plasmídeos com GKCR e CRISPR/Cas9 normal (controlo + GKCR) (13,03%), o grupo de células transfetado com GKCR mostrou uma percentagem de *indel*, ou seja, produção de inserções e deleções, superior em 16,97% para o site E6-31 do HPV18 (P<0,001). Para o site E7-51, o grupo GKCR obteve um *indel* de 21,45%, enquanto o controlo 8,1% e controlo + GKCR 10,6% (P<0,01). Os grupos experimentais transduzidos com CRISPR/Cas9 direcionado para E6 juntamente com GKRC (HPV18-E6-31-GKCR e HPV18-E7-51-GKCR) mostraram resultados de expressão de p53 e pRB (proteína de retinoblastoma) superiores ao controlo pelo método tradicional (P<0,01; P<0,05). Os valores de viabilidade celular dos grupos experimentais foram significativamente inferiores aos grupos de controlo (vetor, método tradicional), tendo a ser esta diferença mais significativa ao longo do tempo (P<0,05).

No estudo de Xiong *et al.* (2021) todas as nanopartículas, contendo sgARNs direcionados para E7 de HPV16, reduziram efetivamente a viabilidade celular de células positivas para o HPV16 (SiHa, S12 e CaSki), quando comparadas ao grupo com plasmídeos vazios (controlo), enquanto nenhuma diferença foi observada na viabilidade celular de células HeLa negativas para o HPV16. Para células SiHa às 24 horas a diferença não foi significativa quando comparado ao controlo, no entanto, a partir das 48 horas esta verificou-se (P<0,001 48h e 72h) com maior destaque para o grupo

veiculado com nanopartículas compostas pelo vetor não viral PBAE546 carregado com CRISPR gARN2 o qual se mostrou mais eficaz (P<0,0001 48h e 72h); Para células S12 ocorreu o mesmo que nas células SiHa, onde só a partir das 48h se verificou uma diferença significativa (P<0,01 48h e 72h) e com igual destaque para o segundo grupo de PBAE546/CRISPR gARN2 (P<0,001 48h; P<0,0001 72h). Para células Caski a diferença foi significativa partir do primeiro dia entre os grupos experimentais e de controlo (P<0,001 24h; P<0,0001 48h; P<0,01 72h), no entanto não se verificaram grandes diferenças entre os grupos experimentais. *In vivo*, onde se induziram tumores subcutâneos através de injeção de células SiHa, o grupo tratado com CRISPR/Cas9 direcionado a HPV16 E7 mostrou inibição significativa do crescimento tumoral e uma redução significativa do seu volume em comparação com o grupo tratado com o plasmídeo vazio (P<0,05). Não foram observadas diferenças entre os grupos nos ratos com tumores subcutâneos gerados por células HeLa. Não foram observadas reações tóxicas óbvias em outros órgãos importantes.

Yoshiba *et al.* (2019) mostraram que células transduzidas com sgARN direcionado a E6 e veiculado por AAV (AAV-sgE6) obtiveram uma diminuição significativa da expressão de E6 e um aumento significativo da expressão de p53. Comprovou-se ainda a indução da apoptose após inativação de E6 por sistema CRISPR/Cas9, dado o aumento do número de células transduzidas com AAV-sgE6 positivas com FITC-*AnnexinV* (46.0±5.0/HPF) comparativamente a células não tratadas (1.0±1.4/HPF) e células transduzidas com o vetor vazio (0.8±1.3/HPF) (P<0,05). A viabilidade celular, por sua vez, diminuiu consoante o aumento da dose de AAV-sgE6. *In vivo*, observou-se uma inibição do crescimento tumoral em ratos injetados com AAV-sgE6 quando comparado com o grupo controlo. No ponto final de 42 dias o grupo experimental padecia de tumores de tamanho significativamente inferior relativamente ao grupo controlo, 114±60 e 817±114 mm^3, respetivamente, (P<0,05). De notar que não foram observadas diferenças significativas no peso dos ratos nem anormalidades na região peritumoral subcutânea.

No estudo de Zhen *et al.* (2020), os níveis de expressão de E6/E7 de HPV16 em células SiHa foram significativamente inferiores após transfeção com CRISPR/Cas9 desenhado para inativar estes genes comparativamente ao grupo transfetado com ARN e vetor vazio (P<0,01). O *knockout* destes genes, por outro lado, resultou num aumento

dramático da apoptose de células SiHa, com consequente supressão significativa da viabilidade celular (P<0,05). Em ratos imunossuprimidos SCID, a inativação de E6 e E7 por tratamento com CRISPR/Cas9 levou à supressão moderada da atividade tumoral, com um aumento ténue da sobrevivência, no entanto, os melhores resultados foram obtidos com a combinação de ambos tratamentos anti-HPV e anti-PD1.

Zhen *et al.* (2020), mostraram níveis de expressão de E6/E7 significativamente reduzidos em células SiHa e CasKi transfetadas com CRISPR/Cas9 com gARN direcionado a HPV16 E6/E7 comparativamente a células transfetadas com vetor vazio (controlo) (P<0,05). A percentagem de células apoptóticas no grupo experimental foi superior ao grupo controlo, sendo que a maior taxa foi atingida no grupo que apresentava ambos genes E6+E7 suprimidos (P<0,05). Quando agregado a nano-lipossomas o sistema CRISPR/Cas9 apresentou resultados ainda mais satisfatórios e eficientes com expressão diminuída de E6/E7 quando comparado com os grupos CRISPR/Cas9 sem nano-lipossoma e Lipofetamina 200-gARN com vetor vazio (P<0,05). Relativamente à viabilidade celular os melhores resultados foram obtidos nos grupos transfetados com CRISPR/Cas9 direcionados a E6/E7 em nano-lipossomas ou em Lipofetamina 2000 (P<0,05), sem diferenças significativas entre ambos os grupos. Em ratos, após 3 semanas de administração da solução terapêutica com CRISPR, o volume tumoral no grupo injetado com lipossoma e gARN direcionado a E6 e E7 foi significativamente inferior relativamente aos grupos de controlo negativo e injetados sem tratamento. Neste grupo foram ainda observados os menores níveis de expressão de ARN E6 e E7 (P<0,05). Não foi observada toxicidade significativa ao nível dos órgãos vitais como rins, coração e fígado dos ratos.

A ciclina dependente da cinase 7 (CDK7) constitui uma subunidade catalítica indispensável da cinase ativadora de CDK (CAK), que é necessária para a transição do ciclo celular e regulação da transcrição (Zhong et al. 2019). THZ1 é um inibidor de CDK7 com uma grande atividade antineoplásica em vários cancros, desse modo Zhong *et al.* (2019), procuraram saber se o poder antineoplásico da supressão de CDK7 (recorrendo a CRISPR/Cas9 *in vitro* e a THZ1 em ratos) também se estendia a células de cancro cervical HPV-positivas. Os autores empregaram dois sistemas CRISPR/Cas9 independentes para suprimir o gene CDK7 em linhas celulares de cancro cervical HPV-positivas (SiHa, HeLa) e HPV-negativas (C33A), tendo induzindo uma redução

substancial de mARN e da proteína de CDK7 ($P<0,05$). Por sua vez, a regulação negativa de CDK7 demonstrou uma inibição significativa da proliferação celular em células HeLa, SiHa e C33A comparativamente aos controlos não tratados com CRISPR/Cas9.

Zhu *et al.* (2018) geraram nanopartículas com PBAE juntamente com plasmídeos contendo Cas9 programada para inativar o gene E7 de HPV16. Estas nanopartículas não demonstraram efeitos citotóxicos ou deletérios nas várias camadas celulares. As células HPV16 positivas SiHa, CaSki e S12, tratadas com Cas9 direcionado a E7 de HPV16 e veiculado por nanopartículas demonstraram uma diminuição significativa da viabilidade celular comparativamente aos grupos não tratados, excetuando nas células HeLa, nas quais não foram observadas diferenças a este nível. Em ratos *nude* inoculados com células SiHa e HeLa (para induzir tumor), os tumores injetados com as nanopartículas direcionadas a HPV16 (PBAE/CRISPR e PBAE/shARN) mostraram taxas de crescimento mais lentas e a média dos volumes dos xenoenxertos rondaram os 52 e 60 mm^3, respetivamente. Estes grupos apresentaram volumes significativamente inferiores comparativamente aos tumores injetados com controlo ou plasmídeo vazio ($P<0,05$). Contudo, não foram denotadas diferenças nos volumes dos xenoenxertos injetados com células HeLa. Não foi detetada toxicidade significativa ao nível do coração, baço, pulmões e rins após a injeção muscular e vaginal.

Risco de Viés dos estudos incluídos

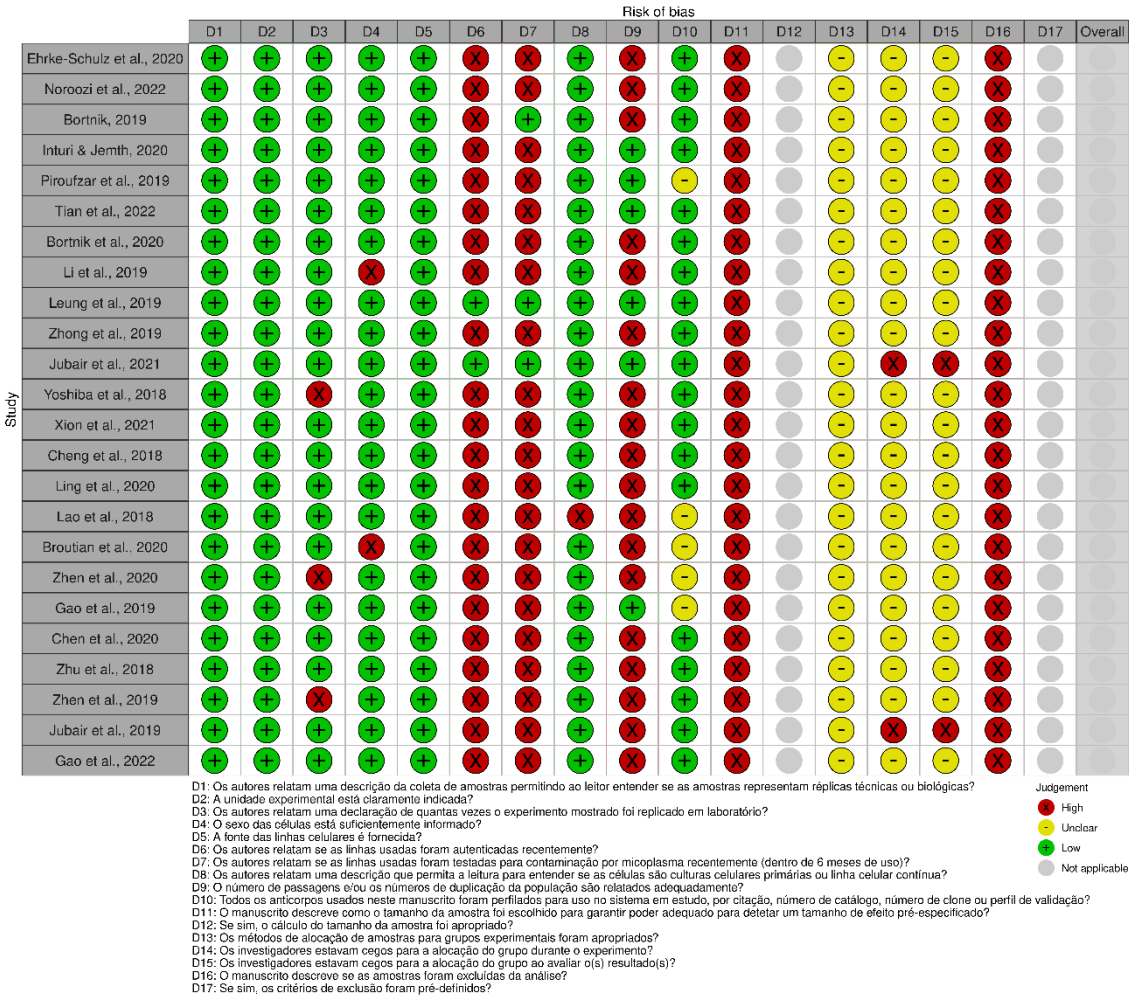

Figura 6. *Traffic Light Plot* do risco de viès dos estudos *in vitro*. D1-D17 disponíveis no Anexo 5. *Fonte "Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments*", McGuinness & Higgins (2021).

Como se pode observar na figura 6., todos os estudos mostram baixo risco de viés em resposta à primeira e segunda perguntas. Os estudos de Yoshiba *et al.* (2018), Zhen *et al.* (2020) (2020), são os únicos que apresentam um alto de risco de viés em resposta à terceira pergunta, por não indicarem claramente quantas vezes o experimento foi replicado em laboratório. Relativamente ao sexo das células, os estudos de Li *et al.* (2019) e Broutian *et al.* (2020) não especificaram corretamente o sexo das várias linhas celulares desconhecidas utilizadas no estudo. Todos os artigos demonstram baixo risco de viés para a pergunta 5, uma vez que todos eles forneciam a origem das linhas celulares mesmo de forma menos explícita. O estudo de Bortnik (2020) responde

positivamente à sétima pergunta, por referir que as linhas celulares utilizadas foram testadas para a contaminação por micoplasma. Os estudos de Leung *et al.* (2019) e Jubair *et al.* (2021) mostram baixo risco de viés para ambas as perguntas 6. e 7. O estudo de Lao *et al.* (2018) foi único do qual não se conseguiu concluir se as linhas celulares utlizadas eram primárias ou de linha celular contínua, demonstrando alto risco na pergunta 8. Apenas seis estudos mencionaram o número de passagens das células, mostrando um baixo risco de viés para a pergunta 9. Os estudos de Piroufzar *et al.* (2019), Lao *et al.* (2018), Broutian *et al.* (2020), Zhen *et al.* (2020) e Gao *et al.* (2019) não reportaram na sua metodologia o recurso a anticorpos, pelo que não houve consenso na resposta à pergunta 10. Nenhum estudo incluído descreveu o método como o tamanho da amostra foi escolhido, por forma a garantir um poder adequado, por isso, a pergunta 11 mostra um alto risco de viés e a pergunta 12. não pôde ser aplicada. Nenhum dos estudos referiu o método de alocação utilizado nem se os investigadores estavam cegos durante esta fase do ensaio, excetuando os estudos de Jubair *et al.* (2019) (2021), onde um dos autores (via correio eletrónico) confessou a inexistência de cegueira durante o decorrer do estudo. Por último nenhum estudo reportou a exclusão de amostras para a análise. Assim os estudos que apresentaram um maior risco de viés foram os estudos de Jubair *et al.* (2019) e de Lao *et al.* (2018), sendo que os restantes poderão apresentar um risco mais elevado ou menor, tendo em conta que grande parte da informação disponibilizada não foi suficiente para responder de forma completa a várias questões.

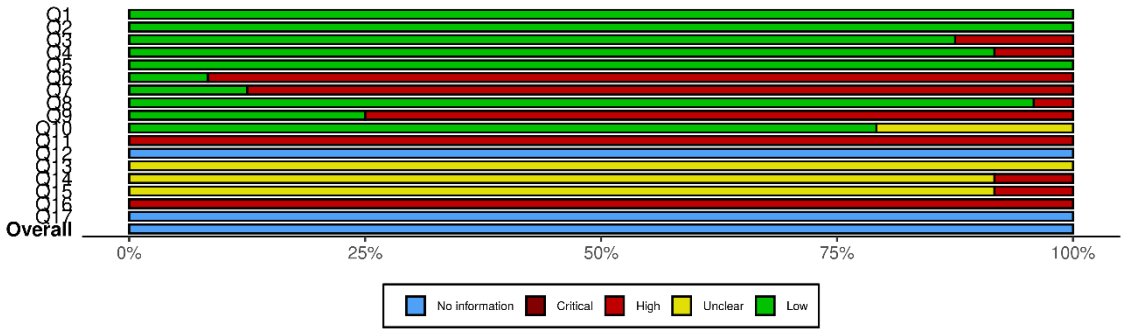

Figura 7. *Summary Plot* do risco de viès dos estudos *in vitro. Fonte: "Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments*", McGuinness & Higgins (2021).

As perguntas que mostram maior risco de viés foram as perguntas 11. e 16. (100%), uma vez que nenhum dos artigos incluídos descreveu o método como o tamanho da amostra foi escolhida, nem se alguma destas amostras foi excluída durante o estudo. Outras perguntas onde os estudos frequentemente demonstraram percentagem elevada de risco, foram as perguntas 6., 7. e 9. (≥75%). Já nas perguntas 3., 4., 8. e 10. os manuscritos revelaram apresentar um baixo risco de viés com percentagens de risco inferiores a 25%. Todos os estudos (100%) mostraram baixo risco de viés nas perguntas 1.,2. e 5. Contudo grande parte dos estudos (75-100%) não apresentou consenso nas respostas às questões 13., 14. e 15., uma vez que os mesmos não reportavam o método de alocação ou se existiu cegueira dos investigadores.

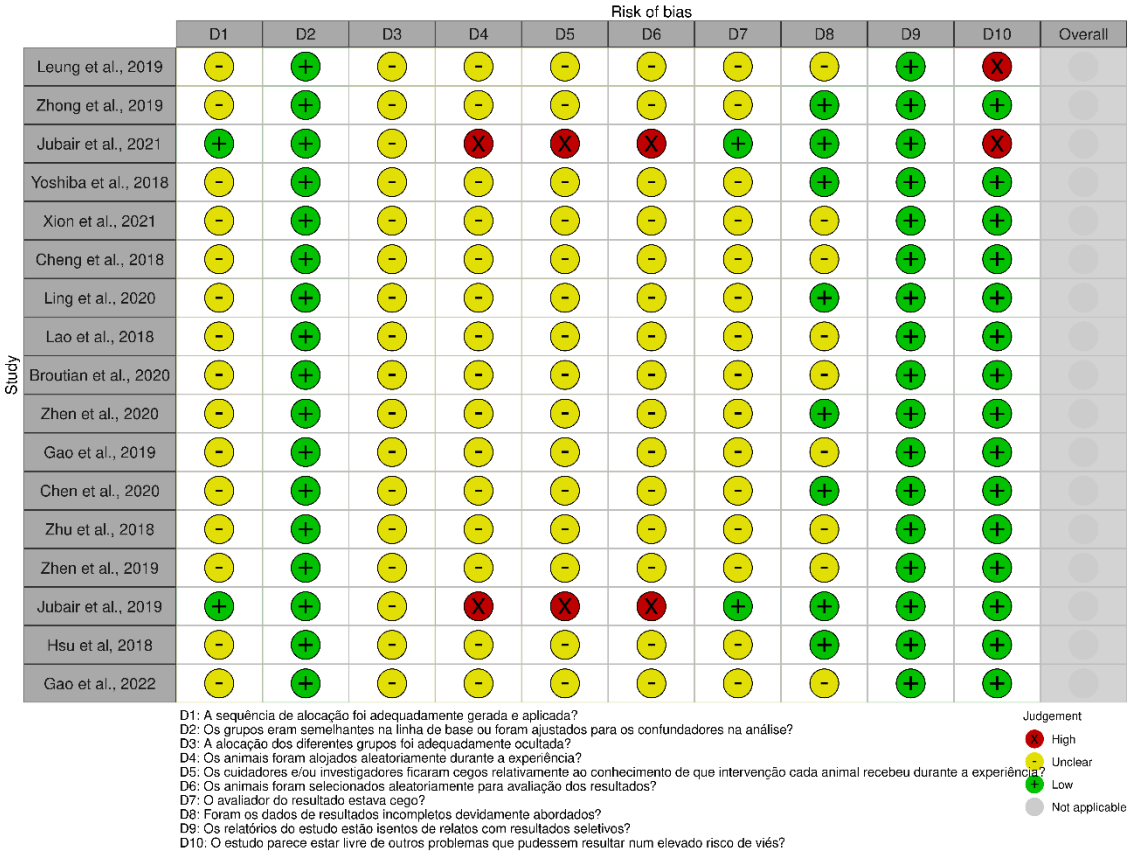

Figura 8. *Traffic Light Plot* do risco de viès dos estudos *in vivo*. D1-D10 disponíveis no Anexo 7. *Fonte: "Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments*", McGuinness & Higgins (2021).

Como se pode constatar na figura 8., praticamente todos os artigos incluídos, excetuando os estudos de Jubair *et al.* (2019) (2021) não respondem suficientemente às

perguntas 1., 4., 5., 6. e 7., uma vez que estes apenas mencionam a realização da alocação dos grupos sem, no entanto, especificar qual o método utilizado, se o alojamento dos animais durante o estudo foi aleatório, se existiu cegueira por parte dos investigadores/cuidadores durante a administração dos tratamentos, se os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação dos resultados e se quem avaliou os resultados estava cego, respetivamente. Todos os estudos não reportaram informação relativamente à ocultação da alocação, pelo que a resposta à pergunta 3 não foi consensual. Relativamente à pergunta 8., oito estudos não reportaram de forma clara a abordagem dos dados dos resultados incompletos, por outro lado os restantes estudos relataram ter incluído todos os participantes e tal ser demonstrado nos resultados obtidos. Todos os artigos mostraram baixo risco de viés à pergunta 2., pois todos os participantes demostravam características semelhantes, as quais também foram corretamente descritas em todos os estudos. Da mesma forma, todos os artigos incluídos tinham os seus protocolos disponibilizados e especificamente descritos juntamente com os resultados obtidos, pelo que mostraram baixo risco de viés em resposta à pergunta 9. Apenas o estudo de Leung *et al.* (2019) e de Jubair *et al.* (2021) evidenciaram alto risco de viés na décima pergunta pelo facto de o primeiro não apresentar grupo de controlo e o segundo realizar diferentes intervenções em partes do corpo de um mesmo participante e, por isso, poder existir enviesamento e risco de contaminação, respetivamente.

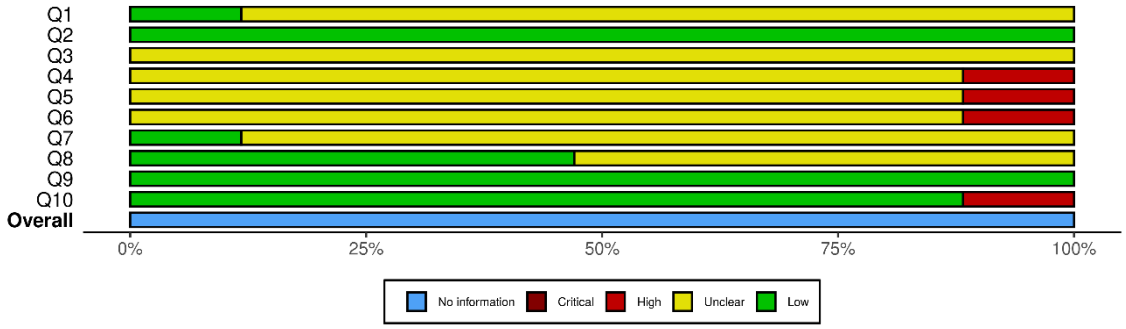

Figura 9. *Summary Plot* do risco de viès dos estudos *in vitro*. *Fonte: "Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments*", McGuinness & Higgins (2021).

A figura 9. mostra que 100% dos artigos possuem baixo risco de viés nas perguntas 2. e 9. Em contrapartida, às questões 1., 4., 5., 6. e 7. mais de 75% e à questão 3. 100% dos estudos não apresenta uma abordagem clara. Praticamente metade dos estudos responde de forma positiva à questão 8., demonstrando um baixo risco de viés. Finalmente, mais de 75% dos artigos apresenta baixo risco de viés na décima pergunta.

IV. DISCUSSÃO

Impacto do sistema CRISPR/Cas em células de carcinomas cervicais e em células de carcinomas da cabeça e pescoço HPV-positivos

A inativação dos genes E6 e/ou E7 de HPV16 e/ou HPV18 em diferentes linhas de células de carcinoma cervical, recorrendo ao sistema CRISPR/Cas, reduziu os níveis de expressão das proteínas E6 e/ou E7 (respetivamente) e mostrou um aumento da indução da apoptose e diminuição da viabilidade ou proliferação celulares (Chen et al., 2020; Cheng et al., 2018; Ehrke-Schulz et al., 2020; Gao et al., 2020; Gao et al., 2022; Inturi & Jemth, 2020; Jubair et al., 2019; Jubair et al., 2021; Lao et al., 2018; Ling et al., 2020; Noroozi et al., 2022; Xiong et al., 2021; Yoshiba et al., 2019; Zhen et al., 2020; Zhen et al., 2020; Zhu et al., 2018). Destes estudos, aqueles que ainda aplicaram esta ferramenta em animais (ratos imunossuprimidos) obtiveram todos o mesmo resultado, nomeadamente uma redução significativa do crescimento tumoral, que, por sua vez, se traduziu num menor volume e peso dos tumores. A congruência dos resultados evidencia um êxito consistente desta tecnologia, fortalecendo e motivando cada vez mais a sua aplicação em humanos para a prevenção/tratamento dos carcinomas cervicais causados por HPV.

Contudo, os estudos de Bortnik (2019) e Bortnik *et al.* (2020), os quais testaram esta tecnologia em linhas de células de carcinoma da cabeça e pescoço HPV-positivo, mostraram que a inativação somente de E7 com CRISPR/Cas9 não foi suficiente para provocar uma diminuição da viabilidade celular e um aumento da apoptose estatisticamente significativos. Nestes estudos a diminuição da viabilidade celular e o aumento significativo da apoptose só foram obtidos quando a supressão abrangeu ambos os oncogenes E6 e E7. Estudos que testaram a supressão dos oncogenes E6 e E7 em células de cancros de cabeça e pescoço HPV-positivos obtiveram resultados idênticos, como por exemplo, o estudo de Shaik *et al.* (2018), onde a supressão de E6 e E7 em células escamosas de carcinoma da cabeça e pescoço HPV-positivo, recorrendo a um siRNA, outra tecnologia de edição genética, induziu a apoptose celular. Estes resultados sugerem que, contrariamente aos carcinomas cervicais que obtêm efeitos na viabilidade e/ou proliferação e/ou apoptose celulares significativos com a supressão de E6 ou E7, os carcinomas de cabeça e pescoço HPV-positivos requerem a inativação dos dois oncogenes E6 e E7 em simultâneo. Isto poderá indiciar que a expressão das

proteínas E6 e E7 é maior nos carcinomas da cabeça e pescoço HPV-positivos do que nos carcinomas cervicais e, por isso, ser necessária a inativação dos dois oncogenes em vez de apenas um, para se obter efeitos significativos na viabilidade, proliferação e apoptose celulares.

Para que se possa comprovar a veracidade desta suposição será necessário o desenvolvimento de estudos que comparem a expressão dos oncogenes E6 e E7 entre os carcinomas da cabeça e pescoço e os carcinomas cervicais HPV-positivos.

Foram ainda revistos estudos que analisaram a possibilidade de a deleção de genes alternativos aos genes E6 e E7 poder interferir na expressão das proteínas E6 e E7 e, por isso também na carcinogénese do HPV. Os estudos de Broutian *et al.* (2020), Leung *et al.* (2019) Piroufzar *et al.* (2020) e de Zhong *et al.* (2019) demonstraram redução da proliferação celular e da viabilidade celular em células de cancro cervical (Leung et al., 2019; Piroufzar et al., 2020; Zhong et al., 2019) e em células escamosas de carcinoma da base da língua positivas para o HPV (Broutian et al., 2020) recorrendo à inativação de diferentes genes através de CRISPR/Cas. Piroufzar *et al.* (2020), verificaram a relação existente entre o gene que codifica MLL5 (*mixed lineage leucemia* 5) e a proteína E6 e Leung *et al.* (2019) identificaram CD71 como um possível marcador de superfície celular que está associado à expressão da proteína E6 de HPV16 e de HPV18. Já Broutian *et al.* (2020) e Zhong *et al.* (2019), apesar de terem obtido resultados semelhantes, não exploraram a relação da supressão destes genes com as proteínas E6 e E7.

Atualmente, têm sido realizadas novas investigações por forma a melhorar o desempenho e resolver alguns defeitos da tecnologia CRISPR/Cas. Os efeitos fora do gene-alvo bem como a entrega mais eficiente do sistema CRISPR/Cas nas células alvo têm sido temáticas fortemente abordadas e que têm levantado questões quanto à aplicação desta tecnologia em seres humanos (Jiang et al. 2019).

Tian *et al.* (2022), mostraram que a sua técnica pode contornar parte destes problemas, tornando o desempenho do sistema CRISPR/Cas mais eficiente e seguro e com uma probabilidade inferior de *off-targets*. Por outro lado, Jubair *et al.* (2019), apesar de terem desenvolvido uma Cas9 mais específica (FokI-dCas9), esta não se mostrou tão

eficiente quanto a variante normal. Uma solução poderia passar pelo aumento da concentração de FokI-dCas9 administrada, uma vez que a eficiência de Cas9 é dose-dependente (Ran et al., 2013; Saayman et al., 2015). Contudo é preciso ter em consideração os efeitos tóxicos induzidos pelo aumento da concentração e também o facto de o tratamento com FokI-dCas9 ser extremamente rigoroso e com requisitos obrigatórios, nomeadamente o emparelhamento simultâneo de dois ARNs guia numa orientação característica e uma distância específica a separar os dois sítios de ligação dos dois ARNs guia (Saifaldeen et al., 2020). Desta forma, novas investigações terão de ser realizadas no sentido de melhorar algumas limitações reveladas pelo CRISPR/Cas.

Apesar do potencial considerável do sistema CRISPR/Cas e dos avanços realizados no sentido da sua aplicação em humanos, existem ainda vários desafios cruciais, que devem ser contornados para garantir o sucesso clínico desta tecnologia no tratamento de cancros provocados pelo HPV *in vivo* (Lin et al., 2021).

De forma geral, o que mais preocupa a comunidade científica são os efeitos fora do gene-alvo que CRISPR/Cas pode desencadear acidentalmente. Contudo, as estratégias e métodos de veiculação, a capacidade de clivagem de Cas9, a resistência imune ao sistema CRISPR/Cas9, o escape viral e ainda questões éticas são outros desafios que devem ser igualmente considerados e contornados (Lin et al., 2021).

Limitações

A heterogeneidade dos estudos incluídos dificultou a interpretação dos dados bem como a comparação dos resultados de forma equitativa.

Tendo em conta o facto de maior parte dos estudos incluídos ser referente à aplicação do CRISPR/Cas no tratamento do cancro cervical, não é possível extrapolar de forma segura os resultados obtidos para o cancro da cabeça e pescoço, pois eventuais diferenças na origem das linhas celulares poderão levar a resultados também eles distintos. São necessários mais estudos em células de carcinoma da cabeça e pescoço para se obterem resultados mais consistentes.

Em conclusão, os resultados descritos ao longo desta revisão são promissores e sugerem que a tecnologia CRISPR/Cas pode vir a ser útil no tratamento e prevenção de carcinomas HPV-positivos, incluindo os de cabeça e pescoço. Contudo, ainda há um longo caminho a percorrer até que esta tecnologia possa ser usada de forma segura em humanos.

O desconhecimento dos mecanismos biológicos subjacentes às imensas interações genéticas reveladas pelo CRISPR/Cas bem como certas limitações encontradas no seu desempenho e segurança refletem a necessidade de elaboração de novos estudos.

Acredita-se que com a extensão das pesquisas, CRISPR/Cas possa adquirir uma aplicação mais abrangente em futuras áreas da medicina, incluído para além do tratamento clínico a investigação médica e o desenvolvimento de medicamentos genéticos. Todavia, para que tal se concretize, esta tecnologia deverá enfrentar rigorosos testes de eficácia, segurança e especificidade e ter, portanto, a sua segurança e eficácia confirmadas previamente à sua aplicação clínica.

V. CONCLUSÃO

A crescente prevalência de tumores HPV-positivos, incluindo os de cabeça e pescoço, em indivíduos mais jovens, enfatiza a necessidade de esforços contínuos no aprimoramento do tratamento de pacientes, por forma a manter uma qualidade de vida pós-tratamento elevada. Novos regimes terapêuticos que pretendam melhorar a morbidade e reduzir a mortalidade associados à modalidade de tratamento padrão atual (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) incluirão terapias de edição genética como o CRISPR/Cas.

Desde a sua elaboração, o CRISPR tem atraído a atenção de vários investigadores, assumindo-se que futuramente com a extensão das suas pesquisas o mesmo possa adquirir um desenvolvimento e aplicação mais amplos. Embora os estudos que incidem sobre os carcinomas HPV-positivos, sobretudo os da região da cabeça e pescoço sejam extremamente escassos, os resultados reunidos são claramente promissores, com efeitos significativos ao nível da proliferação e apoptose celulares *in vitro* e com uma redução do crescimento tumoral notória em modelos em ratos. Neste sentido, torna-se urgente a realização de estudos adicionais tanto em animais como em modelos primários previamente à transição para os ensaios clínicos, por forma a garantir a segurança e eficácia da aplicação clínica do CRISPR/Cas. Estes estudos deverão focar-se essencialmente na contínua otimização e melhoria deste sistema através do desenvolvimento e inovação de novos biomateriais e sistemas de entrega que proporcionem as características de uma tecnologia ideal. Assim, a combinação de melhorias técnicas juntamente com modelos *in vivo* e *ex vivo* mais sofisticados e, por último, de ensaios clínicos rigorosos determinará a especificidade, eficiência e segurança para direcionar/silenciar e potencialmente prevenir ou erradicar neoplasias em humanos desencadeadas por infeções virais através do CRISPR/Cas.

Em modo de conclusão, o sistema CRISPR acoplado à proteína Cas apresenta um grande potencial no tratamento de tumores desencadeados pelo HPV através da supressão estratégica de genes essenciais à sua carcinogénese. Espera-se que a terapia personalizada e direcionada baseada neste sistema seja o futuro da terapia tumoral. Não obstante, tal como supramencionado, mais evidência científica de maior qualidade é necessária para garantir a segurança e sucesso clínico do CRISPR.

VI. REFERÊNCIAS

Adams, A., Wise-Draper, T., & Wells, S. (2014). Human Papillomavirus Induced Transformation in Cervical and Head and Neck Cancers. *Cancers*, *6*(3), 1793–1820. https://doi.org/10.3390/cancers6031793

Aghamiri, S., Talaei, S., Roshanzamiri, S., Zandsalimi, F., Fazeli, E., Aliyu, M., Kheiry Avarvand, O., Ebrahimi, Z., Keshavarz-Fathi, M., & Ghanbarian, H. (2020). Delivery of genome editing tools: A promising strategy for HPV-related cervical malignancy therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *17*(6), 753–766. https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1747429

American Cancer Society. (2021). *Oral Cavity and Oropharyngeal Cancer Causes, Risk Factors, and Prevention*. https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8764.00.pdf

Anderson, G., Ebadi, M., Vo, K., Novak, J., Govindarajan, A., & Amini, A. (2021). An updated review on head and neck cancer treatment with radiation therapy. *Cancers*, *13*(4912). https://doi.org/10.3390/cancers13194912

Barbour, A., Glogauer, J., Grinfeld, L., Ostadsharif Memar, R., Fine, N., Tenenbaum, H., & Glogauer, M. (2021). The role of CRISPR-Cas in advancing precision periodontics. *Journal of Periodontal Research*, *56*(3), 454–461. https://doi.org/10.1111/jre.12846

Boras, V. V., Fučić, A., Baranović, S., Blivajs, I., Milenović, M., Bišof, V., Rakušić, Z., Ceppi, M., & Bruzzone, M. (2019). Environmental and behavioural head and neck cancer risk factors. *Central European Journal of Public Health*, *27*(2), 106–109. https://doi.org/10.21101/cejph.a5565

Bortnik, V. (2019). *CRISPR-Cas9 Targeting of E7 Oncogene in HPV-positive Head and Neck Squamous Cell Carcinomas* [Master's, Griffith University]. https://doi.org/10.25904/1912/2700

Bortnik, V., Wu, M., Julcher, B., Salinas, A., Nikolic, I., Simpson, K. J., McMillan, N. A., & Idris, A. (2021). Loss of HPV type 16 E7 restores cGAS-STING responses in human papilloma virus-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas cells. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *54*(4), 733–739. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.07.010

Brooks, G., Carroll, K. C., Butel, J., & Morse, S. (2012). *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 26/E.* McGraw-Hill Publishing.

Broutian, T. R., Jiang, B., Li, J., Akagi, K., Gui, S., Zhou, Z., Xiao, W., Symer, D. E., & Gillison, M. L. (2020). Human papillomavirus insertions identify the PIM family of serine/threonine kinases as targetable driver genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Letters*, *476*, 23–33. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.012

Bruni, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Collado, J., Gómez, D., Muñoz, J., Bosch, X., de Sanjosé, S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). (2021). Human Papillomavirus and Related Diseases in Europe. *Summary Report*. https://hpvcentre.net/statistics/reports/XEX.pdf?t=1588516266397

Carlander, A. F., Jakobsen, K. K., Bendtsen, S. K., Garset-Zamani, M., Lynggaard, C. D., Jensen, J. S., Grønhøj, C., & von Buchwald, C. (2021). A contemporary systematic review on repartition of HPV-positivity in oropharyngeal cancer worldwide. *Viruses*, *13*(7). https://doi.org/10.3390/v13071326

Chabeda, A., Yanez, R. J. R., Lamprecht, R., Meyers, A. E., Rybicki, E. P., & Hitzeroth, I. I. (2018). Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Research*, *5*, 46–58. https://doi.org/10.1016/j.pvr.2017.12.006

Chen, M., Mao, A., Xu, M., Weng, Q., Mao, J., & Ji, J. (2019). CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer Letters*, *447*, 48–55. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017

Chen, Y., Jiang, H., Wang, T., He, D., Tian, R., Cui, Z., Tian, X., Gao, Q., Ma, X., Yang, J., Wu, J., Tan, S., Xu, H., Tang, X., Wang, Y., Yu, Z., Han, H., Das, B. C., Severinov, K., … You, Z. (2020). In vitro and in vivo growth inhibition of human cervical cancer cells via human papillomavirus E6/E7 mARNs' cleavage by CRISPR/Cas13a system. *Antiviral Research*, *178*. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104794

Cheng, X., Chen, T., Yang, X., Wang, Q., & Hong, L. (2018). Effects of HPV Pseudotype Virus in Cutting E6 Gene Selectively in SiHa Cells. *Current Medical Science*, *38*(2), 212–221. https://doi.org/10.1007/s11596-018-1868-3

Chow, L. Q. M. (2020). Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, *382*(1), 60–72. https://doi.org/10.1056/NEJMra1715715

Cramond, F., Irvine, C., Liao, J., Howells, D., Sena, E., Currie, G., & Macleod, M. (2016). Protocol for a retrospective, controlled cohort study of the impact of a change in Nature Journals' editorial policy for life sciences research on the completeness of reporting study design and execution. *Scientometrics, 108*(1), 315–328. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/s11192-016-1964-8

Cui, Z., Liu, H., Zhang, H., Huang, Z., Tian, R., Li, L., Fan, W., Chen, Y., Chen, L., Zhang, S., Das, B. C., Severinov, K., Hitzeroth, I. I., Debata, P. R., Jin, Z., Liu, J., Huang, Z., Xie, W., Xie, H., … Hu, Z. (2021). The comparison of ZFNs, TALENs, and SpCas9 by GUIDE-seq in HPV-targeted gene therapy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *26*, 1466–1478. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.08.008

de Buhr, H., & Lebbink, R. J. (2018). Harnessing CRISPR to combat human viral infections. *Current Opinion in Immunology*, *54*, 123–129. https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.06.002

Ehrke-Schulz, E., Heinemann, S., Schulte, L., Schiwon, M., & Ehrhardt, A. (2020). Adenoviral vectors armed with papillomavirus oncogene specific CRISPR/CAS9 kill human-papillomavirus-induced cervical cancer cells. *Cancers*, *12*(7), 1–18. https://doi.org/10.3390/cancers12071934

Fitzpatrick, M. B., Hahn, Z., Mandishora, R. S. D., Dao, J., Weber, J., Huang, C. H., Sahoo, M. K., Katzenstein, D. A., & Pinsky, B. A. (2020). Whole-Genome Analysis of Cervical Human Papillomavirus Type 35 from rural Zimbabwean Women. *Scientific Reports*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-63882-z

Gao, C., Wu, P., Yu, L., Liu, L., Liu, H., Tan, X., Wang, L., Huang, X., & Wang, H. (2022). The application of CRISPR/Cas9 system in cervical carcinogenesis. *Cancer Gene Therapy*, *29*(5), 466–474. https://doi.org/10.1038/s41417-021-00366-w

Gao, X., Jin, Z., Tan, X., Zhang, C., Zou, C., Zhang, W., Ding, J., Das, B. C., Severinov, K., Hitzeroth, I. I., Debata, P. R., He, D., Ma, X., Tian, X., Gao, Q., Wu, J., Tian, R., Cui, Z., Fan, W., … Hu, Z. (2020). Hyperbranched poly(β-amino ester) based polyplex nanopaticles for delivery of CRISPR/Cas9 system and treatment of HPV infection associated cervical cancer. *Journal of Controlled Release*, *321*, 654–668. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.045

Garutti, P., Montori, S., Bazzan, Ee., & Tarabbia, C. (2018). Gender differences in the epidemiology and prevention of human papillomavirus (HPV) and HPV-related diseases. *Ital J Gender-Specific Med*, *4*(4), 152–161.

Gong, T., Tang, B., Zhou, X., Zeng, J., Lu, M., Guo, X., Peng, X., Lei, L., Gong, B., & Li, Y. (2018). Genome editing in Streptococcus mutans through self-targeting CRISPR arrays. *Molecular Oral Microbiology*, *33*(6), 440–449. https://doi.org/10.1111/omi.12247

Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wünsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Kelsey, K., Koifman, S., la Vecchia, C.,

Lazarus, P., … Boffetta, P. (2009). Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *18*(2), 541–550. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0347

Hashim, D., Genden, E., Posner, M., Hashibe, M., & Boffetta, P. (2019). Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Annals of Oncology*, *30*(5), 744–756. https://doi.org/10.1093/annonc/mdz084

Hongbao, M., & Young, M. (2017). CRISPR/Cas9. *Researcher*, *9*(8), 71–80. http://www.sciencepub.net/researcher/research090817/11_m113rsj090817_71_80.pdf

Hooijmans, C. R., Rovers, M. M., de Vries, R. B. M., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., & Langendam, M. W. (2014). SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Medical Research Methodology*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43

Hsu, D. S., Kornepati, A. V. R., Glover, W., Kennedy, E. M., & Cullen, B. R. (2018). Targeting HPV16 ADN using CRISPR/Cas inhibits anal cancer growth in vivo. *Future Virology*, *13*(7), 475–482. https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0010

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012). Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, *100*(Pt B), 1–441. https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100B.pdf

Instituto Nacional de Estatística. (2020). *Inquérito Nacional de Saúde - 2019*. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=414434213&DESTAQUESmodo=2

Inturi, R., & Jemth, P. (2021). CRISPR/Cas9-based inactivation of human papillomavirus oncogenes E6 and E7 induces senescence in cervical cancer cells. *Virology*, *562*, 92–102. https://doi.org/10.1101/2020.04.16.044446

Jangam, D. K., & Talreja, K. M. (2020). APPLICATIONS OF CRISPR TECHNOLOGY IN DENTISTRY: A REVIEW. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, *7*(6), 314–320. www.ejbps.com

Jiang, C., Meng, L., Yang, B., & Luo, X. (2019). Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment. *Clinical Genetics*, *97*(1), 73–88. https://doi.org/10.1111/cge.13589

Johnson, D. E., Burtness, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. In *Nature Reviews Disease Primers*, *6*(1). Nature Research. https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3

Jubair, L., Fallaha, S., & McMillan, N. A. J. (2019). Systemic Delivery of CRISPR/Cas9 Targeting HPV Oncogenes Is Effective at Eliminating Established Tumors. *Molecular Therapy*, *27*(12), 2091–2099. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.08.012

Jubair, L., Lam, A. K., Fallaha, S., & McMillan, N. A. J. (2021). CRISPR/Cas9-loaded stealth liposomes effectively cleared established HPV16-driven tumours in syngeneic mice. *PLoS ONE*, *16*(1). https://doi.org/10.1371/Journal.pone.0223288

Jubair, L., & McMillan, N. A. J. (2017). The Therapeutic Potential of CRISPR/Cas9 Systems in Oncogene-Addicted Cancer Types: Virally Driven Cancers as a Model System. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *8*, 56–63. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.006

Lao, Y. H., Li, M., Gao, M. A., Shao, D., Chi, C. W., Huang, D., Chakraborty, S., Ho, T. C., Jiang, W., Wang, H. X., Wang, S., & Leong, K. W. (2018). HPV Oncogene Manipulation Using Nonvirally Delivered CRISPR/Cas9 or Natronobacterium gregoryi Argonaute. *Advanced Science*, *5*(7). https://doi.org/10.1002/advs.201700540

Lau, L., Gray, E. E., Brunette, R. L., & Stetson, D. B. (2015). ADN tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING ADN-sensing pathway. *Science*, *350*(6260), 568–571. https://doi.org/10.1126/science.aab3291

Lechner, M., Liu, J., Masterson, L., & Fenton, T. R. (2022). HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *19*(5), 306–327. https://doi.org/10.1038/s41571-022-00603-7

Leung, T. H. Y., Tang, H. W. M., Siu, M. K. Y., Chan, D. W., Chan, K. K. L., Cheung, A. N. Y., & Ngan, H. Y. S. (2019). CD71+ population enriched by HPV-E6 protein promotes cancer aggressiveness and radioresistance in cervical cancer cells. *Molecular Cancer Research*, *17*(9), 1867–1880. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0068

Li, C., Guo, L., Liu, G., Guo, M., Wei, H., Yang, Q., Wang, J., & Chen, H. (2020). Reprogrammed CRISPR-Cas13a targeting the HPV16/18 E6 gene inhibits proliferation and induces apoptosis in E6-transformed keratinocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *19*, 3856-3860. https://doi.org/10.3892/etm.2020.8631

Lin, H., Li, G., Peng, X., Deng, A., Ye, L., Shi, L., Wang, T., & He, J. (2021). The Use of CRISPR/Cas9 as a Tool to Study Human Infectious Viruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.590989

Ling, K., Yang, L., Yang, N., Chen, M., Wang, Y., Liang, S., Li, Y., Jiang, L., Yan, P., & Liang, Z. (2020). Gene Targeting of HPV18 E6 and E7 Synchronously by Nonviral

Transfection of CRISPR/Cas9 System in Cervical Cancer. *Human Gene Therapy*, *31*(5–6), 297–308. https://doi.org/10.1089/hum.2019.246

Luo, X., Donnelly, C. R., Gong, W., Heath, B. R., Hao, Y., Donnelly, L. A., Moghbeli, T., Tan, Y. S., Lin, X., Bellile, E., Kansy, B. A., Carey, T. E., Brenner, J. C., Cheng, L., Polverini, P. J., Morgan, M. A., Wen, H., Prince, M. E., Ferris, R. L., & Xie, Y. (2020). HPV16 drives cancer immune escape via NLRX1-mediated degradation of STING. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(4), 1635–1652. https://doi.org/10.1172/JCI129497

Mahase, E. (2022). Hepatitis in children: What's behind the outbreaks? *BMJ*, o1067. https://doi.org/10.1136/bmj.o1067

Mariz, B. A. L. A., Kowalski, L. P., William, W. N., de Castro, G., Chaves, A. L. F., Santos, M., de Oliveira, T. B., Araújo, A. L. D., Normando, A. G. C., Ribeiro, A. C. P., Brandão, T. B., Vargas, P. A., Lopes, M. A., Santos-Silva, A. R., & Latin American Cooperative Oncology Group - Brazilian Group of Head and Neck Cancer. (2020). Global prevalence of human papillomavirus-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma following the ASCO guidelines: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *156*, 103116. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103116

McGuinness, L. A., & Higgins, J. P. T. (2021). Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments. *Research Synthesis Methods*, *12*(1), 55–61. https://doi.org/10.1002/jrsm.1411

Nobre, P., Rosa, P. J., Vasconcelos, P., Tavares, I., Carvalho, J., Quinta-Gomes, A., Moura, C., & Carrito, M. (2022). Sexual Health and the Pandemic Crisis: Testing the Role of Psychological Vulnerability/Protective Factors on Sexual Functioning and Sexual Distress During a Critical Life Period in Portugal. *Archives of Sexual Behavior*, *51*(1), 169–181. https://doi.org/10.1007/s10508-021-02209-z

Noroozi, Z., Shamsara, M., Valipour, E., Esfandyari, S., Ehghaghi, A., Monfaredan, A., Azizi, Z., Motevaseli, E., & Modarressi, M. H. (2022). Antiproliferative effects of AAV-delivered CRISPR/Cas9-based degradation of the HPV18-E6 gene in HeLa cells. *Scientific Reports*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-022-06025-w

Ouzzani, M., Hammady, H., Fedorowicz, Z., & Elmagarmid, A. (2016). Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Reviews*, *5*(1). https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4

Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ, 372*(71). doi:10.1136/bmj.n71

Pirouzfar, M., Amiri, F., Dianatpour, M., & Takhshid, M. A. (2020). CRISPR/Cas9-mediated knockout of mll5 enhances apoptotic effect of cisplatin in hela cells In vitro. *EXCLI Journal*, *19*, 170–182. https://doi.org/10.17179/excli2019-1957

Primo, W., & Primo, G. (2019). HPV. *FEMINA*, *47*(12), 850–866. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/01/1048453/femina-2019-4712-850-866.pdf

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.*, *8*, 2281–2308. https://www.nature.com/articles/nprot.2013.143

Regezi, J., Sciubba, J., & Jordan, R. (2008). *Patologia Oral* (Elsevier Editora, Ed.; 5ª).

Reis, M., Ramiro, L., Gaspar De Matos, M., & Diniz, J. A. (2012). Os comportamentos sexuais dos universitários portugueses de ambos os sexos em 2010. *Revista Portuguesa de Saude Publica*, *30*(2), 105–114. https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2012.12.001

Saayman, S., Ali, S. A., Morris, K. V., & Weinberg, M. S. (2015). The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opin. Biol. Ther. 15*, 819–830. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25865334/

Saifaldeen, M., Al-Ansari, D. E., Ramotar, D., & Aouida, M. (2020). CRISPR FokI Dead Cas9 System: Principles and Applications in Genome Engineering. Cells, 9(11), 2518. https://doi.org/10.3390/cells9112518

Shaikh, M. H., Clarke, D. T. W., Johnson, N. W., & McMillan, N. A. J. (2017). Can gene editing and silencing technologies play a role in the treatment of head and neck cancer? *Oral Oncology*, *68*, 9–19. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.02.016

Shaikh, M. H., Idris, A., Johnson, N. W., Fallaha, S., Clarke, D. T. W., Martin, D., Morgan, I. M., Gabrielli, B., & McMillan, N. A. J. (2018). Aurora kinases are a novel therapeutic target for HPV-positive head and neck cancers. *Oral Oncology*, *86*, 105–112. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.09.006

Sociedade Portuguesa de Ginecologia. (2017). *Consenso Nacional sobre vacinas contra HPV* (Ad Médic). https://spginecologia.pt/wp-content/uploads/2021/07/spg-consenso-nacional-sobre-vacinas-contra-hpv-2017.pdf

Son, E., Panwar, A., Mosher, C. H., & Lydiatt, D. (2018). Cancers of the Major Salivary Gland. *J Oncol Pract, 14*(2):99-108. https://doi.org/10.1200/JOP

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Tian, R., Liu, J., Fan, W., Li, R., Cui, Z., Jin, Z., Huang, Z., Xie, H., Li, L., Huang, Z., Hu, Z., Zhou, P., & Tian, X. (2022). Gene knock-out chain reaction enables high disruption efficiency of HPV18 E6/E7 genes in cervical cancer cells. *Molecular Therapy - Oncolytics*, *24*, 171–179. https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.12.011

Valavanidis, A. (2020). Nobel Prize in Chemistry 2020. Discovery of CRISPR-Cas9 Genetic Scissors. A revolutionary genome editing technology that can cut any ADN molecule at a predetermined site. *Scientific Reviews*, *1*, 1–33. https://www.researchgate.net/publication/345672399_Nobel_Prize_in_Chemistry_2020_Discovery_of_CRISPR-Cas9_Genetic_Scissors_A_revolutionary_genome_editing_technology_that_can_cut_any_DNA_molecule_at_a_predetermined_site

Valente de Sousa, P., Rodrigues, J., Rodrigues, A., Carvalho, L., Monteiro, E., & Santos, L. (2021). O Perfil HPV dos Doentes Portadores de Tumores da Orofaringe numa Instituição Oncológica em Portugal entre 2018 e 2019 – Estudo Retrospetivo Descritivo. *Revista Portuguesa de Cirurgia*, *50*, 23–31. https://revista.spcir.com/index.php/spcir/article/view/853

van Harten, A. M., Poell, J. B., Buijze, M., Brink, A., Wells, S. I., René Leemans, C., Wolthuis, R. M. F., & Brakenhoff, R. H. (2019). Characterization of a head and neck cancer-derived cell line panel confirms the distinct TP53-proficient copy number-silent subclass. *Oral Oncology*, *98*, 53–61. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.09.004

World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). *GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020.* https://gco.iarc.fr/today/home

Wu, J., Xiao, F., Zheng, Y., Lin, Y., & Wang, H. L. (2021). Worldwide trend in human papillomavirus–attributable cancer incidence rates between 1990 and 2012 and Bayesian projection to 2030. *Cancer*, *127*(17), 3172–3182. https://doi.org/10.1002/cncr.33628

Xiong, J., Tan, S., Yu, L., Shen, H., Qu, S., Zhang, C., Ren, C., Zhu, D., & Wang, H. (2021). E7-targeted nanotherapeutics for key hpv afflicted cervical lesions by employing crispr/

cas9 and poly (Beta-amino ester). *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 7609–7622. https://doi.org/10.2147/IJN.S335277

Yoshiba, T., Saga, Y., Urabe, M., Uchibori, R., Matsubara, S., Fujiwara, H., & Mizukami, H. (2019). CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6. *Oncology Letters*, *17*(2), 2197–2206. https://doi.org/10.3892/ol.2018.9815

Zhang, Y., & Li, M. (2021). Genome Editing Technologies as Cellular Defense Against Viral Pathogens. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 716344. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.716344

Zhen, S., Liu, Y., Lu, J., Tuo, X., Yang, X., Chen, H., Chen, W., & Li, X. (2020). Human Papillomavirus Oncogene Manipulation Using Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats/Cas9 Delivered by pH-Sensitive Cationic Liposomes. *Human Gene Therapy*, *31*(5–6), 309–324. https://doi.org/10.1089/hum.2019.312

Zhen, S., Lu, J., Liu, Y. H., Chen, W., & Li, X. (2020). Synergistic antitumor effect on cervical cancer by rational combination of PD1 blockade and CRISPR-Cas9-mediated HPV knockout. *Cancer Gene Therapy*, *27*(3–4), 168–178. https://doi.org/10.1038/s41417-019-0131-9

Zhong, S., Zhang, Y., Yin, X., & Di, W. (2019). CDK7 inhibitor suppresses tumor progression through blocking the cell cycle at the G2/M phase and inhibiting transcriptional activity in cervical cancer. *OncoTargets and Therapy*, *12*, 2137–2147. https://doi.org/10.2147/OTT.S195655

Zhu, D., Shen, H., Tan, S., Hu, Z., Wang, L., Yu, L., Tian, X., Ding, W., Ren, C., Gao, C., Cheng, J., Deng, M., Liu, R., Hu, J., Xi, L., Wu, P., Zhang, Z., Ma, D., & Wang, H. (2018). Nanoparticles Based on Poly (β-Amino Ester) and HPV16-Targeting CRISPR/shARN as Potential Drugs for HPV16-Related Cervical Malignancy. *Molecular Therapy*, *26*(10), 2443–2455. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.019

ANEXOS

Anexo 1. *PRISMA checklist*

Secção/Tópico	Item	Verificação do item	Local onde o item está reportado
TÍTULO			
Título	1	Identifica a publicação como uma revisão sistemática	1
RESUMO			
Resumo	2	Ver a lista de verificação PRISMA 2020 para Resumos	
INTRODUÇÃO			
Fundamentação	3	Fundamenta a revisão no contexto do conhecimento existente	15-34
Objetivos	4	Apresenta explicitamente o(s) objetivo(s) ou questão(ões) respeitantes à revisão	34
MÉTODOS			
Critérios de elegibilidade	5	Especifica os critérios de inclusão e exclusão para a revisão e forma como os estudos foram agrupados para as sínteses.	35-36
Fontes de informação	6	Especifica todas as bases de dados, registos, websites, organizações, listas de referências e outras fontes pesquisadas ou consultadas para identificação dos estudos. Especifica a última data em que cada fonte foi pesquisada ou consultada.	35
Estratégia de pesquisa	7	Apresenta as estratégias de pesquisa completas para todas as bases de dados, registos e websites, incluindo todos os filtros e limites utilizados.	35
Processo de seleção de dados	8	Especifica os métodos utilizados para decidir se um estudo satisfaz os critérios de inclusão da revisão, incluindo quantos revisores fizeram a triagem de cada registo e publicação selecionada, se trabalharam de uma forma independente e, se aplicável, os detalhes de ferramentas de automatização utilizadas no processo.	36
Processo de recolha de dados	9	Especifica os métodos utilizados para recolha de dados das publicações, incluindo quantos revisores recolheram a informação de cada publicação, se trabalharam de uma forma independente, todos os processos de obtenção ou confirmação de dados por parte dos investigadores do estudo e, se aplicável, detalhes de ferramentas de automatização utilizadas.	36-37
Dados dos itens	10a	Lista e define todos os resultados para os quais os dados foram pesquisados. Especifica se foram pesquisados todos os resultados compatíveis com cada domínio em cada estudo (p ex. para todas as medidas, momentos, análises) e, se não, especifica os métodos utilizados para decidir quais resultados a recolher.	37
	10b	Lista e define todas as outras variáveis para as quais os dados foram pesquisados (p. ex. características dos participantes e intervenções, fontes de financiamento). Descreve os pressupostos utilizados sobre informação em falta ou pouco clara.	37

Secção/Tópico	Item	Verificação do item	Local onde o item está reportado
Avaliação do risco de viés nos estudos	11	Especifica os métodos utilizados para avaliar o risco de viés dos estudos incluídos, incluindo detalhes sobre o(s) instrumento(s) utilizado(s), quantos revisores avaliaram cada estudo e se trabalharam de forma independente e ainda, se aplicável, detalhes de ferramentas de automatização utilizadas no processo	37
Medidas de efeito	12	Especifica para cada resultado a(s) medida(s) de efeito (p. ex. risco relativo e diferença de média) utilizada(s) na síntese ou apresentação dos resultados	N/A
Método de síntese	13a	Descreve os processos utilizados para decidir os estudos elegíveis para cada síntese (p. ex. apresentar as características da intervenção apresentada no estudo e comparar com os grupos planeados para cada síntese (item #5)).	N/A
	13b	Descreve todos os métodos necessários de preparação de dados para apresentação ou síntese, tais como lidar com os dados em falta no resumo da estatística, ou conversões de dados.	N/A
	13c	Descreve todos os métodos utilizados para apresentar ou exibir os resultados individuais de estudos e sínteses.	37
	13d	Descreve todos os métodos utilizados para resumir os resultados e fornece uma justificação para a(s) escolha(s). Se foi realizada uma meta-análise, Descreve o(s) modelo(s) e método(s) para identificar a presença e extensão da heterogeneidade estatística, e de software utilizado(s)	37
	13e	Descreve todos os métodos utilizados para explorar possíveis causas de heterogeneidade entre os resultados do estudo (p. ex. análise de subgrupos, meta-regressão).	N/A
	13f	Descreve todas as análises de sensibilidade realizadas para avaliar a robustez a síntese dos resultados.	N/A
Avaliação do viés reportado	14	Descreve todos os métodos utilizados para avaliar o risco de viés devido à falta de resultados numa síntese (decorrente de viés de informação)	N/A
Avaliação do grau de confiança	15	Descreve todos os métodos utilizados para avaliar a certeza (ou confiança) no corpo de evidência de um resultado.	N/A
RESULTADOS			
Seleção dos estudos	16a	Descreve os resultados do processo de pesquisa e seleção, desde o número de registos identificados na pesquisa até ao número de estudos incluídos na revisão, idealmente utilizando um fluxograma	39-40
	16b	Cita estudos que parecem satisfazer os critérios de inclusão, mas que foram excluídos, e explica as razões da exclusão	N/A
Características dos estudos	17	Cita cada estudo incluído e apresenta as suas características.	46-59
Risco de viés nos estudos	18	Apresenta a avaliação de risco de viés para cada estudo incluído.	60-64

Secção/Tópico	Item	Verificação do item	Local onde o item está reportado
Resultados individuais dos estudos	19	Para todos os resultados de cada estudo, apresenta: (a) resumo da estatística para cada grupo (quando apropriado) e (b) uma estimativa do efeito e a sua precisão (p. ex. intervalo de confiança/credibilidade), utilizando idealmente tabelas ou gráficos estruturados.	46-59
Resultados das sínteses	20a	Para cada síntese, resume as características e risco de viés entre os estudos selecionados.	N/A
	20b	Apresenta os resultados de todas as sínteses estatísticas realizadas. Se foi feita uma meta-análise, apresenta para cada resultado o resumo da estimativa e a sua precisão (p. ex. intervalo de confiança/credibilidade) e medidas de heterogeneidade estatística. Se forem comparados grupos, descreve a direção do efeito.	N/A
	20c	Apresenta os resultados de todas as investigações de possíveis causas de heterogeneidade entre os resultados do estudo.	N/A
	20d	Apresenta resultados de todas as análises de sensibilidade realizadas para avaliar a robustez dos resultados sintetizados	N/A
Vieses reportados	21	Apresenta a avaliação do risco de viés devido à falta de resultados (resultantes de viés de informação) para cada síntese avaliada.	N/A
Nível de significância	22	Apresenta a avaliação de certeza (ou confiança) no corpo de evidência para cada resultado avaliado.	N/A
DISCUSSÃO			
Discussão	23a	Fornece uma interpretação geral dos resultados no contexto de outra evidência	65-67
	23b	Discute todas as limitações da evidência, incluídas na revisão.	67
	23c	Discute todas as limitações dos processos de revisão utilizados.	68
	23d	Discute as implicações dos resultados para a prática, política e investigação futura.	68
OUTRAS INFORMAÇÕES			
Registo do Protocolo	24a	Fornece informação sobre o registo da revisão, incluindo o nome e número de registo, ou refere que a revisão não está registada.	N/A
	24b	Indica local de acesso ao protocolo da revisão, ou refere que o protocolo não foi preparado	N/A
	24c	Descreve e explica todas as alterações à informação fornecida no registo ou no protocolo	N/A
Apoios	25	Descreve as fontes de financiamento ou apoio sem financiamento que suportam a revisão, e o papel dos financiadores ou patrocinadores da revisão	N/A
Conflito de interesses	26	Declara todos os conflitos de interesses dos autores da revisão.	38
Disponibilidade dos dados,	27	Reporta quais dos seguintes materiais estão acessíveis publicamente e onde podem ser encontrados: modelo	71-79

Secção/Tópico	Item	Verificação do item	Local onde o item está reportado
códigos e outros materiais		de formulários de recolha de dados extraídos dos estudos incluídos, dados utilizados para análise; código analítico, qualquer outro material utilizado na revisão.	

Adaptado de *"The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews"*, Page et al." (2021)

Anexo 2. *PRISMA abstracts checklist*

Secção/Tópico	Item	Verificação do item	Reportado (Sim/Não)
TÍTULO			
Título	1	Identifica a publicação como uma revisão sistemática	Sim
BACKGROUND			
Objetivos	2	Apresenta explicitamente o(s) objetivo(s) ou questão(ões) respeitantes à revisão	Sim
MÉTODOS			
Critérios de elegibilidade	3	Especifica os critérios de inclusão e exclusão para a revisão.	Sim
Fontes de informação	4	Especifica as fontes de informação (ex.: bases de dados, registos) consultadas para identificação dos estudos e a data em que cada um foi consultado pela última vez.	Sim
Risco de viés	5	Especifica os métodos utilizados para avaliar o risco de viés dos estudos incluídos.	Sim
Sínteses de resultados	6	Especifica os métodos utilizados para apresentar e sintetizar resultados.	Sim
RESULTADOS			
Estudos incluídos	7	Apresenta o número total de estudos incluídos e participantes e resume as características relevantes do estudo.	Sim
Sínteses de resultados	8	Apresenta os principais Resultados, preferivelmente indicando o número de estudos incluídos e participantes para cada. Se foi feita uma meta-análise, é reportado o resumo da estimativa e o intervalo de confiança/credibilidade. Se forem comparados grupos, descreve a direção do efeito (ex.: que grupo foi favorecido)	Sim
DISCUSSÃO			
Limitações de evidência	9	Fornece um breve sumário das limitações da evidência incluída na revisão (ex.: risco de viés do estudo, inconsistência e imprecisão).	Sim
Interpretação	10	Fornece uma interpretação geral dos Resultados e implicações importantes.	Sim
OUTROS			
Apoios	11	Especifica a fonte primária de financiamento para a realização da revisão.	Não
Registo	12	Fornece informação sobre o registo da revisão, incluindo o nome e número de registo	Não

Adaptado de *"The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews"*, Page et al. (2021)

Anexo 3. Ferramenta SYRCLE's para avaliação do risco de viés em estudos em animais

P1 A sequência de alocação foi adequadamente gerada e aplicada?
P2 Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para os confundadores na análise?
P3 A alocação dos diferentes grupos foi adequadamente ocultada?
P4 Os animais foram alojados aleatoriamente durante a experiência?
P5 Os cuidadores e/ou investigadores ficaram cegos relativamente ao conhecimento de que intervenção cada animal recebeu durante a experiência?
P6 Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação dos resultados?
P7 O avaliador do resultado estava cego?
P8 Foram os dados de resultados incompletos devidamente abordados?
P9 Os relatórios do estudo estão isentos de relatos com resultados seletivos?
P10 O estudo parece estar livre de outros problemas que pudessem resultar num elevado risco de viés?

Adaptado de *"SYRCLE's risk of bias tool for animal studies",* Hooijmans et al. (2014)

Anexo 4. Critérios de avaliação do risco de viés em estudos em animais

Risco	Baixo	Incerto	Alto
Perguntas	+	-	x
P1	Foi realizada alocação e processo encontra-se descrito (ex.: tabela de números aleatórios, gerador de números aleatórios em computador)	Foi realizada alocação, mas o processo que a gerou não se encontra descrito	Não foi realizada alocação
P2	Existe homogeneidade entre os animais e caso não exista a distribuição de características relevantes foi equilibrada	—	Existe homogeneidade entre os animais e caso não exista a distribuição de características relevantes foi equilibrada
P3	A alocação foi ocultada	Não menciona se a alocação foi ou não ocultada	A alocação não foi ocultada
P4	Os animais/gaiolas foram colocados aleatoriamente dentro da sala/instalação	Não menciona se os animais/gaiolas foram colocados aleatoriamente dentro da sala/instalação	Os animais/gaiolas não foram colocados aleatoriamente dentro da sala/instalação
P5	A cegueira foi adequada	Não menciona se houve cegueira	A cegueira não foi adequada
P6	Os animais foram selecionados aleatoriamente para a avaliação dos resultados	Não menciona se os animais foram selecionados aleatoriamente	Os animais não foram selecionados aleatoriamente para a avaliação dos resultados
P7	Houve cegueira durante a avaliação dos resultados ou o avaliador não foi cego, mas os autores da revisão julgam que o resultado não será influenciado pela falta de cegueira	Não menciona se houve ou não cegueira durante a avaliação dos resultados	Não houve cegueira durante a avaliação dos resultados e os autores da revisão julgam que o resultado possa ter sido influenciado pela falta de cegueira
P8	Todos os animais foram incluídos, se não incluídos na totalidade os dados incompletos foram tratados recorrendo a métodos adequados	Não menciona se todos os animais foram ou não incluídos	os dados incompletos não foram tratados recorrendo a métodos adequados
P9	O protocolo de estudo estava disponível ou o manuscrito incluía todos os resultados esperados	—	O protocolo de estudo não estava disponível nem incluía todos os resultados esperados
P10	Não houve risco de contaminação (ex.: intervenções em diferentes partes do corpo dentro de um participante)	—	Houve risco de contaminação (ex.: intervenções em diferentes partes do corpo dentro de um participante)

Anexo 5. Ferramenta para avaliação do risco de viés *in vitro (version 2)*

Seleção de Amostras e Configuração Experimental	**P1** Os autores relatam uma descrição da coleta de amostras permitindo ao leitor entender se as amostras representam réplicas técnicas ou biológicas?
	P2 A unidade experimental está claramente indicada?
	P3 Os autores relatam uma declaração de quantas vezes o experimento mostrado foi replicado em laboratório?
	P4 O sexo das células está suficientemente informado?
Reagentes e células	**P5** A fonte das linhas celulares é fornecida?
	P6 Os autores relatam se as linhas usadas foram autenticadas recentemente?
	P7 Os autores relatam se as linhas usadas foram testadas para contaminação por micoplasma recentemente (dentro de 6 meses de uso)?
	P8 Os autores relatam uma descrição que permita a leitura para entender se as células são culturas celulares primárias ou linha celular contínua?
	P9 O número de passagens e/ou os números de duplicação da população são relatados adequadamente?
	P10 Todos os anticorpos usados neste manuscrito foram perfilados para uso no sistema em estudo, por citação, número de catálogo, número de clone ou perfil de validação?
Tamanho da amostra	**P11** O manuscrito descreve como o tamanho da amostra foi escolhido para garantir poder adequado para detetar um tamanho de efeito pré-especificado?
	- **P12** Se sim, o cálculo do tamanho da amostra foi apropriado?
Alocação em grupos	**P13** Os métodos de alocação de amostras para grupos experimentais foram apropriados?
Ocultação da alocação	**P14** Os investigadores estavam cegos para a alocação do grupo durante o experimento?
Avaliação cega do resultado	**P15** Os investigadores estavam cegos para a alocação do grupo ao avaliar o(s) resultado(s)?
Atrito	**P16** O manuscrito descreve se as amostras foram excluídas da análise?
	- **P17** Se sim, os critérios de exclusão foram pré-definidos?

Adaptado de *"Protocol for a retrospective, controlled cohort study of the impact of a change in Nature Journals' editorial policy for life sciences research on the completeness of reporting study design and execution",* Cramond et al. (2016)

Anexo 6. Critérios de avaliação do risco de viés em estudos *in vitro*

Risco	Baixo	Incerto	Alto
Perguntas	+	-	x
P1	A descrição sobre a representatividade das amostras quanto a réplicas técnicas ou biológicas é percetível	—	A descrição sobre a representatividade das amostras quanto a réplicas técnicas ou biológicas não é percetível
P2	A unidade experimental está claramente de indicada	—	A unidade experimental não está claramente indicada
P3	O número de vezes que o experimento foi replicado em laboratório está indicado	—	O número de vezes que o experimento foi replicado em laboratório não está reportado
P4	O sexo das células está descrito (mesmo de forma implícita)	—	O sexo das células não está descrito (mesmo de forma implícita)
P5	Existe uma descrição da origem das células	—	Não existe uma descrição da origem das células
P6	A autenticação das células dentro de um ano a partir da publicação usando o perfil Short Tandem Repeat (STR) está reportada	—	A autenticação das células dentro de um ano a partir da publicação usando o perfil Short Tandem Repeat (STR) não está reportada
P7	A testagem das células para contaminação por micoplasma está reportada	—	A testagem das células para contaminação por micoplasma está reportada
P8	É percetível se as células são culturas primárias ou de linha celular contínua	—	Não é percetível se as células são culturas primárias ou de linha celular contínua
P9	O número de passagens e/ou duplicação foram descritos adequadamente	O manuscrito não refere o uso de anticorpos	O número de passagens e/ou duplicação não foram descritos adequadamente
P10	Os anticorpos usados foram perfilados (por citação, número de catálogo, número de clone ou perfil de validação)	O manuscrito não refere o uso de anticorpos	Os anticorpos usados não foram perfilados (por citação, número de catálogo, número de clone ou perfil de validação)

Continuação do Anexo 6.

Risco	Baixo	Incerto	Alto	Não Aplicável
Perguntas	+	-	x	
P11	A escolha do tamanho da amostra foi descrita	—	A escolha do tamanho da amostra não foi descrita	—
P12	(Se Q11 afirmativa) O cálculo do tamanho da amostra foi apropriado	—	(Se Q11 afirmativa) O cálculo do tamanho da amostra não foi apropriado	Se Q11 negativa
P13	O método de alocação das amostras foi apropriado	Não menciona se houve alocação	O método de alocação das amostras não foi apropriado	—
P14	Houve cegueira durante a alocação dos grupos	Não menciona se houve ou não cegueira durante a alocação dos grupos	Não houve cegueira durante a alocação dos grupos	—
P15	Houve cegueira durante a avaliação dos resultados	Não menciona se houve ou não cegueira durante a avaliação dos resultados	Não houve cegueira durante a avaliação dos resultados	—
P16	A exclusão de amostras foi descrita	—	A exclusão de amostras não foi descrita	—
P17	Os critérios de exclusão foram pré-definidos	—	Os critérios de exclusão não foram pré-definidos	Se Q12 negativa