

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIDADE DE ENSINO SUPERIOR DOM BOSCO
CURSO BIOMEDICINA

JOÃO VICTOR BELGA VIANA LOPES

**ANÁLISE DA UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CRISPR-CAS9 PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO: uma revisão integrativa**

São Luís
2021

JOÃO VICTOR BELGA VIANA LOPES

**ANÁLISE DA UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CRISPR-CAS9 PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO: uma revisão integrativa**

Monografia apresentada ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário Unidade de Ensino Superior Dom Bosco como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina
Orientador: Prof. Me. Luis Felipe Lima Lobato.

São Luís

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Centro Universitário – UNDB / Biblioteca

Lopes, João Victor Belga Viana.

Análise da utilização da técnica de CRISPR-CAS9 para tratamento do câncer de pulmão: uma revisão integrativa. / João Victor Belga Viana Lopes. __ São Luís, 2021.

36 f.

Orientador: Profa. Me. Luís Felipe Lima Lobato.

Monografia (Graduação em Biomedicina) - Curso de Biomedicina –Centro Universitário Unidade de Ensino Superior Dom Bosco –UNDB, 2021.

1. CRISPR-CAS9. 2. Terapia gênica. 3. Câncer de pulmão.

I. Título.

CDU 616.24-006.6

c

JOÃO VICTOR BELGA VIANA LOPES

**ANÁLISE DA UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CRISPR-CAS9 PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO: uma revisão integrativa**

Monografia apresentada ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário Unidade de Ensino Superior Dom Bosco como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Me. Luis Felipe Lima Lobato

Mestre em Biologia Parasitária

Centro Universitário Unidade de Ensino Superior Dom Bosco (UNDB)

Prof. Me. Thaianne Coelho dos Santos

Mestre em Ciências da Saúde

Centro Universitário Unidade de Ensino Superior Dom Bosco (UNDB)

Prof. Me. Hivylla Lorrana dos Santos Ferreira

Mestre em Biologia Parasitária

Laboratório Central do Maranhão (LACEN -MA)

Dedico a minha mãe, meu pai e
minha irmã.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maurithânia e Júlio, e a minha irmã, Juliana, pelo apoio e confiança durante os quatro anos da graduação. A minha avó, Vanda, pelo apoio e estímulo para me tornar um excelente profissional.

Ao meu orientador Luis Felipe que aceitou me orientar nesta monografia, e pela sua dedicação, paciência e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

A professora Nathalee que acompanhou meu desenvolvimento desde o início da graduação e foi fundamental na minha formação como profissional e pelo apoio e assistência nos momentos difíceis.

Ao meu professor Roberval pela atenção dispensada que se tornou essencial para que o projeto fosse concluído.

Aos meus colegas do curso, que me ajudaram a chegar até aqui. Com eles compartilhei experiências que me tornaram uma pessoa e profissional melhor. Obrigado pelo apoio que muito ajudou a superar os momentos difíceis.

RESUMO

A técnica CRISPR-Cas9 foi descoberta em bactérias atuando como sistema imune adaptativo, pesquisas posteriores analisaram possibilidade de utilização desse sistema como uma ferramenta de edição gênica, assim esse método se mostrou bastante eficaz devido a sua capacidade de edição pontual dos genes. Deste modo, novos estudos foram desenvolvidos e sua aplicação foi expandida para diversos setores da medicina, sendo um deles o tratamento do câncer de pulmão. Assim o objetivo deste trabalho foi analisar as aplicações do sistema CRISPR-Cas9 no tratamento do câncer de pulmão, para isto foi realizado uma pesquisa bibliográfica em bancos de dados Scielo, PubMed, Google Acadêmico além de dados fornecidos de órgãos governamentais, sendo utilizados artigos em português, inglês e espanhol que contemplavam o tema e os objetivos propostos. As pesquisas demonstraram um grande potencial da técnica para o tratamento do câncer de pulmão podendo ser utilizada para a redução do tumor ou para aprimoramento do sistema imune no combate ao câncer de pulmão, contudo maiores pesquisas são necessárias a fim de garantir a segurança do paciente submetido a terapia

Palavras-chave: Proteína 9 Associada à CRISPR, Neoplasias Pulmonares e Terapia Gênica

ABSTRACT

The CRISPR-Cas9 technique was discovered in bacteria acting as an adaptive immune system, further research analyzed the possibility of using this system as a gene editing tool, so this method proves to be quite effective due to its ability to punctually edit genes. Thus, new studies were developed and their application was expanded to different sectors of medicine, one of them being the treatment of lung cancer. Thus, the objective of this work was to analyze the applications of the CRISPR-Cas9 system in the treatment of lung cancer. For this, a bibliographic search was carried out in Scielo, PubMed, Google Academic databases, as well as data from government agencies, using articles in Portuguese, English and Spanish that contemplated the theme and the proposed objectives. Research has shown a great potential of the technique for the treatment of lung cancer, which can be used to reduce the tumor or to improve the immune system in the fight against lung cancer, however further research is required in order to ensure the safety of the submitted patient a therapy

Keywords: Protein 9 Associated with CRISPR, Lung Neoplasms and Gene Therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Índices de incidência e mortalidade de câncer no mundo no ano de 2018.	14
Figura 2: Incidência de casos de câncer em homens no Brasil em 2020.	15
Figura 3: Índices de mortalidade por câncer em homens no Brasil em 2020.	15
Figura 4: Ação da proteína Cas9 e os mecanismos de reparo celular:.....	18
Figura 5: Mecanismo físicos de entrega.	19
Figura 6: Mecanismo de entrega com DNA nanoclew.	20
Figura 7:	21
Figura 8: Interação dos linfócitos T com as células tumorais.)	23
Figura 9: Estrutura e interação da célula T com CART-1 com uma célula tumoral.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Artigos selecionados na revisão integrativa25

Tabela 2: Descrição dos artigos quanto ao seu objetivo, tipo de estudo e seus resultados esperados26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV	Vírus adenoassociados especificamente projetados
CART	Receptor de antígeno T quimérico
Cas9	Proteína 9 Associada à CRISPR
CP	Câncer de pulmão
CRISRP	Repetições palindrômicas curtas regularmente inter espaçadas
DBS	Quebra de dupla fita
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HDR	Reparo direcionado por homologia
MFN2	Mitofusão 2
MN	Meganuclease
NHEJ	Ligação de extremidades não homólogas
NSCLC	Câncer de pulmão de não pequenas células
PDCD-1	Proteína de morte celular programada 1
PDL1	Ligante de morte programada 1
RNA	Ácido ribonucleico
SCLC	Câncer de pulmão de pequenas células
sgRNA	RNA guia
TALEN	Nucleases com efetores do tipo ativador transcricional
ZFN	Nuclease Dedo de Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1- Câncer de pulmão: Epidemiologia e genes associados.....	13
2.2- Sistema CRISPR-Cas9: Da origem as aplicações na medicina moderna	16
2.3- CRISPR-Cas9: Uma potente ferramenta no tratamento do câncer de pulmão	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) aponta essa patologia como um problema de saúde pública no mundo sendo uma das principais causas de morte prematura, com estimativa de 18 milhões de novos casos no mundo somente no ano de 2018 (INCA, 2021). O câncer de pulmão (CP) é o tipo mais frequente com cerca de 2,9 milhões de casos e 1.76 milhões de óbitos, se tornando a causa mais comum de óbitos por câncer (BADE; CRUZ, 2020).

No Brasil é esperado em média 30.200 novos casos/ano entre 2020 e 2022, com estimativa de 17.760 casos novos de CP em homens e 12.440 em mulheres, sendo a região Sul seguida da região Nordeste as mais afetadas do país (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019). No ano de 2019, foram contabilizados 29.354 óbitos em decorrência do CP. Com relação aos fatores de risco associados, o tabagismo aparece como o principal agente, sendo responsável por 85 % dos casos de CP (INCA, 2021).

Assim, a busca por novas formas de tratamentos eficiente se tornou alvo de pesquisas, deste modo a técnica CRISPR-Cas9, sigla em inglês para Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, passou a ser uma alternativa no tratamento de patologias associadas ao genoma (ZAMBON et al., 2021). O sistema CRISPR-Cas9 foi descoberto em bactérias, fazendo parte do seu sistema imunológico adaptativo, removendo fragmentos de DNA viral invasor, no entanto, sua aplicação terapêutica só foi desenvolvida em 2012 com a finalidade de tratar doenças por meio da edição de genes alterados (ALCÂNTARA et al., 2019).

O método CRISPR-Cas9 passou a ser utilizado no tratamento de câncer devido a sua característica que permite fazer modificações pontuais (ALCÂNTARA et al., 2019). Nesse contexto, existem duas vertentes de tratamento, a primeira voltada à edição de oncogenes modificados no DNA, relacionados à proliferação celular e eventual metástase do câncer (JIANG; LIN; ZHAO, 2019). A segunda possibilidade é a edição de populações de células imunológicas específicas, no caso, os linfócitos T, sendo utilizado o sistema CRISPR-Cas9 para a deleção do gene responsável pela expressão da proteína de morte programada – 1 (PD-1), impedindo o desligamento e posteriormente apoptose dos linfócitos T citotóxicos que podem ser inativados pelas células cancerígenas através do contato com receptor PD-1 presente nessas células (G/MEDHIN et al., 2021).

Nesse sentido, devido aos altos níveis de incidência e prevalência, bem como, o número elevado de óbitos por CP, novas metodologias são necessárias e estão sendo desenvolvidas para oferecer um tratamento mais específico e eficaz, de maneira que possa proporcionar benefícios diretos à qualidade de vida dos pacientes portadores de CP, reduzindo significativamente a população de células cancerígenas, e podendo levar a eventual possível cura da doença. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar as aplicações do sistema CRISPR-Cas9 no tratamento do câncer de pulmão, bem como estudar a carcinogênese e suas perspectivas futuras. Desta forma, a metodologia utilizada para alcançar esses objetivos caracterizou-se por ser uma pesquisa com finalidade básica-estratégica, descritiva com uma abordagem qualitativa e método hipotético-dedutivo, sendo utilizados procedimentos bibliográficos e documentais

2 DESENVOLVIMENTO

2.1- Câncer de pulmão: Epidemiologia e genes associados

O câncer de pulmão (CP) é a neoplasia maligna mais incidente no mundo, somente no ano de 2020 foram estimados mais de 2 milhões de novos casos, além de 1.8 milhões de óbitos no mundo em decorrência dessa neoplasia (Figura 1), a relação entre os índices de incidência e mortalidade indica que essa doença aponta para uma elevada letalidade (FOIS *et al.*, 2021).

Ambos os sexos

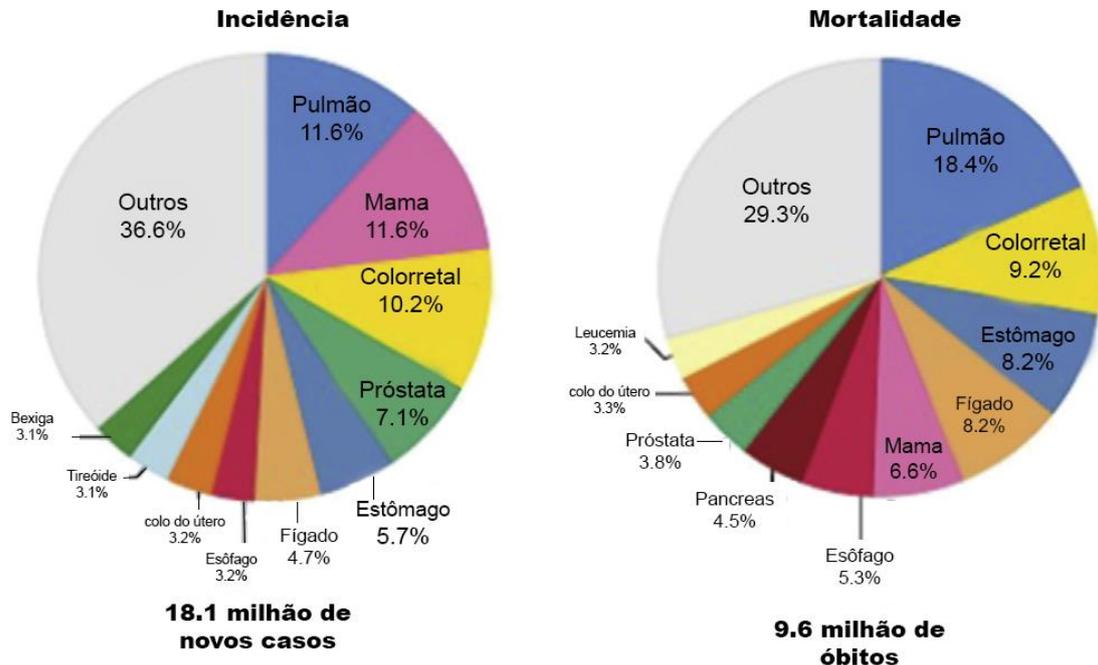


Figura 1: Índices de incidência e mortalidade de câncer no mundo no ano de 2018. A imagem mostra os índices de incidência e mortalidade em ambos os sexos devido ao câncer no mundo no ano de 2018. (Adaptado de BADE, CRUZ; 2020)

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Brasil o CP é a terceira neoplasia maligna mais frequente em homens, conforme mostra a Figura 2. No ano de 2020 foram estimados mais de 30.000 novos casos de CP, sendo 17.760 em homens, entretanto é a neoplasia maligna com maior número de óbitos contabilizados no Brasil, com estimativa de cerca de 29.354 óbitos, sendo 16.722 em homens (Figura 3) (INCA, 2021).

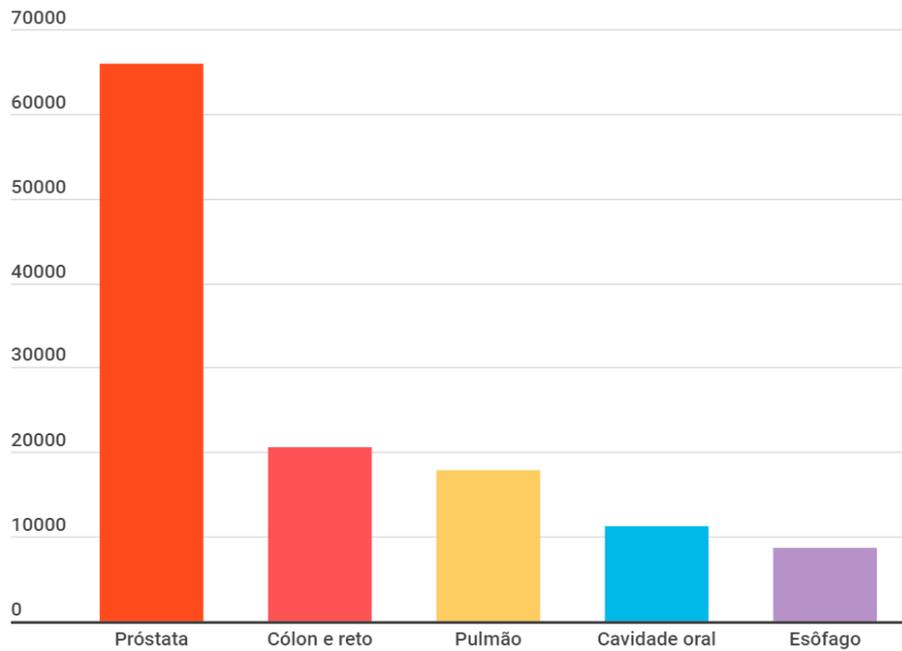


Figura 2: Incidência de casos de câncer em homens no Brasil em 2020. A figura mostra o número de novos casos de câncer em homens no ano de 2020, sendo o câncer de pulmão o terceiro mais incidente. (INCA, 2021)

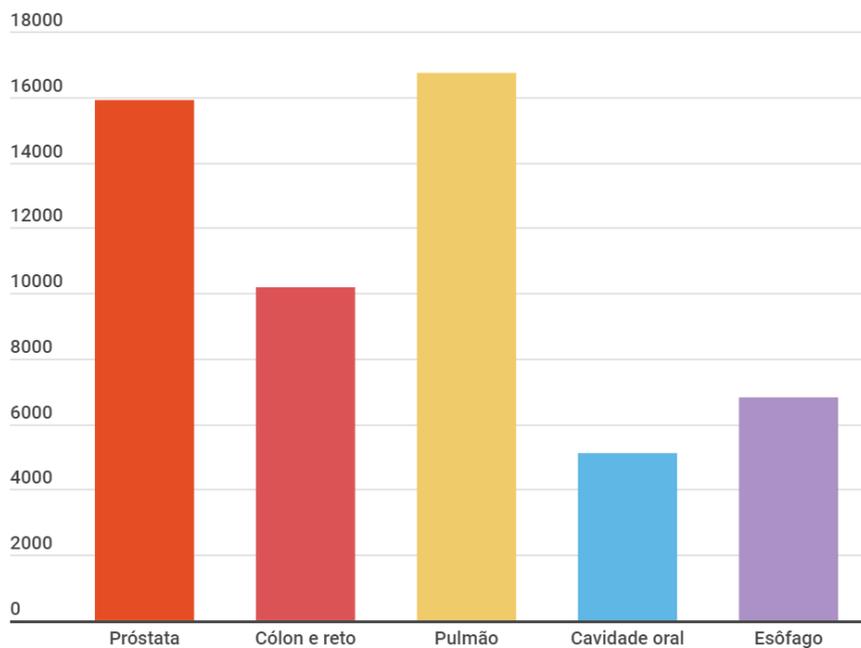


Figura 3: Índices de mortalidade por câncer em homens no Brasil em 2020. A figura mostra os índices de óbitos em decorrência do câncer, sendo liderado pelo câncer de pulmão, seguido pelo câncer de próstata. (INCA, 2021)

O CP possui duas classificações de acordo com as células afetadas, sendo divididas em câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) e câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC). O NSCLC é identificado em cerca de 85% dos casos registrados de CP no mundo, sendo responsável pelos subtipos mais comuns, como o adenocarcinoma (FOIS *et al*, 2021).

O desenvolvimento do CP está associado com a mutação de genes responsáveis pela regulação do crescimento e proliferação celular, sendo o gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) o principal oncogene responsável pela tumorigenesis do NSCLC. Os supressores tumorais também podem fazer parte da formação neoplásica, sendo os genes P53 e o gene de mitofusão 2 (MFN2). Outro gene relacionado com a tumorigenese é o PDL-1, que inibe a função apoptótica das células T proporcionando maior propagação para outros tecidos do corpo (JIANG; LIN; ZHAO, 2019; PARIKH, 2019).

2.2- Sistema CRISPR-Cas9: Da origem as aplicações na medicina moderna

Atualmente existem quatro ferramentas de edição gênica descritas na literatura, sendo elas a meganuclease (MN), nuclease dedo de zinco (ZFN), nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (TALEN) e as Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Interespaçadas e proteínas associadas (CRISPR-Cas9) (GIONO, 2017). Os métodos de edição gênica têm como objetivo identificar o DNA alvo e criar uma quebra de dupla fita (DBS), entretanto para os métodos MN, TALEN e ZFN é necessário a criação de uma proteína para identificar o sitio de ligação, o que torna o processo mais caro, complexo e demorado, em contrapartida o método CRISPR-Cas9 utiliza de outro mecanismo, ao invés de utilizar proteínas essa ferramenta utiliza um RNA guia para localizar o DNA alvo e efetuar o DBS, por esse fator essa técnica se torna mais barata e rápida, além de ser mais efetiva que as demais (KHADEMPAR *et al.*, 2018).

O sistema CRISPR-Cas9 é uma ferramenta de edição genética baseada em um sistema imune adaptativo de bactérias e archeas foi mencionando inicialmente em 1987 por pesquisadores japoneses que descreveram como sendo uma sequência de repetições curtas e interespaçadas (CRISPR) no genoma da *E. Coli* (ISHINO; KRUPOVIC; FORTERRE 2018). Posteriormente em 2005 foi proposto que esse

sistema atuava como um mecanismo imune adaptativo de algumas bactérias e archeas por meio da assimilação de fragmentos de RNA invasor em seu próprio genoma, entretanto somente em 2007 foi realizado um experimento que comprovou sua função como sistema imune adaptativo. Em 2010 foi descoberto que o sistema CRISPR-Cas9 possibilitava a clivagem de genes alvo. No ano de 2012 foi proposta a aplicação do complexo CRISPR-Cas9 na biotecnologia como uma ferramenta de edição gênica, entretanto somente em 2013 foi publicado o primeiro artigo que abordava sobre o sistema CRISPR-Cas9 como uma ferramenta de edição gênica em células humanas (DOUDNA e CHARPENTIER, 2014)

A fim de utilizar o complexo CRISPR-Cas9 como uma nova ferramenta de engenharia genética um protocolo foi desenvolvido durante a pesquisa de Doudna e Chapentier, esse protocolo era dividido em três etapas e se iniciava com a formação de um RNA guia (sgRNA) que era vinculado com a enzima Cas9, esse sgRNA possui a capacidade de reconhecer e se ligar ao gene de interesse. A segunda etapa compreende a introdução *in vitro* do complexo CRISPR-Cas9 na célula alvo, assim iniciando o processo de clivagem do gene alvo. A terceira e última etapa consiste na ativação dos mecanismos de reparo celular, ocasionando a inativação do gene e reparo da fita de DNA (CASTILLO, 2016).

O mecanismo de reparo celular possui duas vias de ativação a primeira ligação de extremidades não homólogas (NHEJ), que une as duas extremidades da fita de DNA clivada, essa via é bastante utilizada no mecanismo de *knockout* devido a remoção do gene de alvo. A via de reparo direcionado por homologia (HDR) utiliza *templates* externos para reparar a fita de DNA, deste modo é possível utilizar genes de interesse no *template* a fim de introduzi-los na sequência de DNA (Figura 4) (FURTADO, 2019)

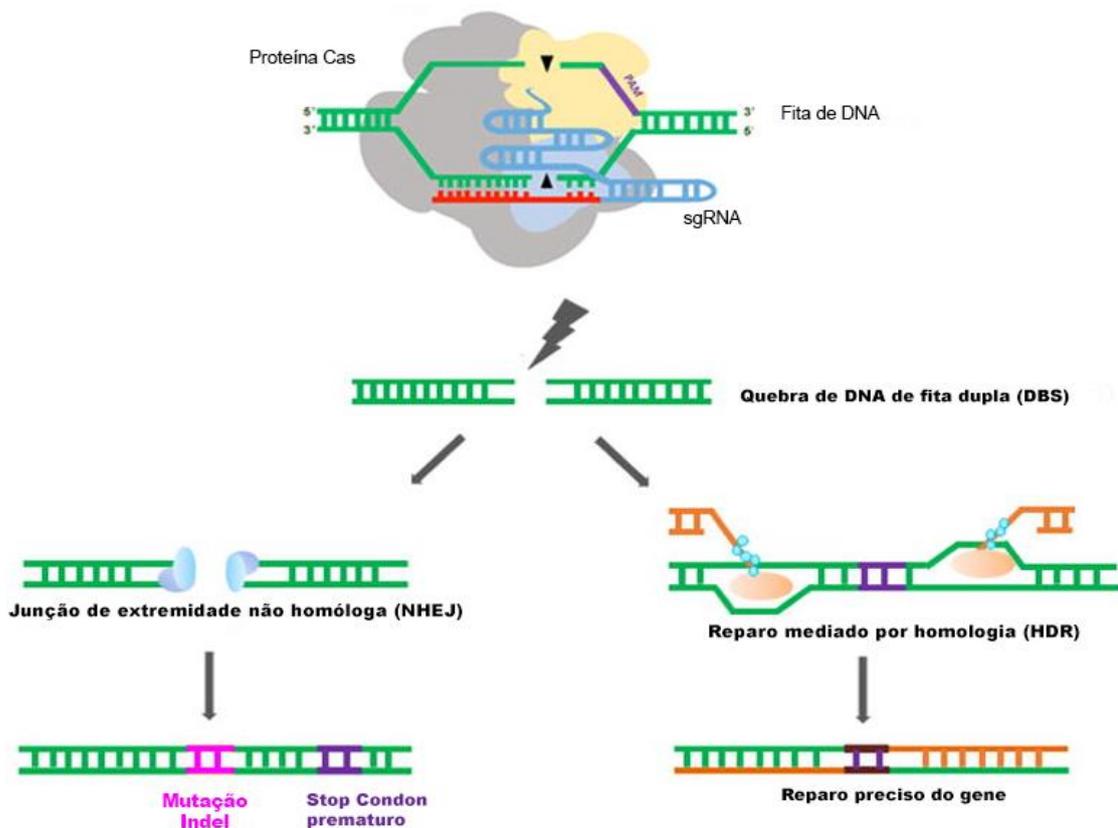


Figura 4: Ação da proteína Cas9 e os mecanismos de reparo celular: A imagem 1 mostra a proteína Cas9 efetuando o DBS e em seguida estão representados os mecanismos de reparo celular, sendo o da esquerda o NHEJ e o da direita o HDR) (adaptado de LIU et al., 2017)

Entretanto, a fim de efetuar a modificação, são necessário mecanismo que permitam entregar o sistema CRISPR-Cas9 até a célula a ser editada, para esta finalidade podem ser utilizadas três tipos de estratégias: a entrega física, não viral e viral (LINO *et al.*, 2018).

No mecanismo de entrega física são presentes técnicas como a microinjeção e eletroporação. A eletroporação é o mecanismo de entrega mais utilizado para transportar componentes através da membrana celular, essa técnica consiste em aumentar a permeabilidade da membrana por meio de descargas elétricas permitindo que o complexo CRISPR-Cas9 seja introduzido na célula alvo sendo bastante utilizado para a edição de uma população de células. Outra técnica mecânica é a microinjeção, esse método consiste em introduzir o complexo CRISPR-Cas9 na célula alvo por meio de uma micropipeta de vidro a nível microscópico (Figura

5), atualmente essa é a técnica mais simples entre os mecanismos de entrega. (LIU *et al.*, 2017; LINO *et al.*, 2018).

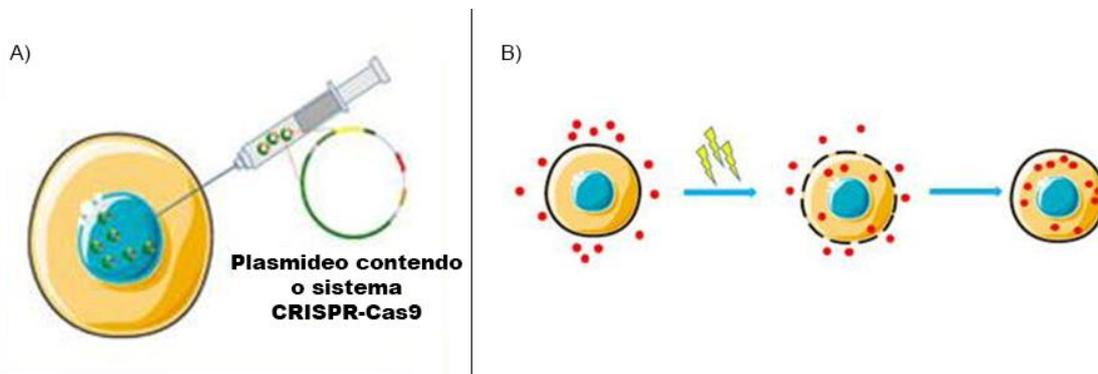


Figura 5: Mecanismos físicos de entrega. A figura 2-A representa o mecanismo de entrega físico via microinjeção e a figura 2-B representa o mecanismo de entrega via eletroporação (adaptado de LIU *et al.*, 2017)

O mecanismo viral utiliza vírus adenoassociados especificamente projetados (AAV) e outros vírus como adenovírus e lentivírus, sendo esse o mecanismo de entrega mais comum. O AAV é um vetor interessante pois, diferente de outros vetores virais, ele não está relacionado com nenhuma doença humana, outro fator para a escolha desse vetor é que apresenta uma alta eficiência de infecção além de uma baixa imunogenicidade. Nesse sistema CRISPR-Cas9 é empacotado no plasmídeo do vírus e entregue por meio da infecção da célula alvo com o AAV. Uma desvantagem desse sistema é que o plasmídeo do vetor só comporta uma quantidade de informação, se limitando a 5kb de informação. (HE *et al.*, 2017; LINO *et al.*, 2018)

Nos mecanismos não virais são utilizados sistemas de nanopartículas para efetuar o transporte do CRISPR-Cas9 na célula alvo. O DNA nanoclew é a tecnologia de entrega mais recente que foi desenvolvida para entrega exclusiva do sistema CRISPR-Cas9, esse mecanismo consiste em uma estrutura esférica de DNA, que permite a entrada na célula por meio de endocitose, essa esfera é revestida com uma carga positiva que permite romper a membrana endossomal liberando o nanoclew com o complexo CRISPR-Cas9 no interior da célula alvo (Figura 6) (LINO *et al.*, 2018).

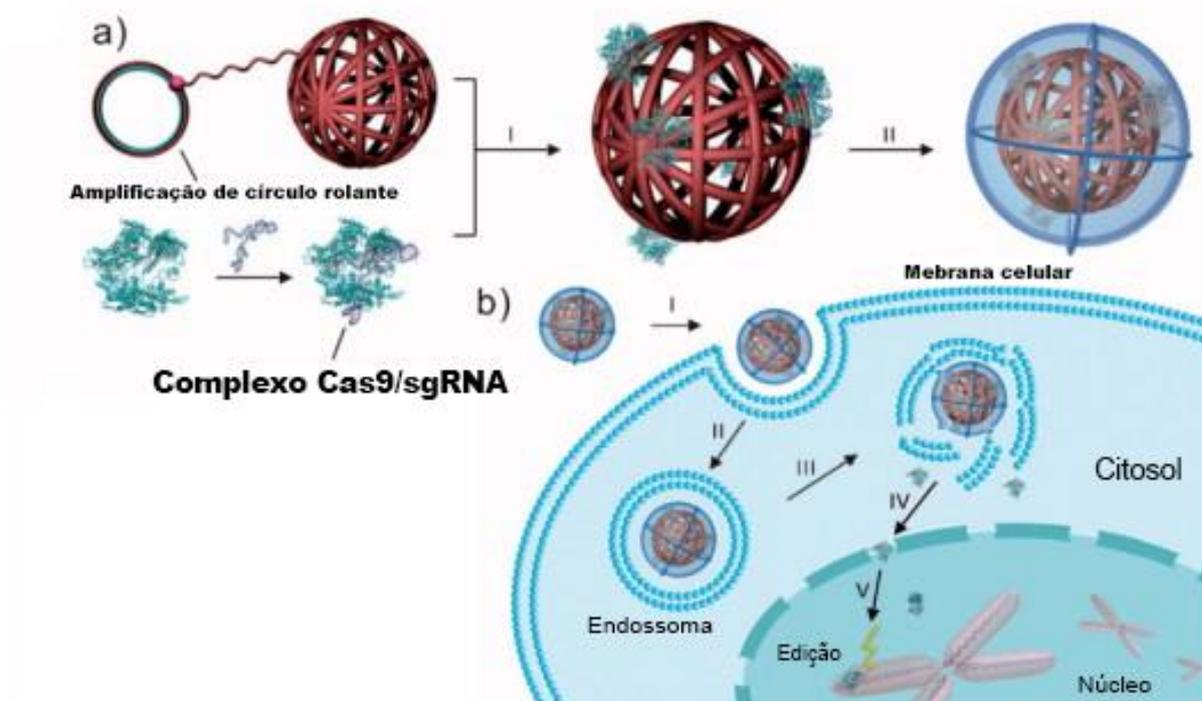


Figura 6: Mecanismo de entrega com DNA nanoclew. A figura 3 mostra o mecanismo de entrega via DNA nanoclew. **A)** Formação da esfera de DNA, por meio da amplificação do circuito rolante, introdução do complexo CRISPR-Cas9 e aplicação do revestimento de polímero com carga positiva **B)** Introdução do DNA nanoclew na célula por meio de endocitose e liberação do DNA nanoclew do endossoma efetuando a entrega do complexo CRISPR-Cas9 no núcleo da célula alvo (adaptado de LINO et al., 2018)

Devido ao seu mecanismo de ação, que permite efetuar um corte em segmentos específicos do DNA, essa ferramenta passou a ser pesquisada para inúmeras finalidades. O sistema CRISPR-Cas9 é uma ferramenta versátil que pode ser utilizada tanto no âmbito terapêutico, quanto na agricultura (TYAGI et al., 2020).

Na perspectiva da agricultura é possível utilizar o sistema CRISPR na modulação de espécies vegetais tornando-as mais resistentes as condições ambientais e a agentes patogênicos, reduzindo as perdas econômicas que esses fatores causam as lavouras (TYAGI *et al.*, 2020).

No âmbito da medicina, essa ferramenta pode ser utilizada com finalidade de estudar genes associados a doenças, além de descobrir suas vias de ativação e seus mecanismos, bem como estudar a resposta celular a medicamentos. Outra possibilidade de aplicação é a sua utilização na modulação e tratamento de diversas doenças, sendo o câncer o principal alvo de pesquisas (KHADEMPAR *et al.*, 2018; TORRES-RUIZ; RODRIGUEZ-PERALES, 2016).

2.3- CRISPR-Cas9: Uma potente ferramenta no tratamento do câncer de pulmão

Tendo em vista os índices de mortalidade do CP, o sistema CRISPR-Cas9 passou a ser uma importante ferramenta no tratamento dessa patologia. O sistema CRISPR-Cas9 pode atuar de diversas maneiras no tratamento do CP, podendo agir tanto no *knockout* quando no reparo de um gene alvo, outro mecanismo é por meio da edição de genes relacionados as células T que favorecem o combate do sistema imune contra o tumor (Figura 7) (CASTILLO, 2016).

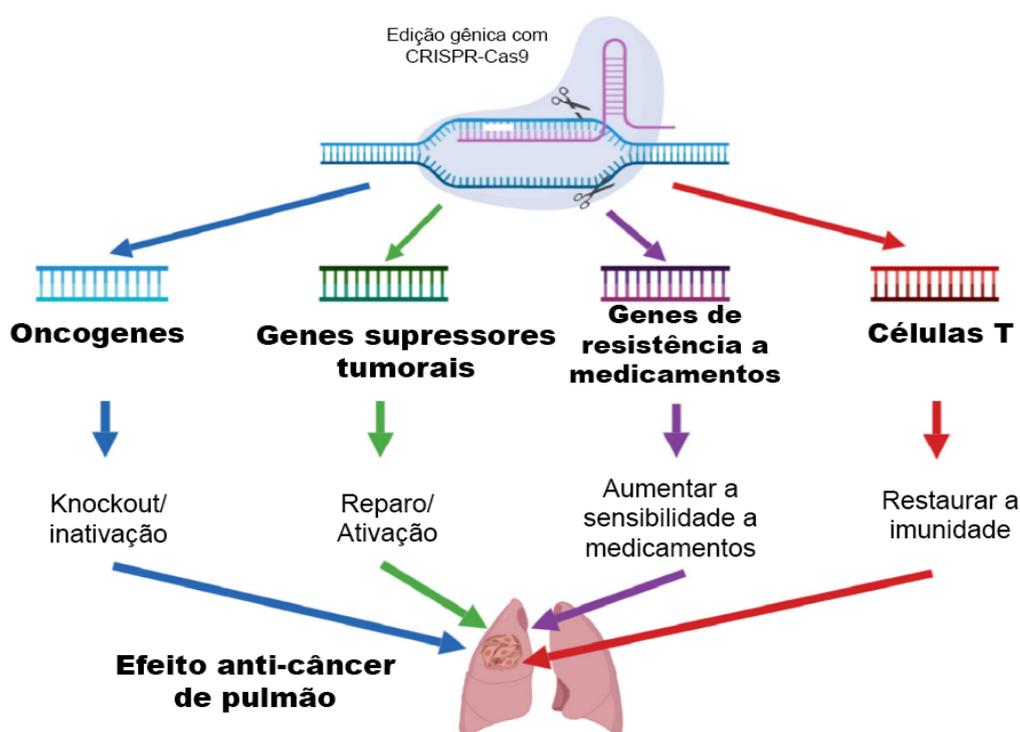


Figura 7: Aplicações do CRISPR-Cas9 no tratamento do câncer de pulmão. A figura mostra quais grupos de gene podem ser utilizados e quais mecanismos são utilizados nas edições a fim de promover o efeito anticâncer de pulmão (adaptado de JIANG; LIN; ZHAO, 2019).

Sabendo que o CP se desenvolve devido a alterações genômicas, o sistema CRISPR-Cas9 pode ser utilizado para gerar um efeito de *knockout* em oncogenes, essa ferramenta também pode ser utilizada para fazer reparos em genes supressores tumorais, restaurando sua função na inibição da oncogênese (JIANG; LIN; ZHAO, 2019).

Os proto-oncogenes desempenham papel fundamental na proliferação celular, quando esses genes sofrem mutação passam a ser chamados de oncogenes e passam a ser superexpressos, gerando um descontrole na proliferação celular. Do mesmo modo que os proto-oncogenes desempenham um importante papel na regulação celular, os supressores tumorais também atuam como agentes reguladores do crescimento celular, além de induzir a apoptose em células neoplásicas e inibir a metástase (SLATTERY, 2017)

Outra forma de utilização do sistema CRISPR-Cas9 no tratamento do CP é por meio da edição de genes de células imunológicas, sendo os linfócitos T as células mais utilizadas nesse método. O tratamento com células T possui duas vertentes, a primeira atua no *knockout* de genes codificadores da proteína PD-1 e a segunda atua na acoplagem de receptores de antígenos quiméricos nos linfócitos T (NAIR *et al.*, 2019; G/MEDHIN *et al.*, 2021).

Na primeira vertente de tratamento com células T, o sistema CRISPR-Cas9 atua no *knockout* do gene PDCD1, chamado de gene de morte celular programada 1, que codifica uma proteína nos linfócitos T chamada de PD-1. Essa proteína desempenha papel de um checkpoint imunológico, atuando na indução apoptótica em células normais, por meio da ligação com receptores de membrana, entretanto as células cancerígenas apresentam PD-1L (ligantes de PD-1) que impedem a ação dos linfócitos (Figura 8). Desde modo, com o *knockout* da proteína pd1 nos linfócitos t a célula tumorais ficam impossibilitadas de fazer o desligamento do linfócito e proporcionando maior efetividade do sistema imune em combater o tumor (JIANG; LIN; ZHAO, 2019; Nair, 2019).

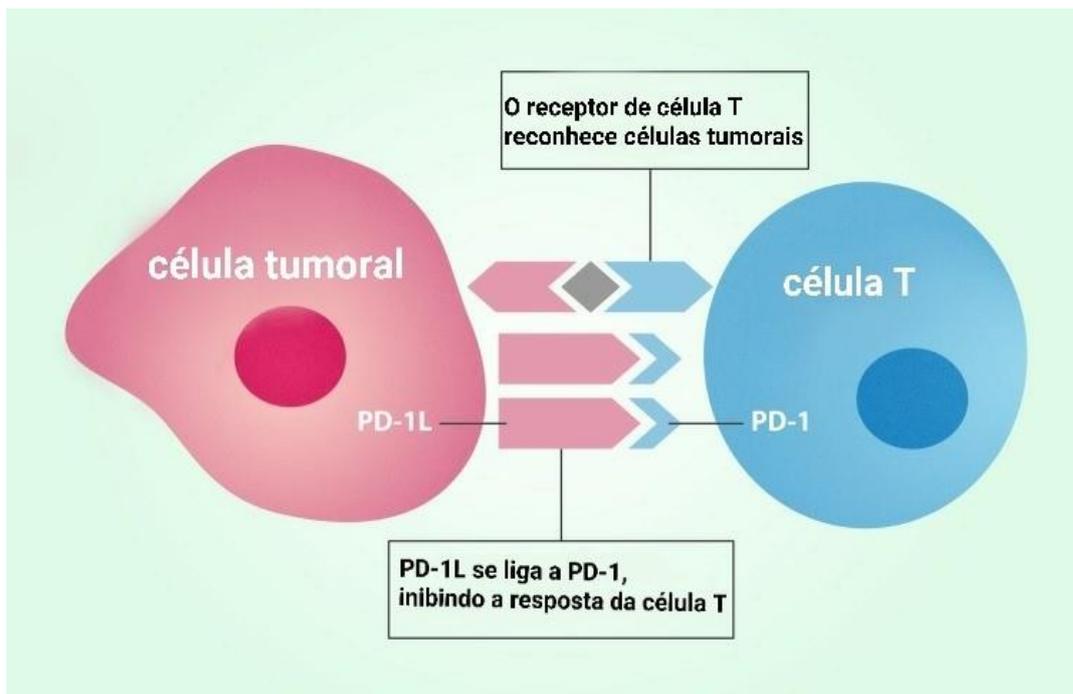


Figura 8: Interação dos linfócitos T com as células tumorais. A figura mostra a interação da célula T com uma célula tumoral, demonstrando a ligação da PD-1 com o PD-1L ocasionando sua inibição. (adaptado de CASTILLO, 2016)

A segunda vertente é chamada de *Chimeric Antigen Receptor T* (CART-1), nessa metodologia de tratamento, os receptores das células T são modificadas pelo sistema CRISPR-Cas9 para expressar um receptor quimérico de antígeno T em sua membrana, esses receptores modificados atuam como marcadores imunológicos que se ligam a epítopos específicos das células tumorais. O CART-1 é dividido em três domínios o primeiro é responsável pela acoplagem na célula neoplásica, o segundo faz a ligação do alvo com a célula T, o último é o domínio de sinalização que atua na ativação da célula T por meio da sinalização de CD3 e moléculas, deste modo aumentando a quantidade de linfócitos T CD8. A utilização desse método permite que o sistema imune identifique e elimine especificamente as células neoplásicas tornando-o mais eficiente no tratamento do CP (Figura 9) (NAIR et al., 2019; QU *et al.*, 2020).

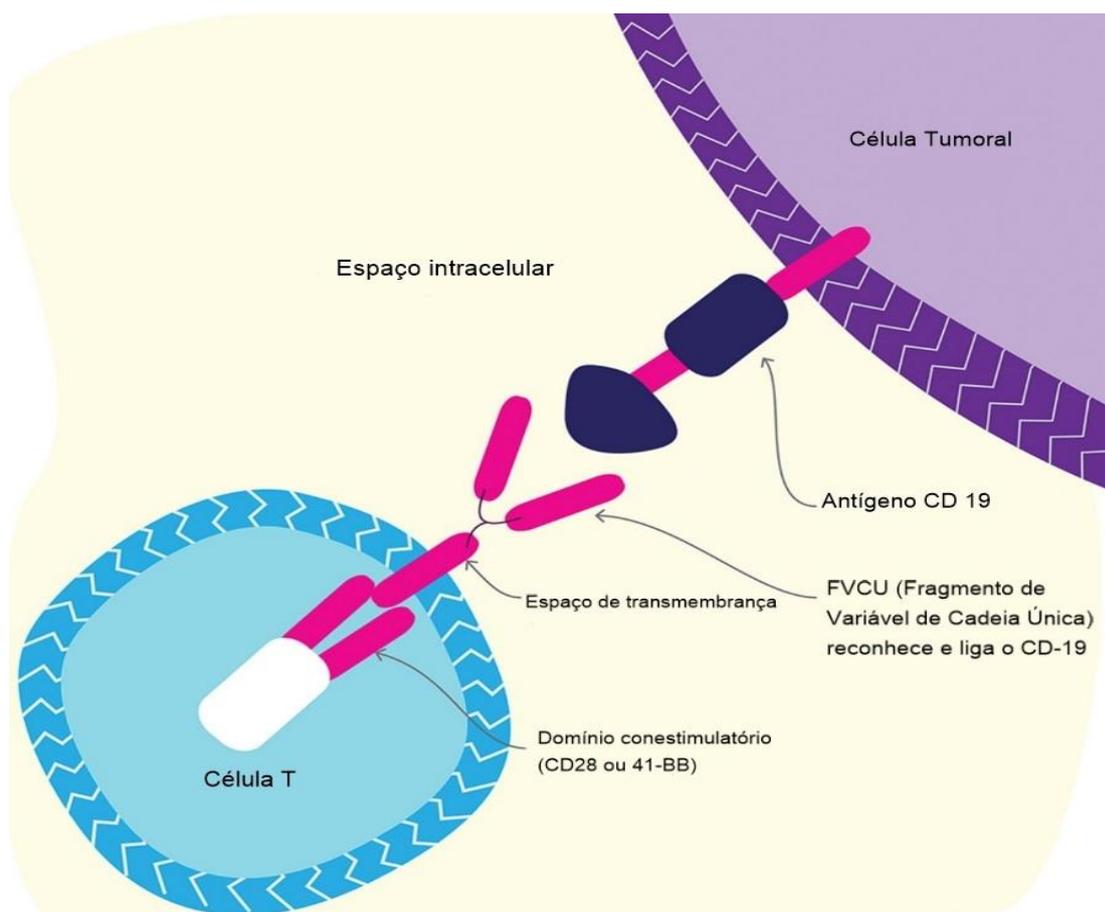


Figura 9: Estrutura e interação da célula T com CART-1 com uma célula tumoral. A figura mostra a interação da célula T quimérica com uma célula tumoral, demonstrando os domínios do receptor (adaptado de Neill; Ress; Roddie, 2020).

3 METODOLOGIA

O presente estudo foi baseado em revisão bibliográfica da literatura do tipo descritivo, com abordagem qualitativa sobre Análise da utilização da técnica de CRISPR-Cas9 para o tratamento do câncer de pulmão registradas nas seguintes bases de dados: Scientific Eletronic Library Online (Scielo), United States National Library of Medicine (PubMed), Google Acadêmico e dados fornecidos de órgãos governamentais identificados pela pesquisa no Google.

Para realização do estudo foram seguidas as seguintes etapas: identificação do tema, estabelecimento dos critérios de inclusão e exclusão, seleção dos estudos, avaliação e extração das informações, interpretação dos resultados e por última apresentação da revisão.

Os critérios de inclusão para seleção dos artigos que compõem esta revisão foram: artigos completos disponíveis nas bases de dados PubMed, Scielo, Google Acadêmico e dados de órgãos governamentais, publicados no idioma português, inglês e espanhol, no recorte temporal de 2014 a 2021 que abordavam o tema proposto e o objetivo da pesquisa. Foram excluídos artigos anteriores ao ano de 2014, revisões de literatura e artigos que não estavam no idioma português. Foram usados os descritores (DeCS): Proteína 9 Associada à CRISPR, Neoplasias Pulmonares e Terapia Gênica.

A pesquisa não apresentou riscos, pois não foi realizada com pessoas e/ou animais, nem direta, nem indiretamente. Este estudo promoveu o conhecimento acerca das aplicações do sistema CRISPR-Cas9 no tratamento do câncer de pulmão

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na busca de artigos científicos nas bases de dados foram encontrados inicialmente 24 (vinte e quatro) artigos científicos, sendo 12 (doze) encontrados no Google Acadêmico e 12 (doze) encontrados no PUBMED, resultando na seleção de 14 (quatorze) artigos, que contemplavam os critérios estabelecidos, tratando do tema escolhido, sendo excluídos aqueles que não obedeceram aos critérios de inclusão.

No quadro 1 encontram-se dispostos os dados referentes aos 15 artigos analisados incluindo autores, título, revista de publicação, base de dados e ano em que o artigo foi publicado.

Tabela 1: Artigos selecionados na revisão integrativa

N°	Autores	Título	Revista de publicação	Base de dados	Ano
01	Hirakawa <i>et al.</i>	Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives	Bioscience Reports	PUBMED	2020
02	Janik <i>et al.</i>	Michal. Various Aspects of a Gene Editing System CRISPR–Cas9	International Journal Of Molecular Sciences	PUBMED	2020

03	Zhan <i>et al.</i>	CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy.	Seminars In Cancer Biology	PUBMED	2018
04	Lino <i>et al.</i>	Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches	Drug Delivery	PUBMED	2018
05	Memi, Ntoku, Papangeli	CRISPR/Cas9 gene-editing: research technologies, clinical applications and ethical considerations.	Seminars in Perinatology	PUBMED	2018
06	Torres-Ruiz, Rodriguez-Perales	CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling	Briefings In Functional Genomics	PUBMED	2016
07	Gómez-Tatay, Aznar	CRISPR-CAS9. EL MAYOR AVANCE EN TÉCNICAS DE EDICIÓN GENÉTICA REQUIERE UNA REFLEXIÓN ÉTICA	Cuadernos de Bioética	PUBMED	2019
08	Khadenpar <i>et al.</i>	CRISPR–Cas9 in genome editing: its function and medical applications	Journal Of Cellular Physiology	PUBMED	2018
09	Nair <i>et al.</i>	Translatable gene therapy for lung cancer using Crispr CAS9—an exploratory review	Cancer Gene Therapy	PUBMED	2019
10	Cheng <i>et al.</i>	CRISPR/Cas9 for cancer treatment: technology, clinical applications and challenges.	Briefings In Functional Genomics	PUBMED	2020
11	Chen <i>et al.</i>	CRISPR-Cas9 for cancer therapy: opportunities and challenges	Cancer Letters	PUBMED	2019
12	Lu <i>et al.</i>	Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer	Nature Medicine	PUBMED	2020
13	Zambon <i>et al.</i>	Tecnologia CRISPR-Cas9: Uma revisão acerca de perspectivas terapêuticas no câncer de pulmão e considerações para aplicação na transgenia humana	Congresso Internacional em Saúde	Google acadêmico	2021
14	Caldwell <i>et al</i>	Identification and Validation of a PD-L1 Binding Peptide for determination of PDL1 Expression in Tumors	Scientific Reports	PubMed	2017

O quadro 2 mostra o objetivo, tipo de estudo e resultados, referentes ao tema, encontrados nos estudos selecionados para a revisão integrativa.

Tabela 2: Descrição dos artigos quanto ao seu objetivo, tipo de estudo e seus resultados esperados

N°	Objetivo	Tipo de estudo	Resultados obtidos
01	Identificar os efeitos do <i>knockout</i> do gene PD-1 em células T e verificar a	Revisão descritiva	O estudo demonstrou resultados positivos com o aumento da reação das células T ao tumor. O autor ainda afirmou que a combinação

	Utilização com a terapia CAR.		com a terapia CAR aumentou a sobrevida e efetividade das células CART.
02	Avaliar os efeitos da clivagem de genes EGFR mutantes.	Revisão descritiva	Com a clivagem dos genes EGFR mutantes foi possível observar a diminuição do tumor e aumento da morte de células neoplásicas.
03	Identificar a efetividade das células CART	Revisão descritiva	O estudo demonstrou melhora significativa das células T modificadas na rejeição do tumor.
04	Investigar as aplicações do sistema CRISPR-Cas9 na medicina.	Revisão descritiva	Pode ser utilizado para identificar alterações cromossômicas por meio da combinação da proteína Cas9 com marcadores fluorescentes.
05	Identificar mais aplicações do sistema CRISPR-Cas9 além das desvantagens desse método	Revisão descritiva	O sistema CRISPR-Cas9 pode ser utilizado para desenvolver modelos de cânceres animais.
06	Entender o sistema CRISPR-Cas9 como uma ferramenta de edição genômica	Revisão descritiva	Com a ferramenta CRISPR-Cas9 é possível fazer modificações pontuais em genes específicos possibilitando alteração da expressão de proteínas.
07	Identificar os riscos do uso da terapia gênica com CRISPR-Cas9	Revisão descritiva	Estudos relataram a ocorrência de mutações <i>off-target</i> . Outro risco é com relação a exposição de pacientes em situação de vulnerabilidade de podem ser submetidos as técnicas sem o consentimento esclarecido.
08	Comparar o sistema CRISPR-Cas9 com outros métodos de edição gênica	Revisão descritiva	O sistema CRISPR-Cas9 utiliza um sgRNA para identificar o gene alvo, o que torna essa técnica mais barata e eficaz em comparação com outros métodos que usam proteínas projetadas, que tornam esses métodos complexos e caros.
09	Avaliar as perspectivas futuras da utilização da técnica	Revisão descritiva	A técnica possui um enorme potencial na ciência podendo ser a chave para o tratamento e cura de diversas doenças. Com a formulação de regulamentações a técnica pode ser desenvolver de forma mais rápida e eficiente.
10	Estudar a efetividade do <i>knockout</i> de oncogenes e reparo de supressores tumorais	Revisão descritiva	Estudos demonstraram a redução do tumor bem como a diminuição da proliferação e metástase das células neoplásicas.
11	Avaliar a efetividade das células T com o <i>knockout</i> do gene PD-1	Revisão descritiva	O <i>knockout</i> do gene PD-1 demonstrou uma redução na quantidade de PD-1 na superfície da célula T resultando.
12	Avaliar a seguridade da edição de células T em	Ensaio clínico	O estudo obteve resultados positivos demonstrando baixas

	pacientes portadores de câncer de pulmão		mutações <i>off-target</i> ocorrendo principalmente em regiões não codificantes.
13	Abordar sobre a Conferência Internacional Sobre a Edição do Gene Humano	Revisão de literatura	A conferência resultou no início da formação de regulamentações e restringiu o uso da ferramenta para edição de embriões e células germinativas.
14	Identificar o princípio do bloqueio da PDL-1 nas células tumorais	Estudo Clínico	O bloqueio da da via PD-1/PDL-1 aumenta a eficiência das células T no combate ao tumor.

Segundo Torres-Ruiz e Rodriguez-Perales (2016), o sistema CRISPR-Cas9 é uma ferramenta revolucionária no ramo da genômica que permitiu alterar ou corrigir, de forma precisa e eficiente, a expressão de um gene alvo, viabilizando estudos aprimorados acerca dos genes e como esses genes tem influência nas vias de ação de doenças.

Memi, Ntoku e Papangeli (2018) também corroboram com o potencial dessa ferramenta na genômica e acrescentam que esse mecanismo pode ser utilizado de forma terapêutica no tratamento de diversas doenças, principalmente as de origem genética.

Khadempar e colaboradores (2018) descrevem o sistema CRISPR-Cas9 como o método mais eficaz, rápido, barato e simples uma vez que utiliza um sgRNA para direcionar a proteína Cas9 ao gene alvo e efetuar a clivagem, em contrapartida à os outros métodos os quais é necessário a elaboração de um complexo proteico tornando-os processos mais caros e demorados.

Em contrapartida Memi e colegas (2018) afirmam que pesquisas recentes identificaram uma elevada incidência de mutações *off-Target* em células embrionárias de camundongos, podendo gerar efeitos adversos. Os mesmos autores apontam também que a introdução de genes específicos na sequência de DNA é mais complexa do que a introdução das mutações *indels*, isso ocorre devido à baixa eficiência do mecanismo de reparo HRD.

Memi, Ntoku e Papangeli (2018) argumentam que essa ferramenta pode ser utilizada no desenvolvimento de modelos *in vivo* de cânceres, por meio do *knockout* de genes supressores de tumor em camundongos, possibilitando melhores estudos acerca da carcinogênese de diversos tipos de câncer.

Lino e colaboradores (2018) descrevem outra aplicação para essa ferramenta no ramo da patologia molecular. Utilizando o mecanismo do sistema

CRISPR-Cas9 em conjunto com agentes fluorescente é possível identificar um locus gênico específico, assim as possibilitando a identificação de alterações cromossômicas fundamentais para o diagnóstico e prognóstico de uma doença.

Para Janik *et al.* (2018) o desenvolvimento da engenharia genética é um novo avanço na medicina possibilitando melhor entendimento do câncer bem como novas descobertas de tratamentos mais eficazes e precisos. Os autores destacaram um estudo que utilizava o sistema CRISPR-Cas9 para clivar genes EGFR mutantes, o *knockout* do gene resultou na morte de células neoplásicas ocasionando uma diminuição significativa do tumor. Cheng e colaboradores (2020) também demonstraram que o *knockout* de oncogenes e reparo de supressores tumorais resultou na diminuição do tumor e reduziu a proliferação e metástase do câncer.

Caldwell e equipe (2017) informam que diversas células neoplásicas apresentam uma superexpressão de PDL-1, sendo presente entre 35% a 95% dos casos de NSCLC, que impedem a ação apoptótica do linfócito T, deste modo os autores afirmam que o bloqueio da interação entre PD-1 e PDL-1 favorece o tratamento do CP uma vez que o sistema imune se torna capaz de lidar com a evasão do tumor.

Chen *et al.* (2019) afirmam que o *knockout* do locus PD-1 mediado por CRISPR-Cas9 reduziu significativamente a expressão de PD-1 nas células T, e assim foi possível observar melhores respostas do sistema imunológico no combate ao tumor.

Um dos problemas da técnica CRISPR-Cas9 é o risco de mutações *off-target* que podem gerar efeitos adversos, entretanto Lu e equipe (2020) desenvolveram um estudo clínico de fase 1 intitulado “Segurança e viabilidade de células T editadas por CRISPR em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas refratário”, que teve como objetivo avaliar os riscos e a viabilidade do uso das células T modificadas, os resultados foram positivos demonstrando mínimas mutações *off-target*, ocorrendo principalmente em regiões de íntrons o que não representa impactos significativos, Lu ainda afirma que pesquisas futuras com técnicas de edição mais avançadas poderão estudar e melhorar a eficácia terapêutica da técnica.

Hirakawa e colaboradores (2020), corroboram que o *knockout* de genes PD-1 em células T é um método vantajoso, e ainda afirmam que sua combinação com terapia a CAR-T, mostrou resultados preliminares positivos com o aumento da

sobrevida das células T modificadas bem como uma melhora na sua efetividade. Zhan *et al* (2019), apontou um estudo que demonstrou o desenvolvimento de células CAR T tendo como resultado uma melhora significativa na rejeição de tumores. Hirakawa e colaboradores (2020) ainda informam que diversos ensaios clínicos envolvendo a edição de células T com CRISPR-Cas9 estão sendo desenvolvidos atualmente.

Gómez-Tatay e Aznar (2019) alertam para o uso da edição gênica em células germinativas, ao passo que pode ser utilizada terapeuticamente a fim de impedir doenças hereditárias também pode ser utilizada para gerar um aprimoramento biológico por meio da seleção de genes de interesse. Os autores também abordam acerca da utilização da técnica em células somáticas afirmando que mutações *off-target* tem sido relatada em diversos estudos, outra preocupação descrita pelos autores é sobre a realização da terapia gênica sem o consentimento esclarecido de pacientes vulneráveis.

Nesse contexto foi realizada a Conferência Internacional Sobre Edição do Gene Humano, que reuniu pesquisadores das técnicas de edição gênica com filósofos na área de bioética além de advogados. O resultado dessa conferência gerou a necessidade de elaborar regulamentações éticas para a manipulação de genes, bem como a restrição de pesquisas envolvendo embriões e células germinativas (ZAMBON *et al.*, 2021)

Nair *et al.* (2019) afirma que o sistema CRISPR-Cas9 apresenta um potencial enorme no desenvolvimento da ciência, possibilitando descobertas de novos tratamentos e que essa ferramenta pode ser a cura de doenças antes incuráveis. Os autores destacam que atualmente o desenvolvimento de pesquisas acerca da edição gênica está progredindo de forma lenta devido as implicações éticas da técnica e ainda assegura que o desenvolvimento de uma regulamentação vai ampliar o número de pesquisas e dar início a uma nova era de terapias contra o câncer e outras doenças.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema CRISPR-Cas9 é uma ferramenta de edição gênica que permite fazer a remoção de um fragmento em um ponto específico na fita de DNA tornando-se um potencial tratamento para diversas doenças, sendo uma delas o CP. A capacidade de recorte pontual possibilita a inativação de genes mutados que causam

a carcinogênese além de possibilitarem a edição de genes em células imunológicas que proporcionam maior eficiência no tratamento. A edição de genes com a ferramenta CRISPR-Cas9 é relativamente recente e devido a isto são necessários estudos e pesquisas mais aprofundados a fim de garantir a segurança do tratamento com essa técnica assim reduzindo o efeito *off-target*.

REFERÊNCIAS

ALCANTARA, Raphael Ladislau et al. A tecnologia de CRISPR-Cas9 na terapia gênica do câncer de pulmão. *REVISTA BRASILEIRA MILITAR DE CIÊNCIAS*, v. 5, n. 13, 2019.

BADE, Brett C.; CRUZ, Charles S. Dela. Lung Cancer 2020. **Clinics In Chest Medicine**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 1-24, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. . **Estatísticas de câncer**. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 06 out. 2021.

CALDWELL, Charles; JOHNSON, Cory E.; BALAJI, V. N.; BALAJI, Govardhan A.; HAMMER, Richard D.; KANNAN, Raghuraman. Identification and Validation of a PD-L1 Binding Peptide for Determination of PDL1 Expression in Tumors. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-10, 20 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10946-2>.

Castillo A. Gene editing using CRISPR-Cas9 for the treatment of lung cancer. *Colomb Med (Cali)*. 2016 Dec 30;47(4):178-180. PMID: 28293040; PMCID: PMC5335857.

CHEN, Minjiang; MAO, Aiwu; XU, Min; WENG, Qiaoyou; MAO, Jianting; JI, Jiansong. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: opportunities and challenges. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 447, p. 48-55, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017>.

CHENG, Xing; FAN, Shaoyi; WEN, Chengcai; DU, Xianfa. CRISPR/Cas9 for cancer treatment: technology, clinical applications and challenges. **Briefings In Functional Genomics**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 209-214, 12 fev. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bfgp/elaa001>.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, [S.L.], v. 346, n. 6213, p. 1-10, 28 nov. 2014. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1258096>.

DUARTE, R. L. D. M; PASCHOAL, M. E. M. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 56-65, jun./2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/QytwY3bdQmckM7Z8zPypmSP/?lang=pt>. Acesso em: 26 ago. 2021

FOIS, Sara S.; PALIOGIANNIS, Panagiotis; ZINELLU, Angelo; FOIS, Alessandro G.; COSSU, Antonio; PALMIERI, Giuseppe. Molecular Epidemiology of the Main Druggable Genetic Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 612, 9 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22020612>

Furtado, Rafael Nogueira Edição genética: riscos e benefícios da modificação do DNA humano. *Revista Bioética* [online]. 2019, v. 27, n. 2, pp. 223-233. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1983-80422019272304>>. Epub 01 Jul 2019. ISSN 1983-8034. <https://doi.org/10.1590/1983-80422019272304>.

G/MEDHIN, Markeshaw Tiruneh; ABEBE, Endeshaw Chekol; SISAY, Tekeba; BERHANE, Nega; BEKELE, Tesfahun; DEJENIE, Tadesse Asmamaw. Current Applications and Future Perspectives of CRISPR-Cas9 for the Treatment of Lung Cancer. **Biologics: Targets and Therapy**, [S.L.], v. 15, p. 199-204, maio 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/btt.s310312>

Giono, Luciana Eugenia; CRISPR/Cas9 y la terapia génica; Medicina (Buenos Aires); Medicina (Buenos Aires); 77; 5; 10-2017; 405-409
GÓMEZ-TATAY, Lucía ; AZNAR, Justo. CRISPR-CAS9. EL MAYOR AVANCE EN TÉCNICAS DE EDICIÓN GENÉTICA REQUIERE UNA REFLEXIÓN ÉTICA. Cuadernos de Bioética, [S.L.], p. 171-185, 2019. Aebi. <http://dx.doi.org/10.30444/CB.31>.

He ZY, Men K, Qin Z, Yang Y, Xu T, Wei YQ. Non-viral and viral delivery systems for CRISPR-Cas9 technology in the biomedical field. *Sci China Life Sci.* 2017 May;60(5):458-467. doi: 10.1007/s11427-017-9033-0. Epub 2017 May 2. PMID: 28527117.

HIRAKAWA, Matthew P.; KRISHNAKUMAR, Raga; TIMLIN, Jerilyn A.; CARNEY, James P.; BUTLER, Kimberly S.. Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives. *Bioscience Reports*, [S.L.], v. 40, n. 4, abr. 2020. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20200127>.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.
INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Câncer de pulmão**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>. Acesso em: 25 jul. 2021.

ISHINO, Yoshizumi; KRUPOVIC, Mart; FORTERRE, Patrick. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 200, n. 7, p. 1-10, abr. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00580-17>.

JANIK, Edyta; NIEMCEWICZ, Marcin; CEREMUGA, Michal; KRZOWSKI, Lukasz; SALUK-BIJAK, Joanna; BIJAK, Michal. Various Aspects of a Gene Editing System—CRISPR–Cas9. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 21, n. 24, p. 9604, 16 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21249604>.

JIANG, Chunyang; LIN, Xiaohui; ZHAO, Zhigang. Applications of CRISPR/Cas9 Technology in the Treatment of Lung Cancer. **Trends In Molecular Medicine**, [S.L.], v. 25, n. 11, p. 1039-1049, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2019.07.007>

KHADEMPAR, Saedeh; FAMILGHADAKCHI, Shokoufeh; MOTLAGH, Roozbeh Akbari; FARAHANI, Najmeh; DASHTIAHANGAR, Maryam; REZAEI, Hamzeh; HAYAT, Seyed Mohammad Gheibi. CRISPR–Cas9 in genome editing: its function and medical applications. *Journal Of Cellular Physiology*, [S.L.], v. 234, n. 5, p. 5751-5761, 26 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27476>.

LINO, Christopher A.; HARPER, Jason C.; CARNEY, James P.; TIMLIN, Jerilyn A.. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*,

[S.L.], v. 25, n. 1, p. 1234-1257, 1 jan. 2018. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>.

LIU, Chang; ZHANG, Li; LIU, Hao; CHENG, Kun. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 266, p. 17-26, nov. 2017. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012>.

LU, You; XUE, Jianxin; DENG, Tao; ZHOU, Xiaojuan; YU, Kun; DENG, Lei; HUANG, Meijuan; YI, Xin; LIANG, Maozhi; WANG, Yu. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 732-740, 27 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0840-5>.

MEMI, Fani; NTOKOU, Aglaia; PAPANGELI, Irinna. CRISPR/Cas9 gene-editing: research technologies, clinical applications and ethical considerations. *Seminars In Perinatology*, [S.L.], v. 42, n. 8, p. 487-500, dez. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2018.09.003>.

NAIR, Jishnu; NAIR, Abhishek; VEERAPPAN, Soundaram; SEN, Dwaipayan. Translatable gene therapy for lung cancer using Crispr CAS9—an exploratory review. **Cancer Gene Therapy**, [S.L.], v. 27, n. 3-4, p. 116-124, 20 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41417-019-0116-8>.

Neill L, Rees J, Roddie C. Neurotoxicity CAR T cell therapy: what the neurologist needs to know. *Practical Neurology* 2020;20:285-293

PARIKH, Ankur R .. Lung Cancer Genomics. *Acta Medica Academica* , [SI], v. 48, n. 1, pág. 78-83, junho. 2019. ISSN 1840-2879. Disponível em: <
<http://www.ama.ba/index.php/ama/article/view/360> >. Data de acesso: 08 de dezembro de 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.5644/ama2006-124.244> .

QU, Jingjing; MEI, Quanhui; CHEN, Lijun; ZHOU, Jianying. Chimeric antigen receptor (CAR)-T-cell therapy in non-small-cell lung cancer (NSCLC): current status and future perspectives. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 619-631, 6 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00262-020-02735-0>.

SCHABATH, Matthew B.; COTE, Michele L.. Cancer Progress and Priorities: lung cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, [S.L.], v. 28, n. 10, p. 1563-1579, out. 2019. American Association for Cancer Research (AACR).
<http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-19-0221>.

SLATTERY, Martha L.; HERRICK, Jennifer S.; MULLANY, Lila E.; SAMOWITZ, Wade S.; SEVENS, John R.; SAKODA, Lori; WOLFF, Roger K.. The co-regulatory networks of tumor suppressor genes, oncogenes, and miRNAs in colorectal cancer. *Genes, Chromosomes And Cancer*, [S.L.], v. 56, n. 11, p. 769-787, 30 jul. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.22481>.

TORRES-RUIZ, Raul; RODRIGUEZ-PERALES, Sandra. CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling. *Briefings In Functional Genomics*, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 4-12, 26 jun. 2016. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/bfpg/elw025>.

TYAGI, Swati; KUMAR, Robin; DAS, Aparup; WON, So Youn; SHUKLA, Pratyosh. CRISPR-Cas9 system: a genome-editing tool with endless possibilities. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 319, p. 36-53, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.008>.

ZAMBON, A. F. *et al.* TECNOLOGIA CRISPR-CAS9: UMA REVISÃO ACERCA DE PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS NO CÂNCER DE PULMÃO E CONSIDERAÇÕES PARA APLICAÇÃO NA TRANSGENIA HUMANA. **Congresso Internacional em Saúde**, Rio Grandedo Sul, v. 1, n. 8, p. 1, jul./2021. Disponível em: <https://publicacoeseventos.unijui.edu.br/index.php/conintsau/article/view/19025>. Acesso em: 16 ago. 2021

ZHAN, Tianzuo; RINDTORFF, Niklas; BETGE, Johannes; EBERT, Matthias P.; BOUTROS, Michael. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Seminars In Cancer Biology*, [S.L.], v. 55, p. 106-119, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.04.001>.