

TERAPIA GÊNICA NO TRATAMENTO DE NEOPLASIAS PULMONARES: APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE CRISPR/CAS9 EM MARCADORES EPIGENÉTICOS DESREGULADOS

Jéssica Achterberg¹, Nicole Grasmuk Israel¹, Suelen Cristina Grott¹

¹Centro Universitário Avantis -Uniavan, Balneário Camboriú-Sc, Brasil

e-mail: jessica.achterberg@uniavan.edu.br; suelen.grott@uniavan.edu.br, nicoleisrael@terra.com.br

Recepção:

Aprovação: 12 de maio de 2025

Resumo – O presente estudo teve como objetivo avaliar a possibilidade do CRISPR-Cas9 na terapia gênica do câncer de pulmão, por meio do conhecimento do mecanismo da CRISPR-Cas e da sua utilização no tratamento do câncer de pulmão. Trata-se de uma revisão de literatura de aspecto descritivo. Diante disso o problema a ser respondido foi se os estudos recentes sobre a técnica de CRISPR/Cas9 estão contribuindo para o controle da expressão gênica do câncer de pulmão. Assim, o objetivo geral desta pesquisa foi verificar publicações dos últimos cinco anos sobre o uso desta técnica na edição e genes envolvidos no câncer de pulmão. Justifica-se devido ao crescimento na incidência e morbidade relacionadas ao câncer de pulmão, sendo a edição gênica uma alternativa menos agressiva aos tratamentos convencionais e que soma esforços com as mudanças de comportamento. Esta pesquisa trata-se de um levantamento bibliográfico com o uso dos bancos de dados, entre os anos de 2018 e 2022. Constatou-se que a técnica de CRISPR/Cas9 está contribuindo para o controle da expressão gênica do câncer de pulmão, com avanços positivos consideráveis neste campo, sendo que o nocauteamento de genes envolvidos com a expressão do câncer pulmonar é o principal mecanismo estudado.

Palavras-Chave – Câncer de Pulmão; CRISPR/Cas9; Edição gênica.

GENE THERAPY IN THE TREATMENT OF LUNG NEOPLASMS: APPLICATION OF THE CRISPR CAS9 TECHNIQUE IN DISREGULATED EPIGENETIC MARKERS

A Abstract – The present study aimed to evaluate the possibility of CRISPR-Cas9 in lung cancer gene therapy, through knowledge of the mechanism of CRISPR-Cas and its use in the treatment of lung cancer. This is a

literature review with a descriptive aspect. Therefore, the question to be answered was whether recent studies on the CRISPR/Cas9 technique are contributing to the control of gene expression in lung cancer. Thus, the general objective of this research was to verify publications in the last five years on the use of this technique in editing and genes involved in lung cancer. It is justified due to the increase in incidence and morbidity related to lung cancer, and gene editing is a less aggressive alternative to conventional treatments and that joins efforts with behavioral changes. This research is a bibliographic survey using databases, between the years 2018 and 2022. It was found that the CRISPR/Cas9 technique is contributing to the control of lung cancer gene expression, with considerable positive advances in this field, and the knockout of genes involved in lung cancer expression is the main mechanism studied.

Keywords – CRISPR/Cas9; Lung cancer; Gene editing.

I. INTRODUÇÃO

O câncer figura mundialmente como o principal problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morte e, portanto, uma barreira para o incremento da expectativa de vida da população [1]. Ao longo dos últimos anos está ocorrendo uma transição tanto demográfica quanto epidemiológica, exemplificadas pelo aumento da proporção de idosos e diminuição das taxas de fertilidade, bem como a substituição da mortalidade por doenças infecciosas por aquelas causadas por doenças crônicas.

Em 2020, os cânceres de maior incidência no mundo foram os de mama (11,7%), de pulmão (11,4%), de cólon e reto (10%), de próstata (7,3%) e pele não melanoma (6,2%). Sendo que no sexo masculino, o câncer de pulmão foi o mais incidente (14,3%) e no sexo feminino foi o câncer de mama (24,5%) [1].

Segundo Luo [2] estima-se que até 2035 as taxas de incidência mundiais de câncer de pulmão irão aumentar

drasticamente entre as mulheres enquanto que entre os homens tenderá a diminuir. De acordo com o Observatório Global do Câncer, em 2020 [3] o câncer de pulmão teve a maior taxa de mortalidade geral, sem distinção de sexo. Analisando a taxa de mortalidade apenas no sexo masculino, o câncer de pulmão também ocupa o primeiro lugar. Já no sexo feminino, o câncer de pulmão já ocupa o segundo lugar entre os tipos de câncer que mais matam [3]. Além disso, o câncer de pulmão é o tumor de maior mortalidade em todo o mundo [4].

Desde a descoberta da dupla fita do DNA em 1953, os estudos nesta área têm avançado rapidamente [5]. Em 1987, um grupo de cientistas da Universidade de Osaka, no Japão estudava a informação genética de bactérias e notou que havia uma frequência de repetições de bases no seu DNA, que a princípio não tinha nenhuma função [6]. Em 1993, uma equipe de pesquisadores da Universidade de Alicante, na Espanha teve o mesmo achado, descrevendo as sequências como repetitivas, palindrômicas, separadas por sequências espaçadoras, tendo uma sequência líder em seu início [6]. Foram nomeadas de CRISPR, sigla para “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” (Conjunto de repetições palindrômicas regularmente espaçadas). Estas sequências eram semelhantes às de bacteriófagos e plasmídeos e sua localização era muito próxima dos genes que codificam a proteína Cas, uma nuclease (enzima) que pode cortar e degradar DNA em locais específicos além de integrar pequenos fragmentos de DNA digerido nas sequências CRISPR, constituindo assim um sistema de defesa imune adaptativa dos procariotos [6].

Foi apenas em 2012 que pesquisadores na Califórnia, liderados por Jennifer Doudna, e na Suécia por Emmanuelle Charpentier, propuseram a utilização desta descoberta do complexo CRISPR-Cas como uma ferramenta biotecnológica para editar e programar genomas in vitro com propósitos terapêuticos [6]. Devido a essa descoberta, em outubro de 2020, as pesquisadoras receberam o prêmio Nobel de Química [7].

Dentre as proteínas Cas, foram observadas duas classes, sendo que as de classe I para atuarem necessitam uma quantidade numerosa de Cas, enquanto que para as de classe II é necessária a atuação de apenas uma proteína Cas. Atualmente a nuclease mais utilizada para edição genômica é a Cas9, de classe II [8].

Dessa forma, a presente pesquisa buscou responder a seguinte questão problema: O estudo recente sobre a técnica de CRISPR/Cas9 está contribuindo para o controle da expressão gênica do câncer de pulmão? Diante disso, o objetivo geral foi verificar publicações dos últimos cinco anos sobre a utilização da técnica de CRISPR/Cas9 na edição de marcadores epigenéticos envolvidos com a expressão de câncer de pulmão.

Considerando a questão problema mencionada, foram levantadas as hipóteses de que o uso da técnica de CRISPR/Cas9 está suprimindo a expressão de oncogenes (genes

relacionados com o aparecimento e crescimento de tumores, malignos ou benignos) envolvidos com o câncer pulmonar, além de estar aumentando a expressão de genes supressores deste tipo de tumor.

Diante disso, esta pesquisa (revisão bibliográfica) mostra-se de suma importância diante do cenário mundial de perspectiva de crescimento tanto de incidência quanto de morbidade relacionados ao câncer de pulmão, pois pretende apresentar como a edição genética de genes envolvidos com a expressão de câncer de pulmão pode contribuir positivamente para o seu controle e tratamento.

II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A. Fisiopatologia do câncer de pulmão

Os tecidos são compostos de tipos diferentes de células para constituir os órgãos do corpo humano [9]. Estes são compostos por parênquima e estroma, sendo o primeiro representado por células que desempenham funções e o segundo por células que darão forma e estrutura ao órgão. Nas neoplasias o parênquima é constituído pelas próprias células neoplásicas e o estroma irá sustentar e nutrir o tumor [10].

O processo de carcinogênese (processo de formação do câncer) no tecido pulmonar é iniciado principalmente por lesões causadas por fumaça de tabaco, vírus oncogênicos, ação de hormônios, mutações genéticas ou alterações epigenéticas. Estas lesões são compostas por células displásicas, clones e subclones celulares que se multiplicam de forma descontrolada. Assim que estas células são permeadas por vasos sanguíneos, processo denominado angiogênese, inicia a invasão dos tecidos subjacentes, o tumor se instala e progride. Quando atinge a circulação linfática ou sanguínea, pode ocorrer seu deslocamento para outros órgãos mais distantes, o que configura a metástase característica de estágios avançados de câncer [11].

Dentre as neoplasias pulmonares malignas primárias, ou seja, originadas no próprio órgão, cerca de 90 a 95% são provenientes do epitélio brônquico e são denominadas de carcinoma brônquico. Sendo assim, quando é mencionada a expressão câncer de pulmão na literatura, está se refere ao carcinoma brônquico [12]. Ainda de acordo com Lechner, [12] o carcinoma brônquico é classificado em quatro tipos principais, que são o carcinoma epidermóide, o adenocarcinoma, o carcinoma de grandes células e o carcinoma de pequenas células.

O carcinoma epidermóide incide nas vias aéreas proximais e em locais mais periféricos dos pulmões, suas células produzem ceratina, pontes intercelulares, formam uma necrose central e apresentam um padrão celular em espiral formando cavitações [13].

O adenocarcinoma é o tipo mais comum em não fumantes, de aparência multinodular [12], também é de ocorrência periférica, produz muco e se diferencia formando glândulas [13].

O carcinoma de grandes células é anaplásico, pouco diferenciado e sem características epidermóides ou glandulares. Sua localização principal é periférica e também formam necrose [13].

E o carcinoma de pequenas células forma grandes massas de localização central na maioria dos casos, sendo raro o surgimento em área periférica e não formam cavitação. Sua aparência celular característica é de grãos de areia [13]. Sua ocorrência está associada ao tabagismo, é o tipo mais agressivo dos subtipos histológicos e apresenta alta incidência de metástases [11].

B. Fatores genéticos na expressão do câncer de pulmão

Dentre os principais oncogenes envolvidos no desenvolvimento patológico e expressão dos carcinomas brônquicos podem ser citados o c-MYC, o k-RAS, o EGFR, o c-MET, p14ARF, p16INK4a, RB, FHIT e RASSF1A e o c-KIT [14, 15, 16]. Já os genes mais conhecidos por efetivar a supressão e inativação dos genes responsáveis pela expressão dos carcinomas brônquicos são o p53, o RB, o p16 e genes do braço curto do cromossomo 3 [17, 18, 12].

Alterações nestes genes incluem as mutações, as metilações na região promotora do DNA, perda de heterozigose e instabilidade de microssatélites, que são situações desencadeadoras de alterações no transcriptoma, podendo levar a inflamação e até a apoptose. A incapacidade celular de reparar este tipo de dano, através da resposta aos sinais que controlam a proliferação, a diferenciação e a apoptose pode levar à expressão do fenótipo anormal e maligno [11].

O tabagismo, considerado um fator ambiental importante para a carcinogênese, tem sido estudado para determinar a sua participação também no aspecto genético relacionado ao câncer pulmonar. O número total de mutações pontuais em regiões de codificação do DNA em fumantes com câncer pulmonar é muito maior que em não fumantes também acometidos pela doença, na ordem de até 2 desvios padrão, podendo ser consideradas hipermutações. Em pacientes fumantes observam-se principalmente as transições, quando uma base pirimidínica (C ou T) é substituída por uma base purínica (G ou A) e vice-versa. Enquanto que em pacientes não fumantes são mais preponderantes as transições, quando uma pirimidina é substituída por outra pirimidina (C ou T) e uma purina por outra purina (G ou A). Quando estas mutações atingem genes codificadores de reparo de DNA, esta célula perde a capacidade de autorreparo e desencadeia o processo carcinogênico [19].

O tabaco possui vários compostos que provocam alterações no DNA, como o alcatrão que é metabolizado pelas enzimas P450, S-transferases, glucuronosiltransferases, sulfatases, formando produtos que causam danos diretamente às bases nitrogenadas por oxidação. Quando essa lesão ocorre num oncogene ou num gene supressor de tumor, a carcinogênese é facilitada. Além disso, outros produtos do tabaco, como as quinonas e derivados possuem a capacidade de causar danos às ligações fosfodiésteres, responsáveis por manter as duas

fitas do DNA unidas, facilitando deste modo as descontinuações da estrutura em hélice e causando quebras no DNA que levam às mutações carcinogênicas [11].

C. CRISPR/Cas9 na terapia gênica do câncer de pulmão

A enzima Cas9 possui a capacidade de clivar fitas de DNA, ela recebeu mutações pontuais nos genes que codificam a sua porção catalítica, fazendo com que perdesse essa função, porém mantendo a sua capacidade de se ligar ao seu alvo. Deste modo é possível acoplar à Cas9 moléculas desenvolvidas para realizar a terapia gênica, com função de inibir ou ativar a transcrição. As alterações das seqüências de nucleotídeos do gene alvo, podem ocorrer de quatro formas, ou seja, através da inserção de transgenes, de substituição alélica, de nocauteamento por inativação gênica ou de nocauteamento por deleção [20].

O reconhecimento do sítio pela Cas9 ocorre através das seqüências espaçadoras PAM (Proto-spacer adjacent motive) que se situam a três bases de distância do local a ser clivado e da seqüência de sgRNA de 20 a 22 bases complementares à seqüência alvo. Após a quebra do DNA alvo pela Cas9 ocorre o mecanismo de reparo, que pode ser por recombinação homóloga (HDR) que fará o reparo de acordo com a informação contida em um molde de DNA, realizando uma inserção ou uma correção. Ou pode ser um reparo por recombinação não homóloga (NHEJ), em que as pontas cortadas de DNA são simplesmente unidas uma à outra, o que gera deleções e substituições que levam a uma perda de função [21].

A figura 1 exemplifica a edição genética para substituir mutações carcinogênicas por seqüências corretas de DNA, onde é possível inserir um fragmento de DNA sem mutações no lugar de uma seqüência alterada utilizando o processo de reparo por recombinação homóloga HDR. A mesma figura mostra ainda o silenciamento de genes alterados através do processo de recombinação não homóloga NHEJ (ZAMBON, 2021).

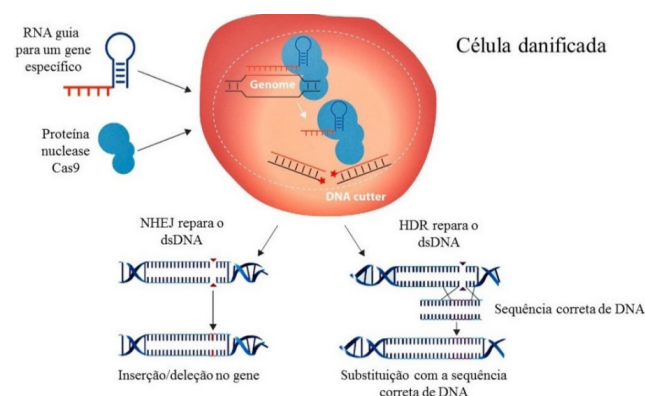


Fig.1. Edição genética utilizando CRISPR/Cas9 por NHEJ e HDR [22].

Segundo Almeida, [8] um dos desafios desta técnica é entregar a macromolécula do sistema CRISPR/Cas9 no alvo terapêutico in vivo, ou seja, no núcleo da célula mutada responsável por codificar as proteínas envolvidas na expressão do câncer de pulmão. Esta macromolécula não atravessa com facilidade a membrana celular e menos ainda a membrana nuclear, sendo necessário um veículo que facilite esta transposição. Inicialmente foi testado o plasmídeo, um vetor viral no qual é incorporado o gene codificador e o sgRNA (RNA guia) que possui a capacidade de injetar o material genético dentro da célula hospedeira, sendo utilizados os lentivírus e os adenovírus.

Há outros métodos de entrega não virais sendo desenvolvidos, como as nano partículas, a eletroporação, a micro injeção e a injeção hidrodinâmica, mas sem a mesma eficiência dos vetores virais devido a problemas com estabilidade e biocompatibilidade em alguns tipos de tecidos. Outro desafio é a especificidade do CRISPR/Cas9 que em genomas extensos ainda é fator a ser questionado, visto que pode conter sequências que causam interações indesejáveis fora do alvo terapêutico [8].

D. Edição de oncogenes que expressam o câncer de pulmão

Os proto-oncogenes possuem uma região estrutural responsável pela codificação dos aminoácidos que irão formar uma proteína específica, e uma região reguladora que irá modular a expressão deste gene [23]. Quando ocorre uma mutação pontual nestes oncogenes, uma deleção cromossômica, uma translocação de segmentos, ou uma amplificação gênica, eles passam a formar proteínas alteradas e a falta da regulação torna esta produção desenfreada levando ao surgimento da neoplasia [10]. As principais alterações ocorrem na expressão de fatores de crescimento ou dos seus receptores; alteram também as proteínas da tradução de sinais que enviam ao núcleo os estímulos para realizar a mitose, bem como as proteínas reguladoras nucleares que facilitam a transcrição dos genes; alteram a hidrólise do GTP o que promove a mitose contínua e ainda alteram a atividade da ciclinaquinase que é responsável por iniciar o ciclo celular e retornar ao repouso reprodutivo ao final de cada ciclo [10].

No carcinoma pulmonar de células não pequenas, uma das mutações mais conhecidas ocorre no proto-oncogene EGFR, que o transforma em um oncogene. Este oncogene está relacionado à expressão da proteína tirosina quinase, um receptor de membrana celular com domínio interno e externo, que em condições normais é ativada por um ligante, porém, se mutado, o estímulo é constante mesmo sem a atuação de um ligante. Muitas vezes ocorrem concomitantemente outras mutações que aumentam a quantidade de receptores na membrana celular, aumentando ainda mais a expressão deste gene. Assim, o EGFR irá induzir a célula a entrar em mitose, aumentar sua função através da transdução de sinal celular, estimulando e ampliando a proliferação, o crescimento celular, a invasão

de tecidos e a resistência à apoptose destas células. A utilização da técnica de CRISPR/Cas9 consiste em diferenciar o alelo mutado com um sgRNA complementar (carregado por um adenovírus incapaz de replicar) que se hibridiza a ele com alta especificidade. A Cas9 faz a sua clivagem, suprimindo através do nocauteamento por deleção aquele pedaço do gene e impedindo que produza a proteína tirosina quinase [8].

Outra possibilidade prática com o uso da técnica de CRISPR/Cas9 que Zhang et al., [24] demonstraram em relação ao nocauteamento de oncogenes em câncer pulmonar de células não pequenas, é que este resulta em dano detectável no DNA das células afetadas, aumentando assim a sensibilidade das mesmas à radioterapia.

Outros autores, realizaram um levantamento dos oncogenes envolvidos em câncer pulmonar já estudados e mencionados em artigos científicos publicados entre 2015 e 2020: JUN, FOS, ABL1, BRAF, RAF1, GNAS, KRAS, NRAS, HRAS, CSF 1R, MYC, EGFR, MET, ALK, CCNE1, DDR2, ERBB3, FGFR1, MDM2, ROS1, SOX2 e TP63 [25].

E. Edição de genes supressores tumorais

Os genes supressores de tumor agem como um freio contra divisões celulares agressivas. Quando ativos, inibem os oncogenes, prevenindo um crescimento desregulado e anormal das células. Em células normais são responsáveis pela proteção contra a superexpressão do ciclo celular, pois monitoram a velocidade de divisão celular, reparando DNA mutado e controlando o processo de apoptose [26].

Os antioncogenes produzem proteínas que em situações normais inibem a proliferação celular e combatem o surgimento de neoplasias, assim, quando sofrem mutações irão perder sua capacidade de regulação do estímulo da mitose, levando ao crescimento aumentado das células. Os genes supressores podem ser de dois tipos, que atuam de modo oposto para promover a regulação. Há o tipo promotor que atua removendo qualquer barreira que esteja impedindo a proliferação celular (como o p53 e o Rb). Ou pode ser do tipo vigilante, que atua garantindo a integridade do DNA, reparando-o sempre que encontram alguma alteração [10].

A técnica de CRISPR/Cas9 foi bem sucedida em experimentos que procuravam bloquear o gene supressor de tumor que expressa a proteína fosfatase homóloga à tensina (PTEN) em células de câncer pulmonar de células não pequenas. O resultado foi um aumento do crescimento do tumor, comprovando a relação direta da atuação dos antioncogenes na proteção contra a expressão de câncer pulmonar [26].

O silenciamento, a deficiência ou a mutação de um antioncogene irá levar à expressão de um oncogene e desencadear a progressão tumoral. Foram encontradas mutações por nocauteamento em genes inibidores de expressão tumorigênica em câncer de pleura, cujas células

apresentavam habilidades de migração e de invasão aumentadas em relação à células sem esta alteração. E o mesmo comportamento foi encontrado em nocauteamento de DNA de células afetadas por câncer de pulmão. Assim, as pesquisas usando a técnica de CRISPR/Cas9 para reparar estes genes supressores de tumor inativados tem se mostrado uma alternativa terapêutica benéfica contra o câncer de pulmão [24].

Ainda na pesquisa de Díaz, Benítez e Cruz [25], estes autores trazem os principais genes supressores de tumores pulmonares que encontraram na literatura entre os anos de 2015 a 2020: TP53, CDKN2A, CDKN1A, RB1, CDK2AP1, ATM, ERCC2, BRCA1, CCND1, STK11, PDLIM2, PTEN, ARID1A, ASCL4, CUL3, EP300, KEAP1, KMT2D, NF1, NOTCH1, RASA1, EDT2 e SMARCA4.

F. Edição de genes reguladores da apoptose

A apoptose é responsável por manter o equilíbrio no número de células, portanto, é de extrema importância na oncogênese já que pode ser inativada levando a uma diminuição da morte celular programada e por consequência, ao aumento do número de células. O gene p53 induz a apoptose, sendo considerado protetor quando ativo. Já o gene bcl2 inibe a apoptose quando ativo, e prolonga a vida das células contribuindo para a progressão das neoplasias [10].

No câncer pulmonar ocorre uma redução da expressão de genes que alteram a sensibilidade das células à indução da morte programada, sendo que a supressão desta via é um fator que facilita a progressão tumoral. O aumento das metilações das regiões promotoras que ficam adjacentes ao local que inicia a transcrição destes genes é o mecanismo responsável por inibir a sua expressão. Para aumentar a expressão destas moléculas é necessário desmetilar as regiões promotoras, sensibilizando novamente estas células à morte induzida e à eficácia da quimioterapia [21].

Outro mecanismo relacionado à morte programada das células envolve proteínas expressas na superfície de linfócitos T citotóxicos, que atuam como ligantes em células cancerígenas inibindo a ativação da resposta imunológica para desencadear a fagocitose das células mutadas. A aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 irá desativar o gene que codifica este receptor dos linfócitos permitindo que estes possam atuar na resposta antitumoral [27].

Estudos recentes têm avaliado o papel essencial da autofagia como um importante modulador na expressão de câncer. A autofagia pode tanto aumentar quanto diminuir a tumorigênese, dependendo do local que ocorre. Quando a autofagia favorece a progressão do tumor, sua inibição irá reduzir a malignidade, estimular a apoptose e reduzir a invasão de tecidos. E quando a autofagia suprime o tumor, sua inibição irá impedir a apoptose e prolongar a vida destas células afetadas. Já foram identificados vários genes envolvidos na expressão da autofagia em câncer de pulmão,

sendo promissor o desenvolvimento de terapias com CRISPR/Cas9 para terapia gênica nesta via de atuação [28].

II. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

A pesquisa é de natureza básica, pois intenta-se colaborar com o conhecimento científico. Enquanto a abordagem é preponderantemente qualitativa, haja visto que pretende-se discutir sobre a utilização da técnica de CRISPR/Cas9 na edição de marcadores epigenéticos envolvidos com a expressão de câncer de pulmão. Seu objetivo é exploratório, buscando um conhecimento mais profundo sobre esta técnica de edição genética, bem como os avanços recentes da ciência neste campo. Para isso, o procedimento técnico utilizado foi o levantamento bibliográfico através dos bancos de dados Google Acadêmico e Science Direct, que foram as duas bases com maior número de artigos disponíveis sobre o tema de interesse.

Os dados para esta pesquisa de revisão bibliográfica foram coletados de artigos publicados entre 2018 e 2022, sendo que para a fundamentação teórica foram utilizados também artigos e livros publicados antes do período de busca dos dados utilizados nesta pesquisa, por conterem as bases sólidas para a construção do conhecimento que se possui hoje sobre o tema. Os descritores utilizados foram: CRISPR/Cas9, câncer de pulmão e edição gênica, pesquisados na língua portuguesa e inglesa. Foram eliminados os artigos que após a leitura do resumo não corresponderam ao objetivo desta pesquisa.

Após realizar buscas foram localizados 592 resultados. Os critérios de exclusão da primeira filtragem foram artigos cujo título inferia fuga ao tema, não se tratando de pesquisa sobre CRISPR/Cas9, câncer de pulmão, pesquisa genética, não voltados a humanos ou que já eram revisões de literatura, assim permaneceram ao total 64 artigos. Para a segunda filtragem foi realizada a leitura dos resumos, sendo excluídos os artigos que fugiram do tema deste trabalho e permanecendo aqueles que já atendiam os critérios, bem como aqueles que ainda não puderam ser classificados com base no resumo. Restaram para a leitura na íntegra o total de 29 publicações.

Por fim, com a leitura integral dos artigos, ainda foram identificados alguns que se tratavam de revisões bibliográficas ou que fugiram do tema mencionado, o que não havia ficado claro durante a leitura dos resumos, assim restaram para compor análise síntese o total de 18 artigos.

A. Pesquisas sobre a técnica CRISPR/Cas9 em genes envolvidos no câncer de pulmão

Dentre as modificações genéticas utilizadas, o nocauteamento de diferentes genes é a mais prevalente. Bialk, Wang, Banas e Kmiec [29] desativaram o gene do Fator Nuclear Relacionado ao Eritróide 2 (NFR2), relacionado à inativação de medicamentos e resistência à quimioterápicos, em células A549 (de câncer de pulmão) de

ratos-modelo. Os resultados foram a diminuição da proliferação das células A549, mesmo sem tratamento medicamentoso, e aumento da sensibilidade a quimioterápicos como cisplatina e carboplatina, com grande diminuição do volume do tumor.

Kawamura [30], realizou o nocauteamento dos genes ATG5, ATG7 e Beclin-1 em cultura de carcinoma de pulmão de células não pequenas. Os genes estão envolvidos com a autofagia em células de tumores pulmonares, porém se comportaram de maneiras diferentes após o silenciamento, além disso apresentaram efeitos tóxicos sobre as células não afetadas pelo tumor. Assim, são necessários mais estudos,

para melhorar a sua seletividade. Bruschi [31], realizou o nocauteamento do gene que codifica a cofilina-1 (CFL-1) associada à transformação e divisão celular, à capacidade de invasão tecidual e metástase, bem como à apoptose. Observou-se aumento da direcionalidade dos filamentos de actina e que ficaram mais fusiformes.

Biggi e Simioni [27], pesquisaram o nocauteamento do gene que codifica a proteína PD-1. As células de tumores pulmonares expressam em sua superfície um receptor para proteína de morte programada (PD-L1), capazes de reconhecer esta proteína (PD-1) que fica na superfície de linfócitos T citotóxicos. Esta interação inibe a ativação dos linfócitos T e suprime a resposta imune contra as células tumorais. O nocauteamento deste gene interrompe a ligação de PD-L1 com PD-1, permitindo que os linfócitos T tenham uma resposta imune contra as células do tumor pulmonar. Porém, pesquisas futuras são necessárias a fim de se obter uma conclusão. Deng et al., [32] bloquearam o gene da quinase dependente de ciclina 5 (Cdk5), em ratos. O resultado foi a supressão de metástases pulmonares e resposta imune aumentada no microambiente do tumor, apresentando uma regulação negativa de PD-L1 *in vivo*. dos Santos [33], também realizou o bloqueio da expressão do gene LRP1B, identificado com frequência inativado em células de câncer pulmonar de células não pequenas, o que sugere seu papel na supressão de tumores. Realizou-se a deleção dos exons em diferentes posições do DNA alvo para criar um clone que servirá de modelo *knockout* para estudos futuros.

Cazzetta et al., [34] realizou o nocauteamento do gene NKG2A, em linfócitos T Vδ2, restaurando a capacidade da célula de combater os tumores, visto que ela é hiperresponsível contra células cancerígenas. Porém, a NKG2A sofre sinalização inibitória de HLA-E que é

produzido pelas células cancerígenas. Manzano [35], utilizou-se da mesma técnica, bloqueando a expressão de genes que codificam os Receptores TCR e PD-1 de células T, responsáveis pelo reconhecimento de uma proteína presente em células tumorais, a PDL-1, inibindo a ação do linfócito. Assim permite-se que os linfócitos T passem a reconhecer a célula tumoral e a eliminem. No entanto, deve-se estudar melhor os efeitos secundários, superar a barreira

da heterogeneidade antigênica de cada tumor e testar terapias combinadas.

Fernández [36], pesquisou os efeitos do silenciamento do gene MEK5, cuja expressão estava aumentada em pacientes com adenocarcinoma pulmonar, por via medicamentosa. combinados com o nocauteamento do gene da ERK5, sua quinase alvo, que promove a angiogênese e aumento do tumor. Isso resultou em diminuição significativa da proliferação de células de tumor pulmonar. Ma et al., [37] também realizou o nocauteamento do gene para o complexo proteico MECOM (MDS1 e EVI1), levando à inibição do surgimento de células tronco cancerígenas. Este complexo possui propriedades oncogênicas, promovendo proliferação celular e diminuindo a apoptose, atuando na transcrição do DNA e possui expressão aumentada em linhagens de células escamosas pulmonares cancerígenas.

Outras modificações genéticas também já foram relatadas, como a inserção de genes em determinadas regiões, como a realizada por Du et al., [38] que inseriram o gene da luciferase atrás do códon de parada do gene da metaloproteínase de matriz 12 (MMP12), envolvida na tumorigênese. Esta pesquisa tinha como objetivo criar um mecanismo que permitisse o monitoramento da atividade de MMP12, através da luciferase, enzima que quando oxidada emite luminosidade. A luciferase foi utilizada para testar a atividade inibitória da molécula Tansinona I sobre a transcrição do gene MMP12, podendo uma ferramenta útil na triagem de drogas para silenciar o gene MMP12.

Nguyen et al., [39] incluiu o gene B7-H3 em cultivos celulares para pesquisa. O antígeno B7-H3 é expresso pelo tumor pulmão, sendo reconhecido por linfócitos T com ligante CD28. A pesquisa pretendeu verificar se a adição de um ligante quimérico extra (CAR) melhoraria a atividade destas células. Foram testados o 41BB-CAR e 41BBL-CAR, sendo que o segundo apresentou uma potente atividade antitumoral, sendo muito superior ao CD28 sozinho. A inserção de mutações foi realizada por Escaron [40], no gene que codifica a chaperona Cosmc. A deleção de Cosmc em células de câncer de pulmão levou a uma alta expressão do antígeno Tn na superfície destas células, contribuindo com a angiogênese e com o recrutamento de células produtoras de IL-10 no microambiente tumoral. Estes dois efeitos promoveram o desenvolvimento de tumores mais agressivos.

A metilação da região promotora da transcrição dos genes dos receptores RIPK3 e MLKL, para redução da sua expressão foi aplicada por Zanetti [21]. Estes receptores são essenciais para induzir a necroptose, assim, quando esta se encontra suprimida, a progressão tumoral de neoplasias pulmonares é facilitada. A técnica de CRISPR/Cas9 mapeia a região promotora destes genes, ajudando a elucidar o seu mecanismo de modulação, havendo fortes indícios de que a ativação da sua transcrição seja dependente da fosforilação do fator de transcrição STAT1 e da sinalização via IFN-γ.

O aumento da expressão do receptor GPRC5A foi estudada por Mori [41]. Eles exercem um efeito supressor de tumores

pulmonares, por suprimir a síntese da proteína oncogênica EGFR, podendo aumentar a apoptose e inibir a viabilidade celular destas células.

Gonzalez [42], realizou a transferência de genes terapêuticos, proteína Nodulina 30-3 (NPv30-3), para o interior da célula cancerosa A549 (modelo de câncer pulmonar). O resultado foi uma redução da viabilidade das células cancerígenas de até 32%, pela indução de sua morte celular programada.

Por fim, outros mecanismos de ação da técnica CRISPR/Cas9 ainda precisam ser elucidados, como o estudado por Ribeiro [43], sobre receptor inibitório LAG3 de linfócitos T. Estes têm potencial de se combinar com a atividade dos receptores PD-1 para melhorar sua especificidade, identificou 3 proteínas capazes de interagir com ele, no entanto as pesquisas ainda se encontram em fase I. Ainda, Gamarra [44], pesquisou a amplificação do gene AHR está relacionado com a maior expressão deste gene em tecidos tumorais de pacientes com câncer de pulmão. A alteração da expressão dos receptores de AHR também está associada ao aumento das mutações dos principais oncogenes (EGFR) e genes supressores de adenocarcinoma pulmonar. O autor indica a necessidade de avançar nas pesquisas para melhor compreensão destas relações.

Com isso, verificou-se que as pesquisas publicadas se tratam, em sua totalidade, de ensaios de fase I (*in vitro*, com cultura celular) ou fase II (*in vivo*, com modelos animais). Ainda não há ensaios clínicos com testes em humanos em andamento. Grande parte dos resultados são promissores e os pesquisadores têm sugerido novas pesquisas incluindo combinações de técnicas para amplificar os resultados positivos. Alguns dos resultados foram inesperadamente negativos, não confirmando as hipóteses iniciais que estavam sendo testadas.

IV. CONCLUSÕES

Sabe-se que a técnica CRISPR/Cas9 é estudada apenas há pouco mais de uma década, e ainda assim já foi capaz de identificar uma grande gama de genes promissores na luta contra o câncer.

Este trabalho permitiu inferir que avanços positivos consideráveis estão ocorrendo neste campo. Quanto mais se avança nos estudos dos genes envolvidos na expressão deste tipo de neoplasia, mais informações refinadas são obtidas para detalhar melhor os experimentos, novas linhas de estudo para genes já conhecidos são estabelecidas e também surgem novas ideias a serem exploradas.

Este trabalho não esgota o tema pesquisado, mas traz uma gama de possibilidades relacionadas ao uso da técnica CRISPR/Cas9. Como ficou bem especificado o longo do texto, são vários os caminhos que aguardam ser trilhados por futuros pesquisadores interessados nesta área de pesquisa.

A popularização da edição gênica, futuramente pode ser uma alternativa menos agressiva aos tratamentos convencionais deste tipo de câncer, como a ressecção cirúrgica e aquelas que costumam gerar vários efeitos adversos, como a radioterapia e a quimioterapia. Assim as pesquisas atuais envolvendo a edição de marcadores epigenéticos que têm mostrado resultados positivos na diminuição da expressão gênica do câncer de pulmão, assumem o importante papel de divulgar este recurso tecnológico que pode ser considerado uma alternativa de tratamento que soma esforços com as já consolidadas e benéficas mudanças de comportamento, como cessação do tabagismo, incremento de atividade física e adesão a hábitos alimentares saudáveis.

V. REFERÊNCIAS

- [1] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: [s.n.], (Brasil). 2022. p. 160. [Online]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/estimativa-2023.pdf>.
- [2] G. Luo, Y. Zhang, J. E. txeberria, M. Arnold, X. Cai, Y. Hao, H. Zou. "Projections of lung cancer incidence by 2035 in 40 countries worldwide: population-based study". JMIR Public Health and Surveillance, vol. 9, nº e43651, pp. 1-15, October, 2023. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc9984998/>.
- [3] J. Ferlay. Observatório Global do Câncer: câncer hoje. Lyon, França: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, 2020. [Online]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>.
- [4] World Health Organization: Agency for Research on Cancer. Fact sheet. Nº 297. fevereiro 2009. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>.
- [5] A. Sganzerla, L. Pessini. "Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas". Saúde Debate, Rio de Janeiro, vol. 44, nº 125, pp. 527-540, agosto, 2020. [Online]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sdeb/a/8z84LrTTPq6Xzr77D3jtWDG/?lang=pt>.
- [6] A. Castillo. "Gene editing for the treatment of lung cancer (CRISPR-Cas9). Colombia Medica, vol. 47, nº4, pp.178-80, 2016. [Online]. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v47n4/1657-9534-cm-47-04-00178.pdf>.
- [7] THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/>.

- [8] A. S. R. Almeida, C. B. Souza. “Sistema CRISPR-Cas9: uma alternativa terapêutica para neoplasia pulmonar”. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, São Paulo, vol. 57, pp. 1-9, 2021. [Online]. Disponível em: https://jbpm.org.br/wp-content/uploads/2022/01/10.593516762444.20210051_PT.pdf.
- [9] V. C. I. Costa. *Anatomia Geral Humana*. Ribeirão Preto, 2008.
- [10] L. Medrado. *Carcinogênese - Desenvolvimento, Diagnóstico e Tratamento das Neoplasias*. São Paulo: Editora Saraiva, 2015. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536520827/>.
- [11] G. Matschinski, T. Mittelman, D. Zanini, d. “Câncer de pulmão e sistema purinérgico”. In: CARDOSO, A. M.; MANFREDI, L. H.; MACIEL, S. F. V. O., eds. *Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas* [online]. Chapecó: Editora UFFS, 2021, pp. 172-189. Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9786586545494.0010>.
- [12] A. J. Lechner, G. M. Matuschak, D. S. Brink. *Pulmões*. Porto Alegre: Grupo A, 2013. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788580552232/>.
- [13] J. B. West, A. M. Luks. “Fisiopatologia pulmonar de West: princípios básicos”. Porto Alegre: Grupo A, 2023. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786558820925/>.
- [14] M. C. Tammemagi, J.R. McLaughlin, S. B. Bull. “Metal analyses of p53 tumor suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancers”. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol.8, nº 7. pp. 625-34, 1999. [Online]. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cebpa/article/8/7/625/177780/Meta-Analyses-of-p53-Tumor-Suppressor-Gene>.
- [15] S. Gazzeri, V. Della Valle, L. Chaussade, C. Brambilla, C. J. Larsen, E. Brambilla. “The human p19ARF protein encoded by the beta transcript of the p16INK4a gene is frequently lost in small cell lung cancer”. *Cancer Research*, vol. 58, nº 17, pp. 3926-31, 1998. [Online]. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/58/17/3926/504332/The-Human-p19ARF-Protein-Encoded-by-the-Transcript>.
- [16] P. T. Cagle, A. K. el-Naggar, H. J. Xu, S. X. Hu, W. F. Benedict. “Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung”. *Potential diagnostic implications*. *The American Journal of Pathology*, vol. 150, nº 2, pp. 393-400, 1997. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1858295/>
- [17] L. Roz, M. Gramegna, H. Ishii, C. M. Croce, G. Sozzi. “Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, nº 6, pp. 3615-20, 2002. [Online]. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.062030799>
- [18] D. G. Burbee, E. Forgacs, S. Zöchbauer-Müller, L. Shivakumar, K. Fong, B. Gao. “Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression”. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 93, nº 9, pp. 691-9, 2001. [Online]. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article/93/9/691/2906562?login=false>
- [19] G. Ramaswamy, D. Li, G. Malachi, S. Janakiraman, D. D. Nathan, L. K. Krishna, A. M. Christopher, F. Robert, F. Lucinda, W. John, C. Ken, W. Jason, Mc. Sandra, B. Ron, O. David, X. Donghai, Y. Ming, J. D. David, W. Mark, R. M. Elaine, K. W. Richard. “Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-Smokers”. *Cell*, vol. 150, nº 6, pp. 1121-1134, 2012. [Online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412010227>.
- [20] C. M. Sogayar, S. M. Mariele, H. C. Jesus-Ferreira, C. Leal-Lopes, A. C. O. Carreira, R. A. C. Machado. “Edição Gênica Por Crispr/Cas9: da teoria à prática. São Paulo: Blucher, 2022. P. 80. [Online]. Disponível em: <https://openaccess.blucher.com.br/download-pdf/543>.
- [21] L. C. Zanetti. *Modulação gênica de RIPK3 e MLKL e seu impacto na sensibilidade a morte por necroptose*. 2021. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein, São Paulo, 2021. [Online]. Disponível em: https://conteudoensino.s3.sa-east-1.amazonaws.com/documentos/biblioteca/_trabalhos-academicos/2021/larissa-cardoso-zanetti.pdf.
- [22] A. F. Zambon, G. M. Bertoldi, L. C. E. de Almeida, L. dos santos, V. D. A. Teixeira, V. A. de oliveira. (2021, july). *tecnologia crispr-cas9: uma revisão acerca de perspectivas terapêuticas no câncer de pulmão e considerações para aplicação na transgenia humana*. In *Congresso Internacional em Saúde* (No. 8). [Online]. Disponível em: <https://publicacoeseventos.unijui.edu.br/index.php/conintsau/article/view/19025/17758>.

- [23] I. Mattos, S. Koifman. Capítulo 2-campos eletromagnéticos e câncer: contribuições das Ciências Biológicas. *Poluição Eletromagnética*, 2004.
- [24] H. Zhang, C. Qin, C. An, X. Zheng, S. Wen, W. Chen, Y. Wu. “Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of câncer”. *MOLECULAR Cancer*, vol. 20, pp. 126, 2021. [Online]. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12943-021-01431-6>.
- [25] G. E. F. Díaz, S. N. G. Benítez, M. A. M. Cruz. “Genes involucrados en el câncer pulmonar”. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 40, nº 2, pp. 125-135, 2021. [Online]. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002021000300018&script=sci_abstract&tlng=en.
- [26] D. Stefanoudakis, N. Kathuria-Prakash, A. W. Sun, M. Abel, C. E. Drolen, C. Ashbaugh, S. Zhang, G. Hui, Y. A. Tabatabaei, Y. Zektser, L. P. Lopez, A. Pantuck, A. Drakaki. “The Potential Revolution of Cancer Treatment with CRISPR Technology”. *Cancers*, vol. 15, nº 6, pp. 1813, 2023. [Online]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/6/1813>.
- [27] A. F. B. Biggi, P. U. Simioni, “Inibição da proteína PD-1 pelo método CRISPR-Cas9 como terapia antitumoral para tumores de pulmão de não pequenas células”. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, [S. l.], vol. 21, nº 1, pp. 2–7, 2019. [Online]. Disponível em: <https://revistas.pucsp.br/index.php/RFCMS/article/view/38943>.
- [28] M. M. Kadhim, A. A. Ramírez-Coronel, A. T. Jalil, H. A. Tal, J. Gupta, Z. H. Jawhar, M. M. Saleh, V. Pandey, X. Zhang, H. Khan. “Autophagy as a self-digestion signal in human cancers: Regulation by microRNAs in affecting carcinogenesis and therapy response”. *Pharmacological Research*, vol. 189, pp. 106695, 2023. [Online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661823000518>.
- [29] P. Bialk, Y. Wang, K. Banas, E. B. Kmiec. “Functional gene knockout of NRF2 increases chemosensitivity of human lung cancer A549 cells in vitro and in a xenograft mouse model”. *Molecular Therapy - Oncolytics Journal*, vol. 11, pp. 75–89, 2018. [Online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2372770518300263>.
- [30] B. Kawamura. “Avaliação de um novo candidato a fármaco para o tratamento do carcinoma de pulmão de células não pequenas”. 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. [Online]. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5167/tde-10122019-120952/pt-br.php.
- [31] L. F. R. D. S. Bruschi. “Desenvolvimento de linhagem humana de adenocarcinoma pulmonar knockout para o gene da Cofilina-1 via CRISPR/Cas9. 2019”. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019. [Online]. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/196699>.
- [32] H. Deng, S. Tan, X. Gao, C. Zou, C. Xu, K. Tu, Z. Zhang. “Cdk5 knocking out mediated by CRISPR-Cas9 genome editing for PD-L1 attenuation and enhanced antitumor immunity”. *Journal Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 10, nº 2, pp. 358 e 373, 2020. [Online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383519305477>.
- [33] C. P. F. dos Santos, “Establishment of a LRP1B-Knockout Human Cancer Cell Line Model with a CRISPR/Cas9 Approach”. 2020. 110 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Universidade do Porto, Portugal, 2020. [Online]. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/131937/2/440964.pdf>.
- [34] V. Cazzetta, E. Bruni, S. Terzoli, C. Carenza, S. Franzese, R. Piazza, D. Mavilio. “NKG2A expression identifies a subset of human Vδ2 T cells exerting the highest antitumor effector functions”. *Cell Reports*, vol. 37, pp. 109871, 2021. [Online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124721013383>.
- [35] M. T. Manzano. “Optimización de la inmunoterapia antitumoral con células CAR-T mediante el control de la expresión génica”. 2021. 250 f. Tese (Doutorado) – Universidad de Granada, Espanha, 2021. [Online]. Disponível em: <https://digibug.ugr.es/handle/10481/70153>.
- [36] A. S. Fernández. “The mek5/erk5 pathway in lung and ovarian câncer”. 2021. 189 f. Tese (Doutorado) – Universidad de Salamanca, Espanha, 2021. [Online]. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=302651>.
- [37] Y. Ma, B. Kang, S. Li, G. Xie, J. Bi, F. Li, G. An, B. Liu, J. Li, Y. Shen, X. Xu, H. Yang, Y. Yang, Y. Gu, N. Wu. “CRISPR-mediated MECOM depletion retards tumor growth by reducing cancer stem cell properties in lung squamous cell carcinoma”. *Molecular Therapy*, vol. 30, pp. 3341–3357, 2022. [Online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001622003719>.

[38] C. Du, Y. Wu, Y. Ju, J. Zhao, P. Yang, Q. Mao, H. Xia. “The luciferase reporter system of the MMP12 endogenous promoter for investigating transcriptional regulation of the human MMP12 gene”. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 43, pp. 55–61, 2020. [Online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345819300521#section-cited-by>.

[39] P. Nguyen, E. Okeke, M. Clay, D. Haydar, J. Justice, C. O'Reilly, S. Pruett-Miller, J. Papizan, J. Moore, S. Zhou, R. Throm, G. Krenciute, S. Gottschalk, C. DeRenzo. “Route of 41BB/41BBL costimulation determines effector function of B7-H3-CAR.CD28 ζ T cells”. *Molecular Therapy Oncolytics*. Vol. 18, pp. 202–14, 2020. [Online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2372770520300978#section-cited-by>.

[40] V. D. C. Escaron, “Rol angiogénico e imunomodulador del antígeno Tn durante el crecimiento tumoral”. 2020. 158 f. Tese (Doutorado) – Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas, Universidad de la República Uruguay, Montevideo, 2020. [Online]. Disponível em: www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/27668/1/uy24-19915.pdf.

[41] C. Mori. “Regulación del gen PEIG-1/GPRC5A por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato”. 2020. 109 f. Tese (Doutorado) – Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2020. [Online]. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/107365>.

[42] A. J. G. Gonzalez, “Desarrollo de una formulación inhalable del sistema Ad5-NPv30-3 como potencial estrategia génica para el tratamiento de cáncer pulmonar”. 2022. 125 f. Dissertação (Mestrado) – Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, 2022. [Online]. Disponível em: <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/3042>.

[43] P. R. Ribeiro, “Screening de proteínas com potenciais interações com o receptor inibitório Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG-3)”. 2020. 132 f. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, 2020. [Online]. Disponível em: <https://ninho.inca.gov.br/jspui/handle/123456789/9121>.

[44] M. H. Gamarra. “Análisis genómico-funcional del receptor hidrocarburos de arilos AHR en el cáncer pulmonar: relación con las terapias dirigidas contra el oncogén EGFR”. 2021. 48 f. Trabalho final de graduação em Biotecnologia – Universitat Politècnica de València, Espanha, 2021. [Online]. Disponível em: <https://riunet.upv.es/handle/10251/171192>.