Uso da técnica de CRISPR/CAS9 no tratamento do câncer de pulmão: uma revisão integrativa

Use of Crispr/Cas9 technique in the treatment of lung cancer: an integrative review

Emilly Alioncio Pijak[1], Jacqueline Fátima Martins de Almeida[1]
[1]Curso de Biomedicina da Universidade Paulista, Campinas-SP, Brasil.

Resumo

Objetivo – Verificar a eficácia do uso da técnica de CRISPR/Cas9 no tratamento do câncer de pulmão por meio de uma revisão integrativa. O câncer de pulmão, é a segunda neoplasia de maior incidência e que mais leva a óbito no mundo. É dividido em quatro grupos histológicos: carcinoma de grandes células, carcinoma de pequenas células, escamoso e adenocarcinoma. O seu desenvolvimento ocorre, além de fatores de risco exógenos, como o tabagismo, principalmente por causa de fatores endógenos genéticos como a ativação de oncogenes-chaves que estão diretamente envolvidos no processo de tumorigênese e na progressão tumoral. A técnica de CRISPR/Cas9, é uma técnica de edição genômica inovadora, que tem sido estudada como possível modalidade de tratamento para diversos tipos de cânceres, entre eles no câncer de pulmão. Uma nova alternativa que possibilita o nocaute e clivagem desses oncogenes e genes de supressão tumoral responsáveis pelo processo de tumorigênese. **Métodos** – Para isso, foi realizada uma revisão da literatura com a análise de 20 artigos científicos publicados em bases de dados como PubMed/MEDLINE, Science Direct e Scielo, no período de 2000 a 2021, que utilizaram a técnica de CRISPR/Cas9 no câncer de pulmão. Dentre eles, 15 estudos eram testes *in vitro*, 3 testes *in vivo* em camundongos e 2 estudos pioneiros no teste em humanos. **Resultados** – 10 dos estudos (50%) desmonstram que a edição por nocaute ou clivagem de oncogenes podem causar uma diminuição na progressão tumoral, no tamanho do tumor e até diminuição da metástase. Os dados mostram que ao nocautar um dos genes responsável pela progressão tumoral como, EGRF, receptor do fator de crescimento epidérmico, é capaz reduzir o tamanho do tumor em até 81,5%. **Conclusão** – Os resultados até o momento têm demonstrado que o uso da técnica de CRISPR/Cas9, com a edição de oncogenes, é eficaz no combate ao câncer de pulmão. Sendo assim, com maiores comprovações em estudos clínicos em seres humanos, esta se torna uma promissora nova modalidade de tratamento, já que apresenta muitas vantagens em relação aos métodos convencionais como, quimioterapia ou ressecamento cirúrgico.

Descritores: Carcinoma pulmonar; Oncogenes

Abstract

Objective – To verify the effectiveness of the use of the CRISPR/Cas9 technique in the treatment of lung cancer through an integrative review. Lung cancer is the second most common neoplasm and the one that causes the most deaths in the world. It is divided into four histological groups: large cell carcinoma, small cell carcinoma, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Its development occurs, besides exogenous risk factors, such as smoking, mainly because of endogenous genetic factors such as the activation of key oncogenes that are directly involved in the process of tumorigenesis and tumor progression. The CRISPR/Cas9 technique is an innovative genomic editing technique that has been studied as a possible treatment modality for several types of cancers, including lung cancer. A new alternative that allows the knockout and cleavage of these oncogenes and tumor suppression genes responsible for the tumorigenesis process. **Methods** – For this, a literature review was performed with the analysis of 20 scientific articles published in databases such as PubMed/MEDLINE, Science Direct and Scielo, in the period from 2000 to 2021, which used the CRISPR/Cas9 technique in lung cancer. Among them, 18 studies were *in vitro* tests, 3 *in vivo* tests in mice, and 2 studies pioneered testing in humans. **Results** – 10 of the studies (50%) demonstrate that editing by knockout or cleavage of oncogenes can cause a decrease in tumor progression, tumor size, and even decreased metastasis. The data show that by knocking out one of the genes responsible for tumor progression such as, EGRF, epidermal growth factor receptor, it is able to reduce tumor size by up to 81.5%. **Conclusion** – The results so far have shown that the use of the CRISPR/Cas9 technique, with oncogene editing, is effective in fighting lung cancer. Thus, with further proof in human clinical trials, this becomes a promising new treatment modality, since it has many advantages over conventional methods such as chemotherapy or surgical resection.

Descriptors: Lung carcinoma; Oncogenes

Introdução

Desde a década de 1980 o câncer de pulmão tem ficado evidente entre a população mundial. Atualmente a neoplasia com maior índice de mortalidade, sendo no Brasil considerado o câncer de segunda maior incidência. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) a estimativa de incidência para novos casos está em torno de 30.200, sendo dessas 12.440 mulheres e 17.760 homens[1].

O câncer de pulmão é dividido em 4 grupos histológicos onde considera-se a característica da célula para classificação como, carcinoma de grandes células, escamoso, adenocarcinoma e câncer de pequenas células. Sendo o último o menos comum e mais perigoso, com um crescimento rápido e agressivo[1,2].

Estudos mostram que o tabagismo é um dos principais fatores que levam ao desenvolvimento do câncer de pulmão, além dos fatores hereditários. Um estudo feito com a população da Espanha em 2016 mostrou que 1 em cada 7 mortes era atribuída ao Tabagismo, esse número foi estimado com os dados da Pesquisa Espanhola de Saúde (2016) e da Pesquisa Europeia de Saúde (2014)

onde atribuíram 56.124 mortes ao tabagismo, desses 84% homens e 50% mulheres[3]. Pessoas não fumantes, mas como histórico familiar tem menor chances de desenvolver câncer que uma pessoa fumante, sem histórico. O risco aumenta em pelo menos 30% quando associa se ambos os fatores. Outros importantes fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão são, genética, inalação de fumaça (fumante passivo), poluição atmosférica e até exposição ocupacional, uma vez que trabalhadores expostos a sílica, cromo, níquel, e arsênico tem grandes chances de desenvolverem a neoplasia[3].

Há dois tipos de genes envolvidos na formação de tumores pulmonares, os oncogenes e os genes de supressão tumoral. Os oncogenes são denominados genes celulares disfuncionais. São originados a partir dos proto-oncogenes devido a uma mutação ou superexpressão. Os proto-oncogenes são expressos em 5 categorias: proteínas controladoras de ciclo celular, fatores de crescimento, tradutores de sinais intracelulares, receptores para fatores de crescimento ou hormônios e fatores de transcrição nuclear. Logo, por relacionar-se principalmente com fatores de crescimento, quando sofrem alguma mutação, acaba ocorrendo uma produção anormal de tais fatores, resultando em um aumento celular descontrolado e passam a ser denominados oncogenes[4].

Os genes de supressão tumoral são responsáveis por retardar a divisão celular, indicar células defeituosas que devem sofrer apoptose (morte programada) e reparação do DNA de modo a controlar o crescimento celular. Porém, quando esses genes se encontram ausentes ou apresentem algum defeito no cromossomo em que se encontram, são capazes de gerar um efeito cancerígeno, uma vez que sem eles ocorre um descontrole no crescimento[4].

Os principais oncogenes envolvidos no processo tumoral do pulmão são derivados da mutação dos proto-oncogenes como *ERB-B1* quando tem sua expressão aumentada, *ERB-B2*, *N-MYC*, *L-MYC* quando amplificados e *K-RAS* quando sofre mutação pontual. Já os principais genes de supressão tumoral são, *NF-1*, *RB* e *TP53*, uma vez que se encontram inibidos ou defeituosos atuam na tumorigênese[5].

O tratamento escolhido para tratar o paciente irá depender do tipo histológico e do estágio em que se encontra. Os canceres de células não pequenas (NSCLCs) em estágios I e II são encaminhados para ressecamento cirúrgico, apresentando bom prognóstico. Já quando o mesmo se encontra em estágio mais avançado que inclui metástase é indicado tratamentos como radioterapia, quimioterapia ou terapia-alvo[6].

O câncer de células pequenas (SCLCs) é raro e agressivo, sendo sempre diagnosticado em estágios avançados. Por esse motivo, o ressecamento cirúrgico não é uma opção, tornando necessário um tratamento intensivo com quimioterapia ou radioterapia. Mesmo sendo um câncer sensíveis a tais métodos de tratamentos, as chances de cura são poucas, e mesmo tendo uma resposta inicial, após um tempo o paciente apresenta recaída e cede a doença[6].

Atualmente, além dos tratamentos considerados convencionais para o tratamento de câncer, está sendo utilizado e estudado com mais afinco a técnica de CRISPR/Cas9. Esta técnica foi descrita em 2012, e se baseia na imunidade adaptativa de bactérias, na qual o lócus genômico CRISPR (Sigla do inglês: *Clustered Regularly Iterspaced Short Palindromic Reapts*) são usados como memória imunológica na clivagem do material genético de bacteriófagos invasores com a expressão do complexo enzimático de endonucleases Cas[7]. Visto a vantagens das bactérias em defesa contra bacteriófagos, estudos foram realizados por um longo tempo, com objetivo de desenvolver essa vantagem em humanos, ou seja, utilizar o CRISPR para tratar doenças e até evitá-las. Uma de suas utilizações está sendo para o tratamento de diversos cânceres, como câncer de mama, pulmão, câncer de ovário metastático e glioblastoma. Sendo os dois últimos, os primeiros estudos realizados em *in vitro* e *in vivo*, onde após pesquisas e testes foi possível observar diminuição na proliferação descontrolada, apoptose, inibição do crescimento celular e até sensibilização a quimioterapia[8].

Diversos grupos de estudos investigam a eficácia do uso da técnica de CRISPR para o tratamento do câncer de pulmão, desde estudos *in vitro* a *in vivo* com camundongos xenoenxertados a fim de encontra um método 100% eficaz que garanta um bom prognóstico aos pacientes[9-11].

Um dos primeiros estudos a trabalhar com essa linha de raciocínio foi realizado pela Taeyoung Koo do Centro de Engenharia Genômica da Coréia, juntamente com outros colegas. Nesse estudo é demonstrado como o nocaute de um gene diretamente relacionado a função de crescimento celular (*EGFR*), é eficaz no combate à proliferação neoplásica e crescimento celular descontrolado[9]. Também se encontram estudos relacionados com o nocaute de oncogenes envolvidos no processo de sensibilização das células neoplásicas (*NFR2*), que permitem que os quimioterápicos atuem de modo eficaz. E os genes de supressão, como *Trp53* e *RB1* cujo efeito produzido através no nocaute foi um aumento da carga tumoral[10,11].

Atualmente, já foi realizado 1 teste clínico em humanos, que apresentou um bom resultado e contribuiu com os estudos até então desenvolvidos. O teste realizado com essa técnica foi em 2016 na China, onde um paciente com um câncer de pulmão agressivo foi alvo de estudo. Com ajuda da técnica de CRISPR/Cas9, os linfócitos T modificados foram injetados no paciente, pois através da inibição de uma proteína específica foi possível fazer com que os linfócitos agissem contra o câncer, com objetivo de derrotá-lo[12].

A presente revisão integrativa tem como objetivo verificar a eficácia do uso da técnica de CRISPR/Cas9 no tratamento do câncer de pulmão e sua contribuição para os tratamentos quimioterápicos e radioterápicos.

Métodos

Trata-se de uma revisão integrativa, com busca ele-

trônica de artigos científicos publicados nas bases de dados, como PubMed/MEDLINE, Science Direct e Scielo. Foram incluídos artigos publicados no período de 2016 e 2021. Para realização das buscas foram utilizadas palavras chaves e suas combinações "CRISPR", "CRISPR/Cas9", "Câncer de pulmão", "oncogenes" e "Knockout".

Foram incluídos apenas artigos originais, publicados em inglês, espanhol ou português. Foram incluídos artigos que continham testes clínicos, *in vivo*, em pacientes com câncer de pulmão e os testes em animais e estudos *in vitro*. Os artigos encontrados deveriam conter dados e informações relevantes a respeito das questões abordadas como, tratamentos do câncer de pulmão, testes que envolvam a técnica de CRISPR/Cas9, no que se baseia a técnica e como está sendo o desenvolvimento da mesma atualmente. Também deveriam estar dentro do período de publicação e conter as fontes de pesquisa que autor teve acesso para o desenvolvimento do artigo, para o caso de buscas mais aprofundadas sobre o assunto. No caso de artigos com testes clínicos, especificamente, deveriam conter os genes alvos a serem trabalhados, o método de edição utilizado, os tipos de células utilizadas para testes *in vitro*, quais cobaias seriam utilizadas nos testes *in vivo* e os resultados obtidos após aplicação da técnica.

Inicialmente foram encontrados um total de 1.300 artigos, os que se encontravam duplicados nas plataformas de base de dados foram excluídos, restando 96 para leitura de títulos e resumos, onde deveriam conter informações de interesse a respeito do tema como, o câncer de pulmão, dados epidemiológicos, tratamentos, tenha utilizado a técnica de CRISPR/Cas9 e por fim sua utilização no tratamento do câncer de pulmão. Os que não se encaixavam no estudo foram excluídos, restando 72 artigos. Após leitura na íntegra, foram selecionados para compor o estudo 20 artigos (Figura 1).

Após seleção desses artigos foram coletadas informações como: Autor, tipo de estudo, espécie utilizada, oncogene de estudo e resultados.

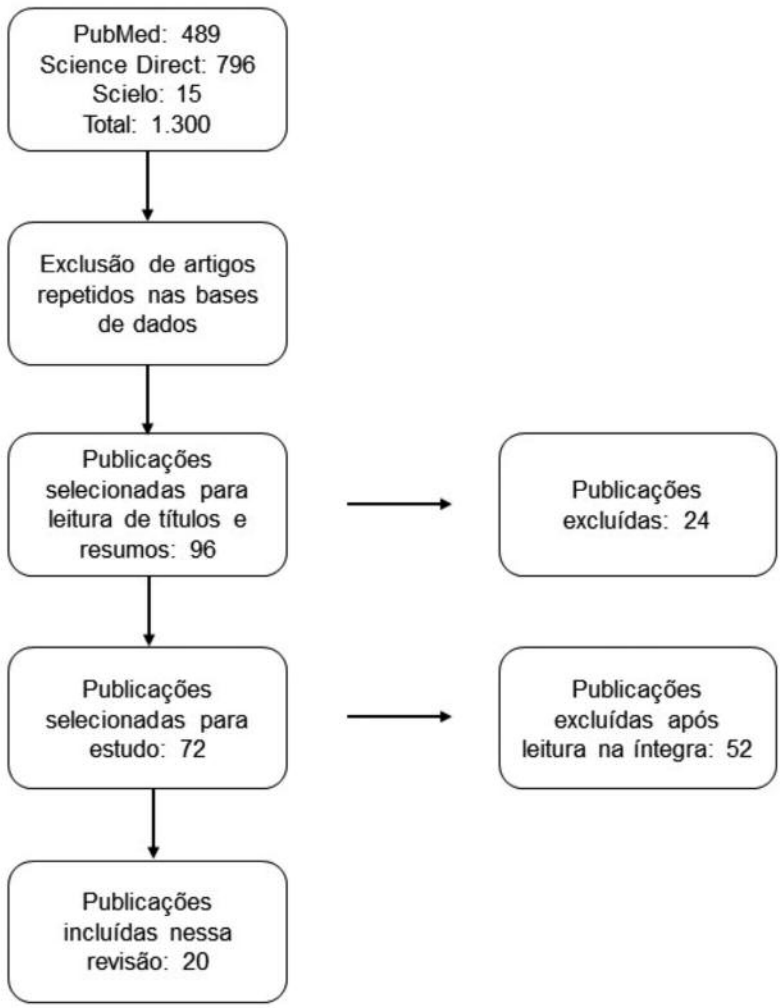

Figura 1. Fluxograma dos critérios de seleção.

Resultados

Os 20 artigos encontrados continham estudos clínicos demonstrando teste em diferentes genes, que estão diretamente envolvidos com tumorigênese do pulmão. Dos 20 artigos, 15 eram teste *in vitro* (Tabela 1), desses, 5 também *in vivo*, juntamente com mais 3 artigos envolvendo estudos *in vivo*, totalizando 8 testes (Tabela 2). Além de 2 artigos contento os primeiros testes em humanos, utilizando CRISPR/Cas9 para tratamento do câncer de pulmão. Ao total foram estudados 18 genes, sendo a maioria oncogenes e apenas 6 sendo genes de supressão. O principal método utilizado foi nocaute, tirando apenas um, cujo método utilizado foi clivagem do material genético.

Nos estudos *in vitro* linhagens de células H1975, NCL-H1650, NSCLC-KRAS, H1299, A549, H2009, HCC44, HCC827, 143B, MCF7, H460, H522, SW480, SW620 e Células de Lewis foram utilizadas. Os genes alvos foram 12 oncogenes, sendo eles EGFR, EGFR com mutação pontual (L858R), FAK, NESTIN, RSF-1, CTNND2, TPX2, MCM4, SLC2A1, BIRCS, CDC20, IGF1R, NRF2, ERCC1, AURORA-B E KRAS. Os genes de supressão incluem GOT1, MFN2, miR-1304. Nos testes *in vivo*, foram utilizados camundongos xenoenxertados, camundongos B6/C57 e camundongos nus BALB, todos contendo células mutadas como H1975, A549, H1299, H1650, células de adenocarcinoma e células de Lewis. Os oncogenes de estudos foram EGFR,

Tabela 1. Estudos *in vitro* de edição de genes utilzando CRISPR/Cas9

Autor	Gene Alvo	Função	Tipo de células	Método de edição	Efeito
Koo T et al[9]	EGFR	oncogene	H1975 e A549	Nocaute	disrupção e apoptose.
Cheung AH-K[13]	EGFR (L858R)	oncogene	NCL – H1650	clivagem	redução da proliferação.
Tang K-J et al[14]	FAK	oncogene	NSCLC - KRAS	Nocaute	Danos no DNA e suscetibilidade a radiação ionizante.
Lee W[15]	KRAS	oncogene	SW620 e SW480	Nocaute	Inibição da proliferação de células cancerosas.
Chen X et al[16]	RSF-1	oncogene	NSCLC, A549 e H1299	Nocaute	Diminuição de células na fase S, inibição da passagem de células da fase G1 para S e apoptose.
Huang F et al[17]	CTNND2	oncogene	Células de Lewis, A549	Nocaute	Inibição da δ – catenina (oncogene que promove malignidade no adenocarcinoma).
Yi J et al[18]	TPX2, MCM4, SLC2A1, BIRC5 e CDC20	oncogene	H2009 e HCC44	Nocaute	Repressão do crescimento celular e inibição proliferação.
Hussmann D et al[19]	IGF1R	oncogene	HCC827	Nocaute	Diminuição da resistência ao fármaco erlotinibe.
Heyza JR et al[20]	ERCC1	oncogene	H1299, H460 e H522	Nocaute	Aumento da sensibilidade ou hipersensibilização das células a cisplatina
Yu J21	AURORA B	oncogene	NSCLC	Nocaute	Ressensibilização das células aos quimioterápicos paclitaxel e cisplatina
Liu F et al[22]	NESTIN	oncogene	H1299 e A549	Nocaute	Inibição do cresecimento e proliferação. Apoptose
Bialk P[10]	NRF2	oncogene	A549	Nocaute	Aumento da quimiosensibilidade das células.
Zhou X et al[23]	GOT1	Gene de supressão	A549 e 143B	Nocaute	Inibição do crescimento de células cancerosas e sua migração.
Xu K et al[24]	MFN2	Gene de supressão	MCF7 e A549	Nocaute	Contribui para formação de colônias e invasão de células cancerosas, aumento da migração celular
Li CG et al[25]	MiR-1304	Gene de supressão	A549 e H1975	Nocaute	Aumento na expressão de hemeoxigenase-1 (HO-10) e cresciemento de NSCLC

Tabela 2 – Estudos *in vivo* de edição de genes utilizando CRISPR/Cas9

Autor	Gene Alvo	Função	Tipos de células	Método de edição	Espécie	Efeito
Koo T et al[9]	EGFR	Oncogene	H1975 e A549	Nocaute	Camundongo xenoenxertado	Redução no tamanho do tumor
Bu X et al[26]	CD38	Oncogene	A549 e H1299	Nocaute	Camundongo xenoenxertado	Supressão da progressão tumoral
Cheung AH-K[13]	EGFR (L859L)	Oncogene	H1650	Nocaute	Camundongos Formação de tu-	mores menores, redução da carga tumoral
Huang F et al[17]	CTNND2	Oncogene	Células de Lewis e A549	Nocaute	Camundongos B6/C57	perda da – catenina, inibição tumorigênese e metástase
Bialk P[10]	NRF2	Oncogene	A549 e H1299	Nocaute	Camundongos	Aumento da quimiosensibilidade
Xu K et al[24]	MFN2	Gene de supressão	A549 e H1299	Nocaute	Camundongos nus BALB	Progressão tumoral
Romero R et al[27]	KEAP1	Gene de supressão	LUAD (adenocarcinoma)	Nocaute	Camundongos	Aumento da carga tumoral e proliferação
Ng SR et al[11]	Trp53 e RB1	Gene de supressão	NR	Nocaute	Camundongos	Aumento da carga tumoral

EGFR (L858R) NRF2 CTNND2 e CD38. Já os genes de supressão incluem MFN2, KEAP1, TRP53 e RB. O método de edição utilizado foi nocaute, apenas um optou pelo método de clivagem que foi demonstrado no estudo de Cheung et al[13]. Os vetores utilizados pelos pesquisadores incluem adenovírus, plasmídio e lentivírus.

Através dos estudos, foi possível dividir os resultados em dois grupos de efeitos principais: os oncogenes, que quando nocauteados foram relacionados a inibição do crescimento celular, proliferação, aumento da divisão celular e metástase, como: EGFR, EGFR(L858R), KRAS, RSF-1, CTNND2, TPX2, MCM4, SLC2A1, BIRCS, CDC20, NESTIN e CD38. E ainda aqueles que foram relacionados com a sensibilidade e resistência a medicamentos quimioterápicos e radioterápicos, que são FAK, IGFR1, ERCC1, AURORA B e NRF2.(Figura 2)

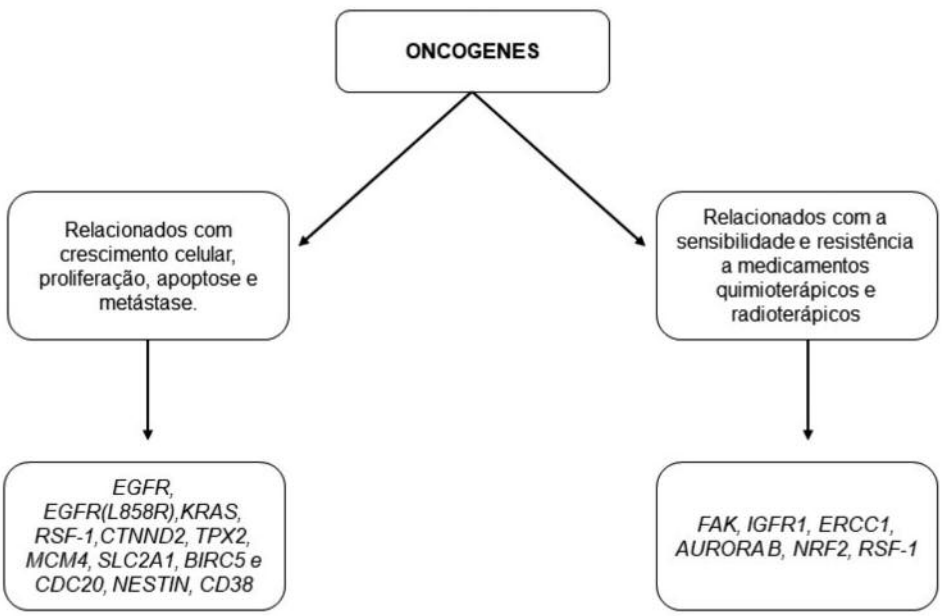

Figura 2. Aplicação dos oncogenes utilizados

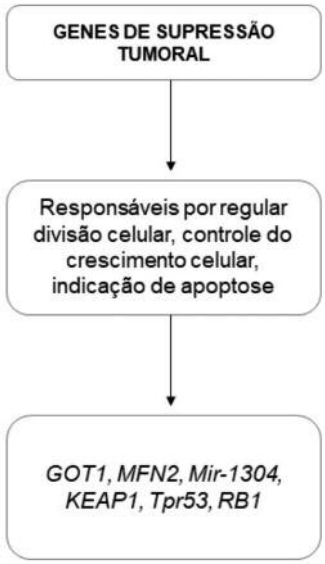

Figura 3. Aplicação dos genes de supressão tumoral

Também foi possível definir que através do nocaute dos genes de supressão tumoral estudados, houve um aumento na progressão tumoral, contribuição para que ocorresse mestástase e aumento da carga tumoral, mostrando a importância do papel de genes para regulação celular.(Figura 3)

Os principais oncogenes estudados estão relacionados com a capacidade das células neoplásica de proliferarem e de progredir para metástase sendo eles EGFR, EGFR (L858R), KRAS, RSF-1, CTNND2, TPX2, MCM4, SLC2A1, BIRC5 e CDC20, NESTIN e CD38.

Em quatro dos estudos clínicos realizado, o vetor utilizado para transfecção de células foi plasmídeo contendo os segmentos de RNA do gene alvo, com exceção ensaio realizado pela Koo T et al, onde além do vetor plasmidial contendo o segmento de RNA do gene, também trabalhou com um vetor de adenovírus para expressar a Cas9.

A começar pelos estudos da Koo T et al, que realizou os dois experimentos demonstrando que o gene EGFR, receptor do fator de crescimento epidérmico, tem um papel crítico na progressão tumoral, sendo responsável por 15% de 85% dos NCSLC. Desse modo, a utilização da técnica de CRISPR/Cas9 através do vetor de adenovírus injetado em células H1975 e A549 teria como objetivo nocautear esse gene. No estudo *in vivo*, tumores foram implantados em camundongos nus por injeção subcutânea de células H1975 e A549, que após alcançarem o tamanho desejado, ocorreu a implantação do vetor. Os resultados obtidos mostraram que o Cas9 específico da mutação de EGFR reduziu o tamanho do tumor em 81,5% e 78,3%, em comparação com os controles. Ou seja, o sistema CRISPR foi capaz de clivar e interromper o oncogene EGFR com alta precisão, levando a uma redução significativa do crescimento do tumor[9].

O nocaute do gene CD38 foi demostrado por Bu X, *in vivo*, uma vez que esse gene é responsável por atividades enzimáticas que são necessárias para o crescimento e migração de células malignas. O mesmo estudo mostrou que a exclusão do gene ARH1 promove a formação de tumores espontâneos. Para realização do estudo, linhas de células A549 e camundongos nus xenoenxertados foram utilizados e o resultado obtido foi uma redução na progressão tumoral, mostrando que uma deficiência de CD38 inibir diretamente o desenvolvimento de tumor em camundongos[26].

Chen X, realizou teste utilizando CRISPR/Cas9 visando o nocaute do oncogene RSF-1, muitas vezes amplificado ou superexpresso em vários tipos de canceres. O estudo se baseou em transfectar células H460 e H1299, e nocautear a expressão de RSF-1, o que resultou em uma diminuição dos níveis do oncogene, aumento da apoptose, aumento das células na fase G1e diminuição de células na fase S, pois houve inibição da migração de células da fase G1 para S[16].

Huang F, por sua vez trabalhou com aproteína δ- Catenina codificado pelo gene CTNND2. A δ- Catenina, pode ser um biomarcador para câncer, pois em vários tipos de canceres encontra-se superexpressada. Foram utilizadas linhas de células de Lewis e A549 para estudo *in vitro* e camundongos B6/C57 para estudo *in vivo*, foram demostrados que ao utilizar CRISPR/Cas9 para nocauteado o gene CTNND2 ocorre uma inibição na expressão de δ- Catenina e por consequência inibição da tumorigênese e mestástase[17].

Dois estudos tiveram como utilização de vetores lentivírais como veículo de nocaute. O teste realizado utilizando uma mutação pontual no gene EGFR, L858R, ministrado por Cheung AH-K. A diferença de seu estudo para os demais autores é que seu método de edição utilizado foi a clivagem, assim seu objetivo foi cortar a região do DNA responsável pela mutação pontual. Seu

estudo mostrou que L858R é responsável por 42,5% dos adenocarcinomas de pulmão em asiáticos e que ao injetar um vetor lentivírus anti-L858L houve uma diminuição na proliferação e morte celular onde L858R foi completamente clivado. Além disso, camundongos com células cancerosas tratados com o vetor, tiveram formação de tumores menores[13].

O oncogene KRAS, está associado á proliferação de vários tipos de câncer, o que torna um alvo perfeito para CRISPR/Cas9. De acordo com os testes realizados pelo Lee We, ao utilizar CRISPR/Cas9 para nocautear o oncogene KRAS através do vetor lentiviral, as linhas de células SW620 e SW480 que continham o gene mutável ao serem transfectadas, apresentaram inibição da proliferação das células cancerosas[15].

Nos estudos de Yi J e Liu F não foi relatado o tipo de vetor utilizado como veículo de transfecção das culturas de células.

Yi J, identificou os genes TPX2, MCM4, SLC2A1, BIRCS E CDC20 como direcionadores de câncer de pulmão que se associam a baixa taxa de sobrevida dos pacientes, quando se apresentam superexpressos, o que os tornou alvos perfeitos para testes de nocaute utilizando CRISPR. O estudo em questão, utilizou linhas de células LUAD H2009 e HCC44 para transfecção, e observou-se que ao nocautear esses genes, ocorre inibição da proliferação das células e repressão no crescimento celular[18].

O estudo realizado por Liu F, utilizou linhas de células A549 e H1299, onde através do vetor direcionado de CRISPR/Cas9 foi causado o nocaute do oncogene. Os resultados obtidos com o nocaute mostraram inibição do processo de proliferação celular e na formação de colônia, também causou um aumento na apoptose[22].

Também foram estudados oncogenes que estão diretamente relacionados com a capacidade de sensibilização e resistência de fármacos utilizados na quimioterapia e radioterapia, auxiliando no aumento da eficácia dos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos. Os oncogenes estudados foram FAK, IGF1R, ERCC1, AURORA B e NRF2.

Tang K-J realizou um estudo onde células NSCLC mutadas pelo gene KRAS foram transfectadas com vetor lentiviral que continham segmentos de RNA contra o oncogene FAK. Os resultados mostram que o gene FAK quando inibido é responsável por um aumento da fase G2 do ciclo celular de células NSCLC -KRAS, além de aumentar as a suscetibilidade das células a radiação, facilitando os efeitos citotóxicos e melhorando assim o tratamento radioterápico. Todos os testes foram confirmados com estudos *in vivo*, onde ratos nus atípicos xenoenxertados foram tratados com doses de radiação e perceberam que a remoção do oncogene FAK prejudicou o crescimento do xenoenxerto[14].

Hussmann D, através de estudos investigou o envolvimento de IGF1R na resistência adquirida ao erlotinibe, inibidor de EGFR em a linha de células HCC827 de adenocarcinoma de pulmão mutado por EGFR. Observou-se então, que a resistência adquirida ao erlotinibe em HCC827 está associada ao aumento da expressão de IGF1R e hiperativação do receptor. Para confirmar, foi realizado o nocaute do oncogene através da transfecção das células com vetor plasmidial contento segmentos de RNA do gene a ser nocauteado. O resultado obtido mostrou que ao causar o nocaute do oncogene, ocorre uma diminuição da resistência ao fármaco erlotinibe, permitindo que ele atue inibindo a EGFR ajudando no tratamento do câncer de pulmão. Para analisar a eficácia do nocaute, células HCC827 que tiveram o oncogene removido foram submetidas a exposição transitória de erlotinibe por 24-72 horas e se mostraram significativamente mais sensíveis[19].

Em seu estudo, Heyza JR trabalhou com o oncogene ERCC1 que foi investigado como biomarcador para eficácia da quimioterapia á base de platina. Um mecanismo proposto de resistência á cisplatina envolve o aumento da expressão de ERCC1. Para comprovar tal proposição, foi realizado um estudo *in vitro*. Linhas de células H1299, H460, H522, H1703, H1650, H358 foram utilizadas e transfectadas com vetor lentiviral com objetivo de nocautear o oncogene ERCC1 expressado e aumentar a sensibilidade á cisplatina. Os resultados obtidos mostraram que nas células H522, A549 e H460 houve um grande aumento na sensibilização ou hipersensibilização, enquanto nas células H1703, H358 e H1299 houve apenas um aumento modesto da sensibilização á cisplatina[20].

Yu J, demostrou o envolvimento Aurora quinase B (Aurora B), um regulador da mitose, a resistência aos medicamentos quimioterápicos, associando ao prognóstico de pacientes com NSCLC. Observou-se que câncer de células não pequenas apresenta superexpressão de Aurora-B, o que também leva resistência a quimioterapia resultando em um mau prognóstico após tratamento. Visando inibir a ação do oncogene, o sistema CRISPR foi utilizado com objetivo de nocautear o Aurora B. Após a transfecção das células com o vetor e o nocaute do oncogene, foi possível obter a ressensibilização das mesmas á quimioterápicos como paclitaxel e cisplatina. Além disso, através de uma análise de triagem celular ativada fluorescente das células transfectadas e que tiveram a oncogene em questão demonstrou que o tratamento com quimioterapia resultou em apoptose[21].

Bialk P, também estudou um gene que está diretamente envolvido na resistência aos fármacos quimioterápicos. O NRF2, fator nuclear 2, é considerado o principal regulador de 100 a 200 genes alvos que estão envolvidos nas respostas celulares ao estresse oxidativo ou eletrofílico e é um dos mais importantes genes envolvidos no controle de fluxo ou inativação das drogas. Foi demonstrado que o aumento da expressão NRF2 leva à resistência das células cancerosas a drogas quimioterápicas, incluindo cisplatina. Nesse estudo, o objetivo foi era nocautear o oncogene NRF2 em linhas de células A549 e em camundongos xenoenxertados. As células foram transfectadas com vetor plasmidial. Os resultados obtidos *in vitro* foram redução da proliferação e aumento da sensibilidade a agentes quimioterápicos. *In vivo*, a proliferação foi mais lenta, mesmo

sem tratamento, também houve um aumento da apoptose quando os tumores são[10].

Nos estudos voltados a função dos genes de supressão tumoral e sua impotância nos processos de tumorigênese, foram analisados os genes GOT1, MFN2, Mir-1304, KEAP1, Tpr53 e RB1.

Em seus estudos Zhou X, mostrou que a glutamato oxaloacetato transaminase 1, GOT1, a qual regula o metabolismo celular possui um papel importante na adaptação metabólica das células cancerosas. Linhas celulares A549 e 143B foram utilizadas para estudos *in vitro*, onde após causarem o nocaute de GOT1 observou-se uma indução a morte celular semelhante a uma isquemia rápida, pois houve uma privação de glicose, levando a dependência e maior vulnerabilidade a baixos níveis de nutrientes. Sendo assim, a regulação negativa do gene GOT1 inibi o crescimento de células cancerosas e migração[23].

Outro estudo realizado com genes de supressão partiu de Xu K, que mostrou a relação da baixa expressão de MFN2, mitofusina 2, com o mau prognóstico de pacientes. Linhas de células A549 de NCSLC e MCF-7 (câncer de mama) foram trasnfectadas e utilizadas para estudo *in vitro*, onde observou-se que, após nocaute do gene houve um crescimento significativamente mais rápido das células, juntamente com uma progressão mais agressiva e aumento da migração tumoral. Todos os estudos passaram por testes *in vivo* com a utilização de camundongos xenoenxertados, onde os resultados foram confirmados. Outro estudo realizado em cima do gene MFN2, foi sua relação com a proteína mTORC2, que possui um papel importante no crescimento, manutenção e proliferação das células. Foi observado que células onde havia ocorrido o nocaute de MFN2, o mTORC2 encontrava-se elevado, causando crescimento das células cancerosas e metástase. Esses dados mostraram que mTORC2 é suprimido pelo gene MFN2 e determinam a importância da inibição do mesmo para tratamento do câncer de pulmão[24].

O gene de supressão KEAP-1 também foi alvo de estudos, Romero R relatou que 20% dos adenorcarcinomas mutados por KRAS apresentam perda de função ou mutação do gene KEAP-1. Foram realizados testes *in vivo* com a utilização de camundongos geneticamente modificados de câncer de pulmão, onde foram observados os efeitos da perda de KEAP1 na progressão do câncer. Os estudos mostraram que ao nocautear o gene de supressão, houve um aumento significativo na carga tumoral, além de apresentar aumento de proliferação[27].

Os microRNA-1304 também entraram em análise, mostrando a relação do mesmo com câncer de células não pequenas (NCSLC). Um estudo realizado *in vitro* com a utilização de linhas de células de adenocarcinoma A549 e NCI-H1975 mostrou que ao nocautear mRNA-1304 houve um aumento no número de células, formação de colônias e aumento da expressão HO-1 (hemeoxigenase-1), o qual é um gene alvo no câncer de células não pequenas que promove o crescimento de células cancerígenas. Logo, os mRNA-1304 possuem um papel fundamental na tumorigênese, uma vez que sua expressão impede o crescimento e sobrevivência das células do NCSCL, induzindo a apoptose[25].

Nos estudos realizados pela Ng SR, foi realizado um duplo nocaute com objetivo de inativar dois genes de supressão encontrados em quase todos os cânceres de pulmão de células pequenas (SCLC), TP53 e RB1. O estudo *in vivo* realizado utilizou camundongos geneticamente modificados, onde através do direcionamento de CRIRPR/Cas9 foi modelado a perda de p107 e p130 (genes da família RB e TP53) através do duplo nocaute. Os resultados obtidos mostraram que a perda de p107 causou um aumento na progressão e metástase, mostrando a importância de ambos no processo de controle tumoral[11].

Discussão

Dentre os 25.000 genes no ser humano, muitos são responsáveis pelo surgimento de neoplasias, quando sofrem algum tipo de mutação (oncogenes) ou por não serem expressos como deveriam (genes de supressão). O câncer de pulmão, apresenta um número considerável de genes responsáveis pelos processos de tumorigênese. E mesmo sendo a neoplasia com maior número de mortalidades, até o presente momento nenhum método convencional de tratamento tem apresentado eficácia, bom prognóstico e chances de sobrevida para pacientes mais graves[28].

Visando impedir a ação desses genes e ao mesmo tempo a descoberta de um tratamento 100% eficaz, muitos testes clínicos *in vitro* e *in vivo* foram realizados por diversos pesquisadores e médicos em cima dos principais oncogenes e genes de supressão do câncer de pulmão. Os oncogenes contribuem para transformação maligna de célula, uma vez que acabam substituindo as funções e controles regulatórios normais de uma célula, gerando um descontrole no crescimento celular[29]. Os estudos que envolvem a edição dos pricipais oncogenes envolvidos no processo de tumorigênese, visando inibi-los e clivá-los são a base teórica da aplicação da técnica de CRISPR/Cas9 como tratamento do câncer de pulmão. O principal método utilizado foi o nocaute, onde eram observados os resultados gerados pela inibição dos genes escolhidos. Através dos estudos foi possível observar como o nocaute dos oncogenes influência nos processos de tumorigênese e resistência a medicamentos quimioterápicos. Dos 17 oncogenes estudados, 12 deles ao serem nocauteados geraram uma diminuição no crescimento celular, proliferação, induziram a apoptose e em alguns casos como no estudo de Huang F, foi possível impedir a metástase[17]. Também ficaram evidentes que 5 dos oncogenes ao serem nocauteados acabaram aumentando a sensibilidade das células neoplásica e diminuíram a resistência contra fármacos utilizados no tratamento, permitindo um aumento da eficácia das terapias a base de quimioterápicos e radioterápicos[10, 14, 19-21].

As descobertas feitas pelos pesquisadores mostram como as chances de desenvolver um tratamento preciso e confiável está perto de acontecer. Os testes desen-

volvidos pela Koo T et al. ressaltaram a importância do gene EGRF e sua ligação com processo de tumorigênese. Através desse estudo foi possível observar como o nocaute induzido pode acarretar numa diminuição do tumor[9]. Assim como Cheung AH-K et al, complementou demonstrando como a clivagem desse mesmo gene, em uma mutação pontual (L858L) é capaz de reduzir a proliferação e causar morte celular[13]. Lee W et al, por sua vez também mostrou a relação do oncogene KRAS com a proliferação agressiva do câncer de pulmão, principalmente o câncer de células não pequenas (NSCLC), o qual atráves de seus estudos relatou como a inibição do oncogene em questão pode resultar numa diminuição da carga[15]. De acordo com os estudos a presentados o oncogene que parece mais promissor para ser alvo do CRISPR/Cas9 é o EGFR, uma vez que os resultados obtidos no *in vivo* ao nocautea-lo foi a redução do volume tumoral em 81,5% e 78,3%[9].

Além das vantangens que a inibição desses genes fundamentais proporcionam no quesito desenvolvimento do tumor, outros estudos complementam que também é possível aumentar a sensibilidade das células cancerosas, permitindo que tratamentos convenionais a base de radioterápicos e quimioterápicos possam agir de maneira eficaz, aumentando consideravelmente as chances de remissão do câncer. A quimioterapia tem como objetivo prevenir e impedir a proliferação, invasão e mestástase das células neoplásicas, além de induzir apoptose. A resistência adquirida ao medicamentos quimioterápicos, se tornou um dos principais problemas no tratamento do câncer de pulmão, que resulta em um fraco desempenho e eficácia. Visando melhorar esse aspecto, a edição genética através do sistema CRISPR/Cas9 tem sido usada com o objetivo de aumentar a eficácia dos tratamentos a base de quimioterápicos[30].

Um dos estudo citados mostra, por exemplo, o medicamento Paclitaxel (PTX), muito utilizado como tratamento quimioterápico de primeira linha para tumores malignos, no caso de câncer de pulmão de células não pequenas, porém sua eficácia terapêutica é restrita por conta da crescente frequência de resistência quimioterápica no NSCLC. Existem uma variedade de genes que foram relacionados com desenvolvimento de resistência ao Paclitaxel, entre ele o RSF-1, como foi desmonstrado anteriormente. O oncogene RSF-1 apresenta-se superexpresso ou amplificado em câncer de pulmão e sua elevação está relacionada com prognóstico ruim. O fato de contribuir para o desenvolvimento de resistência ao PTX se dá por conta da formação do complexo RSF-1/hSNF2H, também conhecido como complexo de remodelação de cromatina ISWI. Sendo assim quando o utiliza-se CRISPR/Cas9 para nocautear o oncogene RSF-1 foi capaz de diminuir a capacidade de migração de células tratadas com PTX e também foi capaz de diminuir a proliferação[30].

Hussmann D et al, apresentou que ao inibir o gene IGF1R, o qual está diretamente relacionado a resistência ao fármaco erlotinibe. Após o processo foi possível observar que o medimento em questão agiu como deveria, exercendo sua ação sobre o gene EGRF inibindo[19]. Outros estudos voltados para mesmo conteúdos foram apresentados por Heyza JR et al. e You J et al, os quais demonstraram a relação dos genes ERCC1 e Aurora B, respectivamente, á resistência de fármacos especifícos, como por exemplo a cisplatina. Ambos observaram que ao inibir esses genes as células sofrem maior sensibilização ao fármaco, permitindo sua ação quimioterápica[20,21].

É de se esperar que ao induzir uma ressensibilização celular, seja possível aumentar as chances de tratamentos convencionais como, radioterapia e quimioterapia, fazendo com que se tornem mais eficazes e permitindo que os medicamentos hajam como deveriam no tumor, levando assim a recidiva.

Assim como os oncogenes, os genes de supressão tumoral foram um dos tópicos abordados. Através do nocaute desses genes, foi possível observar a importância do papel que desempenham. Os genes de supressão tumoral são responsáveis por controlar o crescimento celular, retardar divisão celular, impedir a proliferação descontrolada das células, assim como indicar quais células devem sofrer apoptose. Isso quer dizer que ao nocautear esses genes, ocorre um efeito oposto do que foi obtido ao nocautear os oncogenes, levando a uma piora do tratamento. De acordo com os dados analisádos os genes de supressão tumoral funcionam justamente para impedir que um processo de tumorigênese ocorra, o que leva a entender que sua inativação por algum defeito genético ou causado por fatores externos são reponsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias[11,24,27].

O primeiro teste experimental para tratamento do câncer de pulmão utilizando a técnica de CRISPR/Cas9 foi realizado em 2016. O método utilizado, diferentemente do apresentado até então, não envolve o nocaute de nenhum gene, mas sim a clivagem do material genético das células T. O paciente voluntário para o experimento apresentava câncer de pulmão em metástase, sem muitas chances de sobrevida. Para o experimento, suas células imunológicas, especificamente os linfócitos (células T) foram retiradas do sangue. Com ajuda da técnica de CRISPR/Cas9, a enzima Cas9, responsável por remover partes indesejadas do código genético, clivou o gene responsável por codificar a proteína PD-1, que atua em linfócitos T. Essas proteínas em especial, inibem uma das principais funções do linfócito, que é destruir células cancerígenas. Em casos de câncer, essa proteína é ativada, impedindo que os linfócitos ataquem as células cancerosas. Seguindo essa linha de raciocínio, após a clivagem dos genes, os linfócitos foram multiplicados em laboratório e reinjetados no paciente. Segundos os cientistas, o procedimento ocorreu bem e foi um sucesso, o paciente apresentou melhora[12].

Conclusão

Através dos estudos apresentados, foi possível observar que os oncogenes responsáveis por participar da resposta tumorigênica quando nocauteados pelo sistema CRISPR/Cas9 acabam tendo a resposta cessada, portanto não exercem sua função. Todos os oncogenes

analisados nos estudos apresentaram resultados positivos, porém os mais promissores foram EGFR, e os oncogenes relacionados á resistência quimioterápica e radioterápica, como FAK, IGF1R, ERCC1, AURORA B, RSF-1 e NRF2.

Com os estudos realizados até então, é possível levantar dados acerca da utilização da técnica de CRISPR/Cas9 como nova modalidade de tratamento para o câncer de pulmão. Atualmente, não há um tratamento 100% eficaz que garanta altas chances de sobrevida e bom prognóstico aos pacientes. Com os avanços da técnica de CRISPR/Ca9 e dos estudos com o uso da mesma para o tratamento do câncer de pulmão, em alguns anos será de fato uma alternativa viável como tratamento, a qual já apresenta muitas vantagens com relação às modalidades convencionais. Uma vez que com o nocaute dos oncogene chaves, é possível diminuir a capacidade de proliferação da neoplasia e até impedir sua metástase permitindo ao paciente maiores chances de sobrevida e um bom prognóstico, mesmo para os casos mais avançados.

A técnica de CRISPR/Cas9 vem ganhando cada vez mais destaque no mundo científico e seu uso para tratar câncer de pulmão e outros tipos, está se tornando uma realidade. Futuramente, espera-se que essa modalidade alternativa seja mais explorada e maiores estudos clínicos com seres humanos sejam realizados, para que sirva como mais uma modalidade tratamento eficaz ou como auxiliar nos tratamentos convencionais.

Agradecimentos

A jornada foi longa, mas finalmente acabou. Agradeço imensamente a todos que caminham comigo até aqui. Agradeço aos meus pais, Hyana Paula Alioncio e Elcio Luiz Pijak, por todo suporte que me deram durante esses anos, por todos os "você consegue!" que me falaram e por acreditarem em mim quando eu mesma não acreditava. Agradeço a minha orientadora Jacqueline Moraes, não só por ter me ajudado durante o processo , mas por ter sido uma base de apoio, sempre tirando minhas dúvidas, me levando pelo caminho certo e mantendo firme nele. Por último mas não menos importante, agradeço a Deus, pela paciência e pela força que me deu para aguentar e não desistir quando as coisas ficavam difíceis.

Referências

1. Organização Mundial da Saúde (OMS). Versão para Profissionais de Saúde. Instituto Nacional Do Câncer. 2018 [Internet]. (Acesso 20 dez 2021). Disponível em: https://www.inca.gov.br/tipos-de- cancer/cancer-de-pulmao/profissional-de-saude. Acesso em 20 dez 2021.

2. Capelozzi VL, Ab'saber AM, Silva AGPDA, Gallo CP, Brandão F. Requisitos mínimos para o laudo de anatomia patológica em câncer de pulmão: justificativas na patogênese. J Pneumol. 2002;28(4):201-18. Doi; 10.1590/S0102-35862002000400005.

3. Pérez-Ríos M, Schiaffino A, Montes A, Fernández E, López MJ, Martínez-Sánchez JM, et al. Mortalidad atribuible al consumo de tabaco en España 2016. Arch Bronconeumol. 2020;56(9):559–63.

4. Capelozzi VL. Genética do câncer de pulmão. Rev Med. 2001;80(1):41–51.

5. Pacheco FA, Paschoal MEM, Carvalho MGC. Marcadores tumorais no câncer de pulmão: um caminho para a terapia biológica. J Pneumol. 2002;28(3):143–9. Doi: 10.1590/S0102-3586 2002000300006.

6. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. Mayo Clin Proc. 2019;94(8):1623–40. Doi: 10.1016/j.mayoca.2019. 01.013.

7. Sachdeva M, Sachdeva N, Pal M, Gupta N, Khan IA, Majumdar M, et al. CRISPR/Cas9: molecular tool for gene therapy to target genome and epigenome in the treatment of lung cancer. Cancer Gene Ther. 2015;22(11):509–17. Doi: 10.1038/cgt. 2015.54).

8. Alcantara RL, Lima HPS, Barbosa GO, Gonçalves LC, Silva APL, Passos XS. A técnologia de CRISPR/Cas9 na terapia gênica do câncer de pulmão. Rev Bras Milit Ciênc. 2019;5(13):0. Doi: 10.36414/rbmc.v5i13.25.

9. Koo T, Yoon A-R, Cho H-Y, Bae S, Yun C-O, Kim J-S. Selective disruption of an oncogenic mutant allele by CRISPR/Cas9 induces efficient tumor regression. Nucleic Acids Res. 2017;45(13):7897–908.

10. Bialk P, Wang Y, Banas K, Kmiec EB. Functional gene knockout of NRF2 increases chemosensitivity of human lung cancer A549 cells in vitro and in a xenograft mouse model. Mol Ther Oncolytics. 2018;11:75–89.

11. Ng SR, Rideout WM 3rd, Akama-Garren EH, Bhutkar A, Mercer KL, Schenkel JM, et al. CRISPR-mediated modeling and functional validation of candidate tumor suppressor genes in small cell lung cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(1):513–21.

12. Lacey SF, Fraietta JA. First trial of CRISPR-edited T cells in lung cancer. Trends Mol Med. 2020;26(8):713–5. Doi: 10.1016/jmolmed.2020.06.001.

13. Cheung AH-K, Chow C, Zhang J, Zhou Y, Huang T, Ng KC-K, et al. Specific targeting of point mutations in EGFR L858R-positive lung cancer by CRISPR/Cas9. Lab Invest. 2018;98(7):968–76. Doi: 10.1038/s41374-018-0056-1.

14. Tang K-J, Constanzo JD, Venkateswaran N, Melegari M, Ilcheva M, Morales JC, et al. Focal adhesion kinase regulates the DNA damage response and its inhibition radiosensitizes mutant KRAS lung cancer. Clin Cancer Res. 2016;22(23):5851–63. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2603.

15. Lee W, Lee JH, Jun S, Lee JH, Bang D. Selective targeting of KRAS oncogenic alleles by CRISPR/Cas9 inhibits proliferation of cancer cells. Sci Rep. 2018;8(1). Doi: 10.1038/s41598-018-30205-2.

16. Chen X, Sun X, Guan J, Gai J, Xing J, Fu L, et al. Rsf-1 influences the sensitivity of non-small cell lung cancer to paclitaxel by regulating NF-κB pathway and its downstream proteins. Cell Physiol Biochem. 2017;44(6):2322–36. Doi;10.1159/000486116.

17. Huang F, Chen J, Wang Z, Lan R, Fu L, Zhang L. δ-Catenin promotes tumorigenesis and metastasis of lung adenocarcinoma. Oncol Rep. 2017;39(2):809–17. Doi:10.3892/or2017.6140.

18. Yi J, Wei X, Li X, Wan L, Dong J, Wang R. A genome-wide comprehensive analysis of alterations in driver genes in non-small-cell lung cancer. Anticancer Drugs. 2018;29(1):10–8. Doi:10.1097/CAD.0000000000000571.

19. Hussmann D, Madsen AT, Jakobsen KR, Luo Y, Sorensen BS, Nielsen AL. IGF1R depletion facilitates MET-amplification as mechanism of acquired resistance to erlotinib in HCC827 NSCLC cells. Oncotarget. 2017;8(20):33300–15. Doi: 10.18632/oncotarget.16350.

20. Heyza JR, Lei W, Watza D, Zhang H, Chen W, Back JB. Identification and characterization of synthetic viability with ERCC1 deficiency in response to interstrand crosslinks in lung cancer. Clin Cancer Res. 2019;25(8):2523–36. Doi: 10.1158/1078-0432.ccr-18-3094.

21. Yu J, Zhou J, Xu F, Bai W, Zhang W. High expression of Aurora-B is correlated with poor prognosis and drug resistance in non-small cell lung cancer. Int J Biol Markers. 2018;33(2):215-21. Doi: 10.1177/1724600817753098.

22. Liu F, Zhang Y, Lu M, Wang C, Li Q, Gao Y, et al. Nestin servers as a promising prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. Am J Transl Res. 2017;9(3):1392–401.

23. Zhou X, Curbo S, Li F, Krishnan S, Karlsson A. Inhibition of glutamate oxaloacetate transaminase 1 in cancer cell lines results in altered metabolism with increased dependency of glucose. BMC Cancer. 2018;18(1). Doi:10.1186/s12885-018-4443-1.

24. Xu K, Chen G, Li X, Wu X, Chang Z, Xu J, et al. MFN2 suppresses cancer progression through inhibition of mTORC2/Akt signaling. Sci Rep. 2017;7:41718. Doi: 10.1038/srep 41718.

25. Li C-G, Pu M-F, Li C-Z, Gao M, Liu M-X, Yu C-Z. MicroRNA-1304 suppresses human non-small cell lung cancer cell growth in vitro by targeting heme oxygenase-1. Acta Pharmacol Sin. 2017;38(1):110–9. Doi: 10.1038/aps.2016-92.

26. Bu X, Kato J, Hong JA, Merino MJ, Schrump DS, Lund FE, et al. CD38 knockout suppresses tumorigenesis in mice and clonogenic growth of human lung cancer cells. Carcinogenesis. 2018;39(2):242–51. Doi: 10.1093/carcin/bgx137.

27. Romero R, Sayin VI, Davidson SM, Bauer MR, Singh SX, LeBoeuf SE, et al. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. Nat Med. 2017;23(11):1362–8. Doi:10.1038/nm.4407.

28. El-Telbany A, Ma PC. Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any? Genes Cancer. 2012;3(7–8):467–80. Doi: 10.1177/1947601912465177.

29. Todd R, Munger K. Oncogenes. In: Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2006.

30. Choi JH, Sheu JJ-C, Guan B, Jinawath N, Markowski P, Wang T-L, et al. Functional analysis of 11q13.5 amplicon identifies Rsf-1 (HBXAP) as a gene involved in paclitaxel resistance in ovarian cancer. Cancer Res. 2009;69(4):1407–15. Doi; 10.1158/0008-5472.can-08-3602.

Endereço para correspondência:

Jacqueline Fátima Martins de Almeida
Av.Comendador Enzo Ferrari – Swift
Campinas-SP, CEP 13045-770
Brasil

E-mail: jacqueline.moraes@docente.unip.br

Recebido em 10 de fevereiro de 2022.
Aceito em 10 de junho de 2022.