

FACULDADE DE CIÊNCIA DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ANDRÉ LUIZ PAIVA LUSTOSA

**POTENCIAL DO USO DA TERAPIA GENÉTICA NO TRATAMENTO DE
DOENÇAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado em forma de artigo científico como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina do UniCEUB sob a orientação do professor Dr. Paulo Roberto Martins Queiroz.

BRASÍLIA-DF

2019

Potencial do Uso da Terapia Genética no Tratamento de Doenças: Uma Revisão de Literatura.

André Luiz Paiva Lustosa¹

Paulo Roberto Martins Queiroz²

Resumo

A terapia genética contribui na ampliação e no tratamento de doenças de cunho genético, adquiridas e virais. A realização deste trabalho, tem como objetivo descrever o potencial de uso da terapia genética no tratamento das doenças, feito através de uma revisão de literatura baseada em artigos científicos, livros e revistas eletrônicas. Através da edição genética e do DNA recombinante, permitiu-se sintetizar e transferir genes terapêuticos por meio de vetores, nos quais são responsáveis por reconhecer o alvo-específico, levando o gene terapêutico em seu interior. Estes vetores são transferidos através de métodos *in vivo* e *ex vivo* e combinados com sistemas de terapia como a CRISPR/Cas9, TALEN e ZNF, que podem ser editadas e são utilizadas para ir especificamente no local em que precisa ser corrigido, substituindo totalmente o gene que sofreu mutação ou no caso dos genes virais, retirando-os do DNA da célula.

Palavras-chave: Terapia Genética; Vetores; Sistemas Terapêuticos; Edição Genética; Tratamento; Doenças.

Potential for the Use of Gene Therapy in the Treatment of Diseases: A Literature Review.

Abstract

Gene therapy contributes to the expansion and treatment of genetic, acquired and viral diseases. The objective of this work is to describe the potential use of gene therapy in the treatment of diseases, done through a literature review based on scientific articles, books and electronic journals. Through gene editing and recombinant DNA, it was possible to synthesize and transfer therapeutic genes by means of vectors, in which they are responsible for recognizing the target-specific, leading the therapeutic gene inside. These vectors are transferred through *in vivo* and *ex vivo* methods and combined with therapy systems such as CRISPR/Cas9, TALEN and ZNF, which can be edited and are used to go specifically in the place where it needs to be corrected, completely replacing the gene that mutated or in the case of viral genes, removing them from the cell's DNA.

Keywords: Gene therapy; Vectors; Therapeutic systems; Gene edition; Treatment; Diseases.

¹ Graduando de Biomedicina pelo Centro Universitário de Brasília;

² Bacharel e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília; Mestrado em Biologia Molecular e Doutorado em Biologia Animal pela Universidade de Brasília; Pós-doutorado em Genética Molecular;

1. INTRODUÇÃO

A terapia genética é uma área que atualmente possibilitou a ampliação do tratamento de doenças que podem ser de cunho genético (hemofilias), adquiridas (câncer) e nas virais (HIV), por exemplo (MISRA, 2013). Dentro dessa área genética uma das técnicas possíveis consiste em utilizar DNA recombinante, no qual o gene de interesse é inserido em um vetor. Segundo Misra (2013) esta técnica é utilizada por sua eficiência e eficácia por atravessar a membrana e realizar a inserção do material genético.

Segundo Pájaro et al. (2013), a terapia gênica contribui para novas ferramentas de diagnóstico e tratamento de doenças, um desses ramos é a nanobiotecnologia, à qual vem ganhando força na identificação de formas inovadoras para solucionar diagnósticos que atualmente são difíceis e muitas vezes sem soluções. Este tipo de engenharia genética permite a implementação de métodos que possibilitam armazenar informações no DNA de microrganismos vivos.

A engenharia genética permite uma transferência totalmente controlada e programada artificialmente dos genes, criando assim novos componentes, novas células procariontes e eucariontes e biomoléculas que poderão no futuro serem utilizadas para ajudar na cura de doenças genéticas (BERNAL et al., 2013).

Segundo Buldu et al. (2007), a introdução da tecnologia de DNA recombinante modificou o campo de experimentação, pois permite clonar, sintetizar e projetar novos genes que se introduzidos no organismo poderão alcançar a expressão através de modificações em regiões do genoma. Estes são introduzidos nas células através de vetores, que são classificados em virais ou não virais, responsáveis por levar o gene terapêutico às células-alvo, ou seja, servem de veículos para o transporte.

Os vetores são transferidos para o alvo através de duas formas: no tipo *in vivo*, cujo vetor é introduzido diretamente nas células-alvo, sem que sejam retiradas do corpo; ou, no tipo *ex vivo* cujas células são retiradas do paciente e são introduzidos os vetores contendo o gene terapêutico por meio da engenharia genética e, em seguida, introduzidas as células modificadas novamente no corpo do paciente (AZEVEDO, 2009).

Para Tebas et al. (2014), a capacidade de modificar o genoma humano em locais específicos tem sido objetivo da medicina, visto que a terapia genética é uma modalidade que leva o tratamento específico para doenças que são complexas e que ainda não existem uma cura. Existem diversas técnicas, tais como, os sistemas TALEN (Nucleases com Efectores do tipo Ativador Transcricional), ZFN (Nucleases

Dedos de Zinco) e a CRISPR/Cas9 que chegou para substituir os outros dois sistemas citados anteriormente.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) e CRISPR-associados (Cas) são genes essenciais na imunidade de bactérias. Foi descoberto em 1987 no genoma de bactérias (REIS et al., 2014). Segundo Gonçalves e Paiva (2017), foi encontrada uma sequência variável e intercalada por uma sequência repetida sem função específica. Mas, apenas em 2005, é que esta região foi reconhecida como uma região extra cromossômica que servia de memória imunológica surgindo, assim, a CRISPR e sua proteína associada Cas.

A CRISPR é uma potente ferramenta biotecnológica para edição genômica, pois origina-se no sistema imune adaptativo de bactéria que reconhece o material genético invasor, o cliva em pequenos fragmentos e integra-o em seu próprio DNA (MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2010). Para esses autores, caso ocorra uma segunda infecção, esse material já estará presente no DNA, iniciando uma transcrição do *locus* CRISPR, que vai processar um RNA mensageiro (RNAm), criando fragmentos de CRISPR RNA (RNACr) que se unirão às proteínas Cas e formarão complexos que reconhecerão o RNA estranho e o destruirão.

Muitas doenças que ainda não possuem uma cura, estão sendo alvos do uso desta potente ferramenta biotecnológica de edição genômica conhecida como CRISPR, que permite a correção de genes alterados e modificações que são específicas nos locais alvo (TEBAS et al., 2014).

A hemofilia segundo Santos et al. (2007) é definida como um distúrbio hereditário da coagulação caracterizado pela deficiência do fator VIII, conhecida como hemofilia A ou fator IX, conhecida como hemofilia B da proteína plasmática sanguínea que é responsável pela ativação da cascata de coagulação. O tratamento atual para este distúrbio é apenas reposição do fator IX, porém segundo Nienhuis, Nathwani e Davidoff (2017), o uso da CRISPR e sua proteína associada Cas9, poderá corrigir o erro genético responsável pela hemofilia de forma fundamental.

O câncer de pulmão também é um grande alvo para pesquisas com o sistema CRISPR cas9, pois através dele foi possível injetar linfócitos geneticamente modificados como uma resposta terapêutica à resposta do sistema imunológico contra as células cancerosas presentes no pulmão (CYRANOSKI, 2016). Segundo este mesmo autor, a CRISPR e sua proteína associada 9 (Cas9) desativou uma proteína chamada de PD-1, o que ajudou na resposta imunológica dos linfócitos contra o câncer.

A AIDS ainda é um problema grave de saúde global em que ainda não se tem uma vacina, nem tratamentos que resultem na cura. Os tratamentos existentes

controlam e reduzem a carga viral do vírus nos portadores, contudo a medicação é forte e tóxica para as células humanas e elas não têm capacidade de eliminação completa do vírus. Segundo Saayman et al. (2015), isto desencadeou uma busca por terapias genéticas que bloqueassem a replicação viral do HIV. Com isso, o sistema CRISPR foi utilizada como uma terapia para o HIV tipo 1, que segundo Mojica et al. (2009), o sistema CRISPR é adaptado do mecanismo que as bactérias utilizam para se defenderem de vírus através da clivagem do DNA estranho, servindo de memória, na qual caso aconteça novamente outro contato com o DNA estranho, este será combatido.

Apesar desta técnica de CRISPR ser uma poderosa ferramenta, a comunidade científica realizou em 2015 uma reunião internacional à qual eles nomearam de “Cúpula Internacional sobre Edição do Gene Humano”, onde foram discutidos os cuidados que devem ser tomados em relação a CRISPR quanto ao uso em seres humanos. Para Hirsch, Levy e Chneiweiss (2017), o uso desta técnica envolve questões éticas, pois além de vantajosa, há dúvidas acerca de quais são os prejuízos que ela pode trazer posteriormente.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi descrever o potencial de uso da terapia genética no tratamento de doenças.

2.METODOLOGIA

O trabalho de conclusão de curso tratou-se de uma revisão narrativa da literatura sobre o potencial do uso da terapia genética no tratamento de doenças a qual vem ganhando seu espaço pela capacidade que a técnica possibilita de realizar transferências controladas e artificiais de genes gerando biomoléculas que serão úteis para o tratamento das doenças. Segundo Green, Johnson e Adams (2006), uma revisão narrativa da literatura consiste em pesquisas em bancos de dados, artigos, textos, livros sobre os resultados de pesquisas realizadas sobre o assunto.

As referências que foram coletadas para este projeto foram relacionadas quanto ao potencial de uso da terapia genética e sobre as técnicas genéticas e uso de vetores que estão sendo utilizados no tratamento de doenças genéticas e adquiridas. As referências foram retiradas das bases de dados SciELO internacional, Google acadêmico, PubMed, com pesquisas de artigos escritos nos idiomas português, inglês e espanhol publicados entre 2006 e 2019. Contudo, textos de anos mais antigos, ou livros texto foram utilizados para alguns conceitos, assim como, foram obtidos do repositório institucional do Centro Universitário de Brasília.

As palavras-chave para busca de artigos foram “Câncer de pulmão patologia”, “Hemofilia”, “HIV/ AIDS”, “Terapia gênica”, “gene Therapy”, “CRISPR and treatment”, “engenharia genética e doenças” “CRISPR”, “CRISPR/Cas9”, “CRISPR no tratamento de doenças”, “CRISPR in the treatment of diseases”, “vetores virais na terapia genética”, “nucleases e sistemas terapia genética”, “TALEN, CRISPR, ZNF”. Sendo a base de dados mais relevante foi PubMed.

3.DESENVOLVIMENTO

3.1 O papel das mutações na evolução de doenças.

Segundo Strachan e Read (2013), os genes são regulados por fatores de transcrição que são reconhecidos e ligam-se a sequências nucleotídicas no DNA, produzindo diferentes aminoácidos e sequências que regulam a expressão desempenhando um papel fundamental nas células, pois para Watson et al. (2015) as células dependem do funcionamento correto de milhares de genes. Eles podem sofrer alterações e acabarem sendo danificados em seus diversos sítios da sequência que codificam suas proteínas, como também, em regiões flangeadoras que promovem sua expressão ou seu processamento do RNA mensageiro (mRNA).

Segundo Griffiths (2008), essas alterações são conhecidas como mutações, que são mudanças que ocorrem na sequência de DNA de um gene específico, sendo significativa para a evolução. Estas mutações podem ser espontâneas que surgem ocasionalmente sem agentes interferentes ou induzidas que ocorrem devido a agentes físicos ou químicos. Para este mesmo autor, a mutação cobre uma ampla gama de mudanças que podem ser uma simples troca de pares de bases até uma alteração maior de um cromossomo completo, que são chamados de mutações gênicas.

As mutações gênicas segundo Nussbaum, McInnes e Willard (2008), podem ser causadas por mecanismos básicos, tais como por erros durante a replicação do DNA ou por mutações que surgem devido a uma falha na reparação do DNA após uma lesão na tentativa de reparação da dupla fita de DNA.

Sabe-se que a mutação é a fonte primária da variabilidade genética e que é responsável por manter a vida. Segundo Pierce (2016) a mutação também tem efeitos prejudiciais e são responsáveis por causar doenças genéticas e distúrbios. A mutação é dividida em várias categorias. Por exemplo, para Pierce (2016) elas são divididas em: mutações somáticas, nas quais as células mutadas transmitem a mutação para suas células filhas produzindo células exatamente iguais que são os clones e a mutação germinativa que ocorre em células que originam gametas, estes

por sua vez podem ser passados para outras gerações que vão possuir tanto mutação nas células somáticas quanto nas linhagens germinativas.

Existem várias formas de classificação para as mutações gênicas, variando desde uma pequena mutação em um gene até uma mutação de grandes proporções, porém independentemente do tipo de mutação, elas podem ter grandes efeitos a depender de qual gene tenha sido afetado, podendo levar à perda de uma expressão ou produzir proteínas alteradas e em ambos os casos podem causar as doenças genéticas (NUSSBAUM; MCLNNES; WILLARD, 2008).

3.2 Terapia gênica

A terapia Genética ou Gênica é todo tratamento ou tentativa de tratamento de uma doença genética que pode ser adquirida ou hereditária, através da inserção de genes em células específicas no hospedeiro a fim de reverter o quadro da doença e ter uma terapia de sucesso quando são utilizados genes ao invés de medicamentos potentes (FÉCCHIO; MACEDO; RICCI, 2015).

A terapia é realizada através da introdução dos genes por meio de carreadores que são responsáveis por fazer o reconhecimento específico da célula-alvo e facilitarem a entrada no DNA, estes carreadores são conhecidos como vetores (ARTIOLI; HIRATA; JUNIOR, 2007).

3.2.1 Vetores de transformação

O vetor não pode ser qualquer um, este deve possuir algumas características: deve-se sempre buscar o vetor ideal, ou seja, aquele que não provoque uma reação do sistema imunológico do indivíduo quando se utilizar um vírus ou molécula que será utilizado como vetor; este deve produzir uma resposta duradoura, eficiente e específica na expressão do gene na célula-alvo; além de ter uma produção fácil (MENCK; VENTURA, 2007).

Existem dois métodos para inserir os genes terapêuticos nos vetores para que possam ser transferidos para o interior da célula-alvo. Segundo Karthikeyan e Pradeep (2006) são por meio das técnicas *ex vivo* e *in vivo*.

Na técnica *ex vivo* as células-alvos são retiradas do corpo do paciente, onde através da engenharia genética serão inseridos vetores contendo os genes terapêuticos anteriormente isolados e editados, no qual ao ser realizada a inserção, as células modificadas são reimplantadas. Um exemplo de células mais comumente utilizadas são as células medulares. Já a técnica *in vivo*, são inseridos vetores contendo genes no interior do organismo do paciente, no qual os genes serão levados até a célula-alvo (AZEVEDO, 2009).

As técnicas de transferência dos genes podem ser por processos físicos, químicos ou biológicos, que segundo Fecchio, Macedo e Ricci (2015), no processo físico os genes são inseridos na célula de maneira mecânica, sendo utilizados principalmente no método plasmidial. Já no processo químico o vetor é transferido com o auxílio de algumas substâncias químicas que permitem a entrada do gene na célula, tais como o uso de polímeros catiônicos e lipossomas. Enquanto o biológico é utilizados organismos capazes de inserir o gene no interior da célula como, por exemplo, os vírus, adenovírus e adenoassociados (RAMAMOORTH; NARVEKAR, 2015).

O uso de vetores do tipo plasmídeo, segundo Linden (2010), é uma técnica limitada, que não permite a introdução de genes em órgãos de difícil acesso por serem sequências de DNA simples, porém são eficazes para expressar genes através do DNA recombinante. Nesta técnica para inserir o plasmídeo é necessário o emprego de estratégias que alteram a permeabilidade da membrana na célula-alvo.

Algumas alternativas que permitam inserir o gene do plasmídeo nos alvos específicos, derivam de alguns métodos físicos como a microinjeção que para Pereira (2015), consiste em uma técnica na qual utiliza-se um microscópio e uma micropipeta contendo o gene exógeno, que é inserido diretamente no núcleo da célula alvo. É um método antigo, porém eficiente com 100% de certeza que o material é transferido para o núcleo da célula. Porém, esse método necessita que a célula não esteja em divisão celular, pois DNA apresenta-se condensado impossibilitando a inserção do plasmídeo como gene terapêutico, pois poderá ser perdido durante a divisão.

A eletroporação relatada por Pereira (2015), explica que esse método utiliza campos elétricos alternados e controlados aplicados às células, de modo que provoque uma alteração na permeabilidade da membrana celular, facilitando a entrada do DNA plasmidial. É um método eficiente na transfecção de células que estão em suspensão, pois permite que um grande número de células sejam transfectadas em pouco tempo. Apresenta como limitação um alto índice de morte celular devido a intensidade da voltagem aplicada à célula.

A técnica de eletroporação permite que as moléculas grandes sejam transfectadas, como o DNA por exemplo. Ela é realizada com eletroporadores, que são instrumentos que criam um campo elétrico em uma suspensão de células misturadas com a solução plasmidial, às quais estão dispostas em cubetas com dois eletrodos de alumínio em que são ajustadas a voltagem e a capacitância do eletroporador. Após a eletroporação a cubeta contendo a mistura é incubada para que possa permitir a recuperação da célula e que o gene do plasmídeo seja expresso (AL-DOSARI; GAO, 2015).

No modo *in vivo* segundo Pereira (2015), são utilizados eletrodos responsáveis pela emissão de pulsos elétricos sob o tecido, ao qual irão abrir poros na membrana celular, permitindo a passagem do DNA plasmidial, que é colocado através de uma injeção de DNA, permitindo uma transfecção eficiente. Porém, a injeção provoca um recrutamento de células pró-inflamatórias que liberam citocinas e formarão um ambiente inflamatório no local em que foi inoculado, estando relacionado a uma alta resposta imunológica causada por este método (SHIROTA et al., 2007).

A técnica de eletroporação foi relatada no uso *in vivo*, onde foi utilizada para carregar íons de drogas, anticorpos, oligonucleotídeos para o RNA e para o DNA e o uso no transporte dos quimioterápicos para tratamento das pessoas com câncer (LORIO; DI STASI; BORGES, 2007).

Já os lipossomos são vesículas formadas por bicamadas lipídicas em um meio aquoso, onde conseguem armazenar substâncias que podem ser do tipo lipofílicas e hidrofílicas. Apresentam vantagens por serem biodegradáveis, biocompatíveis, altamente versáteis, não provocam uma resposta imunológica, são sítio-específicas, na qual são colocadas proteínas específicas de tecidos na superfície dos lipossomos que conduzirão o DNA plasmidial até o alvo, sendo muito boa para aplicações e pesquisas terapêuticas (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; PEREIRA, 2015).

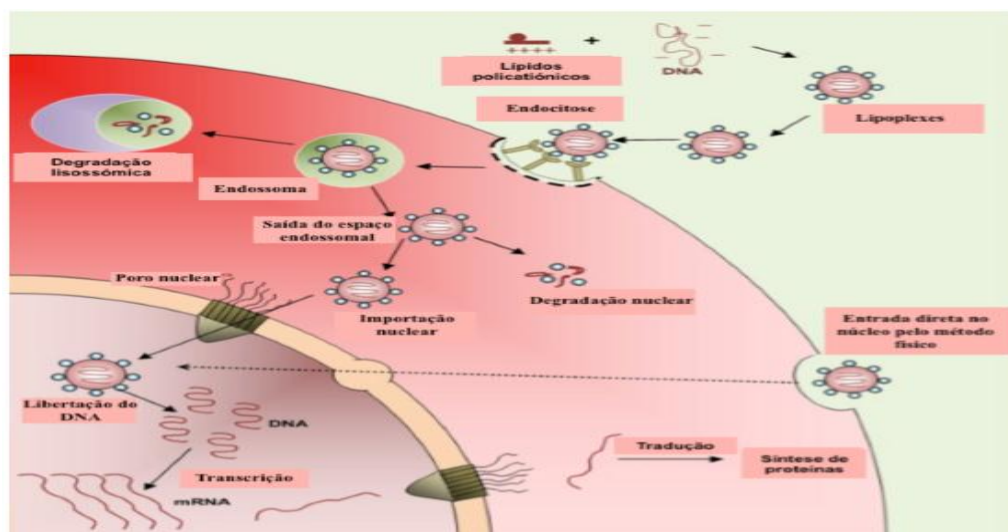
Segundo Chang e Yeh (2012), eles possuem características químicas que facilitam na entrega de algum fármaco terapêutico ou, até mesmo, para o uso da entrega do DNA plasmidial inserido para a terapia genética.

O uso de lipossomos está envolvido no tratamento de câncer, onde eles são utilizados para entrega de fármacos antineoplásicos, na entrega de fármacos cardiovasculares (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

Os lipossomos catiônicos são capazes de interagir eletrostaticamente com o DNA, sendo responsável pela produção de complexos compactos e condensados que reduzem as chances de interferentes como a degradação do DNA plasmidial pela célula e aumentam assim a transferência de maneira eficiente do material genético (figura 1) (ALVES, 2013).

Os vetores nanoestruturados são obtidos através da nanotecnologia, constituídos de polímeros que formam uma espécie de rede, as quais prendem o gene e o liberam quando já estão fundidos às células hospedeiras. Funcionam como vesículas contendo o DNA e podem ser colocados com moléculas que aumentem a sua especificidade com o alvo ou que permitam apenas guiar ou transferir o vetor de um compartimento para outro (LINDEN, 2010).

Figura 1: Mecanismo de ação do lipossoma ao introduzir o DNA na célula-alvo.



Fonte: Adaptado de Pereira (2015).

Esta técnica apresenta uma vantagem, onde o gene terapêutico pode ser encapsulado nos compartimentos produzidos pela nanotecnologia, compostos por células que produzem e secretam moléculas terapêuticas, além de ficarem isoladas do sistema imunológico não gerando nenhuma resposta imune do paciente que está recebendo a terapia genética, além de serem biodegradáveis, seguros e não tóxicos (LINDVALL; WAHLBERG, 2008).

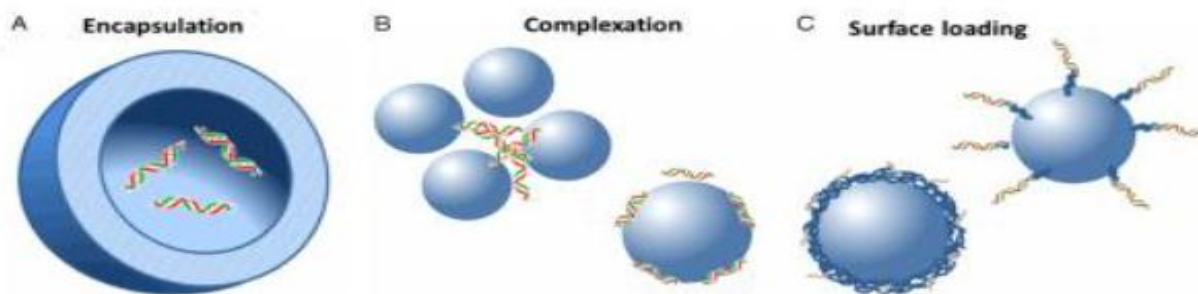
Os polímeros catiônicos utilizados nesse método possuem variações em sua composição, peso e estrutura podendo variar desde ramificações, dendríticas ou lineares. Eles ligam-se eletrostaticamente ao ácido nucléico devido a uma condensação do DNA ou do RNA, onde formam complexos, estes são chamados de poliplexos, cujas estruturas nanométricas protegem o DNA inserido da degradação de enzimas além de promover uma captação celular de forma mais eficiente (AIED et al., 2013).

A formação dos vetores poliméricos dá-se de três formas, ou seja, encapsulação, por adsorção e por interações eletrostáticas (Figura 2), sendo a interação eletrostática a mais comum (CEVHER; DEMIK; SEFIK, 2012). Estes polímeros são utilizados devido a sua melhor capacidade de absorção por endocitose e cada vez mais melhoram suas funções através de modificações químicas que possibilitem um aumento de transfecção e uma redução da toxicidade causada por eles (LOUREIRO, 2016).

Este tipo de vetor que é baseado em nanopartículas, é uma importante ferramenta para tratamento de doenças hereditárias, câncer, doenças

cardiovasculares, desordens neurológicas e inclusive a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), contudo sua aplicação ainda tem controvérsias devido à sua toxicidade a longo prazo apesar de ter as vantagens que foram citadas anteriormente (KELES et al., 2016).

Figura 2: Tipos de vetores nanoestruturados poliméricos.



Fonte: Adaptado de Loureiro (2016).

Os vírus são excelentes ferramentas para uso em terapias de transfecções genéticas, pois apresentam uma alta afinidade para diversas células humanas (CHIRA et al., 2015). Para Kamimura e colaboradores (2011), os vírus naturalmente infectam células e expressam suas proteínas, com uma alta taxa de transdução e uma rápida transcrição do material genético que foi colocado em seu interior. Contudo, segundo Artioli, Hirata e Junior (2007) antes que possa ser utilizado como gene terapêutico, o vetor viral sofre modificações em sua parte genética, tornando-se apenas um meio de disseminação da terapia sem sua virulência. São divididos em Adenovírus, Adenoassociados e retrovírus.

Segundo Pereira (2015), os Adenovírus pertencem à família Adenoviridae, e possuem uma característica de não ter membrana lipídica e ser formado por DNA de fita dupla, além de glicoproteínas capsídicas. No interior das células, eles não integram os genes próprios ao genoma hospedeiro, deixando o DNA viral livre no núcleo da célula hospedeira, sendo transcritos juntamente com os genes da célula hospedeira, porém caso essa célula entre em processo de divisão celular, o DNA viral não é replicado.

O processo de infecção deste tipo de vetor é complexo e não possui nenhuma relação com o ciclo celular, ou seja, age de forma independente. As fibras virais interligam o vírus e o receptor de adenovírus presente nas células hospedeiras que iniciam a infecção. Sua internalização ocorre através da endocitose mediada por um receptor, seguido de uma mediação de endossomos. Dentro do citoplasma o

capsídeo viral se desfaz e migra para o núcleo celular, onde o capsídeo se dissocia e leva a uma transcrição e uma replicação ativa do DNA viral (KAMIMURA et al., 2011).

Os adenovírus para Fecchio, Macedo e Ricci (2015), possuem tropismo por células humanas, apresentando uma elevada eficiência de transfecção, além de possibilitar a transferência de genes grandes. Contudo, demonstram alta imunogenicidade que levam eventualmente à falência do órgão. Para isso, o vetor pode ser utilizado para destruir as células neoplásicas.

Os adenovírus foram objetos de estudo para uso em terapia gênica contra a deficiência da ornitina transcarbamilase (OTC), causada por um defeito no gene OTC que codifica uma enzima que converte amônia em ureia e também foram relatados no uso como terapia em doenças multifatoriais, como o câncer, na artrite reumatoide e no vírus HIV (OLIVEIRA et al., 2018).

Vetores retrovirais são da família Retroviridae, caracterizados por terem uma membrana lipídica, à qual é originada a partir da separação da membrana da célula infectada, um capsídeo proteico e um genoma de cadeia simples de RNA mensageiro, ligado a proteínas (PEREIRA, 2015). Realizam a transcrição reversa que converte seu RNA em um cDNA (DNA complementar) e com a ajuda da integrase que auxilia a integração do DNA viral na célula-alvo (DANIEL; SMITH, 2008).

Para Pereira (2015), os retrovírus são constituídos por sequências genéticas responsáveis pela sua replicação. As repetições terminais longas (LTR) são sequências que contêm genes responsáveis por regular o encapsulamento, a transcrição reversa e a integração dele na célula, os quais são mantidos devido a sua importância para a função do vetor, enquanto os quatro genes *gag*, *pol*, *pro* e *env* que são responsáveis por codificar proteínas estruturais e enzimas para replicação, são retirados da sequência conforme mostra a figura 3.

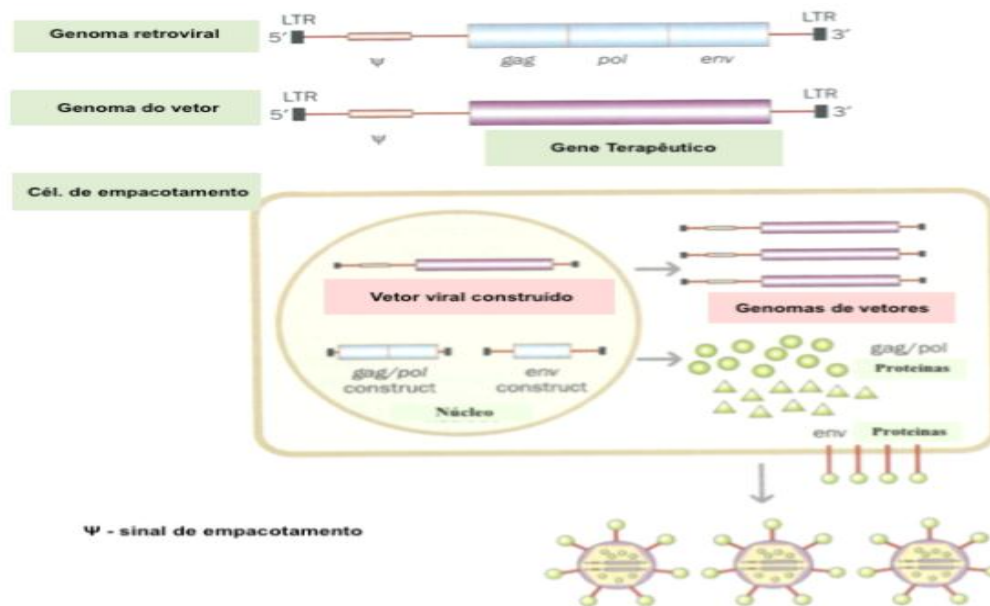
O vetor apresenta apenas um promotor, o gene terapêutico e as sequências, às quais são as responsáveis pela formação do provírus. Devido ao retrovírus possuir apenas essas sequências, o veículo retroviral torna-se deficiente na parte de replicação (STRACHAN; READ, 2013).

Os vetores retrovirais para Menck e Ventura (2007), possuem uma baixa eficiência de produção, que permitem a inserção do transgene no genoma humano, podendo até mesmo restaurar por completo de modo permanente a deficiência celular.

Apresentam como vantagens uma transdução mais estável, inserção no genoma da célula de maneira mais fácil e como desvantagens possuem capacidade de infectar a maioria das células, também podem causar mutações, têm dificuldade

de ser transmitido de forma *in vivo* devido à sua alta resposta imune que é causada e limitação do transgene que pode ser inserido no vetor (PEREIRA, 2015).

Figura 3: Etapas descrevendo a construção de um vetor viral.



Fonte: Adaptado de Pereira (2015).

Os vetores retrovirais tem sido estudos na terapia da deficiência da adenosina desaminase (ADA), a qual resulta no acúmulo de substâncias tóxicas do metabolismo, causando o comprometimento do desenvolvimento dos linfócitos T, B e células Natural Killers (GHOSH; THRASHER; GASPARG, 2015), na terapia contra a imunodeficiência combinada grave, na qual é uma doença q acomete uma mutação no gene IL2RG e na doença granulomatosa crônica, que provoca uma mutação no sistema NADPH oxidase (MUKHERJEE; THRASHER, 2013).

Vetores recombinantes de vírus adenoassociados pertencem à família Parvoviridae, possuem um DNA linear pequeno que além de codificar poucos genes, necessita estar associado a um adenovírus para poder replicar. Sua habilidade de infecção de células pode ocorrer devido à integração ou não de seu genoma no genoma da célula hospedeira (PEREIRA, 2015).

Segundo Kamimura et al. (2011), vetores adenoassociados são constituídos por proteínas rep e cap. A proteína rep é responsável pela replicação e pelo empacotamento do vírus, enquanto a cap é uma proteína estrutural responsável pela formação do capsídeo viral. Sua entrada na célula ocorre por endocitose mediada por receptores específicos, que em seguida causam uma migração e uma liberação

do genoma no núcleo celular, onde o DNA de fita simples irá sofrer conversão em fita dupla, que a partir deste sofrerá a expressão gênica.

Os vetores adenoassociados são mais vantajosos, pois eles são mais sítio-específicos, conseguem ser utilizados no método *in vivo* com alto tropismo pelas células, possuem uma elevada taxa de transferência genética devido ao elevado número de células infectadas, não possuem nenhum tipo de virulência, porém apresentam certas limitações como por exemplo, na limitação no tamanho do transgene que vai ser carregado em seu interior. Além disso, é necessário o emprego de vírus auxiliares para a produção deste tipo de vetor, pois apresenta baixa expressão gênica (FÉCCHIO; MACEDO; RICCI, 2015; PEREIRA, 2015).

Os usos dos vetores adenoassociados foram reportados no tratamento da deficiência da lipoproteína lipase, na artrite reumatoide e na doença de Parkinson (OLIVEIRA et al., 2018). O quadro 1 apresenta de maneira resumida as vantagens e desvantagens dos vetores citados.

Quadro 1: Vantagens e desvantagens dos vetores, adaptado de Pereira (2015).

.Vetores	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	-Método <i>in vivo</i> ; -Alto número de vetores por célula; -Pode usar transgene de tamanho maior; -Não ocorre mutação;	-Alta resposta imunológica; -São virulentos, infecção letal;
Adenoassociados	-Alto tropismo por células; -Permite métodos <i>in vivo</i> ; -Possui pouca resposta imune; -São sítio-específicos na integração celular.	-Limitação no tamanho do transgene; -Necessita vírus auxiliar para utilização; -Baixa Expressão gênica;
Retrovírus	-Inserção no genoma celular; -Estabilidade na transdução;	-Podem causar mutação; -Infecta muitas células; -Alta resposta imunológica
Lipossomos	- Sítio-Específico; - Biocompatível; - Biodegradável; - Não causam resposta imunológica;	- Limitação do tamanho do gene transfectado; - Baixa expressão do transgene;
Eletroporação	- Grande quantidade de células transfectadas; - Moléculas grandes podem ser transfectadas;	- Alto índice de morte celular; - Alta resposta imune no tratamento <i>in vivo</i> ;
Nanoestruturados Poliméricos	-Sem resposta imunológica; -Biodegradáveis; -Não apresentam toxicidade;	- Lesão tecidual; - Sofre degradação pelos lisossomos.

Estes métodos apresentam várias limitações, como mostrado anteriormente. Com isso, através dos avanços das pesquisas na busca de melhores métodos para atingir o nível específico a fim de serem evitadas reações imunes causadas pelos vetores e pelas técnicas, a edição gênica surgiu trazendo sistemas terapêuticos que são mais específicos, causam menos respostas imunológicas e são programáveis, possibilitando uma edição genômica (MENCK; VENTURA, 2007; PEREIRA, 2015).

3.3 Sistemas Terapêuticos

Segundo Hotta e Yamanaka (2015), a edição de genes é baseada em tecnologias que frequentemente necessitam de nucleases programáveis, às quais apresentam funções cruciais para possibilitar a edição genômica. Dentre elas estão as nucleases dedos de zinco (ZNF), Nucleases com Efetores do tipo Ativador Transcricional (TALEN) e a nuclease Cas9 presente no sistema CRISPR/Cas9.

Elas são capazes de produzir uma quebra na dupla fita de DNA em locais específicos. Estas quebras utilizam mecanismos de reparo como o reparo direcionado por homologia (HDR) ou pela união terminal não homóloga (UTNH) (COX; PLATT; ZHANG, 2015).

O reparo direcionado por homologia (HDR) pode ser utilizado para corrigir genes mutados nos quais restauram por completo a funcionalidade, além de reativar a expressão dos genes corretos e ter uma finalidade fisiológica benéfica, no caso da utilização do DNA exógeno como molde em que apresentem os genes terapêuticos. Esses podem ser inseridos em locais específicos diminuindo o risco de mutações e aumentando sua expressão (LISTIK; CARMO, 2016).

O reparo por união terminal não homóloga (UTNH) é associado à reestruturação resultante diretamente da quebra da dupla fita, cujo processo resulta em um reparo que apresenta uma boa precisão, porém está associado à mutações como deleções ou inserções. Os reparos do tipo UTNH podem adicionar códons de parada de forma prematura em genes importantes, causando uma interrupção na transcrição (ARONIN; DIFIGLIA, 2014; PEREZ et al., 2008).

Segundo Listik e Carmo (2016), os mecanismos de reparo do DNA tanto pela união terminal não homóloga quanto pelo reparo direcionado por homologia, fazem parte dos reparos internos da dupla fita de DNA. Com isso, as nucleases estão aí para condicionar e direcionar o alvo terapêutico de maneira específica através das técnicas, TALEN, ZNF e CRISPR/Cas9.

3.3.1 Nuclease TALEN

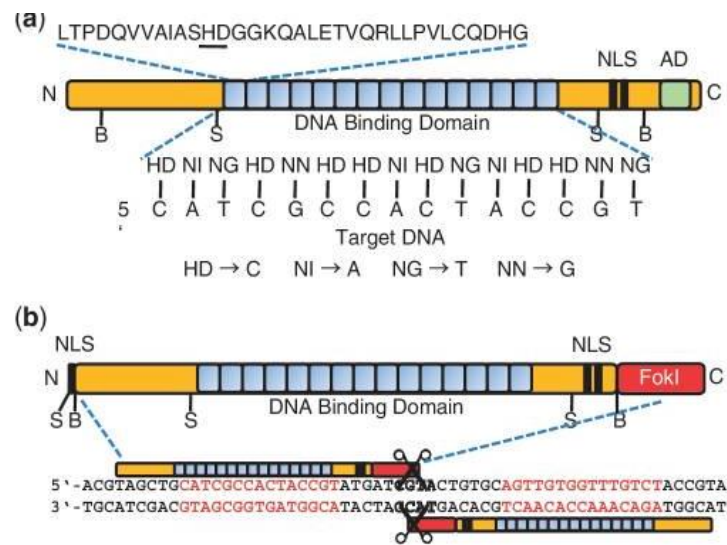
As Nucleases com Efetores do tipo Ativador Transcricional (TALEN), são domínios de ligação do DNA não específicos que são customizados e associados a uma endonuclease chamada FokI, na qual realizará clivagem e promoverá a edição genômica (JOUNG; SANDER, 2013).

Os efetores do tipo ativador de transcrição, são proteínas de fácil manuseio e simples, são inseridos através dos vetores plasmidiais na célula hospedeira e ao entrar no núcleo, elas se ligam a sequências específicas nos promotores da célula hospedeira e iniciam o processo de transcrição. Sua especificidade de direção é determinada no domínio do centro, formado por 32-35 aminoácidos repetidos (CERMAK et al., 2011).

Neste método, os domínios de ligação do DNA são derivados de proteínas da Bactéria *Xanthomonas* que possui sequências repetidas, formadas por resíduos muito variáveis presentes nas posições 12 e 13 do domínio, responsáveis por reconhecerem as bases nitrogenadas do DNA e são altamente variáveis de NN, NI, HD e NG, cujo são responsáveis por reconhecerem cada base nitrogenada A, T, C, G (figura 4) (BOCH et al., 2009).

Para Carlson et al. (2012) o método de TALEN pode promover a edição tanto com a forma de união terminal não homóloga, quanto pelo reparo direcionado por homologia, podendo assim provocar mutações devido a parada imediata com a adição de códons de parada, podendo causar enfermidades ou também, podendo causar inserções ou deleções de sequências grandes de DNA.

Figura 4: Esquema da técnica Nucleases com Efetores do tipo Ativador Transcricional (TALEN).



Fonte: Adaptado de Cermak et al. (2011).

O sistema de nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (TALEN) está sob pesquisa nos laboratórios para testar sua aplicabilidade em tratamentos de hemoglobinopatias, doenças genéticas neurodegenerativas e no tratamento de câncer (CHANDRAKASAN; MALIK, 2014; OKANO et al., 2012; OSBORN et al., 2013).

3.3.2 Nucleases Dedos de Zinco (ZNF)

Os dedos de zinco envolvem desenhos editados que são responsáveis pela clivagem e pelo reconhecimento da dupla fita do DNA em locais específicos. Os dedos de zinco são proteínas quiméricas formadas através da associação das endonucleases com as proteínas dedos de zinco (KIM et al., 2011).

É uma ferramenta eficaz para realização do silenciamento genético, conhecido como knockout, que pode ser feito através do reparo da união terminal não homóloga, como também através do reparo direcionado por homologia, como também por introduzir genes ou corrigir genes mutados (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016).

Os dedos de zinco apresentam domínios proteicos pequenos que utilizam o zinco como estabilizador térmico e estrutural, que estão presentes em várias proteínas responsáveis por reconhecer as sequências de DNA responsáveis pelos fatores de transcrição, através da interação cruzada entre aminoácidos e bases nitrogenadas presentes nos dedos de zinco com a fita de DNA (KLUG, 2010).

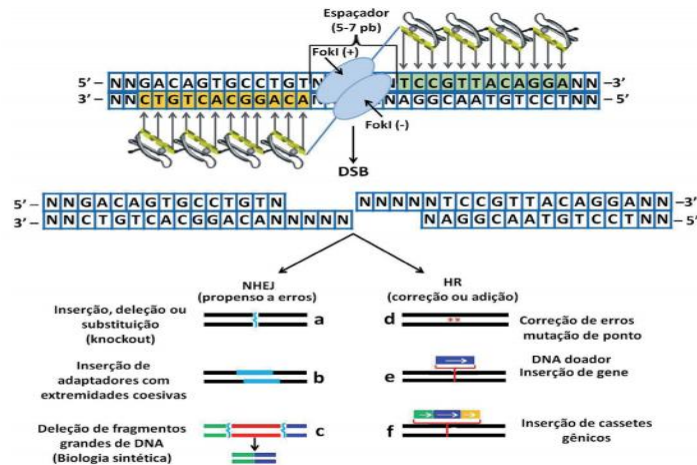
Segundo Listik e Carmo (2016), as nucleases dedos de zinco são formadas a partir de várias associações dedos de zinco com a endonuclease FokI, em que seus domínios pequenos acabam estabilizados pelo Zinco em que pode ser por interação direta na fita de DNA 3'-5' ou cruzada 5'-3' reconhecendo a sequência e assim induzindo sua clivagem.

Os dedos de zinco são construídos por módulos constituídos por dois ou mais domínios dedos de zinco ligados a enzima FokI, a qual necessita de pares de dedos de zinco desenhados para sua utilização na edição gênica, de modo que estes sejam capazes de ligarem ao DNA, permitindo assim sua clivagem (KANDAVELOU et al., 2009).

Após o rompimento da dupla fita de DNA, os mecanismos de reparo entram em ação para que corrijam o dano ocasionado, porém o reparo da união terminal não homóloga ocorre de maneira aleatória, podendo levar a deleções, inserções que acabam modificando a transcrição do DNA, produzindo proteínas diferentes (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016).

Seu uso está associado a doenças infectocontagiosas como o uso em uma terapia contra o vírus do HIV, em que utilizaram a nuclease dedos de zinco para inativação do gene CCR5 presente na membrana dos linfócitos T CD4+, de modo que o linfócito criou uma resistência contra o vírus (MAEDER et al., 2008).

Figura 5: Mecanismo da Nuclease Dedos de Zinco



Fonte: Adaptado de Vasconcelos e Figueiredo (2016).

3.3.3 CRISPR/ Cas9

CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) e CRISPR-associados (Cas) são genes essenciais na imunidade de bactérias. Foi descoberto em 1980 no genoma de bactérias (REIS et al., 2014). Para Haeussler e Concordet (2016), o sistema CRISPR-Cas9 é um dos sistemas com alta taxa de eficiência e simples de manipulação permitindo o seu uso na edição genética.

O sistema CRISPR-Cas9 é composto por um conjunto de repetições palindrômicas regularmente interespaçadas, intercaladas pedaços do DNA de microrganismos (motivo adjacente protoespaçador) e por operons dos genes da Cas9 (CASTRIGNANO, 2017).

Segundo Listik e Carmo (2016), a quebra da dupla fita de DNA pode ser feita através da associação da endonuclease Cas9 com a CRISPR RNA (crRNA) e com o crRNA com ativação em trans (TranscrRNA) formando um complexo. A Cas9 pode ser programada inserindo um RNA sintético, que é constituído pelo crRNA e pelo transcrRNA hibridizados, servindo como transcrito único e quimérico responsável por clivar as sequências de DNA específicas e de interesse (figura 6) (JINEK et al., 2014).

A endonuclease apresenta domínios como o RuvC e HNH, e tem como característica o motivo adjacente ao protoespaçador que é responsável por flanquear

a porção 3' terminal do DNA alvo, servindo como um buscador de proteínas, tornando-se uma endonuclease específica e programável (NISHIMASU et al., 2014).

Cada um dos domínios tem a função de clivar uma das fitas do DNA detectado pelo sistema CRISPR-Cas9. Através de uma mutação em um dos domínios pode inativá-lo, com isso pode ser gerado proteínas de ligação que reconheçam o alvo específico, realizando sua clivagem de uma das fitas de DNA (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

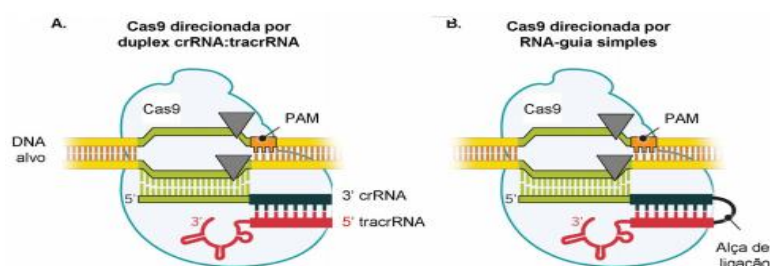
O sistema CRISPR-Cas9 pode induzir a quebra na dupla da fita de DNA, através do reparo direcionado por homologia ou pela união terminal não homóloga, na qual podem aplicar para criar novos modelos para terapias genéticas, removendo sequências mutadas responsáveis por causar doenças genéticas ou adquiridas como HIV/AIDS. Este sistema apresenta vantagens se comparada às outras nucleases conforme mostra o quadro 2 (LISTIK; CARMO, 2016).

O sistema da Cas9 pode atuar também com uma molécula guia de RNA formado pelo crRNA e transcrRNA sintéticos ligados por uma alça, que é responsável por guiar e clivar em pontos específicos através do reparo direcionado por homologia (figura 6 B) (JINEK et al. 2014).

Esta tecnologia tem se mostrado promissora em humanos, pois através da edição gênica, pode trazer a cura de mutações que são responsáveis por causar doenças genéticas, erros inatos do metabolismo e também no combate de vírus que se integram no DNA, como o HIV (CASTRIGNANO, 2017).

Uma das dificuldades do sistema é o uso dos vetores virais como veículo para levar o sistema para o interior, pois como vistos anteriormente esses vetores possuem a capacidade de infectar várias células e não ser possível controlá-los após inseridos, o que traz as preocupações sobre os riscos do uso. Devido a isso outros métodos estão sob avaliação, tais como por plasmídeo, métodos físicos como a eletroporação, de forma que minimizem cada vez mais os riscos e assim a técnica se torne cada vez mais segura para uso (KENNEDY; CULLEN, 2017).

Figura 6: Mecanismo do Sistema CRISPR-Cas9



Fonte: Adaptado de Castrignano (2017).

Quadro 2: Vantagens e Desvantagens das principais nucleases usadas na edição gênica.

Nucleases	Vantagens	Desvantagens
TALEN	-As quebras de fita dupla do DNA podem ser feitas tanto pelo HDR, quanto pela união terminal não homóloga; -Customizável;	-Difícil construção plasmidial, devido ao tamanho; - Domínio FokI utilizado não é específico; - Mutações induzidas;
ZNF	-As quebras de fita dupla do DNA podem ser feitas tanto pelo HDR, quanto pela união terminal não homóloga; -Pode ser usada em células-tronco pluripotentes ou somáticas;	- Caro; -Trabalhoso; -Necessita de regiões ricas em guanina; -Mutações induzidas;
CRISPR- Cas9	-Sistema simples e escalonado; Barato; -As quebras de fita dupla do DNA podem ser feitas tanto pelo HDR, quanto pela união terminal não homóloga;	-Mutações induzidas; -Uso de Vetores virais;

Fonte: Adaptado de Listik e Carmo (2016).

3.4 Doenças genéticas

Segundo Casagrande (2006) as doenças genéticas são alterações no material genético (DNA) que podem ocorrer em um ou mais genes, em parte de um cromossomo ou, até mesmo, em um cromossomo completo.

As doenças genéticas são divididas em grupos que variam de acordo com sua alteração. São eles: Distúrbio de herança mitocondrial, distúrbio monogênico, distúrbio multifatorial e distúrbio cromossômico. Para Casagrande (2006) os distúrbios monogênicos são mutações transmitidas em genes isolados. Os distúrbios de herança mitocondrial são defeitos ocasionados em moléculas presentes no DNA mitocondrial e são mais raras. Os distúrbios cromossômicos são alterações cromossômicas que variam desde duplicações, deleções, translocações e inserções e o distúrbio multifatorial corresponde a interações complexas em que o ambiente e um conjunto de genes dão origem ao desenvolvimento das malformações congênitas e muitas doenças que atualmente estão se tornando cada vez mais frequentes.

A terapia genética para Pereira (2015), estava direcionada para doenças genéticas hereditárias monogênicas no início. Contudo, vários ensaios clínicos foram

feitos atualmente para o tratamento tanto de doenças genéticas como também adquiridas infecciosas como HIV, doenças oncológicas como câncer de pulmão, hemoglobinopatias e doenças cardiovasculares.

3.4.1 Hemofilia

A hemofilia é uma doença genética da coagulação sanguínea pertencente ao grupo de distúrbio monogênico de herança recessiva ligada ao do cromossomo X que afetam os fatores VIII no caso da hemofilia A e IX da coagulação no caso da hemofilia B, na qual ambas apresentam manifestações clínicas semelhantes (SANCHEZ et al., 2018).

Para García e Majluf (2013), a hemofilia é caracterizada por um sangramento que pode acometer articulações, tecidos e músculos, podem ser espontâneas ou induzidas e podem causar inflamações, dores e danos permanentes.

Segundo Castillo-González (2012), a hemofilia A possui uma incidência de 1/5-10.000 homens enquanto a Hemofilia B possui uma incidência de 1/60.000, sendo a segunda doença mais comum estando apenas atrás da doença de Von Willebrand. Por ser uma doença de padrão de herança do cromossomo X, suas manifestações hemorrágicas ocorrem quase que exclusivamente em indivíduos do sexo masculino, porém também pode ocorrer a doença em alguns casos nas mulheres, tais como, na síndrome de Turner (45, X0), e por alguns mecanismos genéticos que desencadeiam efeitos clínicos que inativam um dos X na mulher (CASTILLO-GONZÁLEZ, 2012; MUNDO-AYALA; JALOMA-CRUZ, 2008).

Conforme Lavaut (2014) apresenta, algumas mulheres podem apresentar episódios de alguns sangramentos em certas ocasiões, tais como, menorragia, epistaxe, gengivorragia, os quais estão relacionados diretamente aos níveis de fatores VIII e IX no plasma, no qual acaba necessário um aconselhamento genético nas famílias portadoras para que possam ser identificados os portadores para que haja um diagnóstico pré-natal.

Para Morales-Machin et al.(2008), a variação genética das mutações associadas aos genes codificantes do Fator VIII que é localizado no cromossomo Xq28 e no gene codificante do fator IX localizado no cromossomo Xq27, tornam-se difíceis de detectar de maneira direta, porém foi desenvolvido um método que foi baseado na segregação de polimorfismos presentes nas famílias dos portadores de hemofilia, no qual abriu-se uma possibilidade para sua identificação.

Com a identificação, abriu possibilidades para um diagnóstico e o tratamento, recentemente segundo Franchini, Favaloro e Lippi (2010), o desenvolvimento de medicações está focado em produtos que diminuem o número de infusões a um

paciente hemofílico favorecendo uma adesão melhorada e garantindo uma qualidade de vida. Através disso a engenharia genética apresentou um sucesso terapêutico no perfil farmacocinético e prolongamentos das meias vidas das proteínas terapêuticas através da glicosilação, no qual é um processo de infusão de proteínas direcionadas ao local específico (DEFREES et al., 2006).

Como a hemofilia é uma doença genética monogênica, segundo Horava e Peppas (2017), a terapia genética tem como objetivo procurar um tratamento completo para o hemofílico, utilizando técnicas como CRISPR para uso de vetores virais (adenovírus), na qual embora seja um tratamento que possa ser promissor, ainda há muitas dúvidas a respeito da técnica por não ser conhecida totalmente sobre os efeitos. São pesquisadas técnicas inovadoras dos fatores de coagulação, que podem ser desde administrações orais até mesmo infusões, cujo possam melhorar cada vez mais a adesão dos medicamentos.

Para Martinez-Sanchez e colaboradores (2018), a hemofilia deve ser considerada uma enfermidade fatal, afetando a qualidade de vida dos pacientes e dos portadores. Através das atualizações que sofrem os diagnósticos e as investigações a fundo, as novas descobertas podem desenvolver os produtos terapêuticos mais avançados e, com isso, surgem novas ferramentas para a cura através da terapia genética.

3.4.2 Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é também conhecido como carcinoma de pulmão, que está presente no grupo de distúrbio multifatorial. Segundo o INCA (2011) é um tumor maligno mais comum entre homens e mulheres que está associado ao consumo de derivados de tabaco com alta taxa de mortalidade. Para Araújo e colaboradores (2018), é o segundo câncer com incidência em homens e o quarto com incidência em mulheres.

Segundo Rodrigues e colaboradores (2018), o câncer de pulmão é um dos mais devastadores ficando atrás apenas do câncer de próstata e de mama. A neoplasia de pulmão surge devido ao acúmulo de mutações genéticas que são causadas por diversos fatores, dentre eles a fumaça do cigarro que agride o epitélio pulmonar, provocando as mutações nas células componentes do tecido, gerando a neoplasia.

A neoplasia origina-se por uma célula DNA alterada devido ao fator carcinogênico nas vias aéreas e segundo estudos existe uma possibilidade da herança genética quando associada ao tabagismo ser responsável por metade dos casos de câncer pulmonar (VIEIRA et al., 2017).

Os carcinógenos segundo Ismael e colaboradores (2010), são metabolizados pela citocromo p450, o polimorfismo do metabolismo dessas enzimas pode ser um possível mecanismo para o aumento do risco de câncer de pulmão, além de enzimas que são responsáveis pelo reparo de DNA.

Para Vieira e colaboradores (2017), existem mais de 230 genes ligados ao câncer, onde genes do reparo de DNA possuem uma relação direta com a proliferação das células e a supressão tumoral esteja envolvida no câncer pulmonar.

O receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR) é uma glicoproteína da membrana plasmática que possui uma porção extracelular de ligação EGFR, uma região transmembrana e uma tirosina quinase no meio interno, na qual é responsável por estimular a proliferação celular (SILVA; MAINENTI; LAIZO, 2015 ; YANG et al., 2014; YOSHIDA, ZHANG, HAURA, 2010). Sua superexpressão segundo Solomon (2014), está associado à metástase, à agressividade e a menor sobrevida do indivíduo e é onde ocorre a maior mutação, sendo ela utilizada como marcador para a neoplasia pulmonar, além da EGFR, também mutações na KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), uma proteína importante na mitogênese, em que junto a outras proteínas atuam transmitindo sinais da superfície celular para outras estruturas intracelulares (VIEIRA et al., 2017).

Segundo Sullivan e Planchard (2016) outra proteína chamada BRAF (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) está associada a formação de tumores malignos que dão origem ao câncer pulmonar, em sua forma ativa emite sinais através da MEK (mitogen-activated protein kinase) para poder ativar a ERK (extracellular signal-regulated kinase), que é responsável pela atuação na ativação dos fatores de transcrição que induzem processos bioquímicos, que se diferenciam, proliferam e são importantes para o crescimento celular e sua apoptose (BALDOTTO et al., 2014).

Como já são conhecidos vários genes, testes moleculares foram introduzidos e são de fundamental importância para o sucesso terapêutico (ARAÚJO et al., 2018). Porém, devido ao acesso limitado em países em crescimento, tornando-se um desafio por ser uma técnica de alto custo e nova.

O câncer de pulmão é um grande alvo para pesquisas com o sistema CRISPR cas9, pois através dele foi possível injetar linfócitos geneticamente modificados como uma resposta terapêutica à resposta do sistema imunológico contra as células cancerosas presentes no pulmão (CYRANOSKI, 2016). Segundo este mesmo autor, a CRISPR e sua proteína associada 9 (Cas9) desativou uma proteína chamada de PD-1, responsável por inibir a resposta imunológica do sistema imunológico contra

as células neoplásicas, o que ajudou na resposta imunológica dos linfócitos contra o câncer.

3.4.3 HIV/Aids

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus de RNA que através da transcriptase reversa converte em DNA, capaz de causar a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (SILVA; DALBERTO; NARDI, 2006).

Para Ferreira, Riffel e Sant'ana (2010) o vírus do HIV é não homogêneo, porém ocorrem variações do tipo HIV-I, no caso o HIV-II é menos virulento e está presente apenas na África.

O HIV ainda hoje não existe uma cura completa ou uma vacina, pois o vírus possui uma heterogeneidade genética conferida pelo hospedeiro necessitando de um esforço para pesquisas que tentam descobrir fatores que ajudam na replicação do HIV. A partir disto, a identificação de genes candidatos, tem sido o foco das pesquisas. Segundo An e Winkler (2010), a identificação de genes que afetam a resistência e a sucessão do vírus HIV é de extrema importância para desvendar as interações entre o DNA do hospedeiro e o do vírus.

Para Tebas et al. (2014) a proteína CCR5 presente nas membranas dos linfócitos T CD4 serve de receptor específico impedindo que microrganismos invadam a célula. Devido a isto o vírus do HIV utiliza-o como um co-receptor para ter acesso ao linfócito. Foi descoberto em 1996 uma mutação do gene que codifica o CCR5 em que ocorreu uma deleção de 32 pares de bases do gene, o qual ofereceu uma proteção contra a infecção pelo HIV em pessoas com característica homozigota. Essa descoberta tornou-se a primeira evidência de que o HIV utiliza o gene CCR5 como co-receptor para penetrar na célula (AN; WINKLER, 2010).

O vírus HIV para entrar na célula hospedeira requer uma interação com o receptor de membrana CD4 com ativação de genes co-receptores *CCR5* e *CXCR4* do HIV-I. Esta interação é mediada pela glicoproteína viral gp120 com o co-receptor do CD4, na qual a ligação provoca alterações conformacionais que facilitam na ligação (GRANDE et al., 2019).

Uma vez no citoplasma o genoma viral de RNA é transcrito através de uma transcriptase reversa e torna-se um DNA pró-viral. Este DNA associa-se a proteínas virais e celulares que a transportam para o núcleo celular, onde a fita viral acaba sendo integrada no cromossomo hospedeiro, na qual acaba sendo transcrita e traduzida produzindo assim as poliproteínas que são as proteínas originadas a partir do vírus (FERREIRA; RIFFEL; SANT'ANA, 2010).

Como o genoma do HIV é capaz de sofrer mutações que são capazes de modificar a sua sequência de DNA, torna-se mais difícil descobrir uma cura. Com base nisso, a terapia genética através dos sistemas terapêuticos vieram para modificar e facilitar o tratamento através da técnica de CRISPR/Cas9. Segundo Silva, Dalberto e Nardi (2006) a terapia genética possui como princípio a inserção de genes externos com o objetivo de correção ou modificação das funções das células, nas quais as doenças afetaram. Para Tebas e colaboradores (2014), a capacidade de modificar ou editar genes têm um desafio de gerar uma ruptura no ponto específico na dupla fita do DNA. No caso do HIV o CCR5 foi escolhido por ser co-receptor que facilita a entrada no vírus HIV, no qual pessoas homocigotas que sofreram uma deleção de 32 pares de base no gene CCR5, utilizando a técnica CRISPR/Cas9, tornando-se resistentes a infecção.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da revisão realizada neste artigo foi possível compreender que a terapia gênica está abrindo caminhos novos para tratar doenças originadas por mutações genéticas e doenças que são adquiridas como, por exemplo, virais e doenças provocadas por fatores externos e hábitos alimentares, que as pessoas se expõem. As terapias genéticas têm se mostrado eficazes em seus resultados, mesmo diante de dificuldades e limitações.

A utilização de vetores que servem de veículos para carrear os genes terapêuticos até o local específico possui como característica a eficiência, porém demonstram limitações em relação ao direcionamento celular e também causam efeitos colaterais como, por exemplo, a ativação de respostas imunológicas.

Devido a essas consequências os cientistas através das pesquisas buscaram elaborar uma terapia que gerasse uma menor resposta imunológica onde criaram sistemas terapêuticos que combinados com vetores geraram um resultado muito mais eficiente e específico, pois conseguiram direcionar o alvo para o gene ou local exato que estava mutado, aumentando assim a taxa de sucesso e minimizando as reações adversas e efeitos colaterais. Com isso, os sistemas terapêuticos vieram para somar e cada vez mais vão sendo ampliados e melhorados até que se tornem um sucesso por completo.

5.REFERÊNCIAS

AIED, A., et al. Polymer gene delivery: overcoming the obstacles. **Drug Discovery Today**.England, v.18, n.21-.22, p.1090–1098, Jul. 2013.

AL-DOSARI, M. S.; GAO, X. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. **The AAPS journal**, Estados Unidos, v.11, n.4, p.671. Out. 2009.

ALVES, R.F. **Desenvolvimento e caracterização de vetores não virais para entrega gênica baseados em proteínas e lipossomas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

AN P; WINKLER C A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. **Trends Genetics**. Inglaterra, v.26, n.3, p.119-131, Fev. 2010.

ARAÚJO, L H et al.. Câncer de pulmão no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. Rio de Janeiro, v.44, n.1, p 55-64, Jul. 2018.

ARONIN, N.; DIFIGLIA, M. Huntingtin-lowering strategies in Huntington's disease: antisense oligonucleotides, small RNAs, and gene editing. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**. United States, v. 29, n. 11, p. 1455-1461, Set. 2014.

ARTIOLI, G.G.; HIRATA, R. D. C.; JUNIOR, A.H.L. Terapia gênica, Doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. Niterói, v.13, n.5, p. 349-354, Out. 2007.

AZEVÊDO E, S. Terapia Gênica. **Revista Bioética**. Salvador, v.5 n.2 p.5.2009.

BALDOTTO, C. S. et al. Sobrevida e fatores prognósticos em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas assistidos na saúde suplementar. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 1001-1014, out./ dez. 2014.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v.43, n. 2, p.167-179, Abr/Jun, 2007.

BERNAL, C.P.J. et al.. Biología sintética: aplicaciones y dilemas éticos. **III Congreso Internacional de la REDBIOÉTICA UNESCO para América Latina y el Caribe Bioética en un continente de exclusión: de la reflexión a la acción**. Colômbia, Nov. 2010.

BOCH, J. et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. **Science**. New York, v. 326, n. 5959, p. 1509-12, Dez. 2009.

BULDU, JM et al.. Redes genéticas sintéticas: de lo simple a lo complejo. **Revista española de física**, v.21, n.3, p.10-16, out. 2007.

CASAGRANDE, G L. **A Genética Humana no Livro Didático de Biologia**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Científica e Tecnológica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Educação Científica e Tecnológica da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

CASTILLO-GONZÁLEZ D. Hemofilia: aspectos históricos y genéticos. **Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia**. Ciudad del Habana, v. 28, n. 1, p.22-33. Jan/Mar, 2012.

CARLSON, D. F. et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. United States, v. 109, n. 43, p. 17382-17387, Out. 2012.

CASTRIGNANO, S. Enzimas em Biologia Molecular III. CRISPR- Cas9. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 2017, n. 27, 2017.

CERMAK, T. et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. **Nucleic acids research**, England, v.39, n. 12, p. e82, abr. 2011.

CEVHER E., DEMIR A., SEFIK E. **Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy**. In: SEZER A. D., Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems. InTech; 2012. p.437- 470.

CHANDRAKASAN, S.; MALIK, P. Gene therapy for hemoglobinopathies: the state of the field and the future. **Hematology Oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 199-216, abr.2014.

CHANG, H.I.; YEH, M.K. Clinical Development of liposome-based Drugs: formulation, characterization and therapeutic efficacy. **International journal of nanomedicine**. Nova Zelândia, v.7 n.2012, p. 49-60, Dez. 2011.

CHIRA S, et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. **Oncotarget**, United States, v. 6, n. 31, p. 30675–30703, out. 2015.

COX, D. B.; PLATT, R. J.; ZHANG, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. **Nature medicine**. United States, v. 21, n. 2, p. 121-31, Feb. 2015.

CYRANOSKI, D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. **Nature**, London, v.539, n.7630, p. 479, Nov. 2016.

DANIEL R.; SMITH J.A. Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences. **Human gene therapy**. Estados Unidos, v. 19, n. 6, p.557-568, Jun. 2008.

DEFREES S et al.. GlycoPEGylation of recombinant therapeutic proteins produced in Escherichia coli. **Glycobiology**. Oxford ,v.16, n.9, p. 833-843, set. 2006.

DOUDNA J.A., CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, New York, v.28, n.346, p.6213, Nov. 2014.

FÉCCHIO D. C.; MACEDO L.C.; RICCI G. C. L. O uso da terapia gênica no tratamento de doenças. **Revista UNINGÁ**. Paraná, v.21, n.1, p.44-49. Jan/ Mar. 2015.

FERREIRA R C S; RIFFEL A; SANT'ANA A E G. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química nova**. São Paulo v.33, n.8, p.1743-1755. Ago. 2010

FRANCHINI M; FAVALORO E J; LIPPI G. Mild hemophilia A. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. Parma, Itália, v.8, n.3, p.421-432, Fev. 2010.

GARCÍA-CHÁVEZ J; MAJLUF-CRUZ A. Hemofilia. **Gaceta Médica de México**. México, v. 149, n. 3, p. 308-321, Mai/Jun, 2013.

GHOSH S.; THRASHER A. J.; GASPAR H. B. Gene Therapy for monogenic disorders of the bone marrow. **British journal of haematology**, v. 171, n. 2, p.155- 170, out. 2015.

GRIFFITHS, A J F et al.; WESSLER S R; LEWONTIN, R C; CARROLL, S B. **Introdução a Genética**. 9^o edição. Natal: Guanabara Koogan,2008.

GONÇALVES, G.A. R.; PAIVA, R. M. A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein**, São Paulo, v.15, n. 3, p. 369-375, jul./set. 2017.

GRANDE F et al. CCR5/CXCR4 Dual Antagonism for the Improvement of HIV Infection Therapy. **Molecules** v.24, n.3, p.550, Fev. 2019.

GREEN B. N., JONHSON C. D., ADAMS A. Writing narrative literature reviews for peer-reviewed journals: secrets of the trade. **Journal of chiropractic medicine**. United States, v.5, n.3, p. 101-107. Fev. 2006.

HAEUSSLER, M.; CONCORDET, J. P. Genome Editing with CRISPR-Cas9: Can It Get Any Better? **Journal of genetics and genomics**.China, Mai. 2016.

HIRSCH F.; LÉVY Y.; CHNEIWEISS H. CRISPR-Cas9: A European position on genome editing. **Nature**. London, v. 541, n. 7635, p 30, Jan.2017.

HORAVA S D; PEPPAS N A. Recent advances in hemophilia B therapy. **Drug Delivery and Translational Research**. Espanha,v.7, n.3, p. 359-371, jun. 2017.

HOTTA, A.; YAMANAKA, S. From Genomics to Gene Therapy: Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. **Annual review of genetics**, United States, v. 49, p. 47-70, Set. 2015.

INCA. **ABC do Câncer abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro,2011.Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>. Acesso em : 14 mar 2019.

ISMAEL, G F V et al. Aspectos clínicos e histopatológicos em câncer de pulmão: análise dos dados de uma instituição no interior paulista entre 1997 e 2008. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**. São Paulo, v.7, n. 22, p. 72-78, Out. / Dez. 2010.

JINEK, M.et al.Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. **Science**. United States v. 343, n. 6176, p. 1247997, Mar 14 2014.

JOUNG, J. K.; SANDER, J. D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, England. v. 14, n. 1, p. 49-55, Jan 2013.

KANDAVELOU, K. et al. . Targeted manipulation of mammalian genomes using designed zinc finger nucleases. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, San Diego, v. 388, n. 1, p. 56-61, 2009.

KAMIMURA K. et al. Advances in Gene Delivery Systems.**Pharmaceutical medicine**,Nova Zelandia. v. 25, n. 5, p.293- 306.out. 2011.

KARTHIKEYAN, B, V; PRADEEP A,R.Gene therapy in periodontics: a review and future implications. **The Journal of Contemporary Dental Practice**. v.7, n.3, p.83-91. Jul. 2006.

KELES E., et al. Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications. **Biomaterials science**.England, v.4, n.9, p.1291-1309. Ago. 2016.

KENNEDY E. M., CULLEN B.R. Gene editing: a new tool for viral disease. **Annual Review of Medicine**, United States, v.68, p.401-411, Jan.2017.

KIM, S. et al. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. **Nature Methods**, New York, v. 8, p. 7, 2011.

KLUG, A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation.**Annual review of biochemistry**. United States, v. 79, p. 213-231, Jan. 2010.

LAVAUT K. Importancia del diagnóstico de portadoras en familias con antecedentes de hemofilia. **Revista Cubana Hematología Inmunología Hemoterapia**. Ciudad del Habana,v. 30 n. 2, p. 108-113. abr/jun, 2014.

LINDEN, R. Terapia Gênica:o que é, o que não e o que será. **Estudos Avançados**. São Paulo,v.24, n.70, p.31-69. Ago. 2010.

LINDVALL, O.; WAHLBERG, L. U. Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? **Experimental Neurology**. Rio de Janeiro, v.209, n.1, p.82-88,Jan. 2008.

LISTIK, E.; CARMO, A. C. V. As Características dos Mecanismos e Sistemas de Edição Genômica. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**. São Paulo, v.3, n.10,p. 2357-8173. Abr/Jun, 2016.

LORIO, F. F.; DI STASI, C. A.; BORGES, F. S. Eletroporação: uma revisão. **Revista Fisioterapia Ser**, São Paulo, v. ano 2, n. 2. Abr/mai/jun, 2007.

LOUREIRO, A. P. C. **Vetores não virais com aplicação na terapia gênica: Os poliplexos**. Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.Portugal, 2016.

MAEDER M. L. et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. **Molecular cell**, United States, v. 31, n. 2, p. 294-301, jun. 2008.

MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 3, p. 181-190, mar. 2010.

MARTINEZ-SANCHEZ, L. M. et al . Hemofilia: abordaje diagnóstico y terapéutico. **Revista Facultad Nacional de Salud Pública**, Medellín , v. 36, n. 2, p. 85-93, Mai/Ago, 2018.

MENCK C.F.M.; VENTURA A. M. Manipulando genes em busca de cura:o futuro da terapia gênica. **Revista USP**. São Paulo,n.75, p.51-61,Set/nov. 2007.

MISRA, S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. **The Journal of the Association of Physicians of India**, Bombay, v. 61, n.2, p.127-133, Fev.2013.

MOJICA F. J. et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. **Society for General Microbiology**. London, v 155, n. parte 3 , p733-740, Mar.2009.

MORALES-MACHÍN A et al. Diagnóstico prenatal molecular indirecto de Hemofilia A y B. **Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**, Maracaibo,v.49, n.3, p 289-297, out. 2008.

MUKHERJEE S.; THRASHER A. J. Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects. **Gene**, v. 525, n. 2, p. 174-181, ago. 2013.

MUNDO-AYALA J N, JALOMA-CRUZ A. Evaluación del patrón de inactivación del cromosoma X en portadoras sintomáticas y mujeres con hemofilia. **Gaceta Médica México** . México, v.144, n.2, p 171-174, Nov 2008.

NIENHUIS A.W.; NATHWANI A. C.; DAVIDOFF A. M. Gene therapy for hemophilia. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**. San Diego, v. 25, n. 5, p. 1163-1167, Mai.2017.

NISHIMASU, H. et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. **Cell**. United States v. 156, n. 5, p. 935-949, Fev. 2014.

NUSSBAUM, R L; MCLNNES, R R; WILLARD, H F.**Thompson e Thompson, genética médica**. 7º edição, Rio de Janeiro: editora Elsevier, 2008.

OKANO, H. et al. The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 17, n. 6, p. 336-340, dez. 2012.

OLIVEIRA, B. A. et al. Vetores virais para uso em terapia gênica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 9, n. 2, p. 57-66, jun. 2018.

OSBORN, M. J. et al. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. **Molecular Therapy**, v. 21, n. 6, p. 1151-1159, jun. 2013.

PÁJARO C N, OLIVERO V J, REDONDO P J. **Nanotecnología aplicada a la medicina**. Revista Científica Guillermo de Ockham.Colômbia, v.11 n.1 p. 125-133, Jan/ jun. 2013.

PEREIRA, J. M. C .L. A. **Terapia genética: Métodos e aplicações**. 2015.Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Porto, 2015.

PIERCE, B A. **Genética um enfoque conceitual**. 5º edição. Guanabara Koogan :Rio de Janeiro, 2016.

PEREZ, E. E. et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. **Nature biotechnology**. United States, v. 26, n. 7, p. 808-816, Jul.2008.

RAMAMOORTH M., NARVEKAR A. Non viral vectors in gene therapy-an overview. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, Índia, v.9,n.1,p. GE 01-06. Jan/2015.

REIS, A. et al. New England Biolabs, inc. CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology, New England, 2014. Disponível em <<https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>>. Acesso em : 11 mar, 2018.

RODRIGUES, W P. Câncer de pulmão suas consequências na qualidade de vida. **Revista Saúde em Foco**. Edição nº 10, Bahia, 2018. Disponível em <http://unifia.edu.br/revista_eletronica/revistas/saude_foco/artigos/ano2018/011_C%C3%82NCER_DE_PULM%C3%83O_E_SUAS.pdf> Acesso em : 14 mar 2019

SANTOS, E. G. et al. Deformidades e Incapacidades dos Hemofílicos. **Revista de Terapia Ocupacional da Universidade de São Paulo**. São Paulo, v. 18, n. 2, p.86-94, Mai/ago.2007.

SAAYMAN, S. et al. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. **Expert opinion on Biological Therapy**. London, v. 15, n. 6, p. 819-830, Jun. 2015.

SHIROTA, H. et al. Potential of transfected muscle cells to contribute to DNA vaccine immunogenicity. **The Journal of immunology**. United States, v. 179, n.1, p. 329-336, Ago. 2007.

SILVA, F H; DALBERTO, T P; NARDI, N B. Beyond retrovirus infection: HIV meets gene therapy. **Genetics and Molecular Biology**. São Paulo, v.29, n. 2, p. 367-379. 2006.

SILVA, H. A. P.; MAINENTI, P.; LAIZO, Ar. O papel de marcadores tumorais no câncer de pulmão: revisão da literatura. **Revista Médica Minas Gerais**, Minas Gerais v. 25, n. 4, p. 597-564, Mar. 2015.

SOLOMON, B. J. et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 371, n. 23, p. 2167-2177, dec. 2014.

STRACHAN, T; READ, A. **Genética Molecular Humana**.4º edição. Artmed, Porto Alegre ,2013.

SULLIVAN, I.; PLANCHARD, D. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: the latest evidence and developments. **Therapeutic advances in medical oncology**, v. 8, n. 1, p. 32-47, 2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4699265/> doi: 10.1177/175883401561735> Acesso em : 14 mar 2019.

TEBAS, P. et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. **The New England journal of medicine**, Boston, v.370, n. 10, p. 901-910, Mar.2014.

TEMPLETON, N. S. **Gene and cell therapy: therapeutic mechanisms and strategies**. 3ª edição. New York, CRC Press, 2008.

VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F. **Edição de Genoma com nuclease “Zinc Finger”**.21º edição, 2016.

VIEIRA, V. S. et al. Câncer de Pulmão de não pequenas células. **Enciclopédia Biosfera- Centro científico conhecer**. Goiânia, v.14 n.25, p 1512, Jun. 2017.

WATSON, J. et al.. **Molecular Biology of the gene**. 7^o edição. Porto Alegre: ArtMed, 2015.

YANG, Z.M. et al. Analysis of CEA expression and EGFR mutation status in non-small cell lung cancers. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok v. 15, n. 8, p. 3451-3455, Ago. 2014.

YOSHIDA, T.; ZHANG, G.; HAURA, E.B. Targeting epidermal growth factor receptor: central signaling kinase in lung cancer. **Biochemical pharmacology**, v.80 n.5, p.613-623, 2010. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20519133>> Acesso em : 14 mar 2019.