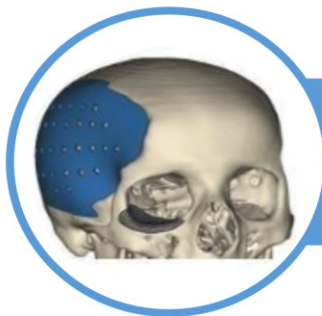




USO DE CRISPR-CAS9 EM ONCOLOGIA: REVISÃO SISTEMÁTICA DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS IN VIVO E ENSAIOS CLÍNICOS DE FASE I

BLENOW ALEX SILVA¹, RAFAEL RAUBER², RAFAEL FREZ MION³, LUÍZA LIMA MARTINS⁴, NATHALIA FORMENTINI⁵, VINICIUS GUTH⁶



<https://doi.org/10.36557/2674-8169.2025v7n723-749>

Artigo recebido em 6 de Agosto e publicado em 16 de Setembro de 2025

REVISÃO SISTEMÁTICA

RESUMO

O uso de terapias baseadas em CRISPR-Cas9 para câncer tem sido proposto como promissor, porém as evidências clínicas permanecem limitadas e heterogêneas. Realizamos uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos in vivo e ensaios clínicos para sintetizar as evidências de eficácia e segurança de intervenções terapêuticas com CRISPR-Cas9 em oncologia. Pesquisamos as bases MEDLINE/PubMed e EBSCO até 8 de julho de 2025. Incluímos estudos (2019–2024) em inglês ou português que envolveram humanos ou modelos animais in vivo com câncer e utilizaram CRISPR-Cas9 como intervenção terapêutica; excluímos estudos apenas in vitro, aplicações não oncológicas, propostas teóricas, revisões e duplicatas. Devido à heterogeneidade, empregamos síntese narrativa; o risco de viés foi avaliado por ROBINS-I (ensaios clínicos) e SYRCLE (pré-clínicos), e a certeza da evidência foi julgada pelo GRADE. Identificamos 10 estudos elegíveis (5 ensaios clínicos de fase I; 5 pré-clínicos in vivo). Nos ensaios clínicos (n=36), as intervenções foram majoritariamente deleção de PD-1 em células T (e.g., edição por eletroporação), com desfechos mostrando respostas parciais de 0–19% e doença estável em até 47% dos pacientes; um estudo reportou mediana de sobrevida de 42,6 semanas. A toxicidade reportada foi geralmente baixa a moderada; translocações cromossômicas foram observadas em um estudo. Nos modelos pré-clínicos, observou-se supressão tumoral significativa em todos os estudos, com reduções médias de ~50–70% em volume/número de metástases versus controles (p<0,05 na maioria), e baixa toxicidade aparente. A certeza global da evidência foi muito baixa para eficácia e segurança, principalmente por risco de viés elevado/moderado, amostras pequenas, inconsistência e imprecisão. Esta revisão indica que terapias oncológicas baseadas em CRISPR-Cas9 apresentam sinais iniciais de segurança e atividade biológica, mas as evidências atuais são insuficientes para estabelecer superioridade sobre tratamentos convencionais. São necessários ensaios fase II/III controlados, com maior tamanho amostral, padronização de desfechos e monitoramento de longo prazo (incluindo efeitos off-target) antes de qualquer adoção clínica ampla.

Palavras-chave: CRISPR-Cas9; terapia gênica; câncer; revisão sistemática; ensaios clínicos de fase I; estudos pré-clínicos;

Use of CRISPR-Cas9 in oncology: systematic review of preclinical in vivo studies and phase I clinical trials

ABSTRACT

The use of CRISPR-Cas9-based therapies for cancer has been proposed as promising, but clinical evidence remains limited and heterogeneous. We conducted a systematic review of preclinical in vivo studies and clinical trials to synthesize the evidence of efficacy and safety of CRISPR-Cas9 therapeutic interventions in oncology. We searched the MEDLINE/PubMed and EBSCO databases up to July 8, 2025. We included studies (2019–2024) in English or Portuguese that involved humans or in vivo animal models with cancer and used CRISPR-Cas9 as a therapeutic intervention; we excluded in vitro studies, non-oncological applications, theoretical proposals, reviews, and duplicates. Due to heterogeneity, we employed narrative synthesis; risk of bias was assessed by ROBINS-I (clinical trials) and SYRCLE (preclinical), and certainty of evidence was judged by GRADE. We identified 10 eligible studies (5 phase I clinical trials; 5 preclinical in vivo studies). In clinical trials (n=36), interventions were mostly PD-1 deletion in T cells (e.g., electroporation editing), with outcomes showing partial responses of 0–19% and stable disease in up to 47% of patients; one study reported a median survival of 42.6 weeks. Reported toxicity was generally low to moderate; chromosomal translocations were observed in one study. In preclinical models, significant tumor suppression was observed in all studies, with mean reductions of ~50–70% in volume/number of metastases versus controls ($p < 0.05$ in most), and low apparent toxicity. The overall certainty of the evidence was very low for efficacy and safety, mainly due to high/moderate risk of bias, small sample sizes, inconsistency, and imprecision. This review indicates that CRISPR-Cas9-based cancer therapies show early signs of safety and biological activity, but current evidence is insufficient to establish superiority over conventional treatments. Controlled phase II/III trials with larger sample sizes, standardized outcomes, and long-term monitoring (including off-target effects) are needed before any widespread clinical adoption.

Keywords: CRISPR-Cas9; gene therapy; cancer; systematic review; phase I clinical trials; preclinical studies

Instituição afiliada – CENTRO UNIVERSITÁRIO FAG

Autor correspondente: Blenow Alex Silva blenows@gmail.com

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



INTRODUÇÃO

O câncer atualmente representa uma das doenças mais prevalentes no Brasil com mais de 700 mil casos esperados para o triênio de 2023-2025 (1) tendo em vista a grande prevalência da doença e a heterogeneidade de cada caso e que as terapias convencionais podem sofrer de baixa especificidade e se faz necessário considerar novas terapias que considerem esses fatores. Com os recentes avanços em pesquisa foi observado um crescente número de modalidades de tratamentos nunca vistos antes em especial terapias genéticas. O sistema “clustered-interspaced short palindromic repeats” (CRISPR) e “CRISPR associated protein 9” (Cas9) é uma ferramenta que usa RNA para reconhecimento e ligação, seguindo do direcionamento da Cas9 para “cortar” o DNA em ponto específico, sendo mais fácil de trabalhar do que as outras ferramentas atuais como ZFNs e TALENs (2).

CRISPR representa um mecanismo natural dos procariontes e funciona como a imunidade adaptativa desses organismos que os protege de ataque por DNA viral de bacteriófagos e plasmídeos. Sequências únicas localizadas entre as repetições palindrômicas chamadas de “espaçadores” representam DNA estranho originado de bacteriófagos e outros organismos que podem ter infectado a bactéria (3)

Uma vez infectada a bactéria incorpora um fragmento de DNA no locus do CRISPR formando uma matriz de CRISPR que passa por transcrição produzindo CRISPR RNA (crRNA). Esse processo usa proteínas Cas9 que funcionam como tesouras moleculares que quebram o DNA em ligações de nucleotídeos específicas. (3) O crRNA é um RNA dependente de alvo, além disso o sistema também depende de o RNA independente de alvo chamado de trans-activating RNA (tracrRNA) e uma Cas nuclease formando complexos de pre-crRNA onde um sistema de repetição de palíndromos é anelado ao tracrRNA junto com a proteína Cas9 (4). A enzima RNase 3 quebra as fitas entre esses complexos gerando complexos efetores que produzem crRNA

Em 2012 foi proposto por Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier o uso de CRISPR em edição de genoma que envolve combinar crRNA e tracrRNA que naturalmente não se combinam para formar uma única molécula com a ajuda de um ligante. Essa molécula é chamada de single guide RNA (sgRNA) que quando sintetizada

junto com uma sequência de alvo e introduzida na célula desejada junto com Cas9, levando a um complexo efetor que lê o DNA até achar a sequência apropriada junto com a sequência PAM, se ligando e quebrando na localização desejada (5)

O PAM (protospacer adjacent motif) é uma pequena sequência única do DNA viral que se complementa com a sequência do crRNA (4). O complexo efetor então corta as duas fitas do DNA algumas bases acima do PAM em coordenação com a proteína nuclease neutralizando o DNA viral.

A proteína Cas9 funciona como uma tesoura genética de dois domínios o de reconhecimento e o de nuclease. As subunidades de nuclease quebram cada fita de DNA criando quebras de fita dupla. Após a quebra o mecanismo de reparo natural de DNA começa por meio de dois caminhos sendo o mais comum para eucariontes a união de extremidades não homólogas, ele repara a quebra de fita dupla ao juntar novamente as fitas quebradas de maneira não específica o que leva a mutações na conformação das bases levando ao desligamento do gene, criando indels, inserções ou deleções de nucleotídeos que ocorrem durante o reparo do DNA, frequentemente resultando em mutações que podem inativar genes. (4) (6). O domínio de reconhecimento ajuda a incorporar os novos fragmentos de DNA no local da quebra sem adições ou deleções levando a uma taxa de erro menor (4).

O câncer atualmente pode ser definido como a proliferação irrefreada de células transformadas por meio de uma evolução na seleção natural (7). Dessa forma se entende o câncer como uma doença genética em que as células afetadas são diferentes das do hospedeiro por uma alteração seja nos oncogenes, genes responsáveis por sinalizar a divisão e crescimento celular, ou genes supressores tumorais, que atuam atenuando o efeito dos oncogenes, sendo basicamente reguladores de crescimento negativos, promovendo a apoptose da célula com oncogene alterado ou regulando o crescimento. Sabidamente a maioria dos tumores apresentam defeitos nos genes supressores tumorais, seja por deleção ou por mutações que os inativam. (8).

Atualmente se reconhece um grupo de características conhecidas como “Hallmarks of Cancer”, que foram definidas por Hanahan e Weinberg no ano de 2000, que define 6 principais características que todos os tipos de células cancerígenas atendem, a auto-suficiência em sinalização de crescimento, a insensibilidade à supressores de crescimento, evasão a apoptose, potencial replicativo, angiogênese e

invasão de tecidos. (9)

O tratamento de câncer pode ser abordado de maneira diversa, desde redução de tumores associado a radioterapia, ressecção cirúrgica há tratamento de tumores associados aos genes. Oncogenes são diferentes de genes normais e são vitais seja no início da doença ou na sua persistência. O uso de CRISPR-Cas9 atinge diretamente esses genes com o objetivo de eliminar o câncer ao identificar o oncogene responsável e pode ser usado, *in vivo*, para desligá-los. (4).

No entanto uma rápida pesquisa na literatura nos mostra uma preocupante falta de estudos que comparem essas terapias com o objetivo de determinar sua eficácia e segurança seja em ensaios clínicos ou pré-clínicos para entender em que fase essa tecnologia se encontra e quais os desafios atuais para torná-la uma alternativa de tratamento adequada.

O Objetivo geral dessa pesquisa é determinar a eficácia e segurança do uso de CRISPR-Cas9 ao tratar doenças oncológicas seja em modelos animais ou seres humanos. Especificamente espera-se definir em que ponto as pesquisas se encontram, se o sistema é mais eficaz que tratamentos convencionais ou se comparado a outros modelos de edição genética, quais os desafios são encontrados no seu uso, e quais os efeitos da terapia no câncer e no organismo como um todo

METODOLOGIA

Foram definidos 7 critérios para a inclusão do estudo, Estudos envolvendo seres humanos ou modelos animais in vivo (como camundongos) com diagnóstico de câncer, Terapia gênica utilizando o sistema CRISPR-Cas9 como estratégia de tratamento oncológico (seja para desligar oncogenes, corrigir mutações, ou modificar células imunológicas, como Células T). Ensaios clínicos (fase I, II ou III) ou estudos pré-clínicos in vivo. Estudos que reportem dados de eficácia (ex: resposta tumoral, sobrevida) e/ou segurança (ex: efeitos adversos, eventos off-target). Publicados em Inglês ou português, entre 2019 a 2024. Os critérios de exclusão foram 7, sendo eles estudos exclusivamente in vitro, estudos de áreas não oncológicas, artigos que sejam sobre o uso agrícola, microbiano ou procariótico de CRISPR, Artigos apenas teóricos, como propostas de uso

sem dados experimentais. Revisões narrativas, editoriais ou cartas ao editor, artigos sem texto completo e publicações duplicadas, sendo mantida a mais atual ou mais completa. Os estudos foram agrupados de forma narrativa descritiva divididos principalmente em estudos clínicos e pré-clínicos, dentro desses grupos foi destacado o tipo de câncer, a estratégia terapêutica e o método de entrega, devido a heterogeneidade dos métodos, intervenções e desfechos optou-se por uma síntese qualitativa sem meta-análise. Foram pesquisados em 2 bases de dados, Pubmed, e EBSCO, consultadas entre os meses de outubro de 2024 e julho de 2025

As pesquisas foram feitas por meio de uma estratégia de busca estruturada em operadores booleanos, aplicando filtros de ano 2019 a 2025 e ensaios clínicos. Os estudos foram compilados no rayyan, em seguida foi feito o seu screening pelo seu título e resumos procurando saber se entravam nos critérios de inclusão, tendo sido revisado por um único pesquisador. Os dados foram coletados por meio de leitura dos artigos. Foram analisados 73 artigos dos quais 33 passaram pelo screening inicial de título e resumo, desses 5 foram excluídos por não ser possível obter textos completos, os 28 restantes foram analisados por leitura dos textos completos com a obtenção de 10 artigos que se encaixavam nos critérios de inclusão.

Às seguintes variáveis foram sistematicamente extraídas de cada estudo: título, primeiro autor, ano de publicação e país onde o estudo foi conduzido, o desenho do estudo (clínico, pré-clínico), características dos participantes como tipo de população, tipo de câncer e número de indivíduos quando disponível. Os tipos de intervenção CRISPR-Cas9 que foram empregados, comparadores quando disponíveis e por fim financiamentos e conflitos de interesse quando relatados. Os resultados de eficiência de cada estudo foram categorizados da seguinte maneira

- Resposta imunológica ao tumor
- Redução de tumor
- Sobrevivência global

Qualquer medida de resposta imunológica ao tumor, redução e sobrevivência global foi incluída, considerando a validade e confiabilidade da ferramenta usada para análise.

Antecipando que cada estudo individualmente poderiam relatar

diferentes dados foi selecionado um resultado para inclusão na análise e relato dos resultados principais para aplicar GRADE, escolhendo o resultado que forneceu as informações mais completas para análise .

Também foi coletado dados sobre

- O relatório: autor e ano
- O tipo de câncer estudado: tumores sólidos ou hematológicos
- Os participantes: modelo animal ou humanos
- O desenho e características da pesquisa: mecanismo de amostra, atribuição do tratamento
- O tipo de intervenção
- Avaliação de segurança do método: Graus de AE(adverse effects) relatados, toxicidade e efeitos off target

O risco de viés nos estudos clínicos fase I foram feitos usando a ferramenta ROBINS-I V2 (Risk of Bias In Non-Randomized Studies of Interventions) (10) sua escolha se baseou na natureza de alguns estudos incluídos que correspondem a fase clinica I sem grupo controle ou alocação randomizada .

Os estudos In vivo foram avaliados usando a ferramenta SYRCLE Risk of bias, para modelos animais, considerando randomização, ocultação de alocação, cegamento dos pesquisadores e avaliação dos desfechos. Embora tenha sido observado escassez de informações metodológicas detalhadas nos estudos e heterogeneidade dos delineamentos.

Como essa revisão sistemática incluiu estudos pré-clínicos in vivo e ensaios clínicos de fase I não randomizados, não foi realizado meta-análise e as medidas de efeito foram apresentadas como descritas por casa estudo, devido a não padronização das medidas de efeito entre estudo.

Como as intervenções em sua grande maioria se basearam na deleção da proteína PD-1 em células T, os pesquisadores agruparam os estudos em 3 grupos: Modelos com deleção de PD-1, modelos com deleção mista, e modelos com deleção de outras proteínas.

Os estudos foram tabulados e apresentados na tabela1 por tipo de câncer e

ranqueados do menor para um maior risco de viés com separação de clínicos e pré-clínicos respectivamente dada o maior nível de evidencia desses primeiros, sendo destacados os resultados de cada estudo e tipo de intervenção aplicada.

O agrupamento dos resultados foi feito em modelo qualitativo narrativo de acordo com a resposta ao tumor ou redução do mesmo no caso de tumores sólidos, já que os pesquisadores consideraram que esse agrupamento melhor define o objetivo da pesquisa em determinar a eficácia desses métodos.

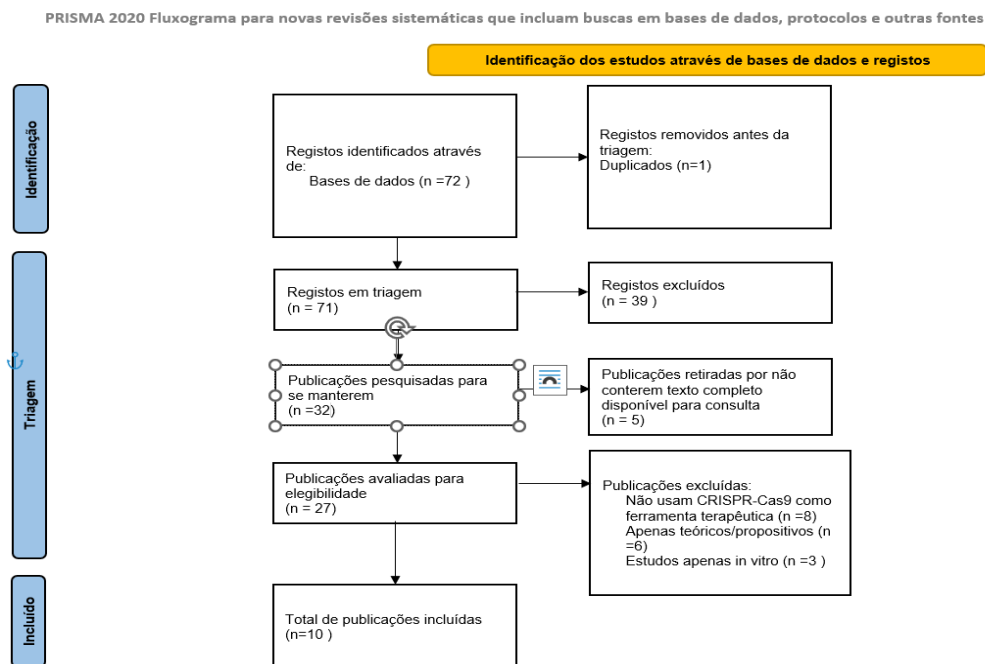
Nenhuma técnica para detecção de viés de publicação foi aplicada, entretanto a possibilidade de viés de relato seletivo foi considerada qualitativamente durante a extração de dados, sendo observadas lacunas em variáveis relevantes como ausência de detalhamento de eventos adversos ou medidas de segurança em alguns estudos o que pode indicar omissão de resultados. A inexistência de registros públicos como o NCT para a maioria dos estudos limitou a avaliação dos desfechos originalmente propostos, em grande parte devido a fase em que os estudos se encontram.

A confiança na evidência foi avaliada utilizando a abordagem GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation), adaptada para incluir estudos observacionais e pré-clínicos, conforme permitido por diretrizes específicas para esse tipo de evidência (11). A avaliação foi realizada por desfecho, considerando cinco domínios principais: risco de viés, inconsistência, imprecisão, evidência indireta e viés de publicação. Para os estudos clínicos, a avaliação considerou também o delineamento do estudo (como ausência de grupo controle ou randomização). Já para os estudos pré-clínicos, a análise foi baseada na extrapolação do modelo experimental para humanos, consistência dos efeitos observados, precisão das medições e clareza dos desfechos relatado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca inicial nas bases de dados mostrou um total de 72 artigos potencialmente relevantes, sendo um removido por duplicação, dos demais 71 39 foram excluídos após um screening inicial com a leitura de títulos e resumos, dos restantes 5 foram excluídos pela incapacidade dos pesquisadores em obterem seus textos completos, dos 27

restantes, 10 foram selecionados e incluídos na revisão sistemática, dos restantes 8 foram excluídos por não usarem CRISPR-Cas9 como ferramenta terapêutica, 6 por serem apenas artigos que apresentavam teorias ou propostas do seu uso, e 3 foram excluídas por serem apenas estudos in vitro, o processo de seleção de estudos pode ser melhor visualizado na figura 1 seguindo o fluxograma PRISMA 2020



Traduzido por: Verónica Abreu*, Sónia Gonçalves-Lopes*, José Luís Sousa* e Verónica Oliveira / *ESS Jean Piaget - Vila Nova de Gaia - Portugal
de: Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021;372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71

Figura 1

Entre os artigos inicialmente considerados elegíveis, destacam-se alguns estudos que poderiam, à primeira vista, atender aos critérios de inclusão estabelecidos, mas foram posteriormente excluídos após análise detalhada do texto completo. Por exemplo, o estudo de Yang et al (12) sobre uma plataforma conjugada de CRISPR-cas9 para direcionamento e entrega da ferramenta editora genética parecia interessante, no entanto foi excluído ao constatar que a conjugação da plataforma com uma molécula da azidohomoalanina (AHA) descaracteriza a proteína cas9 e portanto não seria um uso da mesma na intervenção proposta. O estudo de Benjamin et al (13) Que fala sobre o uso de UCART19 parece ser uma boa inclusão para a revisão no entanto foi excluído ao se considerar que a produção de UCART19 é feita por meio de TALENs e não CRISPR-Cas9.

Foram incluídos 10 estudos nesta revisão sistemática, sendo ensaios clínicos

fase I e estudos pré-clínicos in vivo. Abaixo estão detalhadas as características principais de cada estudo incluído:

1. **Fieni C. et al., 2024. Prevention of prostate cancer metastasis by a CRISPR-delivering nanoplatform for interleukin-30 genome editing** – Preclinical in vivo (NSG camundongo, câncer de próstata): Utilizou uma nanoplataforma de lipídios para entrega de CRISPR-Cas9, promovendo o knockout do gene IL-30. O grupo controle recebeu nanopartículas vazias. Observou-se redução significativa de metástases, sem toxicidade detectável (14).
2. **Wang Z. et al., 2021. Phase I study of CAR-T cells with PD-1 and TCR disruption in mesothelin-positive solid tumors** – Ensaio clínico fase I (15 pacientes com tumores sólidos): Avaliação de células CAR-T editadas por CRISPR (knockout PD-1/TCR), entregues por eletroporação. Não houve grupo comparador convencional. Observou-se resposta clínica limitada e ausência de eventos adversos graves. (15)
3. **Foy S.P. et al., 2023. Non-viral precision T cell receptor replacement for personalized cell therapy** – Ensaio clínico fase I (16 pacientes com tumores sólidos): Testou substituição do receptor T via CRISPR-Cas9. Houve respostas limitadas e eventos adversos grau 3, sem grupo controle convencional. (16)
4. **Zhang J. et al., 2022 Non-viral CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL** – Ensaio clínico e pré-clínico (8 pacientes B-NHL): Células CAR-T editadas (anti-CD19) via CRISPR, com integração no locus AAVS1, entregues por eletroporação. Grupo controle com CAR-T lentiviral. Alta remissão e sem eventos adversos graves. (17)
5. **Stadtmauer E.A. et al., 2020. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer** – Ensaio clínico fase I (3 pacientes com câncer refratário): Edição multiplex de células T via CRISPR, com entrega por eletroporação. Não houve grupo controle. Eficácia limitada, com observação de translocações. (18)
6. **Gu Q. et al., 2024. Knockout of Shcbp1 sensitizes immunotherapy** – Pré-clínico in vivo (MMTV-PyMT camundongo, câncer de mama): Knockout do gene Shcbp1

via CRISPR, utilizando modelo animal com grupo selvagem como controle. Redução tumoral observada. (19)

7. **Zhao M. et al., 2022. Bacterial protoplast-derived nanovesicles CRISPR-Cas9 tumor macrophages** – Pré-clínico in vivo (modelos murinos diversos): Edição de macrófagos tumorais via CRISPR entregue por nanovesículas bacterianas. Grupo controle com vesículas não funcionais. Aumentou resposta antitumoral e apresentou baixa toxicidade. (20)
8. **Lu Y. et al., 2020. Safety of CRISPR-edited T cells in Non small cell lung cancer** – Ensaio clínico fase I (12 pacientes com NSCLC): Células T com PD-1 knockout via CRISPR. Eletroporação foi usada para entrega. Não houve grupo controle. Sobrevida mediana de 42,6 semanas, baixa toxicidade e baixa edição off-target. (21)
9. **Bexte T. et al., 2024. CRISPR-Cas9 editing of NKG2A improves the efficacy of primary CD33-directed chimeric antigen receptor natural killer cells** – Pré-clínico in vivo (AML murino): Knockout de KLRC1 (NKG2A) em células CAR-NK. Controle com NK não-editadas. Maior atividade antileucêmica e toxicidade mínima. (22)
10. **Qu J. et al., 2024. In vivo gene editing of T-cells in lymph nodes for enhanced cancer immunotherapy.** – Pré-clínico in vivo (melanoma e AML murino): Edição in vivo de células T em linfonodos para knockout de PD-1. Controle com nanopartículas vazias e, em alguns experimentos, animais não tratados. Melhora de eficácia imunoterapêutica, sem toxicidade detectável. (23)

A tabela detalhada encontra-se na Tabela 1. Todas as características detalhadas dos estudos, como desenho, população, tipo de câncer, intervenção com CRISPR-Cas9, método de entrega, grupo comparador, desfechos de eficácia e segurança, estão descritas conforme recomendado pelo PRISMA 2020.

Todos os estudos foram avaliados com as devidas ferramentas para cada tipo como descrito anteriormente, entre os estudos clínicos predominou o alto risco de viés, principalmente devido a ausência de randomização, cegamento e grupos de controle convencionais, no entanto os autores acharam pertinente inclui-los na

pesquisa devido ao seu valor para a discussão bem como a escassez de estudos que preenchessem todos os critérios para um baixo risco de viés. Os detalhes completos das avaliações dos estudos clínicos usando a ferramenta ROBINS-V encontram-se nas Tabela 2 e Tabela 3 em conjunto com as avaliações dos estudos pré-clínicos no qual foi aplicado o SYRCLE, importante ressaltar que embora os artigos não tenham satisfeitos todos os domínios da ferramenta seu valor para a discussão do uso de CRISPR-Cas9 no futuro ainda é relevante uma vez que a falta de certas informações não é incomum em artigos dessa natureza, em que os experimentos encontram-se nos estágios iniciais.

Para todos os desfechos avaliados, um resumo de suas estatísticas, e uma estimativa de sua precisão e efeito, quando apresentado, foram apresentados na tabela Tabela 4. A pouca quantidade dos dados precisos limitou a realização de uma síntese quantitativa (meta-análise) para a maioria dos desfechos.

CRISPR-Cas9	Safety of CRISPR-	Bacterial protoplast-	Knockout of Shcbp1	CRISPR-engineered	Non-viral CAR-T cells	Non-viral precision T	Phase I study of	Prevention of prostate	Title
Bexte T. et al.	Lu Y. et al.	Zhao. M et al	Gu Q. et al.	Stadtmauer E.A. et al.	Zhang J. et al.	Foy S.P. et al.	Wang Z. et al.	Fieni C. et al.	Authors
2024	2020	2022	2023	2020	2022	2023	2021	2024	Year
	China/USA	Unknown	China	USA	China	USA	China	Italy	Country
Preclinical in vivo	Clinical phase I	Preclinical in vivo	Preclinical in vivo	Clinical phase I	Clinical/pre clinical	Clinical phase I	Clinical phase I	Preclinical in vivo	Study Design
Animal models	12 NSCLC patients	Animal model	MMTV-PyMT mice	3 refractory	8 B-NHL patients	16 solid tumor	15 solid tumor	NSG mice prostate	Population /Model
Acute Myeloid	NSCLC	Various cancers	Breast cancer	Solid tumors	B-NHL	Solid tumors	Solid tumors	Prostate cancer	Cancer Type
KLRC1 (NKG2A)	PD-1 KO	Macrophage editing	Shcbp1 KO	Multiplex KO	CAR insertion	TCR replacement	PD-1/TCR knockout	IL-30 knockout	CRISPR-Cas9
Electroporation of	Electroporation	Bacterial vesicles	In vivo CRISPR	Electroporation	Electroporation	Electroporation	Electroporation	Lipid NPs	Delivery Method
Non-edited NK cells	None	Control vesicles	Wild-type	None	Lentiviral CAR-T	None	None (patients)	Empty NPs	Comparator
Enhanced anti-	Median OS 42.6 weeks	Enhanced response	Tumor reduction	Limited efficacy	High remission	Limited response	Limited response	Reduced metastasis	Efficacy Outcomes
Minimal off-target	Low off-target	Low toxicity	NR	Translocations	No SAE	Grade 3 AE	No severe AE	No toxicity	Safety Outcomes

Tabela 1- tabela de síntese com autores, ano, país, desenho do estudo, população/modelo, tipo de câncer, intervenção com CRISPR-Cas9, método de entrega, comparador, desfechos de eficácia e segurança.

Estudo (Autor, Ano)	Confundimento	Seleção dos Participantes	Classificação da Intervenção	Desvios da Intervenção	Dados Faltantes	Mensuração dos Desfechos	Relato Seletivo	Risco de Viés Global
Wang et al., 2021	Moderado	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Moderado	Moderado
Foy et al., 2023	Moderado	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Moderado	Moderado
Zhang et al., 2022 (parte clínica)	Moderado	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Moderado
Stadtmauer et al., 2020	Moderado	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Moderado
Lu et al., 2020	Moderado	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Moderado	Moderado

Tabela 2- Avaliação do risco de viés dos estudos clínicos incluídos, realizada com base na ferramenta RoB 2.0.

Estudo / Autor / Ano	Randomização da alocação	Randomização da ordem	Cegamento na alocação	Cegamento na condução	Cegamento na análise	Dados incompletos	Relato seletivo	Outros vieses	Comentários
Fieni C. et al., 2024	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Todos os animais foram analisados;	Todos os desfechos	Não foram identificados	O estudo não detalha
Gu Q. et al., 2023	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Todos os animais foram incluídos	Todos os desfechos	Possível viés de performance/det	Não há detalhamento
Zhao M. et al., 2022	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Nenhum animal excluído da	Todos os desfechos	Possível viés de performance/det	O método de preparação dos
Bexte T. et al., 2024	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Todos os animais incluídos na	Todos os desfechos	Possível viés por falta de	Estudo com modelo
Zhang J. et al., 2022 (animal)	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Nenhum animal excluído; todos	Não há evidências de	Possível viés por ausência de	Segmento pré- clínico do estudo;
Qu J. et al., 2024	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Todos os animais incluídos; sem	Todos os desfechos	Não há indícios de outros vieses	Detalhes de segurança bem

Tabela 3 -Avaliação do risco de viés dos estudos pré-clínicos incluídos, realizada com base na ferramenta SYRCLE.

Study (Author, Year)	Group/Comparator or	N/group	Outcome /Endpoint	Summary statistics / Resultado	Effect estimate (p, IC, etc)
Fieni C. et al., 2024	IL-30 KO vs. Empty NPs	7 vs 7	Metastasis nodules	3.2 ± 1.1 vs 9.7 ± 2.1	p < 0.01
Wang Z. et al., 2021	CRISPR CAR-T	15	Best overall response (SD)	2/15 SD, 6/15 progressão	-
Foy S.P. et al., 2023	TCR replacement	16	Partial response	3/16 (19%) PR, 8/16 SD, 5/16 PD	-
Zhang J. et al., 2022	CRISPR vs. Lenti CAR-T	8 vs 8	Remission	8/8 (100%) vs 6/8 (75%)	-
Stadtmaier E.A., 2020	Multiplex KO	3	Clinical response	1 SD, 2 PD	-
Gu Q. et al., 2023	Shc1 KO vs. WT	6 vs 6	Tumor volume (mm³) (day 20)	72 ± 13 vs 187 ± 41	p < 0.01
Zhao M. et al., 2022	NV-CRISPR vs. NV-control	8 vs 8	Tumor growth inhibition (%)	68% vs 31%	p < 0.05
Lu Y. et al., 2020	CRISPR PD-1 KO	12	Median OS	42.6 weeks	-
Bexte T. et al., 2024	NKG2A KO CAR-NK vs. control	6 vs 6	Tumor burden (RLU, day 21)	4.7 × 10 ⁶ vs 1.2 × 10 ⁷	p < 0.01
Qu J. et al., 2024	CRISPR PD1-KO hydro-EP vs. ctrl	7 vs 7	Tumor growth, metastasis, survival	Supressão tumoral significativa, ↑	p < 0.05 (diferenças entre grupos)

Tabela 4 - Resumo dos resultados principais apresentados em cada estudo, incluindo grupos comparadores, número de participantes ou animais por grupo, desfechos

avaliados, estatísticas descritivas e medidas de efeito quando disponíveis.

Quatro estudos avaliaram cânceres de sólidos em fases clínicas, Wang Z. et al. Foy S.P. et al. Stadtmauer E.A. et al. Lu Y. et al. em um total de 36 participantes com intervenções principalmente em deleção de genes PD-1 em células T, e um com troca de TCR Foy S.P. et al., Um estudo avaliou o uso de células CAR-T anti-CD19 com integração de PD-1 em 8 pacientes com linfoma não Hodgkin Zhang J. et al., todos com um risco de viés global moderado.

Cinco estudos avaliaram diferentes tipos de cânceres em modelos animais, Fieni. et al. Gu et al. Zhao et al. Bexte et al. e Qu et al. com risco incerto/elevado, como não houve descrição de randomização ou cegamento nos modelos esse resultado é esperado, no entanto é compreensível uma vez que tradicionalmente esses estudos com suas características experimentais não terem tanto rigor metodológico.

Os estudos clínicos relataram taxas de resposta parcial variando de 0% a 19% e doença estável em até 47% dos pacientes tratados com células editadas por CRISPR-Cas9. Nos modelos pré-clínicos, observou-se supressão tumoral significativa em todos os estudos, com redução média do volume ou número de metástases entre 50% e 70% nos grupos tratados em comparação aos controles ($p < 0.05$ na maioria dos casos).

Observou-se elevada heterogeneidade entre os estudos incluídos, atribuída principalmente à diversidade dos modelos experimentais utilizados (diferentes espécies animais, linhagens tumorais, e protocolos de intervenção), métodos de entrega do CRISPR-Cas9 (nanopartículas, eletroporação, vesículas bacterianas), e variações nos desfechos avaliados (crescimento tumoral, resposta clínica, sobrevida, toxicidade). Além disso, os critérios de inclusão, tempo de seguimento e métodos de avaliação de eficácia e segurança variaram substancialmente entre os estudos clínicos, dificultando comparações diretas e impedindo a realização de síntese quantitativa.

Foi avaliado o risco de viés decorrente de resultados ausentes ou não publicados nos estudos incluídos. Não foi possível realizar avaliação formal de viés de publicação (por exemplo, funnel plot), devido ao número reduzido e à heterogeneidade dos estudos incluídos. Entretanto, reconhece-se a possibilidade de viés de relato, uma vez que estudos com resultados negativos ou sem eficácia significativa podem ser menos propensos à publicação, especialmente no contexto de intervenções inovadoras como

CRISPR-Cas9. Além disso, alguns estudos não relataram todos os desfechos de interesse de forma completa, limitando a avaliação abrangente dos efeitos adversos e da eficácia em longo prazo. Essa limitação deve ser considerada na interpretação dos resultados da presente revisão.

A avaliação GRADE foi realizada separadamente para os estudos pré-clínicos e para os ensaios clínicos de fase I. Para ambos os tipos de estudo, a certeza da evidência foi considerada muito baixa para os desfechos de eficácia e segurança, devido ao alto risco de viés, inconsistência dos resultados, indireção (modelos animais ou pacientes altamente selecionados), imprecisão (pequeno tamanho amostral, ausência de estimativas quantitativas robustas) e possibilidade de viés de publicação. As limitações metodológicas foram especialmente evidentes nos estudos pré-clínicos, pela ausência de randomização e cegamento, enquanto nos ensaios clínicos predominou a ausência de grupos controle e relatos incompletos de eventos adversos. Os detalhes da avaliação podem ser verificados na Tabela 5

Desfecho	Estudos incluídos	Tipo	Grau inicial	Risco de viés	Inconsistência	Indireção	Imprecisão	Viés de publicação	Grau final	Explicação breve
Eficácia	Fieni, Gu, Zhao, Bexte, Qu	Pré-clínico	Baixa	Grave	Grave	Grave	Grave	Possível	Muito baixa	Não descrevem randomização/cegamento, diferentes modelos animais e tumores, N pequeno, possível viés
Segurança	Fieni, Gu, Zhao, Bexte, Qu	Pré-clínico	Baixa	Grave	Moderada	Grave	Grave	Possível	Muito baixa	Falta de avaliação sistemática dos eventos adversos, relato incompleto e ausência de análise
Eficácia	Wang, Foy, Zhang, Stadtmauer, Lu	Clínico fase I	Baixa	Grave	Moderada	Grave	Grave	Possível	Muito baixa	Alto risco de viés (sem randomização/control e), heterogeneidade dos pacientes, amostras pequenas,
Segurança	Wang, Foy, Zhang, Stadtmauer, Lu	Clínico fase I	Baixa	Grave	Moderada	Grave	Grave	Possível	Muito baixa	Relato limitado de eventos adversos, avaliações de curta duração, relato incompleto em alguns

Tabela 5- A valiação da certeza da evidência (GRADE) para eficácia e segurança nos estudos clínicos e pré-clínicos incluídos.

Resultados iniciais mostram que a aplicações de CRISPR-Cas9 em câncer são promissoras mas muito preliminares. Os poucos estudos clínicos encontrados mostram que a edição de células por CRISPR como as células T tem métodos de entrega seguros e persistem por um tempo demonstrando a sua viabilidade. Como demonstrado por Stadmauer et al., células editadas podem sobreviver por até 9 meses com nenhum ou poucos efeitos adversos (18). O que se alinha com os demais estudos que demonstraram poucos efeitos adversos, mostrando que o uso de CRISPR é *tecnicamente possível e inicialmente seguro* na oncologia.

No entanto ainda é cedo para dizer com certeza que a ferramenta é tão eficaz quanto tratamentos convencionais, como mostrado na revisão atual os estudos que fizeram uso de comparadores usaram métodos não convencionais de tratamento ou então modelos sem tratamento, o que se mostra animador no entanto são estudos como de Stadmauer et al. que mostraram melhora em pacientes refratário a tratamentos convencionais (18) ou Gu et al. e Foy et al. que demonstraram que a ferramenta pode ser usada como forma de potencializar imunoterapias (19) (16).

Criticamente é importante enxergar a performance de CRISPR-Cas9 em outras aplicabilidades como terapias como células CAR-T que se mostrou um método efetivo e aprovado para imunoterapia embora com métodos mais antigos de edição genética. Como mostrado por Zhang et al. o potencial de CAR-Ts editadas por CRISPR em linfomas (17).

Em outras palavras o conceito de terapia celular por edição genética é validado por evidências existentes mostrando que a justificativa biológica para o uso de CRISPR em câncer é sólida, mesmo que provas clínicas precisem de bem mais evidências, com a rápida inovação no campo e a versatilidade da ferramenta se torna prematuro descartá-la como tratamento para doenças oncológicas.

A evidência para CRISPR-Cas9 na terapia oncológica é extremamente limitada e os achados dessa revisão foram restringidos por diversos fatores. Escassez de estudos, foram poucos os que atenderam aos critérios de inclusão refletindo o quão novo é esse campo de estudo. Apenas alguns estudos clínicos foram conduzidos, e todos em fase I com uma pequena amostragem de pacientes. Isso limita a confiança em quaisquer conclusões sobre eficácia ou segurança. Devido ao tempo das amostras e ausência de grupos controle os resultados poderiam ser devido ao acaso ou fatores de seleção. A

falta ou pouco rigor metodológico empregado nos estudos reduziram a confiança também, alguns estudos não trataram todos os pacientes inscritos ou houve falta de medidas claras de resultados, os estudos pré-clínicos tiveram uma grande variabilidade em tipos de estudo e modelos. A heterogeneidade entre os estudos foi significativa, cada ensaio procurou modificar diferentes genes ou tipos de câncer, usando métodos de entrega diferentes.

Dado a novidade que é o CRISPR-Cas9, resultados mais positivos tem mais chances de serem publicados o que causam os vieses de publicação.

Resumidamente a evidência incluída nesta revisão é limitada em quantidade e qualidade, os achados devem ser interpretados *somente* como indicações preliminares, sujeito a confirmação por estudos maiores e mais rigorosos no estudo. A falta de dados robustos enfatiza a necessidade cuidado: não se pode ainda estimar de maneira confiável quão efetivo ou seguro CRISPR é para terapias oncológicas enquanto mais evidências não forem coletadas.

É importante também reconhecer as limitações no nosso processo de revisão, o que pode afetar a completude e confiabilidade das conclusões desta revisão.

Nossa pesquisa de literatura pode não ter capturado todos os estudos relevantes, sendo incluídos estudos revistos por pares e apenas em inglês. Dados não publicados, resumos de conferências, não foram incluídos, o que pode significar que alguns ensaios preliminares ou estudos internacionais foram perdidos.

Como o foco foi o uso de CRISPR-Cas9 no câncer, especificamente, em quanto necessário pode ter excluído técnicas mais amplas ou relacionadas. A demais nossa seleção de base de dados pode ter sido limitada, se não pesquisamos certas bases de dados ou registros de ensaios rigorosamente, estudos relevantes podem ter sido omitidos. Esse viés de seleção no processo de revisão pode ter distorcido nossos achados em direção a um subconjunto das evidências disponíveis.

Como a extração de dados e avaliações iniciais foram feitas por um único pesquisador existe um risco maior de erros, avaliação dupla e extração não foram feitas de maneira consistente, o que condiz com uma limitação metodológica que permite erros ou enviesamento subjetivo em seleção e interpretação de estudos.

A heterogeneidade dos estudos impediu uma síntese quantitativa dos estudos, levando a uma síntese qualitativa dos resultados o que carrega um risco de viés de

narrativa. Foi tentado mitigar isso através de um estudo sistemático e detalhado de acad estudo, mas sem uma métrica uniforme de resultados as comparações foram informais.

Embora tenha sido feito um estudo de risco de viés nos estudos incluídos a natureza nova das intervenções fez alguns critérios de qualidade difícil de se aplicar e as ferramentas tradicionais de estudo de viés pode não ter capturado a singularidade dos estudos com edição genética. Quaisquer conclusões sobre baixa confiabilidade dos estudos são baseados em indicadores gerias ao invés de validação empírica a longo prazo. Isso se mostra uma limitação de quão confiante a evidência pode ser julgada.

Por fim é importante ressaltar que o uso de CRISPR no câncer esta evoluindo rapidamente. Novos achados podem ter aparecido entre a nossa procura e a publicação dessa revisão. Esta é uma fotografia estática no tempo e dessa forma implicações podem se tornar rapidamente obsoletas se , por exemplo, um ensaio de fase III ou grande avanço seja feito. Nossos processos não incluíram revisões sistemáticas vivas o que é uma limitação na rápida atualização dessa área de pesquisa.

Ao reconhecer essas limitações é necessário se enfatizar que as conclusões aqui apresentadas devem ser vistas como provisionais. Mesmo que foi feito a tentativa de minimizar vieses e erros certas restrições (inerentes no método e recursos disponíveis) significam que existe o risco de não ter sido capturado o quadro como um todo. Revisões futuras podem melhorar nesse aspecto ao incluir mais bases de dados, estudos em outras linguagens, literatura cinza e atualização de evidência com maior frequência.

De acordo com os resultados apresentados existem importantes implicações para o futuro. Por agora intervenções baseadas em CRISPR-Cas9 devem permanecer em ensaios clínicos, a tecnologia não está pronta para acompanhar o consultório devido a eficácia incerta e riscos em potencial (24). O CRISPR-Cas9 pode, no futuro, ser integrado como uma terapia personalizada, por exemplo, modificando as próprias células imunes do paciente para combater melhor o seu tumor. Isso representa uma nova abordagem de medicina de precisão em oncologia, permitindo ajustes genéticos sob medida para o câncer de cada indivíduo. No entanto, até que mais evidências estejam disponíveis, o uso prático permanece restrito à experimentação. Os clínicos também devem começar a se preparar para como tais terapias poderão ser oferecidas.

A continuidade das pesquisas é fundamental para que o potencial do CRISPR no câncer possa ser plenamente alcançado. Antes de tudo, são necessários ensaios clínicos

maiores e mais rigorosos. Ensaios de fase II e III, com número suficiente de pacientes e grupos controle (ou pelo menos comparadores bem escolhidos), são essenciais para realmente testar a eficácia. Esses estudos também devem acompanhar os pacientes por períodos prolongados, a fim de detectar efeitos colaterais tardios ou recidivas do câncer. Estudos futuros devem ainda abordar as atuais lacunas de evidência, como, por exemplo, investigar de forma mais aprofundada os efeitos off-target.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, embora o CRISPR-Cas9 seja celebrado como uma ferramenta revolucionária de edição gênica, com potencial para transformar a terapia do câncer, nossa revisão destaca que ainda estamos apenas no começo da avaliação dessa abordagem na prática. Os resultados até agora, embora encorajadores em princípio, precisam ser respaldados por muito mais evidências antes que o CRISPR possa se tornar uma opção amplamente utilizada para pacientes oncológicos. Neste momento, são necessários cautela, rigor científico e uma supervisão cuidadosa. Se essas condições forem atendidas, a versatilidade e o poder inovador do CRISPR, já demonstrados em outros contextos, poderão realmente inaugurar uma nova era de oncologia de precisão no futuro. Por enquanto, o otimismo deve ser equilibrado com realismo, e todos os envolvidos (clínicos, pesquisadores e formuladores de políticas) devem trabalhar juntos para enfrentar as limitações atuais e acelerar a chegada de tratamentos oncológicos baseados em CRISPR que sejam seguros e eficazes

REFERÊNCIAS

1. de Oliveira Santos M, da Silva de Lima F, Martins LFL, Pinto Oliveira JF, de Almeida LM, de Camargo Cancela M. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. Revista Brasileira de Cancerologia. 2023 Janeiro.
2. Balon K, Sheriff A, Jacków J, Łaczmański Ł. Targeting Cancer with CRISPR/Cas9-Based Therapy. Internetinoal Journal of Molecular Sciences. 2022 Janeiro: p. 573.
3. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short

- palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology (Reading, England). 2005 Agosto: p. 2551-2561.
4. Balasubramanian A, Veluswami K, Rao , Aggarwa S, Mani S. xploring Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-Associated Protein 9 (CRISPR-Cas9) as a Therapeutic Modality for Cancer: A Scoping Review. Cureus. 2024 Julho.
 5. Charpentier E, Marraffini LA. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. Current Opinion in Microbiology. 2014 Junho: p. 114-119.
 6. Huang D, Miller M, Ashok B, Jain S, Peppas NA. CRISPR/Cas Systems to Overcome Challenges in Developing the Next Generation of T Cells for Cancer Therapy. Advanced Drug Delivery Reviews. 2020: p. 17-35.
 7. Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ. Uptading the Definition Of Cancer. Molecular Cancer Research. 2023 Julho 6: p. 1142-1147.
 8. Vogt PK. Cancer genes. Western Journal of Medicine. 1993 Março: p. 273-278.
 9. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. Cell. 2000 Janeiro: p. 57-70.
 10. Seungju Yang SHIJYCJKHLYKK. An Antibody-CRISPR/Cas Conjugate Platform for Target-Specific Delivery and Gene Editing in Cancer. Advanced Science. 2024 Março.
 11. Reuben Benjamin, et al. Genome-edited, donor-derived allogeneic anti-CD19 chimeric. The Lancet. 2020 Dezembro: p. 1885-1894.
 12. Cristiano Fieni, et al. Prevention of prostate cancer metastasis by a CRISPR-delivering nanoplatform for interleukin-30 genome editing. Molecular Therapy. 2024 Novembro : p. 3932-3954.
 13. Zhenguang Wang et al. Phase I study of CAR-T cells with PD-1 and TCR disruption in mesothelin-positive solid tumors. Cellular & Molecular Immunology. 2021 Agosto: p. 2188–2198.
 14. Susan P. Foy, et al. Non-viral precision T cell receptor replacement for personalized cell therapy. Nature. 2023 Março: p. 687-718.
 15. Jiqin Zhang et al. Non-viral CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL. Nature. 2022 Setembro: p. 369-403.
 16. Edward A. Stadtmauer, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. Nature. 2020 Fevereiro.
 17. Qianlin Gu, et al. Knockout of Shcbp1 sensitizes immunotherapy. Molecular Carcinogenesis. 2024 Abril: p. 601-616.
 18. Mingming Zhao et al. Bacterial protoplast-derived nanovesicles CRISPR-Cas9 tumor macrophages. Nature communications. 2024 Janeiro.
 19. You Lu, et al. Safety of CRISPR-edited T cells in non-small-cell lung cancer. Nature Medicine. 2020 Junho: p. 732-740.
 20. Tobias Bexte, et al. CRISPR-Cas9 editing of NKG2A improves the efficacy of primary CD33-directed chimeric antigen receptor natural killer cells. Nature Communications. 2024 Setembro.
 21. Jin Qu, et al. In vivo gene editing of T-cells in lymph nodes for enhanced cancer immunotherapy. Nature Communications. 2024 Novembro.
 22. Mohammad Chehelgerd, et al. Comprehensive review of CRISPR-based gene editing: mechanisms, challenges, and applications in cancer therapy. Molecular Cancer. 2024 Janeiro.
 23. Jonathan Ac Sterne, et al. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. BMJ. 2016 Outubro.
 24. Gordon H. Guyatt, et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and



strength of recommendations. BMJ. 2008 Abril 26; p. 924–926.