



## TERAPIAS CRISPR-CAS9 E CAR-T CELS COMO POSSÍVEL TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

João Henrique da Silva Guaita<sup>1</sup>, Mariana Rodrigues Davanso<sup>2</sup>

### Resumo

A terapia gênica consiste na transferência de genes mutáveis através de mecanismos vetoriais como vírus, bactérias ou vacinas, permitindo uma qualidade no tratamento e prognóstico melhor para os portadores. Os tratamentos com a terapia gênica têm utilidade em diversas doenças, cujo um dos focos das pesquisas científicas nos últimos anos tem sido em desenvolver uma terapia eficiente tanto para tratamento quanto para cura de carcinomas mais conhecidos como câncer. Com os progressos em diversas dessas pesquisas hoje já encontramos maneiras *in vitro* e *in vivo* de obter-se sucesso na regressão das células proliferativas carcinogênicas. Pesquisadores mostram sobre a leucemia mieloide crônica uma doença grave onde a principal alteração ocorre pela translocação entre os cromossomos 9 e 22, também conhecido como cromossomo *Philadelphia (Ph)*. Decorrente da importância dos efeitos desta doença e a falta de tratamentos seguros, eficientes e que disponibilizem uma qualidade de vida melhor ao paciente, as metodologias das terapias CRISPR- Cas9 e as CAR-T e a sua possível aplicação no tratamento para a leucemia mieloide crônica está se tornando uma realidade cada vez mais prospera. Com esta junção de terapias se torna possível um tratamento com melhor prognóstico futuramente para a leucemia mieloide crônica com maior sensibilidade e seletividade.

**Palavras-chave:** Terapia de genes. CRISPR-Cas9. CAR-T Leucemia.

### Abstract

Gene therapy consists of the transfer of mutable genes through vectorial mechanisms such as viruses, bacteria, or vaccines, allowing a better quality of treatment and prognosis for carriers. Treatments with gene therapy are useful in several diseases, one of the focuses of scientific research in recent years has been to develop an efficient therapy for both the treatment and cure of better-known carcinomas and cancer. With the progress in several of this research, today we have already found *in vitro*, and *in vivo* ways get yourself success in the regression of carcinogenic proliferative cells. Researchers show about chronic myeloid leukemia a serious disease where the main alteration occurs by the translocation between chromosomes 9 and 22 and by Philadelphia chromosome (Ph). Due to the importance of the effects of this disease and the lack of safe, efficient treatments that provide a better quality of life for the patient, the methodologies of CRISPR-Cas9 and CAR-T therapies and their possible application in the treatment of chronic myeloid leukemia is becoming an increasingly prosperous reality. With this combination of therapies, it becomes possible to have a treatment with better prognosis in the future for chronic myeloid leukemia with greater sensitivity and selectivity.

**Keywords:** Chronic myeloid leucemia. Gene therapy. CRISPR-Cas9. CAR-T cells.

### 1 Introdução

A leucemia mieloide crônica (LMC) é um câncer de progressão lenta que envolve células hematopoiéticas mieloides na medula óssea, ocasionando uma proliferação anormal dessas células.

1 Acadêmico do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba,PR); Endereço para correspondência: joahguaita@hotmail.com

2 Docente do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba,PR). Endereço para correspondência: mariana.davanso@utp.br



A Organização mundial da saúde (OMS) classifica a LMC como uma neoplasia mielo proliferativa de desvio a esquerda com predomínio de granulócitos neutrófilos. Caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), a LMC tem cromossomos que correspondem à translocação entre os braços longos do cromossomo 9 e 22, resultando na expressão da proteína de fusão BCR-ABL, “essa proteína tem como atividade enzimática a tirosina quinase, que é responsável pelo descontrole na divisão celular e inibidores de apoptose” (ALMEIDA *et al.*, 2022, p. 154 - 155). A LMC é uma doença evolutiva que é reconhecida em 3 fases: fase crônica (FC), fase acelerada (FA) e crise blástica (CB). A FC tem como característica de ser uma fase em que os portadores são assintomáticos onde podem apresentar um hemograma com características de esplenomegalia volumosa, hepatomegalia e leucocitose de desvio a esquerda. A FA se caracteriza pela evolução e a aceleração na proliferação de células tumorais. A CB se caracteriza pela soma de promielócitos e blastos serem encontrados de 1% a 19% na corrente sanguínea ou medula óssea (BORTOLHEIRO E CHIATTONI, 2008).

A LMC e outros tipos de carcinomas tem como característica a perda da estimulação de apoptose acarretada pela alteração cromossômica, no caso da LMC a principal alteração cromossômica é identificada pelo aparecimento do cromossomo *Philadelfia* (Ph) que ocorre a translocação dos braços longos dos cromossomos 9 e 22. Essa alteração cromossômica afeta em muitos aspectos funcionais as células progenitoras hematopoiéticas, as principais funções dessas células progenitoras é a divisão e diferenciação, com a alteração cromossômica essas células progenitoras se dividem sem controle e sem diferenciação ocasionando uma proliferação desordenada dentro do organismo. Por conta dessa proliferação desordenada as células sem diferenciação perdem muitas vezes a capacidade de apoptose, a apoptose é o meio em que as células têm de marcação para que elas possam ser destruídas. Na LMC ocorre nas células o desaparecimento das características para a apoptose que é ocasionada pela perda de receptores chamados de Fas – FasL que são responsáveis pela marcação das células que serão destruídas (LAGO E PETRONI, 2017).

O conhecimento e a evolução das tecnologias têm guiado muitas alternativas de tratamentos para diversas leucemias, como transplante de medula óssea, quimioterapia com hidroxiureia, terapias medicamentosas com interferon-alfa (INF- $\alpha$ ), bussulfato ou citarabina em baixa dose, infusão linfocitária e tecnologias inovadoras como a CRISPR-Cas9 e a CAR-T (SANTOS *et al.*, 2019).

Portanto, com o desenvolvimento de novas tecnologias para a redução dos danos aos portadores, terapias gênicas inovadoras vêm possibilitando e desenvolvendo terapias genicas que vem evoluindo e inovando constantemente para que possam ser utilizadas em tratamentos de doenças que afetam genes defeituosos ou com erros na expressão genica (CALDATO E ALVES, 2019).

Este trabalho tem por objetivo descrever as terapias CRISPR-Cas9 e CAR-T, suas metodologias e as aplicações em conjunto como um possível tratamento para a leucemia mieloide crônica. Para que isso seja possível foram realizadas diversas pesquisas em artigos científicos mais



atualizados e publicados em revistas de renome internacional. Colaborando para o desenvolvimento evolutivo e a discussão sobre a desenvoltura das terapias gênicas, focada no possível tratamento da leucemia mieloide crônica. Podendo ser futuramente de utilização para fins profissionais e acadêmicos.

## 2 Método

A seguinte pesquisa trata da utilização terapia gênica na doença leucemia mieloide crônica e para isso utilizou plataformas como o *Pubmed* e *Scielo* como base de dados para pesquisa e com as seguintes palavras chaves, transferência de genes, terapia genética, engenharia genética, CRISPR-Cas9, CAR-T e leucemia. Os artigos revisados neste trabalho são caracterizados como artigos de revisão de artigos originais, nos idiomas em inglês, espanhol e português. Onde o período de pesquisa bibliográfica foi realizado entre agosto de 2022 a junho de 2023, a revisão contou com um período de publicação dos artigos limitante de 10 anos do período de início das pesquisas bibliográficas.

## 3 Discussão

A terapia gênica viral tem como objetivo principal a transferência ou indução de material genético do vetor viral para as células carcinogênicas, podendo modificar ou ajustar o gene defeituoso. Em casos de câncer como a LMC, pode ser utilizada para modificar o material genético da célula carcinogênica com o intuito de corrigir os genes responsáveis pela expressão proliferativa ou pelos inibidores de apoptose. Essa modificação genética feita no DNA do vírus só é possível pelo desenvolvimento da técnica de CRISPR-Cas9 que foi desenvolvida com o descobrimento da enzima de proteção Cas9 das bactérias que auxiliam na transferência ou indução genica do vírus específico na célula carcinogênica estimula-se uma resposta que modifica o genoma da célula sem ocasionar problemas na transdução genica, com essa alteração genica a célula tumoral perde a sua capacidade de replicação e incorpora receptores de apoptose induzidos pela técnica CRISPR-Cas9 (COSTANZI-STRAUSS E STRAUSS, 2015).

A terapia gênica é um assunto que engloba não só pesquisa básica e clínica, mas também considerações éticas, biossegurança e aspectos regulatórios. A efetividade da terapia gênica requer uma gama de tecnologias que permite a produção de material biológico em escala e com qualidade apropriada para aplicação em seres humanos (COSTANZI-STRAUSS E STRAUSS, 2015).

Em termos gerais, a terapia genica utiliza de uma transferência de ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio de inserção direta do genoma e/ou por meio de transferência. Devido à dificuldade e falta de vetores para transferência desse genoma, foi se desenvolvendo estudos e novos métodos de vetores para a transferência genica utilizando-se vetores virais. Os vetores virais



são utilizados pela facilidade que eles encontram em transferir o seu material genético para as células hospedeiras, obtendo uma vantagem contra a doença. Entre as dificuldades que impedem o uso clínico, destacam-se a eficiência da transferência, o direcionamento do gene para atuar especificamente nas células-alvo, a duração da expressão e a segurança do método, que engloba efeitos off-target e mutações por inserção. Com relação às barreiras na eficiência da terapia, a razão crucial é a necessidade do desenvolvimento de um sistema de entrega de genes eficaz, que resulte em expressão duradoura (RABELO, SILVA E BARBOSA, 2018).

Além da expressão duradoura existem exigências que a terapia genica requer, como a restrição a infecções e replicação duradoura, assertividade das células-alvo e a transferência do gene transgênico. Com essas requisições o vetor que pode ser uma opção para o tratamento são os vetores oncológicos, que possuem todos os requisitos acima descritos. Vírus oncológicos possuem extensa engenharia que restringe a infecção e replicação, assegurando que estes processos ocorram somente em células-alvo, como células tumorais. Com esta abordagem, a célula tumoral se torna uma fábrica de novas partículas virais que são liberadas após quebra celular. Estas novas partículas, por sua vez, infectam mais células tumorais, amplificando o processo lítico e consequentemente destruindo as células tumorais. As células saudáveis não permitem a replicação do vírus oncológico e não sofrem com sua presença. Como o nome indica, os vírus oncológicos destroem particularmente células de origem oncológica, a principal exigência funcional do sistema é associar uma característica presente apenas nas células tumorais com o programa de replicação viral. Por exemplo, um vetor é capaz de se replicar e quebrar apenas as células com p53 mutada ou células sem pRb. Outros benefícios do uso de vírus oncológicos incluem o mecanismo de morte celular independente de apoptose e a indução de uma resposta imunológica adaptativa (COSTANZI-STRAUSS E STRAUSS, 2015).

Os principais vetores virais utilizados nessas terapias são os retrovírus, adenovírus e vírus adenoassociado (AAV), pois esses vetores têm em comum atingir células específicas com apenas a alteração no seu genoma e nos receptores externos virais. O desenvolvimento desses vetores virais tem alguns benefícios e malefícios. Os vetores retrovirais permitem uma baixa reação inflamatória do hospedeiro causando um efeito mais prolongado do tratamento e uma boa resposta quanto a transferência ou integração do genoma na célula hospedeira, mas essa transferência ou integração são em sua maioria não efetivas por falhas nas transduções genicas posteriores diminuindo a efetividade a longo prazo não permitindo um tratamento prolongado. Já os vetores adenovírus permitem uma alta taxa de eficiência na transdução do genoma integrado ou transferido, mas ocasionam uma resposta imunológica intensa no indivíduo retardando o tratamento, ocasionando uma limitação no tratamento gênico. Já os vetores virais AAV permitem a integração ou transferência de genomas ocorrerem com maior simplicidade pelo fato de não ocasionarem uma reação imunológica intensa, mas encontra dificuldade na sua proliferação para um efeito duradouro. Mesmo com dificuldades atualmente, o vetor de vírus adenoassociado (AAV) é a principal plataforma para entrega de terapia genética in vivo (WANG *et al.*, 2019).



Entre as tecnologias criadas para promover edições genômicas destacam-se as nucleases “engenheiras”, tais como sistema CRISPR - Cas9 (do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated system*) e a CAR-T (do inglês, *chimeric antigen receptors*) (OSAKABE *et al.*, 2015; TEIMOURIAN E ABDOLLAHZADEH, 2015).

Diante disso, o aperfeiçoamento dessa transferência e seletividade dos tecidos lesados com a utilização do AVV juntamente com o método de Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas (CRISPR-Cas9) que utiliza das fitas de DNA ou RNA curtas e repetidas de bactérias (figura 1) e a tecnologia da CAR-T, se tornou necessária para avanços na utilização da terapia genica viral. Metodologias como a CRISPR-Cas9 e CAR-T tornaram-se uma combinação no desenvolvimento de tratamentos oncológicos de maior eficácia e seguros (MOLLANOORIA *et al.*, 2018)

A CRISPR-Cas9 identifica a sequência do DNA específico das bactérias, que são utilizadas como método de defesa contra possíveis infecções, que consiste em quebrar e espaçar as sequências de DNA invasor (WANG *et al.*, 2022).

Esse sistema imunológico adaptativo de algumas bactérias contém uma sequência curta de DNA de bacteriófago ou plasmídeo invadido que foi clivado a partir deles é armazenado no locus CRISPR desses organismos como uma nova sequência espaçadora. Este DNA é transcrito e processado em RNA para reconhecimento de invasão subsequente do mesmo vírus ou plasmídeo para eliminá-los. A sequência Protospacer Adjacent Motif (PAM), uma sequência que contém alguns nucleotídeos, é o local de reconhecimento no DNA dos invasores e reconhecida pela Cas nuclease, mas não integrada ao genoma do hospedeiro com a sequência Protospacer. Invasões subsequentes resultam na transcrição de um RNA dos espaçadores no locus CRISPR, que é chamado de RNA pré crispr (pré-crRNA). No tipo II do sistema CRISPR (CRISPR/Cas9), um segundo RNA, denominado CRISPR RNA trans ativador (tracrRNA), é transcrito e resulta na maturação do pré-crRNA ao se ligar às sequências repetidas do pré-crRNA e formar um RNA estrutura duplex que é clivada pela RNase III. Essa estrutura também funciona como um andaime entre crRNA e Cas9. Finalmente, o duplex crRNA/tracrRNA recruta a nuclease Cas9 para formar um complexo de ribonucleoproteína que cumpre a função Cas9 e o navega para se alinhar com o DNA alvo por pareamento de bases com o espaçador crRNA complementar. Para simplificar ainda mais este sistema de edição de genoma para aplicação em laboratório, o CRISPR/Cas9 foi reduzido em 2 partes: a proteína Cas9 juntamente com um único sgRNA, um RNA artificial contendo crRNA e tracrRNA. A atividade da nuclease Cas9 requer a presença da sequência PAM imediatamente após a extremidade 3' da sequência de DNA complementar do sgRNA (5'-NGG-3' para SpCas9), portanto, na presença da sequência PAM no DNA alvo, a nuclease Cas9 induz uma dupla quebra de fita (DSB) em três nucleotídeos a montante do PAM (figura 1) (MOLLANOORI *et al.*, 2018).

Geralmente, os DSBs que iniciam o processo de dois mecanismos intrínsecos para o reparo de DSB podem ser categorizados em duas abordagens de reparo diferentes: abordagem de reparo dirigido homólogo (HDR) que é usada para ativar o DNA desejado e levar ao reparo preciso da

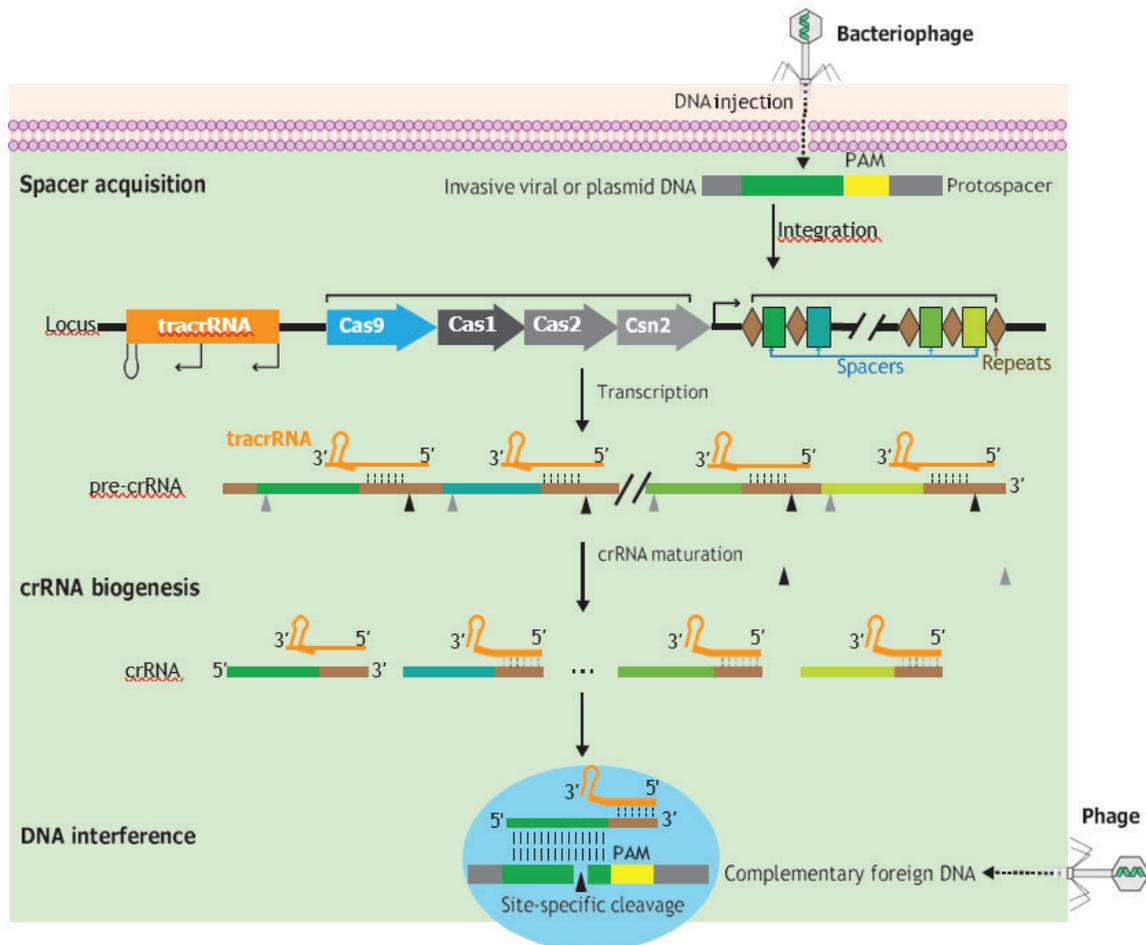


Figura 1: Mecanismo de funcionamento da técnica de CRISPR-Cas9. Adaptado de (JIANG, F. E DOUDNA, J. A. pg – 507, 2017).

Possivelmente a mais empolgante e promissora das abordagens tem sido o uso de células T do sangue periférico que foram geneticamente modificadas para expressar o receptor de antígeno quimérico (CAR). Os CARs são compostos por um fragmento variável extracelular de cadeia única (scFv), que serve como a fração de direcionamento, um espaçador transmembrana e sinalizador/ativador intracelular do(s) domínio(s). Os construtos de CAR são transfectados em células T usando transfecção de plasmídeo, mRNA ou transdução de vetor viral para direcioná-los para antígenos associados a tumores (TAAs) expostos à superfície. A estrutura CAR evoluiu de uma composição inicial envolvendo apenas o domínio de sinalização CD3 (apelidado de “CAR de primeira geração”) para formas mais complexas nas quais os endodomínios coestimulatórios foram adicionados, dando origem a sinalização de segunda geração (por exemplo, CD3 mais 41BB ou CD28 domínios) e CARs de terceira geração (por exemplo, domínios de sinalização CD3, mais 41BB e CD28) que têm aumentado a persistência e proliferação de células T. CARs também foram construídas para



atingir peptídeos específicos dentro do contexto de moléculas de antígeno leucocitário humano, potencialmente permitindo o direcionamento de moléculas intracelulares para o combate as células carcinogênicas (NEWICK *et al.*, 2017).

Diversos experimentos clínicos com a terapia CART-T vêm desenvolvendo expressar receptores antigênicos (CTL019) contra células neoplásicas, esses receptores aplicados como tratamento de leucemias em remissão obtiveram resultados satisfatórios. Com seu uso terapêutico contra leucemias permite uma maior especificidade, pois diferente dos demais tratamentos as CAR-T não afetam as células normais, mas apenas as células alvo, porém esses resultados foram definidos apenas em portadores com o estado em remissão ou refrataria das leucemias (LIM, 2017).

As CAR-T promovem uma citotoxicidade por granzimas e perforinas agindo com uma depleção seletiva das células neoplásicas (figura 2). (JACKSON, 2016)

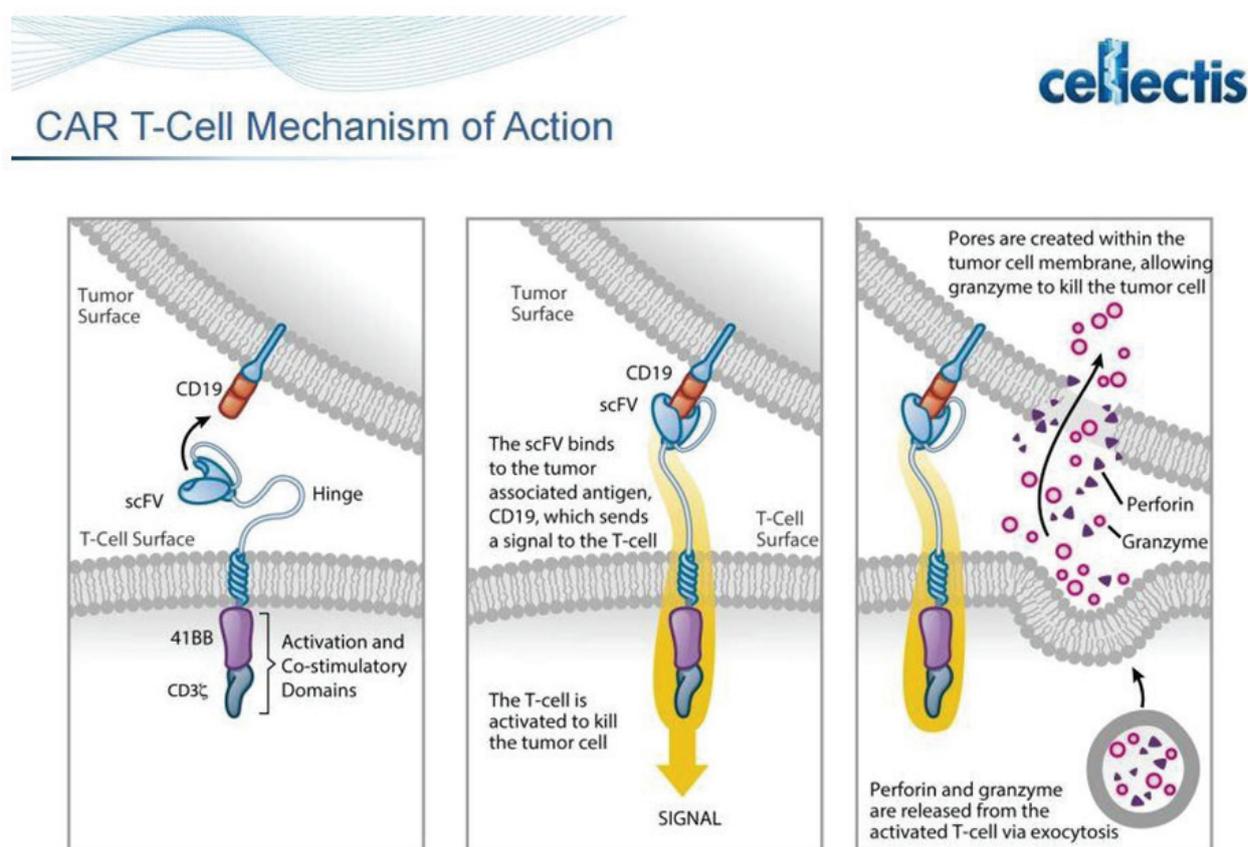


Figura 2: Mecanismo de ação das CAR-T em células neoplásicas. Fonte: SHU. Seton Hall University, 2015.

A relação entre a CAR-T e a CRISPR-Cas9 para o tratamento da leucemia mieloide crônica, vem de algumas limitações na ação das CAR-T, incluindo o processo demorado e caro para sua produção, a presença de moléculas intrínsecas de antígeno leucocitário humano (HLA) das células



CAR-T reconhecidas como moléculas HLA estranhas que desencadeiam uma rápida rejeição imunológica em receptores específicos que impede sua aplicação em ambiente alogênico e a dificuldade de uma coleta de boa qualidade. Essas limitações levaram à ideia de produzir CAR-T universais, geneticamente modificadas através da tecnologia CRISPR-Cas9 para a deleção ou edição dos genomas dos receptores que são induzidos a apoptose assim que se ligam com as células tumorais, fornecendo um possível tratamento para superar essas limitações contra a leucemia mieloide crônica, simplificar a produção das CAR-T e uma alta taxa de disponibilização. Estudos indicam uma melhora na eficácia antitumoral e nos resultados clínicos dos pacientes com câncer com o uso das CAR-T universais. A união entre essas duas técnicas elucidada nos estudos clínicos dos tratamentos de leucemia mieloide crônica e linfóide, evidenciaram uma resposta positiva quanto ao seu potencial terapêutico (HAY E TURTLE, 2018; LEVINE *et al.*, 2017; MOLLANOORIA *et al.*, 2018).

## Conclusão

Dado como um possível sucesso da relação das terapias CAR-T e CRISPR-Cas9 para a utilização no tratamento para leucemia mieloide crônica entre outras leucemias e carcinomas, estudos evidenciaram que é possível a união das técnicas para promover uma resposta antitumoral com eficácia e maior segurança, proporcionando um prognóstico melhor. Ainda assim alguns fatores como a citotoxicidade do tratamento a longo prazo, quantidade de doses, tempo entre elas e a adaptação da terapia para que a doença possa ser reduzida ou isenta. Desta forma o avanço das pesquisas é indispensável para garantir maior aplicabilidade, sensibilidade, eficácia e a uma maior viabilidade dessas terapias para que possam estar no mercado com maior acessibilidade e em menor tempo possível.

## Referências

- ALMEIDA, A., SANTOS, A., OLIVEIRA, N., STEAGALL, M., PINTO, C., FEDOZZI, F. Os Desafios da Jornada do Paciente com Leucemia Mieloide Aguda no Brasil. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. V. 44, S154-S155 2022.
- BORTOLHEIRO, T., CHIATTONE, C. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. V. 30, p. 3 – 7, 2008.
- CALDATO T. C., ALVES J.C.P. Terapia celular no tratamento da leucemia mieloide crônica. *Revista Saúde Uni Toledo*. V. 3, n. 2, p. 50-61, dez. 2019.
- COSTANZI-STRAUSS, E., STRAUSS, B. Perspectivas da terapia gênica. *Revista de medicina*. V. 94.4, p. 211-222, 2015.
- DERIANO, L., ROTH, D. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annual review of genetics*. V. 47.1, p. 433-55, 2013.
- FRANCESCO, T., MAGUIRE, A., ROSSI, S., PIERCE, E., MELILLO, P., MARSHALL, K., BANFI, S., SURACE, E., SUN, J., ACERRA, C., WRIGHT, J., WELLMAN, J., HIGH, K., AURICCHIO, A., BENNETT, J., SIMONELLI,



- F. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno- associated virus in patients with Leber congenital Amaurosis type 2. *Ophthalmology*. V. 120.6, p. 1283-1291, 2013.
- GAJ, T., GERBACH, C., BARBAS, C. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. V. 10, p. 1–9, 2013.
- HAY, K., TURTLE, C. CD19-specific chimeric antigen receptor-modified CAR-T cell therapy for te treatment of chronic lymphocytic leukemia in the ibrutinib era. *Immunotherapy*. V. 10, n. 4, p. 251-254, Feb. 2018.
- JACKSON, H.J., RAFIQ, S. Driving CAR T-cells forward. *Rev Clin Oncol*. V13, p. 370-383, 2016.
- JIANG, F., DOUDNA, J. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*. V. 46.1, p. 505-529, 2017.
- LAGO, C., PETRONI, T. Fisiopatologia e diagnóstico da leucemia mieloide crônica. *Revista saúde UniToledo* 1.1, 2017.
- LEVINE, B.L., MISKIN, J., WONNACOTT, K., KEIR, C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy”. *Review Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. V. 4, p. 92-101, Mar. 2017.
- LI, H., YANG, Y., HONG, W., HUANG, M., WU, M., ZHAO, X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances, and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020.
- .LI, H., YANG, Y., HONG, W., HUANG, M., WU, M., ZHAO X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal transduction and targeted therapy*. V. 5.1, p. 1-23, 2020.
- LIM, W.; JUNE, C. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell*. V. 168, n. 4, p. 724-740, 2017.
- MA, Y., ZHANG, L., HUANG, X. Genome modification by CRISPR/Cas9. *The FEBS Journal* 281, 2014.
- MENCK, C., VENTURA, A. Manipulando Genes em Busca de Cura: O Futuro da Terapia Gênica. *Revista USP*, São Paulo, n.75, p. 50-61, setembro/novembro 2007.
- MOLLANOORIA, H., SHAHRAKIB, H., RAHMATIA, H., TEIMOURIANA, S. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Human immunology*. V. 79.12, p. 876-882, 2018.
- MOLLANOORI, H., TEIMOURIAN, S. Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy. *Biotechnology Letters*
- MORENO-MATEOS, M., VEJNAR, C., BEAUDOIN, J., FERNANDEZ, J., GIRALDEZ, A. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature methods*. V. 12.10, p. 982-988, 2015.
- NEWICK, K., O'BRIEN, S., MOON, E., ALBELDA, S. CAR T cell therapy for solid tumors. *Annual review of medicine*. V. 68, p. 139-152, 2017.
- RABELO, A. e SILVA, BARBOSA, JR. Realidades e perspectivas do uso de terapia gênica no tratamento de doenças. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*. V. 20.3, 122- 127, 2018.
- SAMI, H., OGRIS, M. Biopharmaceuticals and gene vectors opening new avenues in cancer immune therapy. *Ther Deliv*. P.419-22, 2016.
- SANTOS, M., JESUS, G., FERREIRA, L., FRANÇA, R. Leucemia mieloide, aguda e crônica: diagnósticos e possíveis tratamentos. *Revista Saúde em Foco – Edição nº 11*, 2019.
- SHU. Seton Hall University,2015. Disponível em <http://blogs.shu.edu/cancer/2015/11/11/gene-edited-donor-t-cells-save-baby-with-incurable-leukemia/>. Acesso: maio, 2023.



SIVALINGAM, J., KENANOV, D., HAN, H., NIRMAL, A., NG, W., LEE, S., MASILAMANI, J., PHAN, T., MAURER-STROH, S., KON, O. Multidimensional genome-wide analyses show accurate FVIII integration by ZFN in primary human cells. *Molecular Therapy*. V. 24.3, p. 607- 619, 2016.

WANG, D., ZHANG, F., GUANGPING G. CRISPR-based therapeutic genome editing strategies and in vivo delivery by AAV vectors. *Cell*. V. 181.1, p. 136-150, 2020.

ZHANG, F., WEN, Y., GUO, X. CRISPR/Cas9 for genome editing progress, implications, and challenges. *Human molecular genetics*. V. 23.R1, R40-R46, 2014.

