



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE FARMÁCIA

Raiza Rabelo Maciel

Biologia sintética aplicada a imunoterapia com células CAR-T no tratamento de neoplasias: uma revisão narrativa

Florianópolis

2023

Raiza Rabelo Maciel

Biologia sintética aplicada a imunoterapia com células CAR-T no tratamento de neoplasias: uma revisão narrativa

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Farmacêutica.

Orientador: Prof., Dr.Hernan Francisco Terenzi

Florianópolis

2023

Rabelo Maciel, Raiza

Biologia sintética aplicada a imunoterapia com células CAR-T no tratamento de neoplasias: uma revisão narrativa / Raiza Rabelo Maciel ; orientador, Hernan Terenzi, 2023.
48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Células CAR-T. 3. Biologia sintética.
4. Imunoterapia. I. Terenzi, Hernan. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Raiza Rabelo Maciel

Biologia sintética aplicada a imunoterapia com células CAR T no tratamento de neoplasias: uma revisão narrativa

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Biologia sintética aplicada a imunoterapia com células CAR T no tratamento de neoplasias: uma revisão narrativa e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Centro de Ciências da Saúde, 21 de novembro de 2023.

Florianópolis
2023

RESUMO

O desenvolvimento de terapias imunológicas, como a terapia com células CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cell*), tem provocado mudanças na área da oncologia, proporcionando uma abordagem promissora no tratamento do câncer. A terapia CAR-T envolve a modificação genética de linfócitos T do paciente para expressar receptores quiméricos que os concedem a capacidade de reconhecer e destruir células neoplásicas de forma direcionada. Algumas das adversidades encontradas com a utilização dessa imunoterapia envolvem o desenvolvimento de resistência ao tratamento, ineficiência em tumores sólidos devido à heterogeneidade antigênica e imunológica, e reações adversas relacionadas à liberação de citocinas pelo sistema imunológico. Portanto, para aprimorar a eficácia e segurança das células CAR-T, é essencial compreender as principais metodologias empregadas em sua modificação, a fim de ativar eficientemente as células T, bem como modular receptores quiméricos para aumentar a sensibilidade e efetividade. Com isso, a biologia sintética, ao manipular os genes de linfócitos T, aprimora a eficácia e precisão no enfrentamento a neoplasias, ao mesmo tempo em que busca minimizar os efeitos adversos. Essa revisão procura apresentar algumas das técnicas de edição genética associada a biologia sintética, como CRISPR-Cas9, nucleases personalizadas TALENs e ZFNs, transposons e SynNotch, que ocasionam modificações genéticas e promovem a inserção de receptores externos.

Palavras-chave: Biologia sintética; CAR-T; CRISPR-Cas9; TALENs; ZFNs; Transposons; SynNotch.

ABSTRACT

The development of immune therapies, as CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-cell) therapy, has revolutionized the field of oncology, providing a promising new approach to cancer treatment. CAR-T therapy involves genetically modifying the patient's T lymphocytes to express chimeric receptors that give them the ability to recognize and destroy neoplastic cells in a targeted manner. Some of the adversities encountered with the use of this immunotherapy involve the development of resistance to treatment, inefficiency in solid tumors due to antigenic and immunological heterogeneity, and adverse reactions related to cytokine release by the immune system. Therefore, to enhance the efficacy and safety of CAR-T cells, it is essential to understand the main methodologies employed in their modification in order to efficiently activate T cells as well as modulating chimeric receptors to increase sensitivity and effectiveness. Thus, synthetic biology, by manipulating the genes of T lymphocytes, improves the efficacy and precision in the fight against neoplasm, while minimizing adverse effects. This review aims to present some of the gene editing techniques associated with synthetic biology such as CRISPR-Cas9, TALENs and ZFNs custom nucleases, transposons, and SynNotch, that cause genetic modifications and promote the insertion of external receptors.

Keywords: Synthetic Biology; CAR-T; CRISPR-Cas9; TALENs; ZFNs; Transposons; SynNotch.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Rejeição imunomediada de tumores transplantados;
- Figura 2: Ilustração esquemática de terapia celular CAR-T ou CAR-NK;
- Figura 3: Comparação das plataformas SB, ZFN, TALEN e CRISPR/Cas9.
- Figura 4: Plataformas de edição de genoma e mecanismos para reparo de DSB com DNA endógeno;
- Figura 5: Componentes CRISPR/Cas9 e variantes da classe de enzimas Cas9.
- Figura 6: Sistema transposon da Bela Adormecida para engenharia de células CAR-T.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAR-T Chimeric antigen receptor T cell
CAR-NK Chimeric antigen receptor-Natural Killer
CRISPR Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA CRISPR RNA
DSB Double Strand Breaks
FDA Food and Drug Administration
GFP Green Fluorescent Protein
HR Recombinação Homóloga
Indels Insertion-deletion
ITR Repetições Terminais Invertidas
LLA Leucemia linfoblástica aguda
LNH Linfoma não-Hodgkin
MHC Major histocompatibility complex
PAM Protospacer Adjacent Motif
SB Sleeping Beauty
scFv Single chain fragment variable
sgRNA Single RNA
SLC Síndrome da liberação de citocinas
SynNotch Synthetic Notch
tracRNA RNA CRISPR Transativador
TALENs Transcription activator-like effector nucleases
TCR T cell receptor
ZFNs Zinc Finger Nucleases

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO	5
1.2 JUSTIFICATIVA	5
2. METODOLOGIA	6
3. DESENVOLVIMENTO	7
3.1 TALENs e ZFNs	15
3.2 CRISPR-Cas9	19
3.3 Transposons	23
3.4 SynNotch	26
4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	29
REFERÊNCIAS	31

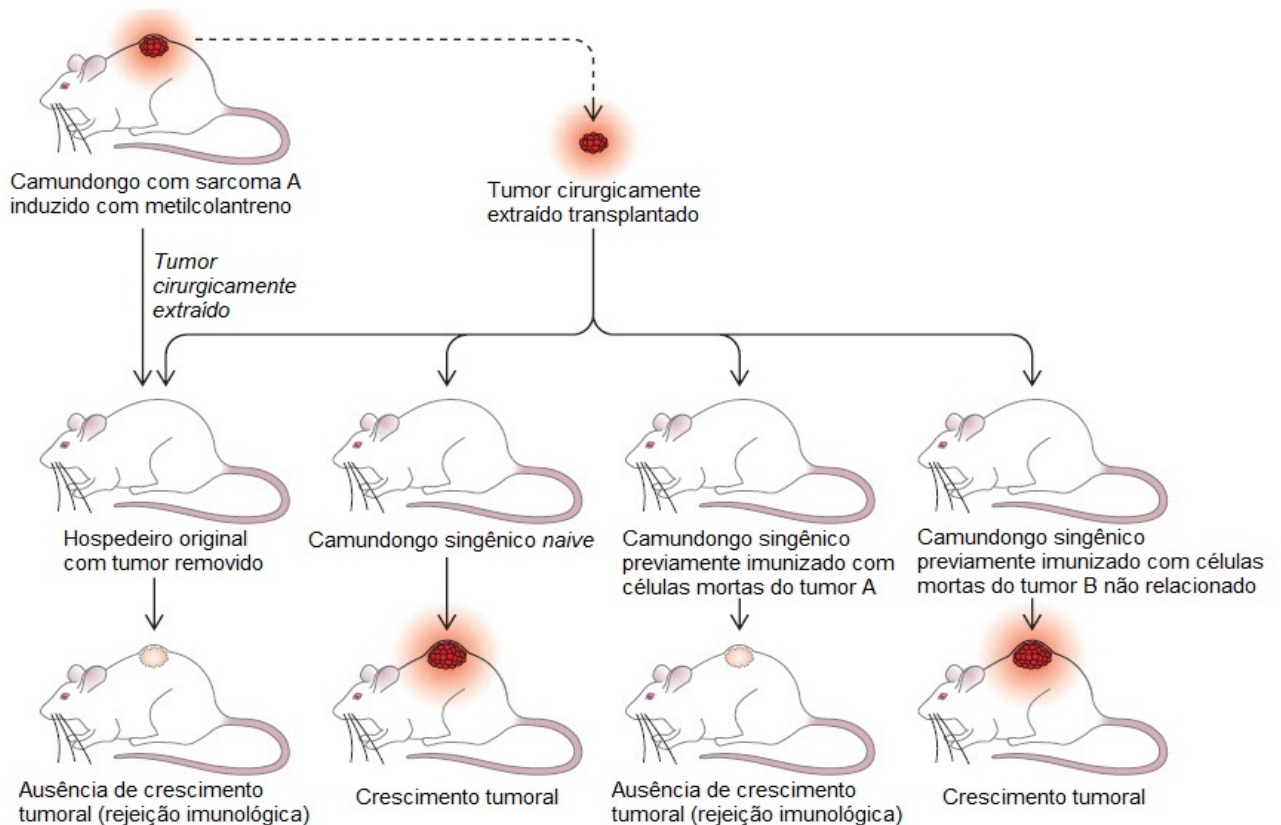
1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 50 um estudo relata a relação entre o sistema imune e o câncer, ao observar a capacidade inata do organismo em detectar células neoplásicas e combatê-las, levando a identificação de antígenos diretamente relacionados a tumores que estavam presentes na superfície de células tumorais que, no entanto, não eram reconhecidos pelo sistema imunológico (MITCHISON, 1955). O processo neoplásico é correlacionado a uma falha no sistema imune em identificar e eliminar células malignas que por diferentes estímulos não mantém as características de uma célula normal, favorecendo a proliferação celular tumoral estimulando a progressão do câncer (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2016). Experimentos clássicos demonstram a ligação direta entre mecanismos do sistema imunológico e a defesa contra o câncer ao analisarem a rejeição de tumores quimicamente induzidos que eram semelhantes a eles por camundongos imunizados. Além disso, camundongos que não haviam sido previamente expostos ao tumor, foram protegidos contra o crescimento tumoral ao serem imunizados com células tumorais mortas, administradas antes do desafio com células tumorais viáveis (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2016; REDMAN, CHANG, 2011) (Fig. 1).

A resposta imune ao processo tumoral está principalmente relacionada como reconhecimento de peptídeos decorrentes do processamento citosólico de proteínas acopladas a células ou antígenos tumorais, que, quando ligadas ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC do inglês *Major histocompatibility complex*) desencadeiam respostas imunológicas de linfócitos T. Através do sequenciamento de células únicas bem como clones de células T específicas tem sido possível a identificação e o isolamento de linfócitos T específicas de tumores (GIDEON, 1989; REDMAN, CHANG, 2011). Desse modo, a imunoterapia, em suma, possui o intuito de estimular a resposta imune do paciente, auxiliando e reforçando a capacidade em reconhecer e suprimir células neoplásicas (CHEN, 2013). Para elaboração de novas terapias imunes, é imprescindível associar os eventos do sistema imunológico envolvidos em neoplasias, uma vez que os receptores de células T (TCRs do inglês *T cell receptors*) reconhecem naturalmente os antígenos intracelulares apresentados pelos MHCs (THORSSON, 2018).

A imunoterapia, que teve início no século XVIII com a reflexão sobre o papel do sistema imunológico no combate às doenças, tornou-se uma abordagem revolucionária no tratamento do câncer e de várias doenças autoimunes. Essa abordagem tem evoluído significativamente ao longo das décadas, impulsionada por descobertas fundamentais na pesquisa imunológica e no desenvolvimento de terapias inovadoras (MELLMAN, COUKOS, DRANOFF, 2011; ENO, 2017).

Figura 1 - Rejeição imunomediada de tumores transplantados



Fonte: "Tumor immunology" (2011). Enquanto o hospedeiro original e os camundongos singênicos *naive* imunizados com células mortas do tumor original não apresentam crescimento tumoral após o transplante de células tumorais, os camundongos singênicos *naive* não imunizados e os camundongos imunizados com células mortas de um tumor não relacionado apresentam crescimento tumoral.

A imunoterapia inicialmente focou-se no desenvolvimento de vacinas, como a de Louis Pasteur e a descoberta dos anticorpos por Emil von Behring, abrindo

caminho para a compreensão dos mecanismos imunológicos (LOMBARD, PASTORET, MOULIN, 2007; KAUFMANN, 2017). A vacina desenvolvida por Pasteur se baseou no enfraquecimento do vírus da raiva, através do tecido nervoso de coelhos infectados pela raiva, tornando-o menos patogênico, para que desse modo não levasse a doença, mas sim, que estimulasse a resposta imunológica adaptativa do hospedeiro. Já Behring focou suas pesquisas sobre difteria e tétano, duas doenças infecciosas graves causadas por toxinas produzidas por bactérias, observando indivíduos que se recuperavam dessas doenças posteriormente desenvolviam proteção contra infecções subseqüentes. A descoberta de Behring e Kitasato acerca de substâncias que tinham a capacidade de neutralizar as toxinas da difteria, então denominadas "antitoxinas", e a potencial utilização do soro sanguíneo de animais ou pessoas que haviam se recuperado da doença, determinou a imunização passiva, na qual anticorpos poderiam ser transferidos de um indivíduo a outro (LOMBARD, PASTORET, MOULIN, 2007; KAUFMANN, 2017).

Nas últimas décadas, avanços na imunologia, como a descoberta das células e a engenharia genética, possibilitaram o desenvolvimento de terapias que potencializam a capacidade do sistema imunológico de combater doenças, levando a tratamentos bem-sucedidos em casos anteriormente considerados inacessíveis (RIBATTI, 2017). Concebido inicialmente no final do século XIX por William Coley (1981), que testou a regressão tumoral em pacientes com infecções bacterianas, a imunoterapia atualmente é amplamente utilizada como uma das principais abordagens no tratamento do câncer, com terapias direcionadas que incluem uma variedade de estratégias como citocinas, vacinas terapêuticas, anticorpos monoclonais, terapia celular e terapia com *checkpoint* imunológico (PARDOLL, 2012).

Uma das abordagens antineoplásicas mais promissoras no uso clínico é a terapia com células T do receptor de antígeno quimérico (CAR) (D'ALOIA, 2018). Zelig Eshhar e colaboradores (2016) criaram as primeiras moléculas quiméricas receptoras de células T (CAR-T, do inglês *Chimeric Antigen Receptor T-cell*) que eram capazes de reconhecer e matar células tumorais de maneira específica. O estudo demonstra o processo pelo qual se resulta em CAR-T que reconhecem antígenos específicos expressos em células tumorais, levando à sua ativação e

destruição do tumor. Desse modo, os linfócitos T do paciente são colhidos e manipulados para expressar um CAR, uma proteína de fusão que combina um fragmento variável de cadeia única de anticorpo (scFv) que reconhece um antígeno de superfície tumoral com domínios de sinalização intracelular derivados dos TCRs e receptores de sinalização associados (D'ALOIA, 2018).

Contudo, tendo em vista que o sistema imune é influenciado por diversos fatores, tal qual o estágio da doença, o tipo e local do tumor e a própria resposta imune do paciente, a imunoterapia pode se tornar ineficaz. Uma das barreiras encontradas com a utilização de células CAR-T é o eventual desenvolvimento de resistência ao tratamento, posto que as células cancerígenas podem sofrer alterações genéticas que acarretaria no não reconhecimento pelo sistema imune, e que, a longo prazo, afetaria a eficácia da terapêutica (NEELAPU, 2018).

A biologia sintética se desenvolveu rapidamente desde o início do século XXI, e se concentrou na elaboração e aprimoramento de sistemas biológicos propondo-se a criação de funções biológicas direcionadas e personalizadas, permitindo a manipulação de genes, proteínas e vias metabólicas com precisão (BENNER, SISMOUR, 2005). Em um primeiro momento, a biologia sintética se resumiu na montagem de partes biológicas simples, como genes e proteínas, para criar circuitos genéticos básicos como a construção do genoma de uma bactéria a partir do zero ocasionando a criação da primeira célula bacteriana sintética por Craig Venter (2010). Contudo, no decorrer dos anos, avançou para a construção de sistemas biológicos mais complexos e a criação de organismos sintéticos.

A aplicação da biologia sintética na imunoterapia tem possibilitado a eliminação seletiva de células cancerosas por meio da concepção de circuitos genéticos responsivos a estímulos específicos, garantindo maior precisão, especificidade e previsibilidade de células CAR-T (ZHANG, 2022). Ao combinar engenharia genética e biologia molecular, a biologia sintética projeta células modificadas que têm a capacidade de atacar células malignas de forma altamente específica e ao manipular os genes de linfócitos T, pode-se aprimorar sua eficácia e precisão no combate a neoplasias, ao mesmo tempo em que minimizem os efeitos colaterais (ESENSTEN, BLUESTONE, LIM, 2017).

Frequentemente é empregado o uso de vetores virais e bacterianos como ferramentas que desempenham função fundamental na construção e manipulação de sistemas biológicos, permitindo a introdução de material genético estrategicamente projetado em organismos-alvo (RILEY *et al.*, 2019). Vetores virais, como adenovírus ou lentivírus, são frequentemente usados na transferência de genes em células e organismos. Eles são modificados para carregar genes específicos ou partes do genoma e, em seguida, são usados para introduzir esses genes em células-alvo (MOCO, AHARONY, KAMEN, 2019; HAAS *et al.*, 2019). Essa abordagem é fundamental na terapia genética, onde a biologia sintética contribui para o desenvolvimento de novos tratamentos direcionados a doenças.

Por outro lado, vetores bacterianos, como plasmídeos, são comuns na engenharia genética e na manipulação de bactérias pois servem como veículos para inserir sequências de DNA nas células bacterianas, permitindo a produção de proteínas recombinantes ou a modificação de vias metabólicas. A biologia sintética faz uso desses vetores bacterianos para criar organismos geneticamente modificados que podem ser usados em aplicações diversas. Nesse contexto, vetores virais e bacterianos desempenham um papel crucial na entrega eficaz de genes que codificam os receptores CAR para as células do sistema imunológico do paciente (OSBORN *et al.*, 2016).

1.1 OBJETIVO

Neste estudo foi elaborado uma revisão narrativa sobre a aplicação da biologia sintética para o aprimoramento da imunoterapia com células CAR-T para o tratamento de neoplasias.

1.2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de terapias imunológicas, como a terapia com células CAR-T, tem revolucionado o campo da oncologia, proporcionando uma nova

abordagem promissora no tratamento do câncer. A imunoterapia com células CAR-T demonstrou ser uma inovação terapêutica importante no tratamento de neoplasias, com resultados notáveis em pacientes com leucemia e linfoma.

No entanto, a aplicação bem-sucedida em cânceres sólidos e o aumento da eficácia ainda são obstáculos nesse campo de pesquisa, sendo necessário o aprimoramento da eficácia das terapias CAR-T a fim de torná-las mais confiáveis em diferentes cenários clínicos. A utilização da biologia sintética é capaz de aprimorar a eficácia das CAR-T por meio da engenharia genética, tornando-as capazes de superar barreiras tumorais, resistência imunológica e heterogeneidade genética, oferecendo uma promissora perspectiva para o tratamento do câncer e outras doenças relacionadas. Assim, nota-se a importância e a relevância de pesquisas e aplicações futuras nessa área.

Este estudo visa apresentar a aplicação de tecnologias de biologia sintética, como CRISPR-Cas9, TALENs, ZFNs, transposons, e sistema SynNotch que permitem a personalização mais ampla e acessível, aumento da eficácia e segurança além de possibilitar um controle mais preciso sobre a atividade das CAR-T.

2 METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão narrativa da literatura tendo a busca por artigos com base em sites como Pubmed, Science Direct, Nature e Google Scholar, além de referência em livros físicos e digitais, utilizando palavras-chave tais como: *Synthetic biology*, *CAR T cells*, *Transposons*, *TALENs*, *ZFNs*, *CRISPR-Cas9*, *SynNotch*. Não houve restrição quanto ao ano de publicação ou ao idioma dos artigos durante a pesquisa.

3 DESENVOLVIMENTO

A terapia com células CAR-T é um tratamento promissor que envolve várias etapas importantes. A depender do estado de saúde do paciente, podem ser necessários tratamentos preparatórios como a linfodepleção. Trata-se de um procedimento que envolve a redução seletiva das células do sistema imunológico, especialmente as células linfóides. A remoção parcial das células do sistema imunológico do paciente pode diminuir a competição por recursos com as células T modificadas introduzidas durante a terapia. Essa abordagem pode potencializar a eficácia, possibilitando que as novas células se proliferem e atuem de forma mais eficiente. Além disso, essa estratégia pode ser utilizada com o propósito de diminuir a carga tumoral pré-tratamento, o que, por sua vez, contribui para melhorar a resposta das células CAR-T ao combate da neoplasia. A redução do número de células malignas a serem combatidas proporciona um ambiente mais favorável para a ação das células CAR-T, permitindo que elas exerçam seu potencial terapêutico de forma mais eficaz e direcionada (AMINI, *et al.*, 2022).

A linfodepleção desempenha um papel fundamental ao minimizar as adversidades relacionadas ao sistema imunológico, como a síndrome da liberação de citocinas (SLC), que pode surgir como uma ocorrência intensa nas células CAR-T ou em outras terapias imunológicas. Esta abordagem estratégica não apenas contribui para a eficácia do tratamento, mas também atua como um importante mecanismo de controle das respostas imunológicas exacerbadas, proporcionando assim uma intervenção terapêutica mais segura e equilibrada (AMINI, *et al.*, 2022).

A linfodepleção é uma estratégia versátil que pode ser realizada por meio de diversas abordagens, com a administração de quimioterapia, o qual é o método mais frequente. Essa modalidade envolve a utilização de agentes quimioterápicos, que têm como alvo não apenas as células malignas, mas também o sistema imunológico, incluindo os linfócitos. A quimioterapia é um meio eficaz de criar um ambiente propício para a terapia com células CAR-T, para remover seletivamente as células imunes que podem interferir no tratamento, permitindo que as células CAR-T atuem de forma mais eficiente e direcionada. Além disso, a linfodepleção pode

abranger a aplicação de tratamentos direcionados a células linfóides específicas, como a terapia com anticorpos monoclonais. Essa abordagem terapêutica visa de forma precisa as células do sistema linfático, contribuindo para a otimização do ambiente imunológico antes da terapia com células CAR-T. O uso de anticorpos monoclonais oferece uma estratégia personalizada que complementa a linfodepleção com quimioterapia, garantindo uma preparação abrangente e eficaz do sistema imunológico para o tratamento. É importante salientar que este procedimento pode tornar os pacientes mais suscetíveis a infecções, uma vez que o sistema imunológico estará temporariamente debilitado. Portanto, é fundamental que os pacientes submetidos à linfodepleção tenham monitoramento terapêutico e recebam cuidados médicos adequados durante o processo de recuperação (AMINI, *et al*, 2022).

A imunoterapia com células CAR-T ocorre primeiramente pela coleta de células T do paciente por aférese, uma técnica utilizada em diversas situações para coleta, remoção ou recuperação de componentes específicos do sangue ou de outros fluidos corporais, enquanto o restante do sangue ou fluido é devolvido ao paciente. No caso da imunoterapia com células CAR-T, a aférese é comumente usada para abundância de células T. Esse procedimento pode ainda ser utilizado para remover componentes indesejados do sangue, como anticorpos em casos de doenças autoimunes, proteínas anormais em distúrbios como a gamopatia monoclonal, ou para reduzir o excesso de glóbulos vermelhos em pacientes com policitemia vera (WARD, 2011).

O procedimento de aférese envolve o uso de uma máquina especializada, chamada aferesador, que coleta o sangue do paciente através de cateter de hemodiálise ou via cateter periférico, separando os componentes desejados, como as células T. O aferesador, após a separação, retorna ao paciente o restante do sangue, garantindo que a perda de sangue seja mínima e que o processo seja executado com segurança e eficácia. Dessa forma, é possível obter os componentes desejados para fins terapêuticos sem representar um risco substancial para a saúde do paciente (WARD, 2011).

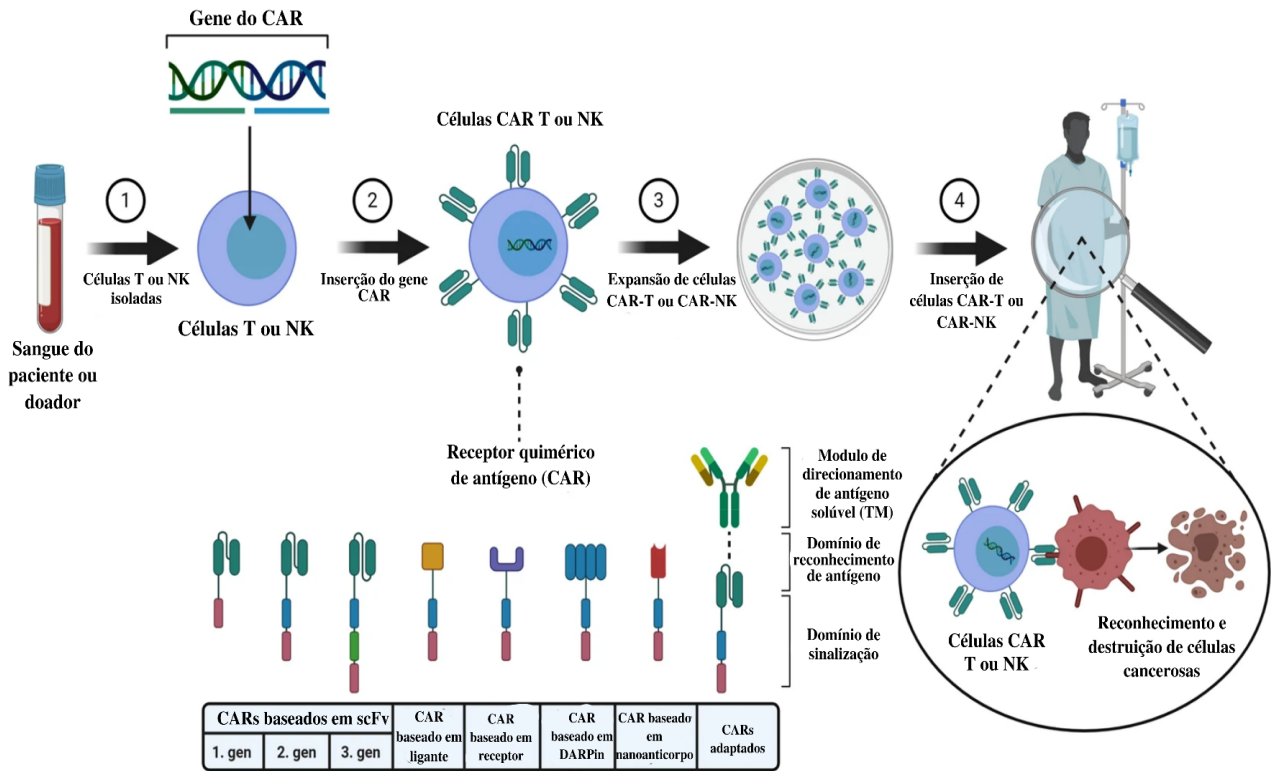
As células T são colhidas e então geneticamente modificadas, isso envolve a introdução de um gene que codifica um CAR que foi projetado para conter uma proteína específica encontrada na superfície das células malignas que se deseja combater. O CAR é predominantemente constituído por um domínio de ligação extracelular, derivado principalmente de um fragmento de anticorpo monoclonal, scFv que é conectado aos domínios de ligação intracelular do complexo receptor das células T. A resposta citotóxica é resultante da ligação do scFv a um antígeno tumoral, ocasionando a ativação da célula T, independentemente da histocompatibilidade. Constantemente, novas iterações de CAR estão em processo de desenvolvimento, trazendo consigo modificações nos domínios coestimulatórios intracelulares e/ou nos domínios de direcionamento. Esses últimos podem incorporar diversas moléculas, como nanocorpos, proteínas de repetição de anquirina projetadas (DARPs), ligantes ou receptores, em vez dos tradicionais scFvs. (ALBINGER, HARTMANN, ULLRICH, 2021).

Essa alteração genética é realizada em laboratório e permite que as células T expressem o CAR em sua superfície. Após a modificação genética, as células T são proliferadas em laboratório. Este é um processo chamado proliferação celular que estimula as células a se dividir e multiplicar, aumentando significativamente o número de células CAR-T disponíveis para a terapia. Uma vez que as células CAR-T são expandidas e o paciente está devidamente preparado, uma única dose de células CAR-T é administrada, geralmente por via intravenosa. As células CAR-T são ativadas quando encontram células malignas, desencadeando uma resposta imune direcionada (ALBINGER, HARTMANN, ULLRICH, 2021) (Fig. 2).

As células CAR-T podem ser divididas em quatro gerações de acordo com a estrutura do endodomínio. As células CAR-T de primeira geração possuem um único domínio intracelular de ativação, geralmente o domínio CD3-zeta. Embora tenham sido inovadoras, elas eram menos eficazes na persistência e na capacidade de matar células cancerosas por não produzirem interleucina-2 suficiente, que possui a finalidade de induzir a proliferação e diferenciação de linfócitos B. Além disso, eram mais propensas a causar efeitos colaterais graves, como a Síndrome de Liberação de Citocinas (SLC). As CAR-T de segunda geração introduziram uma melhoria

fundamental, adicionando um segundo domínio intracelular, geralmente derivado de uma molécula coestimulatória, como CD28 ou 4-1BB (ZHANG, 2017).

Figura 2 - Ilustração esquemática de terapia celular CAR-T ou CAR-NK



Fonte: Imagem traduzida de "Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany" (2021). (1) As células T ou NK são isoladas do sangue do paciente ou do doador. (2) Posteriormente, as células são geneticamente modificadas para expressar receptores de antígenos quiméricos (CARs). (3) As células CAR-T ou CAR-NK são expandidas até que um número suficiente de células seja alcançado e (4) (re)injetadas no corpo do paciente, onde podem combater as células cancerígenas. As construções CAR possuem um módulo de direcionamento que reconhece antígenos tumorais e um único domínio de sinalização intracelular (1. gen) ou um (2. gen) ou dois (3. gen) domínios coestimuladores adicionais. Na maioria das construções CAR, o módulo de direcionamento consiste em um fragmento variável de cadeia única (scFv). Novas construções de CAR também podem possuir nanocorpos, proteínas de repetição de anquirina projetadas (DARPin), ligantes ou receptores em vez de scFvs para reconhecimento de alvo. Os CARs adaptadores consistem em dois componentes: um módulo de direcionamento de antígeno solúvel (TM) e um CAR que tem como alvo esse TM. Receptor de antígeno quimérico CAR, DARPin projetou proteínas de repetição de anquirina, geração de genes, fragmento variável de cadeia única scFv, módulo de direcionamento TM. *Esta figura foi criada usando BioRender.*

Isso melhorou significativamente a capacidade das células T modificadas de se multiplicarem, prolongarem sua vida útil no organismo e eliminar as células

cancerosas, reduzindo os efeitos colaterais. Já as CAR-T de terceira geração incorporam mais de um domínio coestimulatório em sua estrutura. Essa abordagem tinha como objetivo aumentar ainda mais a eficácia e a segurança. No entanto, as melhorias foram menos eficazes do que as CAR-T de segunda geração. As CAR-T de quarta geração são uma evolução recente que busca fornecer maior controle sobre a atividade das células T modificadas através da adição na estrutura de segunda geração de IL-12, citocina produzida por linfócitos B encarregada de aumentar as funções citotóxicas de células T (ZHANG, 2017).

A terapia com células CAR-T têm demonstrado resultados promissores no tratamento de neoplasias e sua eficácia levou à aprovação por órgãos regulatórios importantes, como *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos. Com a aprovação da primeira terapia com células CAR-T em 2017 para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda de células B em pacientes pediátricos e jovens adultos (ZHENG, KROS, LI, 2018). Kymriah (tisagenlecleucel) e Yescarta (axicabtagene ciloleucel), representam células T autólogas geneticamente modificadas direcionadas especificamente para o antígeno CD19. Ambos receberam a aprovação da FDA para uso clínico em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) e determinados subtipos de linfoma não-Hodgkin (LNH) (BRAENDSTRUP, LEVINE, RUELLA, 2020). A aprovação regulatória proporciona uma base sólida para a utilização clínica desta imunoterapia, ressaltando a importância e o potencial terapêutico das células CAR-T, garantindo sua segurança e eficácia e reconhecendo o impacto positivo dessa abordagem terapêutica.

A imunoterapia com células CAR-T tem demonstrado eficácia em tratamentos de alguns tipos de câncer hematológico, como a leucemia linfoblástica aguda (LLA) e certos linfomas não Hodgkin de células B e tem levado à remissão duradoura e até mesmo à cura em pacientes com LLA e linfomas de células B.(GRUPP *et al*, 2016; SCHUSTER *et al*, 2017). Isso se deve ao fato de que essas neoplasias expressam antígenos de superfície específicos e as células CAR-T são projetadas para atingir esses antígenos de forma precisa, permitindo um tratamento altamente direcionado.

No entanto, a eficácia da imunoterapia com células CAR-T varia em outros tipos de câncer, particularmente em tumores sólidos. Isso ocorre em parte devido à

heterogeneidade antigênica e imunológica desses tumores. Muitos cânceres sólidos são penetrados por diferentes tipos de células que suportam o crescimento do tumor, angiogênese e metástase, tornando difícil para as células CAR-T eliminar todas as células cancerosas (MAROFI, 2021). Além disso, o microambiente tumoral nos cânceres sólidos pode ser supressor imunológico, tornando as células T menos eficazes. Essas são algumas das razões pelas quais a imunoterapia com células CAR-T não é tão eficaz em cânceres sólidos quanto em certos cânceres hematológicos (MAROFI, 2021).

Apesar de ser uma abordagem promissora no tratamento de determinados tipos de neoplasias, pode enfrentar desafios de eficácia em algumas situações clínicas. Uma das principais preocupações diz respeito às reações adversas relacionadas à liberação de citocinas pelo sistema imunológico ativado, o que pode levar a uma resposta inflamatória exagerada, muitas vezes denominada síndrome de liberação de citocinas. SRC pode resultar em sintomas como febre, hipotensão, insuficiência respiratória e, em casos extremos, danos a órgãos vitais (LEE *et al.*, 2014).

Além disso, as células CAR-T também podem atacar não apenas as células cancerosas, mas também células saudáveis do corpo, levando a efeitos colaterais potencialmente graves. Em tratamentos de leucemia com células CAR-T, os pacientes podem desenvolver citopenias, uma condição em que a produção de série hematológica saudável é comprometida, o que resultaria possivelmente em anemia, trombocitopenia e neutropenia, aumentando a susceptibilidade a infecções. As complicações neurológicas, como a encefalopatia relacionada ao tratamento, também são uma preocupação, pois podem causar confusão, dificuldades de fala e outros sintomas (GUST, 2017; BONIFANT *et al.*, 2016; TEACHEY *et al.*, 2016).

Comumente, vetores virais, tais como adenovírus, lentivírus e retrovírus, são empregados na inserção de genes CAR nas células T do paciente. Na imunoterapia com células CAR-T, a introdução das células-alvo por meio de técnicas de transdução viral implica na seleção de vírus específicos, devido à sua eficaz capacidade de integrar o DNA transgênico nas células-alvo. A escolha desses vetores virais é crucial, pois assegura a estabilidade e a durabilidade das

modificações genéticas introduzidas nas células T. Esses vetores são escolhidos por sua capacidade de traduzir eficientemente as células T com o gene desejado, permitindo que as células T expressem o receptor CAR em sua superfície (MOCO, AHARONY, KAMEN, 2019; HAAS, *et al* 2019).

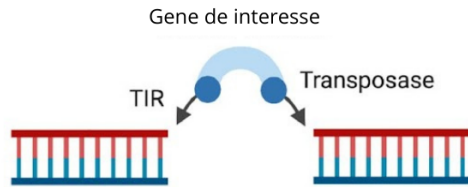
Os vetores virais são modificados para serem seguros e não replicativos, minimizando o risco de infecção viral, desempenhando alta eficiência na transdução de genes, podendo, no entanto, desencadear uma resposta imunológica adversa (SHEARER, SAUNDERS, 2015; SUERTH, SCHAMBACH, BAUM, 2012).

Além dos vetores virais, os bacterianos também são utilizados para entregar genes CAR em células do sistema imunológico. Esses vetores bacterianos são projetados para fornecer com precisão o gene CAR nas células T do paciente, estimulando assim uma resposta imunológica direcionada às células neoplásicas sendo menos imunogênicos que vetores virais (RILEY *et al.*, 2019). As limitações encontradas na imunoterapia com células CAR-T incentivaram as pesquisas científicas a explorar diferentes alternativas tecnológicas para a edição genética que possuem uma abordagem semelhante na união de uma sequência de DNA especificada pelo usuário e na facilitação da quebra da dupla cadeia de DNA (DSB do inglês *Double Strand Breaks*). Com o intuito de realizar modificações genéticas pré definidas e promover a inserção de receptores externos foram abordadas técnicas de edição genética tais como transposons, nucleases personalizadas e repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente espaçadas (CRISPR do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) associadas a enzima Cas9 (CRISPR-Cas9) (RILEY *et al.*, 2019).

Na engenharia genética das células T, as sequências genéticas que codificam o CAR são cuidadosamente inseridas nos vetores virais. Essas sequências contêm as informações necessárias para a expressão do CAR na superfície das células T, bem como para a capacidade das células T de identificar e atacar células-alvo específicas, como as células neoplásicas. A escolha do local de inserção do gene CAR é um aspecto crítico, e é nesse ponto que técnicas de edição genética, como CRISPR-Cas9, ZFN e TALENs, podem ser aplicadas para garantir a precisão na integração do CAR no genoma das células T. Isso é fundamental para

Figura 3 - Comparação das plataformas SB, ZFN, TALEN e CRISPR/Cas9

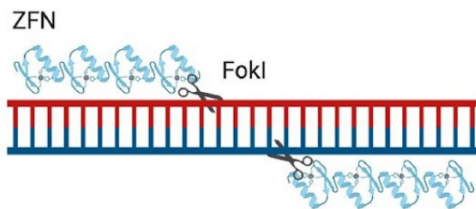
a Transposons



- Baixa genotoxicidade Custo-benefício
- Menos tóxico que a transdução viral
- Adequado para co-entrega de múltiplos genes

- Entrega ineficiente de plasmídeos em células humanas
- Não é adequado para interrupção ou substituição de genes

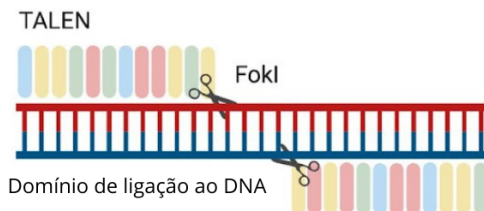
b Nucleases dedo de zinco (ZFN)



- Edição específica com poucos efeitos fora do alvo
- Entrega eficiente devido ao seu menor tamanho

- Engenharia substancial de proteínas necessária para diferentes alvos genéticos

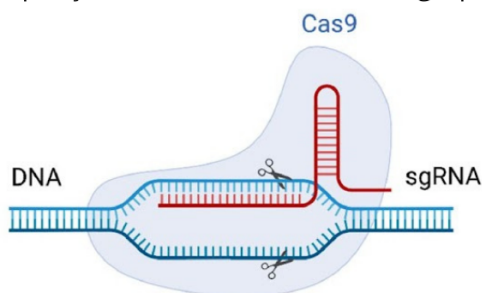
c Nucleases Efetoras do tipo Ativador de Transcrição (TALENs)



- Edição específica com poucos efeitos fora do alvo
- Design mais simples que ZFN

- Entrega ineficiente devido ao seu grande tamanho
- Engenharia de proteínas substancial necessária para diferentes alvos genéticos

d Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas (CRISPR)/Cas9



- Alteração mínima para atingir novos objetivos
- Fabricação eficiente e escalonável
- Adequado para uma variedade de plataformas de entrega

- Edição menos específica que ZFN e TALEN
- Riscos de mutagênese e imunogenicidade fora do alvo
- Entrega ineficiente in vivo

Fonte: Imagem traduzida de "Delivery technologies for T cell gene editing: Applications in cancer immunotherapy" (2021). Vantagens (verde) e desvantagens (vermelho) do transposon (a) Bela Adormecida (SB), (b) ZFN, (c) TALEN e (d) CRISPR/Cas9 em sua especificidade e eficiência de edição, e capacidade de ser entregue às células T.

garantir a eficácia e a segurança do tratamento com células CAR-T. (ATSAVAPRANEE, BILLINGSLEY, MITCHELL, 2021) (Fig. 3).

Uma vez que os vírus vetores estão carregados com o gene CAR modificado, eles são introduzidos nas células T do paciente, esse processo, muitas vezes, se dá por vetores virais ou eletroporação. A transdução viral ocorre quando os vírus infectam as células T e liberam seu material genético modificado no interior da célula. Esse material genético então se integra no DNA das células T, permitindo que elas expressem o CAR em sua superfície, capacitando as células T a serem altamente direcionadas, prontas para identificar e destruir as células-alvo específicas (ZHANG, 2017).

A eletroporação é uma técnica que consiste na aplicação de campos elétricos pulsados direcionados às células causando uma comprometendo temporariamente a integridade da membrana celular, resultando na formação de canais na estrutura da membrana que proporcionam uma via para a entrada de proteínas projetadas nas células-alvo. (ATSAVAPRANEE, BILLINGSLEY, MITCHELL, 2021). Ao permitir que essas proteínas acessem o núcleo celular a expressão controlada de características desejadas é desencadeada. A eletroporação representa um método altamente eficaz e controlado para facilitar a introdução de informações genéticas específicas nas células. Este processo é de suma importância na imunoterapia com células CAR-T, pois possibilita a transmissão eficaz das sequências genéticas que codificam o CAR. Esta fase representa um passo importante, já que o CAR é a característica distintiva das células T terapêuticas, conferindo-lhes a capacidade de identificar e atacar seletivamente as células-alvo (ATSAVAPRANEE, BILLINGSLEY, MITCHELL, 2021).

3.1. TALENs e ZFNs

Na década de noventa, a descoberta das nucleases de dedo de zinco (ZFNs, do inglês *Zinc Finger Nucleases*), marcou um marco significativo no campo da edição genômica, estabelecendo as bases conceituais para o subsequente desenvolvimento nessa área de pesquisa. No entanto, a verdadeira concretização desse avanço ocorreu apenas em 2002, quando se registrou a criação do primeiro

organismo com genoma editado. Foi somente em 2010 que uma nova e revolucionária abordagem foi proposta, conhecida como TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*). Os TALENs são caracterizados por serem fusões entre efetores do tipo ativador de transcrição (TALE) e o domínio catalítico da endonuclease FokI, representando uma evolução significativa em relação às ZFNs e introduzindo uma nova era na edição genômica de alta precisão (BECKER, BOCH, 2021).

As TALENs assim como as ZFNs são tecnologias de edição genética que desempenham um papel importante na terapia com células CAR-T permitindo a edição precisa do genoma das células T para melhorar a eficácia e a especificidade da terapia (DANA, 2011). O papel dessas nucleases na terapia com células CAR-T é semelhante ao da CRISPR-Cas9, pois são tecnologias usadas para modificar os linfócitos T *ex vivo* antes de reintroduzi-los no paciente. No entanto, enquanto o CRISPR-Cas9 usa uma proteína chamada Cas9 associada a um guia de RNA, os TALENs usam proteínas de dedo de talen e os ZFNs utilizam proteínas de zinco que são projetadas para se ligarem às sequências específicas de DNA (OSBORN *et al*, 2016).

As ZFNs são proteínas projetadas com a finalidade de se ligarem a sequências específicas de DNA no genoma. Cada proteína de dedo de zinco é construída para reconhecer uma sequência de três a quatro nucleotídeos no DNA alvo, garantindo alta especificidade na edição genômica. A especificidade de sequência das ZFNs se dá pela região da proteína dedo de zinco que contém três a seis dedos Cys2-His2, cada um dos quais reconhece um código triplo de nucleotídeos. A criação das ZFNs envolve a fusão de proteínas com a enzima de restrição FokI, amplamente utilizada devido à sua capacidade de formar um dímero funcional para se tornar ativa. Duas proteínas dedo de zinco ligam-se a fitas opostas de DNA no espaço próximo, permitindo que a endonuclease FokI fundida forme um dímero funcional que cliva o DNA. Esse dímero proporciona maior especificidade na quebra do DNA que irá desencadear os mecanismos de reparo celular (ZHANG, ZHANG, YIN, 2019).

No contexto da engenharia genética de linfócitos T, TALENs são compostos por um domínio de ligação ao DNA, denominado TALE, e um domínio de nuclease

onde a proteína *Fok I* atua como endonuclease para cortar o DNA na posição desejada. Cada TALE confirma uma única base alvo do DNA, permitindo a montagem de um TALEN que pode se ligar a uma sequência de DNA longa e específica (JOUNG, SANDER, 2013). As TALENs ou ZFNs são frequentemente introduzidas às células-alvo por meio de técnicas de transdução viral ou eletroporação (TREEN *et al*, 2014).

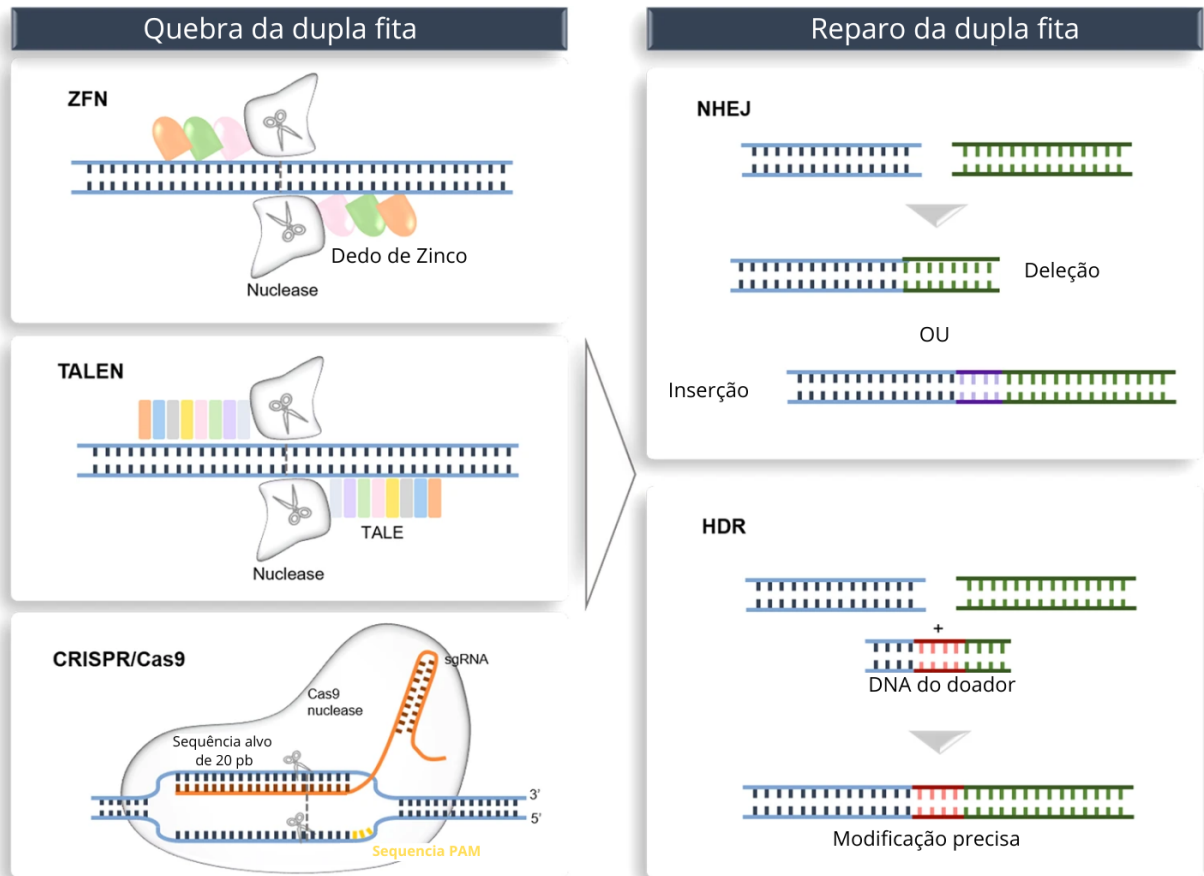
A tradução viral implica o uso de vetores virais geneticamente modificados que carregam TALENs ou ZFNs para o interior das células-alvo, fornecendo-lhes acesso ao DNA. Da mesma forma, a eletroporação envolve a aplicação de campos elétricos pulsados, o que perturba temporariamente a membrana celular e permite a entrada das proteínas projetadas nas células-alvo, permitindo o acesso ao ambiente nuclear (XIA *et al*, 2015; MIR, 2005; SEBASTIANO *et al*, 2011). Essas abordagens representam técnicas fundamentais para a engenharia genética direcionada, fornecendo uma plataforma viável para a realização de edições genéticas precisas e controladas.

Uma vez que as nucleases TALENs e ZFNs são inseridas nas células T, elas iniciam o reconhecimento das sequências de DNA alvo por meio de sua alta especificidade de ligação. Após o reconhecimento, as nucleases desencadeiam quebras no DNA nas regiões alvo identificadas. O sistema de reparo do DNA da célula é então ativado em resposta a essas quebras, resultando em NHEJ (Junção Final Não Homóloga), que frequentemente resulta em inserções ou deleções na sequência do DNA no local da quebra causando desativação de genes ou alteração de suas funções, ou HR (Recombinação Homóloga) que permite a substituição precisa da sequência de DNA, introduzindo uma sequência desejada no local da quebra (URNOV *et al*, 2010; LI *et al*, 2020) (Fig. 4).

O NHEJ é um sistema de reparo que liga as extremidades quebradas do DNA, geralmente sem a necessidade de uma sequência de DNA homóloga como modelo. O processo se inicia pela ligação de ambas as extremidades pelo heterodímero Ku70/80, que posteriormente atrai a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs) para a quebra da dupla fita de DNA, que

tem como finalidade a formação de um sináptico responsável por juntar as extremidades de DNA (WETERINGS, CHEN, 2008).

Figura 4 - Plataformas de edição de genoma e mecanismos para reparo de DSB com DNA endógeno



Fonte: Imagem traduzida de "Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects" (2020). Nucleases de edição de genoma (ZFNs, TALENs e CRISPR/Cas9) induzem DSBs em locais alvo. Os DSBs podem ser reparados pelo NHEJ ou, na presença do modelo do doador, pelo HDR. A interrupção do gene ao atingir o locus com NHEJ leva à formação de indels. Quando dois DSBs têm como alvo ambos os lados de uma amplificação ou inserção patogênica, uma deleção terapêutica das sequências intervenientes pode ser criada, levando à correção do gene NHEJ. Na presença de um modelo HDR corrigido pelo doador, a correção do gene HDR ou a adição de genes induz um DSB no locus desejado. Quebra de fita dupla DSB, nucleases de dedo de zinco ZFN, nucleases efetoras semelhantes ao ativador de transcrição TALEN, CRISPR/Cas9 agrupada regularmente interespçada com repetição palindrômica curta associada a 9 nucleases, junção final não homóloga NHEJ, reparo direcionado por homologia HDR.

O NHEJ une as extremidades do DNA danificadas podendo resultar em pequenas inserções ou deleções (*indels* do inglês *insertion-deletion*) na sequência

de DNA. Dependendo da natureza da edição pretendida, os *indels* podem, resultar em mutações ou inativação de um gene. É importante destacar que o NHEJ é um processo de reparo de DNA com alta eficiência, no entanto, a precisão na edição nem sempre é garantida, uma vez que os *indels* podem levar a mudanças imprevistas no genoma (WETERINGS, CHEN, 2008).

A HR é um mecanismo que permite a substituição precisa de uma sequência de DNA em um organismo por outra sequência desejada, introduzindo um local específico onde ocorreu uma quebra na molécula de DNA. Primeiramente, é essencial reconhecer o local no genoma onde se deseja realizar a substituição ou edição genética, o que envolve a identificação de uma sequência de DNA que seja homóloga à sequência desejada a ser subjacente. A cromátide irmã é usada como modelo homólogo nas fases S e G2, as sequências precisam ser compatíveis para que ocorra a troca genética. A via HR se inicia com a quebra na molécula de DNA pelo complexo MRN, em conjunto com a proteína CtIP e outras exonucleases, resultado em uma fita simples de DNA que possui a extremidade revestida pela proteína de replicação A (RPA) (BRANDSMA, VAN GENT 2012).

Em seguida, o BRCA2 facilita a substituição do RPA pelo RAD51, formando um filamento de nucleoproteína que busca a sequência homóloga na cromátide irmã. Usando a sequência íntegra como molde, a extremidade do DNA é estendida e após a restauração de qualquer informação de sequência perdida, as sequências homólogas se alinham e ocorre a troca de informações genéticas. A célula utiliza a sequência homóloga como um modelo para reparar a quebra no DNA, substituindo a sequência original pela sequência desejada. Esse processo resulta em uma substituição precisa da sequência de DNA no local de interesse. Após a HR, as células podem ser selecionadas e avaliadas para garantir que a edição genética tenha sido bem-sucedida. Isso envolve a verificação da inserção da sequência desejada e a eliminação de eventuais erros ou mutações indesejadas (BRANDSMA, VAN GENT, 2012).

Desta forma, o uso de TALENs e ZFNs representa uma abordagem precisa e direcionada para promoção de modificações genéticas específicas em células T,

com o objetivo de potencializar sua atividade imuno terapêutica e sua eficácia na identificação e combate de células neoplásicas.

3.2. CRISPR-Cas9

A técnica de edição de genes CRISPR-Cas9 utiliza uma enzima chamada Cas9, associada a um guia de RNA projetado para se ligar a uma sequência específica de DNA. Quando a Cas9 identifica a sequência alvo correspondente, é realizada uma clivagem no DNA, permitindo assim a possibilidade de inserção, remoção ou substituição de segmentos genéticos (DOUDNA, CHARPENTIER, 2014). Na terapia com células CAR-T, a técnica CRISPR-Cas9 é aplicada para modificar os linfócitos T para introduzir ou aprimorar os genes que codificam CARs, otimizando sua expressão e função, assegurando que os linfócitos T modificados tenham uma resposta mais direcionada e eficaz contra células malignas (STADTMAUER *et al.*, 2020).

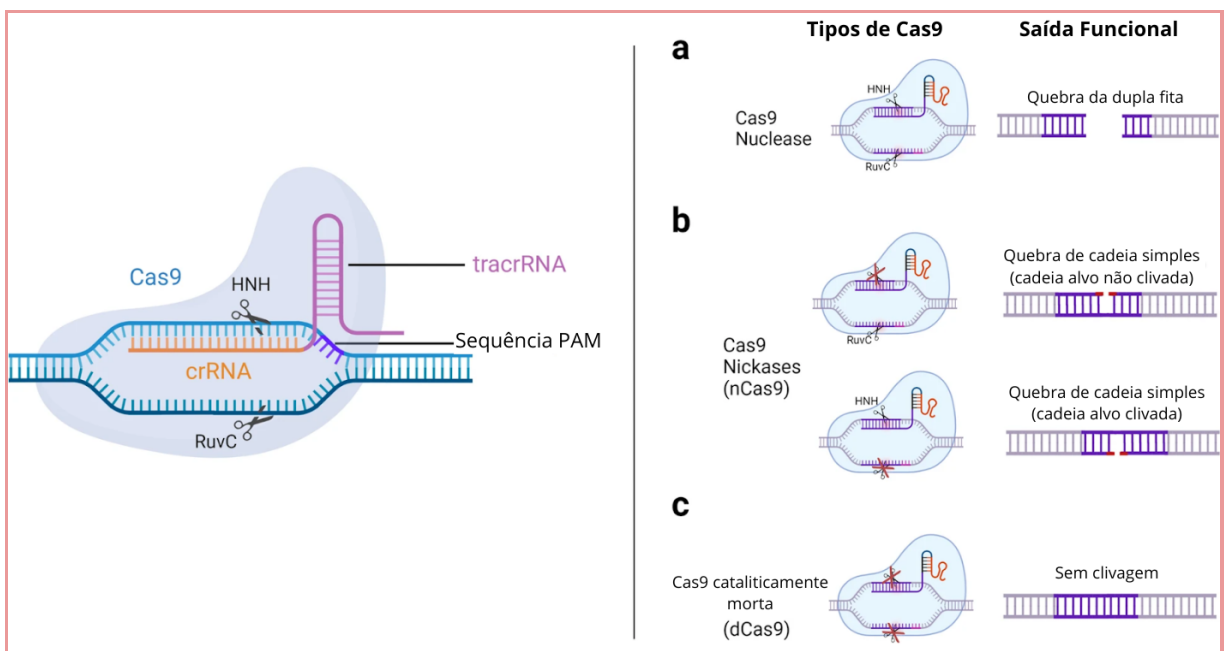
Naturalmente, CRISPR-Cas9 em uma bactéria atua como uma resposta imune adaptativa (TERNS, TERNS, 2011). Uma vez que o DNA de um vírus bacteriófago é inserido na bactéria, o complexo de proteínas Cas1 e Cas2 buscam uma porção precisa de nucleotídeos denominada PAM (do inglês *Protospacer Adjacent Motif*). Essa porção é então clivada em uma sessão de 20 a 26 bases e em seguida é inserido na extremidade 5' da fita de codificação da matriz CRISPR que posteriormente é transcrita pela RNA polimerase em uma molécula de RNA e processado em uma porção menor chamada crRNA (CRISPR RNA). Esse processamento é realizado por tracrRNA (RNA CRISPR Transativador) que age dando estrutura e, por possuir regiões complementares ao crRNA, adere-se ao mesmo (JINEK *et al.*, 2012).

CrRNA e tracrRNA são então clivados pela RNAase (RNA polimerase) resultando em um sgRNA (do inglês *Single RNA*) que é captada pela enzima endonuclease Cas9. O sgRNA é projetado para ser complementar a uma sequência de DNA específica que se deseja editar, ou seja, é possível escolher o gene-alvo a ser editado, sendo responsável por direcionar a Cas9 para o local exato do gene que

será alterado. Uma vez dentro da célula, a Cas9 é ativada pelo sgRNA e realiza quebra na dupla hélice do DNA na localização desejada (DIMITRI, HERBST, FRAIETTA, 2022).

Além disso, pode ser utilizada ainda uma versão inativa do Cas9 que se liga a um DNA específico, mas não o corta. Sendo possível também fundir uma proteína ativadora ao Cas9 inativado, o que força o gene anexado a ser mais ativo e transcrever mais RNA. Da mesma forma, pode-se anexar uma proteína inibitória, que desliga o gene alvo ou anexar uma proteína fluorescente a Cas9 inativada mais comumente chamada GFP (*Green Fluorescent Protein*) para que seja possível observar onde a proteína Cas9 está ligada (DIMITRI, HERBST, FRAIETTA, 2022) (Fig.5).

Figura 5 - Componentes CRISPR/Cas9 e variantes da classe de enzimas Cas9



Fonte: Imagem traduzida de "Engineering the next-generation of CAR T-cells with CRISPR-Cas9 gene editing" (2022). (Esquerda) **(A)** endonuclease Cas9 pode clivar um local específico dentro do DNA, conforme determinado pela complementaridade do crRNA sintético (crispr) com a fita de DNA alvo, juntamente com um grampo de tracrRNA (transativador) para fornecer estabilidade estrutural. O crRNA e o tracrRNA constituem um único complexo de RNA guia (sgRNA). Especificidade adicional é fornecida pelo motivo adjacente do protoespaçador (PAM) que direciona Cas9 para cortar 3 pares de bases a montante. **um** Cas9 corta o DNA através de seus domínios HNH e RuvC, cada um cortando uma única fita de DNA, resultando em uma quebra de fita dupla. **(B)** Mutações em um domínio ou em ambos os domínios restringem Cas9 a realizar cortes de fita simples (nCas9) ou **(C)** não possuir atividade catalítica (dCas9).

A técnica CRISPR-Cas9 tem sido mostrada como promissora na área de imunoterapia com células CAR-T. A capacidade de editar genes oferece oportunidades para aprimorar a eficácia dessa terapia. Primeiramente, um CRISPR-Cas9 pode ser usado para criar células CAR-T personalizadas, otimizadas para combater um tipo específico de câncer. Isso envolve a introdução de genes que direcionam as células para atacar as células neoplásicas de maneira mais eficaz. Além disso, a edição genética permite a desativação de genes que inibem a atividade de linfócitos T, tornando-os mais resistentes à supressão imunológica do microambiente tumoral. Desta forma, a técnica CRISPR-Cas9 permite a criação de células CAR-T mais eficientes e adaptadas a desafios específicos em cânceres sólidos (DIMITRI, HERBST, FRAIETTA, 2022).

Outra aplicação importante do CRISPR-Cas9 na imunoterapia com células CAR-T é a capacidade de evitar efeitos colaterais indesejados. O direcionamento preciso dos genes permite minimizar a possibilidade de ocorrências adversárias ou destruição de células saudáveis. Isso é particularmente relevante em cânceres sólidos, onde a toxicidade pode ser um problema significativo (MO, 2021).

Além disso, a tecnologia CRISPR-Cas9 pode ser usada para melhorar a segurança das terapias CAR-T, controlando a atividade das células modificadas. Isso pode ser alcançado por meio da inserção de interruptores genéticos que regulam a ativação das células CAR-T ou a introdução de sistemas de autorreparo para evitar efeitos fora do alvo. Essas abordagens têm o potencial de tornar a imunoterapia com células CAR-T mais segura e eficaz em uma ampla variedade de cânceres sólidos. O primeiro passo é identificar genes ou elementos reguladores que podem ser usados como "interruptores genéticos" (DIMITRI, HERBST, FRAIETTA, 2022).

Estes interruptores são genes que, quando ativados ou desativados, influenciam a atividade das células CAR-T e podem estar envolvidos em processos como ativação de células T, resposta imunológica ou produção de citocinas. Uma vez identificados os alvos, são projetados vetores CRISPR-Cas9 específicos que contêm sequências de guia de RNA direcionadas a genes-alvo. Esses vetores são

programados para serem entregues às células CAR-T que são coletadas do paciente e modificadas *in vitro*. Nesse processo, os interruptores genéticos são ativados, desativados ou ajustados de forma a controlar a atividade das células CAR-T. Após a edição genética, as células CAR-T são avaliadas para verificar se os interruptores genéticos foram modificados com sucesso e se a atividade está sob controle. Com os interruptores genéticos ajustados, as células CAR-T podem ser ativadas ou desativadas sob demanda, controlando sua atividade e diminuindo o risco de ativação inapropriada (DIMITRI, HERBST, FRAIETTA, 2022).

3.3. Transposons

Na década de 1930, a geneticista Barbara McClintock, que viria a se tornar uma das pioneiras na pesquisa sobre os transposons, iniciou suas investigações com plantas de milho e observou variações genéticas que não condiziam com os padrões de genética mendeliana. McClintock percebeu que os genes, ou sequências de DNA, eram capazes de se mover ao longo do genoma do milho, resultando em mutações e variações genéticas, revolucionando, desse modo, a compreensão da genética e abriu caminho para o estudo dos transposons e da instabilidade genômica (BIÉMONT, 2010).

Existem dois principais tipos de transposons: os transposons de DNA, elementos transponíveis que se movem diretamente no genoma, por meio de um processo chamado de transposição *cut-and-paste* e os retrotransposons, transposons que se movem por meio de um processo de transcrição reversa que são transcritos em RNA e, em seguida, reconvertidos em DNA por uma enzima chamada transcriptase reversa (MAGNANI *et al*, 2020).

A transposição, processo pelo qual um transposon se move de uma posição para outra no genoma geralmente é mediada pela proteína transposase e ocorre por meio de dois processos principais: “cortar e colar” e “copiar e colar”. No processo cortar e colar, a transposição corta o transposon de sua localização original e o insere em um novo local do genoma. No processo copiar e colar, o transposon é duplicado e uma cópia é inserida em um novo local, mantendo uma cópia no local

original (MAGNANI *et al*, 2020). A transposição é regular e se liga às extremidades diretas da transposição catalisando a quebra das ligações fosfodiéster no DNA, gerando quebras de dupla fita. As extremidades diretas do transposon são então ligadas às quebras de dupla fita, e o transposon é inserido em um novo local. A transposase “Bela Adormecida” (SB, do inglês *Sleeping Beauty*), foi concebida a partir de antigas sequências de transposon Tc1 / Mariner identificadas nos genomas de Salmonídeos, por meio de uma evolução controlada em laboratório. Seu nome, SB, é uma metáfora retirada do famoso conto de fadas dos irmãos Grimm, "A Bela Adormecida". A transposase SB representa um marco significativo, sendo o primeiro componente enzimático funcionalmente ativo capaz de catalisar o processo de transposição. Ela foi construída com base em sequências de elementos transposicionais previamente inativos isoladas de genomas de peixes, e é eficaz em uma ampla variedade de vertebrados, incluindo células humanas. (IVICS, *et al*, 1997).

Outro sistema de transposon notável é o PiggyBac, que teve origem nas décadas de 1980 a partir da mariposa *Trichoplusia ni*. Desde 2005, o PiggyBac tem sido empregado para a modificação genômica de células de mamíferos. Ao longo dos anos, tanto o sistema SB quanto o PiggyBac têm se destacado como alguns dos sistemas de transferência de genes não virais mais explorados, desempenhando um papel crucial em pesquisas de engenharia genética e terapias gênicas (WILSON, COATES, GEORGE, 2007).

SB é um sistema de transposição de DNA, que foi originalmente derivado de elementos transponíveis encontrados em peixes-dourados (peixes Zebra, do inglês *Zebrafish*) e adaptado para uso em pesquisas genéticas. SB se baseia no direcionamento do gene CAR em células T. No entanto, não é a técnica de transposição mais comumente usada em pesquisas de células CAR-T. O PiggyBac tem sido utilizado em pesquisas de engenharia genética que utiliza um transposon para mover sequências de DNA tendo estrutura e mecanismo de ação distintos em comparação com o Sleeping Beauty, podendo ser usado para inserir genes, incluindo o CAR, em células T. Os sistemas de transposição SB e PiggyBac são compostos por duas principais regiões, sendo as sequências semelhantes às que flanqueiam o transposon chamadas Repetições Terminais Invertidas (ITRs do inglês

Inverted Terminal Repeats), onde ocorre a transposição, e um gene codificador da enzima transposase, uma enzima especializada que catalisa o processo de "corte e cola" da transposição, responsável pela mobilidade do transposon que reconhece os terminais repetidos e facilita o corte e a inserção do transposon (MAGNANI *et al*, 2020).

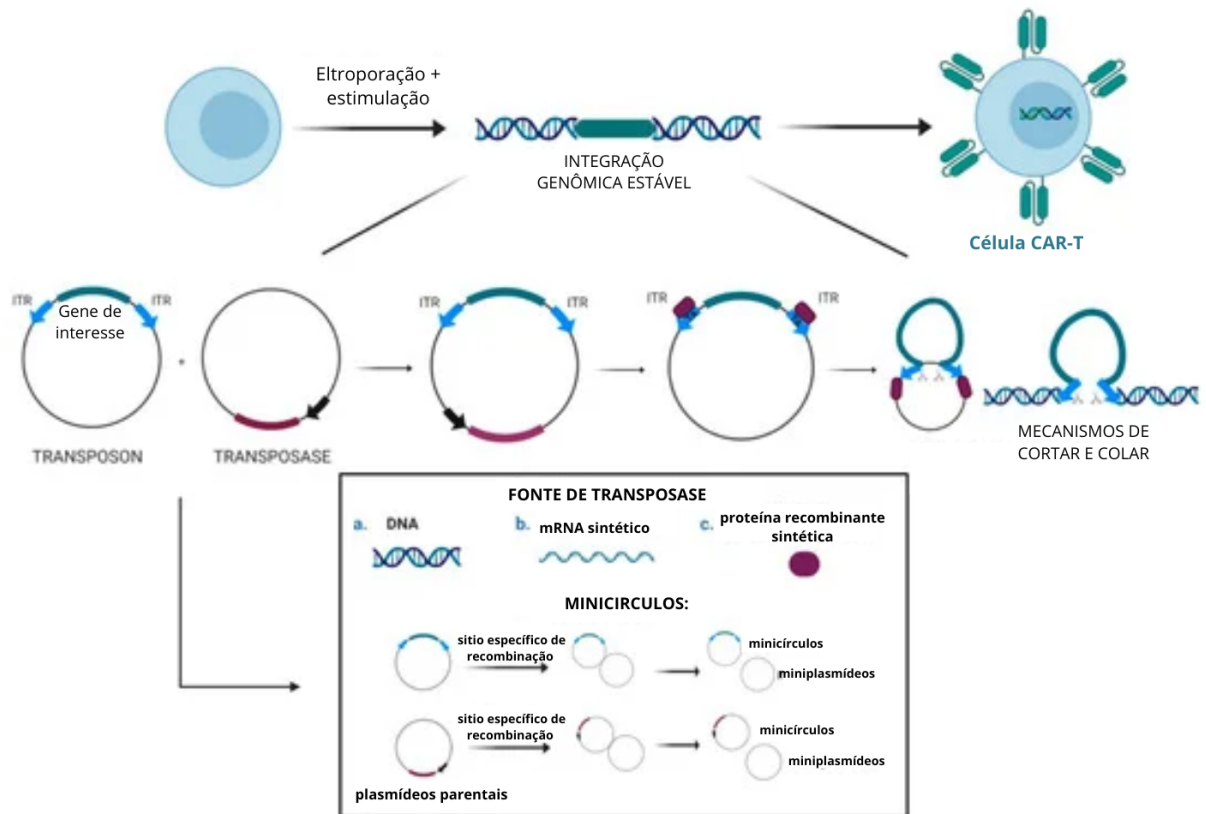
A atuação da transposase envolve a identificação específica e subsequente ligação da transposase às ITRs, localizadas nas extremidades do transposon, estabelecendo uma interação seletiva e determinante. Uma vez que a transposase foi designada aos ITRs, uma sequência de reações enzimáticas é iniciada de forma coordenada. Isso inclui a ativação dos domínios catalíticos da enzima, que desempenham sua função no processo de mobilização do transposon acarretando em um corte preciso nas ITRs, que efetua a separação do transposon do DNA plasmídico permitindo a liberação do transposon de sua matriz plasmídica. Isso leva a transição do transposon de seu estado prévio, onde estava inserido no plasmídeo, para sua nova condição, onde está apto para ser transportado e integrado no genoma do hospedeiro (DYDA, CHANDLER, HICKMAN, 2012).

Como resultado do processo de transposição, o gene de interesse transportado pelo transposon é inserido no genoma do hospedeiro, permitindo sua expressão e funcionamento dentro das células. A inserção de um transposon em uma nova região do genoma pode causar diversos efeitos, como: interromper a função de um gene; criar novos locais de regulação; ou até mesmo promover rearranjos cromossômicos. A mobilidade dos transposons é uma fonte significativa de variação genética dentro de uma população e é um mecanismo importante na evolução (DYDA, CHANDLER, HICKMAN, 2012) (Fig 6).

Desse modo, os transposons são elementos genéticos móveis que desempenham um papel crucial na evolução e diversificação genética. Sua mobilidade controlada e regulação são fundamentais para manter a estabilidade genômica de um organismo. Além disso, sua capacidade de alterar o genoma se torna uma ferramenta importante em pesquisas e aplicações em biotecnologia. No entanto, é importante notar que a utilização de transposons em terapia gênica e terapias celulares ainda está em fase de pesquisa e desenvolvimento, e questões de

segurança, precisão e regulamentação precisam ser cuidadosamente abordadas antes de sua ampla implementação em aplicações clínicas.

Figura 6 - Sistema transposon da Bela Adormecida para engenharia de células CAR-T



Fonte: Imagem traduzida de "Transposon-based CAR T cells in acute leukemias: where are we going?" (2020). Sistemas de entrega de genes baseados em transposon de DNA de dois componentes: plasmídeo transposon transportando o gene de interesse flanqueado pelos ITRs e plasmídeo de expressão de transposase; mecanismo de transposição 'recortar e colar' da Bela Adormecida para uma integração genômica estável do CAR; diferentes fontes de transposases atualmente disponíveis: DNA plasmidial, mRNA sintético e proteína recombinante sintética; recombinação de plasmídeos parentais em minicírculos e miniplasmídeos. ITR, repetição terminal invertida. Criado com Biorender.com

3.4. SynNotch

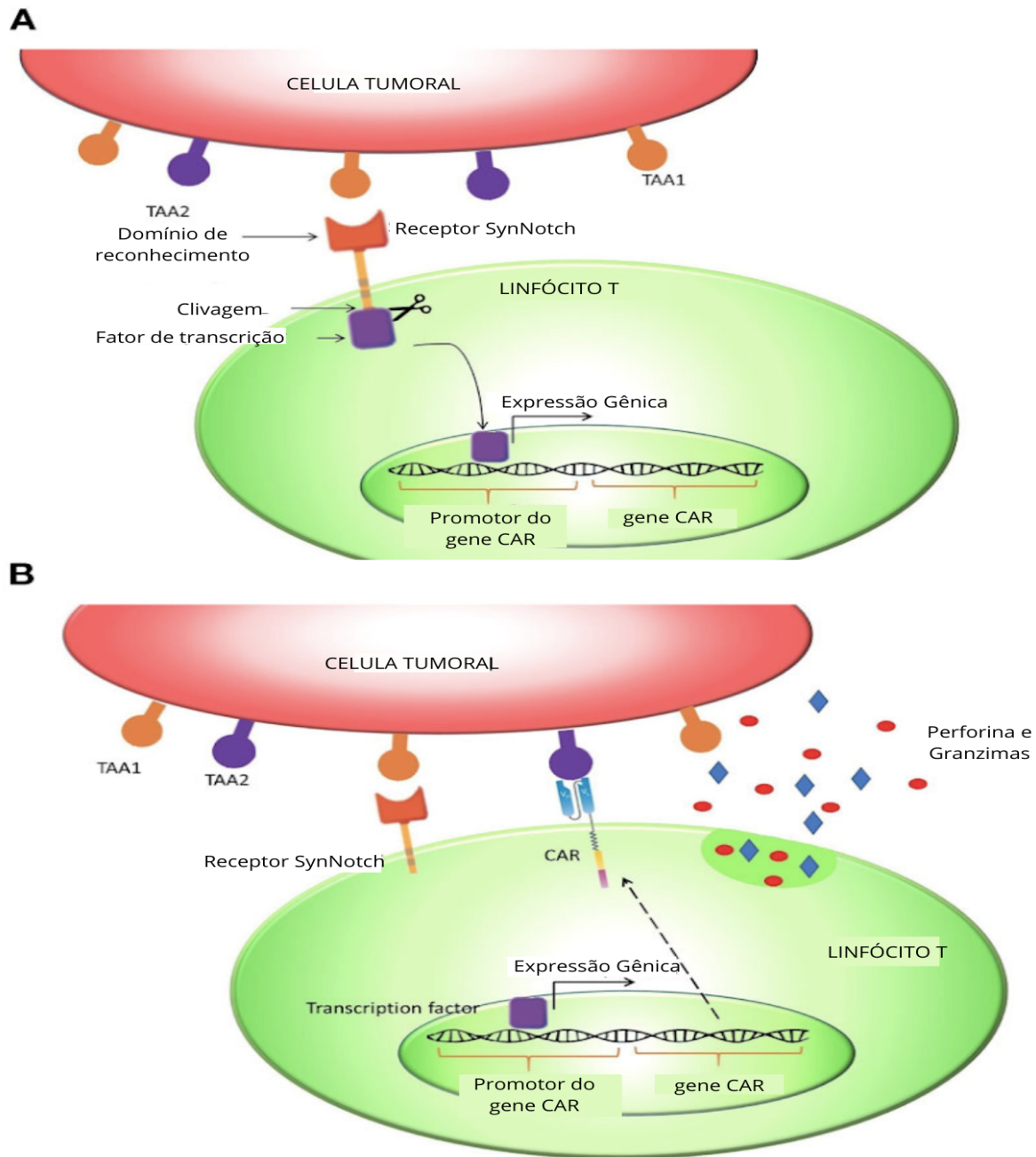
A técnica SynNotch (do inglês *Synthetic Notch*) é uma estratégia avançada de engenharia genética que desempenha um papel inovador e promissor na terapia de células CAR-T. O sistema SynNotch tem como objetivo aprimorar a capacidade das

células CAR-T em reconhecer e reagir de forma altamente específica a células-alvo. No contexto do SynNotch, o desenvolvimento de uma versão sintética desse sistema, permite a programação das células CAR-T para reconhecer não apenas um único antígeno, mas múltiplos alvos ou até mesmo sequências complexas de antígenos. Conferindo, assim, respostas mais precisas e flexíveis, tornando as células CAR-T SynNotch particularmente eficazes na identificação e eliminação de uma variedade de células-alvo, incluindo aquelas que exibem heterogeneidade antigênica (ROYBAL,2016).

O sistema SynNotch envolve a criação de um receptor sintético denominado receptor SynNotch que é constituído com base em sequências sintéticas de DNA e projetado para refletir uma antígeno específico nas células cancerosas, podendo ser diferente do antígeno primário identificado pelo receptor CAR-T, permitindo uma maior especificidade na identificação das células-alvo. O desenvolvimento da tecnologia SynNotch se deu através da busca por maneiras de projetar sistemas de regulação gênica sintética para controlar a expressão de genes específicos em resposta a estímulos externos. Este sistema se baseia na imitação de um mecanismo biológico existente, o "Notch", que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento celular e na comunicação entre células (MORSUT *et al*, 2016).

O "Notch" é um sistema de comunicação celular complexo e conservado, fundamental para o desenvolvimento e a regulação de várias funções biológicas em organismos multicelulares. Este mecanismo biológico é composto por proteínas de membrana chamadas receptores Notch e seus ligantes, que são proteínas encontradas na superfície de células vizinhas. A função principal do sistema Notch é a transmissão de sinais entre células adjacentes, permitindo uma comunicação direta e precisa. Quando duas células estão em proximidade física, o receptor Notch de uma célula pode interagir com o ligante presente na membrana da célula vizinha. Esse processo desencadeia uma série de eventos intracelulares que resultam na ativação de genes-alvo específicos que determinam o destino celular, a proliferação, a diferenciação e a apoptose em diferentes contextos de desenvolvimento e homeostase (KHANALI *et al*, 2021) (Fig. 7).

Figura 7 - Células T CAR do receptor SynNotch



Fonte: Imagem traduzida de "AK/STAT-dependent chimeric antigen receptor (CAR) expression: a design benefiting from a dual AND/OR gate aiming to increase specificity, reduce tumor escape and affect tumor microenvironment." (2021). Os receptores SynNotch são projetados para seguir a lógica AND para mitigar a toxicidade no alvo fora do tumor. (A) Esses receptores liberam um fator de transcrição quimérico sintético (GAL4-VP64) após o reconhecer o antígeno 1 associado ao tumor (TAA1). (B) O fator de transcrição liga-se ao promotor responsivo a GAL4 e induz a expressão de CAR contra TAA2.

O receptor SynNotch é composto por duas partes principais: o domínio extracelular, responsável por reconhecer o antígeno, e o domínio intracelular, que

desencadeia uma resposta nas células T. O gene que codifica o receptor SynNotch é introduzido nas células CAR-T, que passam a expressar o receptor em sua superfície, através do uso de vetores virais modificados. Como resultado, as células T CAR-T passam a expressar o receptor SynNotch na sua superfície (ROYBAL,2016).

Quando o receptor SynNotch se liga ao seu antígeno-alvo, o domínio extracelular do receptor reconhece o antígeno levando a ativação da expressão de receptores CAR-T específicos para esse antígeno, iniciando assim o processo de sinalização intracelular, levando ativação de genes que estimulam o direcionamento da resposta imunológica das células T apenas para as células que expressam o antígeno desejado. As células CAR-T ativadas direcionam sua resposta imunológica contra as células neoplásicas, liberando citocinas inflamatórias e destruindo as células malignas. O processo de ativação das células CAR-T e a subsequente eliminação das células tumorais podem levar à proliferação destas células amplificando a resposta imunológica contra o câncer (MIAO, 2022).

Uma das principais vantagens da técnica SynNotch é a capacidade de projetar receptores SynNotch para diferentes alvos, o que torna as células CAR-T altamente adaptáveis a uma variedade de tipos de neoplasia. Isso permite uma abordagem mais personalizada no tratamento, já que diferentes tipos de neoplasia podem expressar diferentes antígenos. A técnica SynNotch pode ajudar a minimizar a probabilidade de ataque às células, uma vez que a ativação das células CAR-T ocorre apenas quando o receptor SynNotch confirma o antígeno-alvo em células tumorais (KHANALI *et al*, 2021).

4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A imunoterapia com células CAR-T demonstrou eficácia e resultados promissores no tratamento de vários tipos de câncer, promovendo respostas imunes direcionadas contra células tumorais. No entanto, a melhoria da eficácia, segurança e controle dessas terapias ainda é um processo que ainda está em

desenvolvimento. Além disso, atualmente, a imunoterapia com células CAR-T é um tratamento personalizado, requerendo um processo de fabricação sob medida para cada paciente. A aplicação das ferramentas de biologia sintética oferece a capacidade de aprimorar as CAR-T, possibilitando uma adaptação mais precisa e personalizada no tratamento de neoplasias.

A junção da imunoterapia com células CAR-T e as inovações na biologia sintética, incluindo CRISPR-Cas9, TALENs, ZFNs e transposons, representa um promissor aperfeiçoamento no tratamento do câncer. Até agora, a imunoterapia com células CAR-T demonstrou grande efetividade em tipos de câncer hematológicos, como a leucemia linfoblástica aguda e o linfoma difuso de células B. No entanto, está sendo ativamente explorada sua aplicação em cânceres sólidos. Superar os desafios específicos associados a esses tipos de câncer sólidos, como a barreira tumoral e a diversidade genética, é fundamental para o sucesso da terapia CAR-T nesses contextos.

Outra perspectiva é a busca por abordagens mais seguras e personalizadas como a criação de células CAR-T que possam ser reguladas com maior precisão, permitindo a ativação e desativação sob demanda concedendo a capacidade de minimizar efeitos colaterais indesejados e ajustar a terapia de acordo com a resposta do paciente. O futuro da imunoterapia com células CAR-T é repleto de possibilidades para transformar o tratamento do câncer e proporcionar abordagens cada vez mais personalizadas e eficazes.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª Edição. Elsevier, 2015
- ALBINGER, Nawid; HARTMANN, Jessica; ULLRICH, Evelyn. Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany. **Gene therapy**, v. 28, n. 9, p. 513-527, 2021.
- AMINI, Leila *et al.* Preparing for CAR T cell therapy: patient selection, bridging therapies and lymphodepletion. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 19, n. 5, p. 342-355, 2022.
- ATSAVAPRANEE, Ella S.; BILLINGSLEY, Margaret M.; MITCHELL, Michael J. Delivery technologies for T cell gene editing: Applications in cancer immunotherapy. **EBioMedicine**, v. 67, 2021.
- BECKER, Sebastian; BOCH, Jens. TALE and TALEN genome editing technologies. **Gene and Genome Editing**, v. 2, p. 100007, 2021. BENNER, Steven A.; SISMOUR, A. Michael. Synthetic biology. **Nature reviews genetics**, v. 6, n. 7, p. 533-543, 2005.
- BIÉMONT, Christian. A brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution. **Genetics**, v. 186, n. 4, p. 1085-1093, 2010.
- BONIFANT, Challice L. *et al.* Toxicity and management in CAR T-cell therapy. **Molecular Therapy-Oncolytics**, v. 3, 2016.
- BRAENDSTRUP, Peter; LEVINE, Bruce L.; RUELLA, Marco. O longo caminho para a primeira terapia genética aprovada pela FDA: células T receptoras de antígenos quiméricos direcionadas ao CD19. **Citoterapia**, v. 22, n. 2, pág. 57-69, 2020.
- BRANDSMA, Inger; VAN GENT, Dik C. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. **Genome integrity**, v. 3, p. 1-10, 2012.
- CARROLL, Dana. Genome engineering with zinc-finger nucleases. **Genetics**, v. 188, n. 4, p. 773-782, 2011.

CHEN, Daniel S., MELLMAN, Ira, **Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle**. *Immunity* 39, July, 2013.

COLEY, William B. II. Contribution to the knowledge of sarcoma. **Annals of surgery**, v. 14, n. 3, p. 199, 1891.

D'ALOIA, Maria Michela et al. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. **Cell death & disease**, v. 9, n. 3, p. 282, 2018.

DIMITRI, Alexander; HERBST, Friederike; FRAIETTA, Joseph A. Engineering the next-generation of CAR T-cells with CRISPR-Cas9 gene editing. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, p. 78, 2022.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 2014.

DYDA, Fred; CHANDLER, Michael; HICKMAN, Alison Burgess. The emerging diversity of transpososome architectures. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 45, n. 4, p. 493-521, 2012.

ENO, Jessica. Immunotherapy through the years. **Journal of the advanced practitioner in oncology**, v. 8, n. 7, p. 747, 2017.

ESENSTEN, Jonathan H.; BLUESTONE, Jeffrey A.; LIM, Wendell A. Engineering therapeutic T cells: from synthetic biology to clinical trials. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 12, p. 305-330, 2017.

GIDEON Gross, TOVA Waks, ZELIG Eshhar, Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Vol. 86, 10024-10028, December, 1989. *Immunology*.

GRUPP, Stephan A. et al. Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 16, p. 1509-1518, 2013.

GUST, Juliane et al. Endothelial activation and blood–brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells. **Cancer discovery**, v. 7, n. 12, p. 1404-1419, 2017.

HAAS, Andrew R. et al. Phase I study of lentiviral-transduced chimeric antigen receptor-modified T cells recognizing mesothelin in advanced solid cancers. **Molecular Therapy**, v. 27, n. 11, p. 1919-1929, 2019.

IVICS, Zoltán et al. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 501-510, 1997.

JINEK, Martin et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.

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

KAUFMANN, Stefan HE. Emil von Behring: translational medicine at the dawn of immunology. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 6, p. 341-343, 2017.

KHANALI, Javad et al. JAK/STAT-dependent chimeric antigen receptor (CAR) expression: a design benefiting from a dual AND/OR gate aiming to increase specificity, reduce tumor escape and affect tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 638639, 2021.

LEE, Daniel W. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 124, n. 2, p. 188-195, 2014.

LI, Hongyi et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1, 2020.

LOMBARD, Michel; PASTORET, Paul-Pierre; MOULIN, A. M. A brief history of vaccines and vaccination. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 26, n. 1, p. 29-48, 2007.

MAGNANI, Chiara F. et al. Transposon-based CAR T cells in acute leukemias: where are we going?. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1337, 2020.

MAROFI, Farooq et al. CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. **Stem cell research & therapy**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2021.

MELLMAN, Ira; COUKOS, George; DRANOFF, Glenn. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480-489, 2011.

MIAO, Lele et al. Special chimeric antigen receptor (CAR) modifications of T cells: a review. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 832765, 2022.

MITCHISON, N. A. Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse: I. The role of lymph node cells in conferring immunity by adoptive transfer. **The Journal of experimental medicine**, v. 102, n. 2, p. 157-177, 1955.

MO, Fengzhen et al. Células T receptoras de antígeno quimérico baseadas em nanocorpos projetadas pela tecnologia CRISPR/Cas9 para imunoterapia de tumores sólidos. **Transdução de sinal e terapia direcionada**, v. 6, n. 1, pág. 80, 2021.

MOÇO, Pablo D.; AHARONY, Noga; KAMEN, Amine. Adeno-Associated Viral Vectors for Homology-Directed Generation of CAR-T Cells. **Biotechnology Journal**, v. 15, n. 1, p. 1900286, 2020.

MORSUT, Leonardo et al. Engineering customized cell sensing and response behaviors using synthetic notch receptors. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 780-791, 2016.

NEELAPU, Sattva S. et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy—assessment and management of toxicities. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 15, n. 1, p. 47-62, 2018.

OSBORN, Mark J. et al. Evaluation of TCR gene editing achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL nucleases. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 3, p. 570-581, 2016.

PARDOLL, Drew M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature reviews cancer**, v. 12, n. 4, p. 252-264, 2012.

REDMAN, Bruce G.; CHANG, Alfred E. Tumor immunology. **ACP Medicine**, v. 206, n. 47, p. 137-151, 2011.

RIBATTI, Domenico. The discovery of plasma cells: an historical note. **Immunology letters**, v. 188, p. 64-67, 2017.

RILEY, Rachel S. et al. Delivery technologies for cancer immunotherapy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 18, n. 3, p. 175-196, 2019.

ROYBAL, Kole T. et al. Engineering T cells with customized therapeutic response programs using synthetic notch receptors. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 419-432. e16, 2016.

SEBASTIANO, Vittorio et al. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. **Stem cells**, v. 29, n. 11, p. 1717-1726, 2011.

SHEARER, Robert F.; SAUNDERS, Darren N. Experimental design for stable genetic manipulation in mammalian cell lines: lentivirus and alternatives. **Genes to Cells**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2015.

STADTMAUER, Edward A. et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. **Science**, v. 367, n. 6481, p. eaba7365, 2020.

SUERTH, Julia D.; SCHAMBACH, Axel; BAUM, Christopher. Genetic modification of lymphocytes by retrovirus-based vectors. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 5, p. 598-608, 2012.

TEACHEY, David T. et al. Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Cancer discovery**, v. 6, n. 6, p. 664-679, 2016.

TERNS, Michael P.; TERNS, Rebecca M. CRISPR-based adaptive immune systems. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 3, p. 321-327, 2011.

THORSSON, Vésteinn *et al.* **The Immune Landscape of Cancer**. *Immunity* 48, 812-830, April, 2018. Published by Elsevier Inc.

TREEN, Nicholas et al. Tissue-specific and ubiquitous gene knockouts by TALEN electroporation provide new approaches to investigating gene function in Ciona. **Development**, v. 141, n. 2, p. 481-487, 2014.

URNOV, Fyodor D. et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 9, p. 636-646, 2010.

WARD, David M. Conventional apheresis therapies: a review. **Journal of clinical apheresis**, v. 26, n. 5, p. 230-238, 2011.

WETERINGS, Eric; CHEN, David J. The endless tale of non-homologous end-joining. **Cell research**, v. 18, n. 1, p. 114-124, 2008.

WILSON, Matthew H.; COATES, Craig J.; GEORGE, Alfred L. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. **Molecular therapy**, v. 15, n. 1, p. 139-145, 2007.

XIA, Emily et al. TALEN-mediated gene targeting for cystic fibrosis-gene therapy. **Genes**, v. 10, n. 1, p. 39, 2019.

ZHANG, Cheng *et al.* Engineering car-t cells. **Biomarker research**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2017.

ZHANG, Cuilin et al. Synthetic biology in chimeric antigen receptor T (CAR T) cell engineering. **ACS Synthetic Biology**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2022.

ZHANG, Hong-Xia; ZHANG, Ying; YIN, Hao. Genome editing with mRNA encoding ZFN, TALEN, and Cas9. **Molecular Therapy**, v. 27, n. 4, p. 735-746, 2019.

ZHENG, Ping-Pin; KROS, Johan M.; LI, Jin. Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. **Drug discovery today**, v. 23, n. 6, p. 1175-1182, 2018.