



EDIÇÃO GENÔMICA: UMA NOVA ESPERANÇA NO TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME?

GENOMIC EDITING: NEW HOPE IN THE TREATMENT OF SICKLE CELL DISEASE?

EDICIÓN GENÓMICA: ¿NUEVA ESPERANZA EN EL TRATAMIENTO DE LA DREPANOCITOSIS?

Thalia Galvão Cardozo¹, Ana Júlia Ribeiro da Silva¹, Juliana Silva Alves², Mirela Aparecida Oliveira¹, Maria Eugênia Giraldi Solano¹

e565328

<https://doi.org/10.47820/recima21.v5i6.5328>

PUBLICADO: 06/2024

RESUMO

A doença falciforme (DF) é um grupo de hemoglobinopatias hereditárias caracterizadas por mutações que afetam a cadeia β -globina da hemoglobina. Objetivo: agrupar o que já há na literatura sobre o uso do sistema CRISPR-Cas9 no tratamento da doença falciforme. Materiais e métodos: Trata-se de uma revisão integrativa, em que a questão norteadora foi “O sistema CRISPR-Cas9 é capaz de tratar a doença falciforme?”. A busca pelos artigos ocorreu no PubMed a partir dos termos “CRISPR-cas9”, “sickle cell”, “anemia” combinados entre si por operadores booleanos. Resultados e discussão: A correção da doença que causa a mutação falciforme usando edição genética representa a abordagem terapêutica mais direta. O complexo CRISPR gRNA/Cas9 ribonucleoproteína pré-complexada direcionado a β -globina junto com o modelo de doador de DNA são entregues em células-tronco hematopoiéticas e progenitoras autólogas isolados de pacientes com anemia falciforme, resultando na correção mediada por reparo direcionado por homologia da mutação causadora. A modificação genética mediada por CRISPR-Cas9 demonstrou eficiência variável, especificidade e persistência em células-tronco hematopoiéticas. Conclusão: A descoberta recente do CRISPR/Cas9 não apenas revolucionou a engenharia do genoma, mas também trouxe a possibilidade de traduzir esses conceitos em uma realidade clinicamente significativa.

PALAVRAS-CHAVE: Anemia. Falcização. Edição.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a group of hereditary hemoglobinopathies characterized by mutations that affect the β -globin chain of hemoglobin. Objective: to group what already exists in the literature on the use of the CRISPR-Cas9 system in the treatment of sickle cell disease. Materials and methods: This is an integrative review, in which the guiding question was “Is the CRISPR-Cas9 system capable of treating sickle cell disease?”. The search for articles was carried out in PubMed using the terms “CRISPR-cas9”, “sickle cell”, “anemia” combined with Boolean operators. Results and Discussion: Correction of the disease causing the sickle cell mutation using gene editing represents the most direct therapeutic approach. The β -globin-targeted pre-complexed CRISPR gRNA/Cas9 ribonucleoprotein complex along with the DNA donor template are delivered into hematopoietic stem cells and autologous progenitors isolated from patients with sickle cell disease, resulting in repair mediated by homology-directed repair of the causative mutation. CRISPR-Cas9-mediated genetic modification has demonstrated variable efficiency, specificity, and persistence in hematopoietic stem cells. Conclusion: The recent discovery of CRISPR/Cas9 not only revolutionized genome engineering, but also brought the possibility of translating these concepts into a clinically meaningful reality.

KEYWORDS: Anemia. Sickling. Edition.

RESUMEN

La anemia falciforme (SCD) es un grupo de hemoglobinopatías hereditarias caracterizadas por mutaciones que afectan la cadena β -globina de la hemoglobina. Objetivo: agrupar lo ya existente en la literatura sobre el uso del sistema CRISPR-Cas9 en el tratamiento de la anemia falciforme. Materiales y métodos: Se trata de una revisión integradora, en la que la pregunta orientadora fue “¿Es

¹ Universidade Professor Edson Antônio Velano - UNIFENAS.

² Universidade Anhembi Morumbi - SJC.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EDIÇÃO GENÔMICA: UMA NOVA ESPERANÇA NO TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME?
Thalia Galvão Cardozo, Ana Júlia Ribeiro da Silva, Juliana Silva Alves, Mirela Aparecida Oliveira, Maria Eugênia Giraldi Solano

el sistema CRISPR-Cas9 capaz de tratar la anemia falciforme?”. La búsqueda de artículos se realizó en PubMed utilizando los términos “CRISPR-cas9”, “sickle cell”, “anemia” combinados con operadores booleanos. Resultados y discusión: La corrección de la enfermedad que causa la mutación de células falciformes mediante la edición de genes representa el enfoque terapéutico más directo. El complejo CRISPR gRNA/ribonucleoproteína Cas9 precomplejado que se dirige a la β -globina junto con la plantilla del donante de ADN se administran en células madre hematopoyéticas y progenitoras autólogas aisladas de pacientes con anemia falciforme, lo que da como resultado una corrección de la mutación causante mediada por reparación dirigida por homología. . La modificación genética mediada por CRISPR-Cas9 ha demostrado eficiencia, especificidad y persistencia variables en células madre hematopoyéticas. Conclusión: El reciente descubrimiento de CRISPR/Cas9 no sólo ha revolucionado la ingeniería genómica, sino que también ha brindado la posibilidad de traducir estos conceptos en una realidad clínicamente significativa.

PALABRAS CLAVE: Anemia. Hoz. Edición.

INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é um grupo de hemoglobinopatias hereditárias caracterizadas por mutações que afetam a cadeia β -globina da hemoglobina (Brandow; Liem, 2022). A fisiopatologia está diretamente relacionada à polimerização da hemoglobina desoxigenada, levando a uma cascata de eventos patológicos, incluindo falcização de eritrócitos, vaso-oclusão, isquemia tecidual e lesão de reperfusão, bem como hemólise, ativação anormal de vias inflamatórias e oxidativas, disfunção endotelial, aumento da atividade oxidativa estresse, e ativação das vias de coagulação (Neumayr; Hoppe; Brown, 2019). A DF é caracterizada por anemia hemolítica crônica, dor aguda e crônica grave, bem como danos aos órgãos-alvo que ocorrem ao longo da vida (Brandow; Liem, 2022).

A triagem neonatal, a imunização precoce e o tratamento profilático com penicilina em bebês e crianças, assim como o manejo abrangente da dor e das complicações da doença melhoraram os resultados dos pacientes; no entanto, a expectativa média de vida de um paciente com doença falciforme permanece apenas cerca de 40 a 50 anos (Payne *et al.*, 2017). Estima-se que o impacto da DF na qualidade de vida (QV) do paciente seja maior do que o da fibrose cística e semelhante ao de pacientes em hemodiálise, que é amplamente reconhecido como tendo um impacto severo na QV (Osunkwo *et al.*, 2021).

Durante os últimos anos, houve um aumento dramático na pesquisa de tratamentos que abordam elementos distintos da fisiopatologia da doença falciforme e até mesmo novas abordagens curativas que fornecem nova esperança a pacientes e médicos para uma doença clinicamente importante que há muito é negligenciada. Atualmente estão sob investigação novas terapias genéticas que oferecem uma esperança considerável para uma terapia curativa de aplicação mais ampla (Neumayr; Hoppe; Brown, 2019).

A correção específica do local do gene mutado que causa uma doença monogênica em células-tronco hematopoiéticas e progenitoras autólogas tem o potencial de ser usada como tratamento para distúrbios hereditários das células sanguíneas, como hemoglobinopatias e imunodeficiências primárias. As endonucleases direcionadas podem ser usadas para induzir uma



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EDIÇÃO GENÔMICA: UMA NOVA ESPERANÇA NO TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME?
Thalia Galvão Cardozo, Ana Júlia Ribeiro da Silva, Juliana Silva Alves, Mirela Aparecida Oliveira, Maria Eugênia Giraldi Solano

quebra de fita dupla próxima à mutação, e um modelo de doador de ácido desoxirribonucleico (DNA) homólogo exógeno possuindo a sequência corretiva pode ser utilizado pelas células alvo para reparar a fita dupla por reparo dirigido por homologia; se essa fita dupla for fixado pela via de junção de extremidade não homóloga propensa a erros, inserções ou deleções (indels) podem ser introduzidas para interromper o gene (Romero *et. al.*, 2019).

O reaproveitamento de sistemas “CRISPR” (Sistema de Sequência de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Interespaçada) bacterianos para facilitar a clivagem de DNA complementar guiada por RNA revolucionou o campo da edição de genes em células de mamíferos. *S. pyogenes* Cas9 tem sido o sistema CRISPR mais usado e seu uso para edição do genoma requer apenas a presença da nuclease Cas9 e um RNA guia (gRNA). A edição do genoma Cas9 de células-tronco hematopoiéticas e progenitoras autólogos tem o poder de ser uma terapia mais segura e eficaz para uma grande quantidade de doenças genéticas. Estudos recentes mostraram que os erros genéticos causadores de doenças podem ser corrigidos usando CRISPR/Cas9 em células-tronco hematopoiéticas e progenitoras de enxerto de longo prazo que são preservados em linhagens efectoras a jusante (Dagdas *et. al.*, 2017).

O objetivo deste estudo é agrupar o que já há na literatura sobre o uso do sistema CRISPR-Cas9 no tratamento da doença falciforme.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo trata-se de uma revisão integrativa da literatura relacionada ao uso do sistema CRISPR-cas9 no tratamento da doença falciforme. Uma revisão integrativa sintetiza e avalia o conhecimento atual de um tópico para fornecer novos insights sobre ele. Uma revisão integrativa permite a síntese do conhecimento de várias abordagens de pesquisa em um campo fragmentado. As revisões integrativas são um veículo único para sintetizar o conhecimento existente (Cronin; George, 2020).

A revisão integrativa tem seis fases distintas, que foram seguidas na ordem. Primeiro, identificamos o tema e elaboramos a questão norteadora, em seguida, estabelecemos os critérios de inclusão e exclusão, após isso, definimos as informações a serem extraídas dos estudos selecionados, depois avaliamos os estudos incluídos na revisão, interpretamos os resultados e por último apresentamos a síntese de conhecimento (De Sousa *et. al.*, 2017).

O tema definido já foi exposto anteriormente. A pergunta norteadora definida foi: “O sistema CRISPR-Cas9 é capaz de tratar a doença falciforme?”. Com a finalidade de responder esta questão, a coleta de dados ocorreu no mês de janeiro de 2023, por dois juízes independentes, na base de dados: PubMed. Para a busca dos artigos utilizaram-se os termos “CRISPR-cas9”, “*sickle cell*”, “anemia” combinados entre si por operadores booleanos.

Como critérios de inclusão para o estudo delimitaram-se apenas artigos publicados entre os anos de 2018 e 2023, com estudos que respondam à questão norteadora, textos disponíveis na íntegra nos idiomas português, inglês e espanhol. Para critérios de exclusão definiram-se: estudos



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EDIÇÃO GENÔMICA: UMA NOVA ESPERANÇA NO TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME?
Thalia Galvão Cardozo, Ana Júlia Ribeiro da Silva, Juliana Silva Alves, Mirela Aparecida Oliveira, Maria Eugênia Giraldi Solano

sem desfecho clínico ou incompletos, artigos de opinião, editoriais, documentos ministeriais, capítulos de livro, teses, dissertações, artigos duplicados e relatos de caso.

A seleção ocorreu através da leitura de títulos, resumos e, quando necessária, a leitura completa dos textos para selecioná-los conforme os critérios pré-definidos. Inicialmente foram encontrados 59 artigos. Aplicando os primeiros critérios, ficamos com 23 artigos. Após a leitura dos títulos e resumos, foram considerados 11 artigos para serem lidos na íntegra. Ao final obteve-se uma amostra de 07 estudos para a revisão integrativa.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A identificação dos artigos aconteceu inicialmente por ordem cronológica, iniciando a partir das publicações feitas em 2018 e finalizadas em 2023. Havendo identificação por autores, base de dados, objetivo do estudo, características metodológicas, autores, ano, título do estudo, número de pacientes e conclusão. Aplicados todos os critérios, foram incluídos sete artigos para compor a revisão de literatura. Um artigo de 2006 foi incluído nos resultados devido sua grande relevância no estudo.

Tabela 1. Identificação dos artigos incluídos na revisão

Autor	Anos	Tipo de estudo	Base de dados
Vakulskas	2018	Estudo experimental	PubMed
Takahashi	2006	Estudo experimental	PubMed
Demirci	2018	Revisão	PubMed
Park	2021	Revisão	PubMed
Wu	2019	Estudo experimental	PubMed
Park	2021	Revisão	PubMed
Ramadier	2019	Estudo experimental	PubMed

A doença falciforme é uma doença autossômica recessiva dos glóbulos vermelhos que é geneticamente causada pela alteração do nucleotídeo de uma adenina (A) para timidina (T) no códon 6 da β -globina, levando à substituição do ácido glutâmico por valina na proteína beta-globina. Postula-se que a correção do gene β -globina mediada por recombinação homóloga em células-tronco hematopoiéticas e progenitoras autólogos seria uma abordagem curativa segura e definitiva para SCD. Consequentemente, vários relatórios mostraram correção Glu6Val eficiente em doença falciforme células-tronco hematopoiéticas e progenitoras, embora a eficiência da correção às vezes possa ser vinculada a *indels* fora do alvo na mesma população editada. (Vakulskas, 2018)

Junto com o desenvolvimento de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos (iPS) por Yamanaka e colegas através da introdução de fatores de reprogramação específicos (Takahashi; Yamanaka, 2006), contornando as questões éticas em torno das células-tronco embrionárias, avanços sólidos na edição do genoma com métodos incluindo nucleases de dedo de zinco (ZFNs),



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EDIÇÃO GENÔMICA: UMA NOVA ESPERANÇA NO TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME?
Thalia Galvão Cardozo, Ana Júlia Ribeiro da Silva, Juliana Silva Alves, Mirela Aparecida Oliveira, Maria Eugênia Giraldi Solano

nucleases efectoras semelhantes a ativadoras de transcrição (TALENs) e repetições palindrômicas agrupadas regularmente interespaçadas (A proteína-9 nuclease (Cas9) associada a CRISPR trouxe o potencial de transformar ideias promissoras para as clínicas. Essas nucleases comprovadamente editam com eficiência genomas de vários modelos animais e células humanas (Demirci; Uchida; Tisdale, 2018).

A correção da doença que causa a mutação falciforme usando edição genética representa a abordagem terapêutica mais direta. O complexo CRISPR gRNA/Cas9 ribonucleoproteína pré-complexada direcionado a β -globina junto com o modelo de doador de DNA são entregues em células-tronco hematopoiéticas e progenitoras autólogas isolados de pacientes com anemia falciforme, resultando na correção mediada por reparo direcionado por homologia da mutação causadora. Embora promissora, a edição de genes *in vivo* para curar a anemia falciforme apresenta muitos desafios. Tanto a alta eficiência de entrega *in vivo* quanto a alta eficiência de edição em doença falciforme células-tronco hematopoiéticas são necessárias, e a edição de células/tecidos fora do alvo é uma preocupação potencial (Park; Bao, 2021).

A modificação genética mediada por CRISPR-Cas9 demonstrou eficiência variável, especificidade e persistência em células-tronco hematopoiéticas. (Wu *et al.*, 2019) Neste estudo, demonstramos que nossa abordagem de correção de genes não viral e livre de seleção usando R-66 SCD gRNA otimizado e modelo SCD5ct-wt oligonucleotídeo de fita simples poderia atingir um alto nível (até 37% em células CD34 + de sangue periférico e 33 % em células CD34 + da medula óssea) da correção do gene β -globina em CD34 + células-tronco/progenitoras hematopoiéticas autólogas derivados de pacientes com doença falciforme e células-tronco/progenitoras hematopoiéticas autólogas falciformes editados por genes podem se diferenciar em células eritróides que produziram um alto nível de hemoglobina normal hemoglobina normal *in vitro* (até 47% hemoglobina normal), resultando em uma redução significativa da quantidade de glóbulos vermelhos falciformes de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas autólogas falciformes diferenciados, mesmo sob condições hipóxicas extremas. Descobrimos que o aumento nas cadeias de γ -globina restaurou o equilíbrio geral da globina semelhante a β para as cadeias de α -globina. Além disso, demonstramos que CD34 + células-tronco/progenitoras hematopoiéticas autólogas editados por genes derivados da medula óssea de pacientes com doença falciforme foram capazes de enxertar em camundongos NSG e os alelos corrigidos permaneceram estáveis por até 16 semanas após o transplante. Esses resultados mostram claramente a promessa da edição do genoma baseada em CRISPR/Cas9 para a cura da doença falciforme (Park *et al.*, 2019).

De maneira mais geral, a combinação de estratégias de adição de genes e edição de genoma tem o potencial de induzir simultaneamente a expressão de proteínas terapêuticas e regular negativamente os genes causadores de doenças. A título de exemplo, vislumbramos que esta tecnologia versátil pode permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças autossômicas dominantes, que requerem a regulação negativa do alelo dominante (Ramadier *et al.*, 2021).



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EDIÇÃO GENÔMICA: UMA NOVA ESPERANÇA NO TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME?
Thalia Galvão Cardozo, Ana Júlia Ribeiro da Silva, Juliana Silva Alves, Mirela Aparecida Oliveira, Maria Eugênia Giraldi Solano

A terapia genética avançou rapidamente no século 21 com a promessa de uma cura para doença falciforme, e as estratégias de edição de genes baseadas no sistema de sequência de repetição palindrômica curta regularmente interespçada (CRISPR)/Cas9 revolucionaram o campo da terapia genética ao direcionar com precisão genes (Ma, 2023). Uma estratégia de edição de genes usando nucleases projetadas, como nucleases efetoras TAL (TALENs), nucleases de dedo de zinco e sistemas de repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespçadas/Cas9, cria uma quebra de fita dupla de DNA em uma localização definida pelo usuário. A tecnologia oferece o potencial para reparar permanentemente mutações causadoras de doenças por meio de correção, exclusão, adição e interrupção das sequências específicas mediadas pela geração de DNA direcionada, seguida por junção de extremidade não homóloga ou reparo direcionado por homologia (Park; So; Gang, 2021).

CONSIDERAÇÕES

O progresso rápido e substancial nas abordagens de edição do genoma provou ser valioso como uma opção curativa, dada a plausibilidade de corrigir a mutação subjacente nas células-tronco/progenitoras hematopoiéticas derivadas do paciente, induzir a expressão de hemoglobina fetal para contornar a falcização dos glóbulos vermelhos, ou criar células-tronco pluripotentes induzidas corrigidas, entre outras abordagens. A descoberta recente do CRISPR/Cas9 não apenas revolucionou a engenharia do genoma, mas também trouxe a possibilidade de traduzir esses conceitos em uma realidade clinicamente significativa. Em um futuro próximo, ensaios clínicos randomizados poderão nos provar de forma mais certa a confiabilidade da edição de genoma.

REFERÊNCIAS

- BRANDOW, A. M.; LIEM, R. I. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2022.
- CRONIN, M. A.; GEORGE, E. The why and how of the integrative review. **Organizational Research Methods**, e.1094428120935507, 2020.
- DAGDAS, Y. S.; CHEN, J. S.; STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J. A.; YILDIZ, A. A conformational checkpoint between DNA binding and cleavage by CRISPR-Cas9. **Sci Adv.**, 3, eaao0027, 2017.
- DE SOUSA, L. M. M.; MARQUES-VIEIRA, C. M. A.; SEVERINO, S. S. P.; ANTUNES, A. V. A metodologia de revisão integrativa da literatura em enfermagem. **Portal de Revistas de Enfermagem**, n. 21, Série 2, nov. 2017.
- DEMIRCI, S.; UCHIDA, N.; TISDALE, J. F. Gene therapy for sickle cell disease: An update. **Cytotherapy**, v. 20, n. 7, p. 899-910, jul; 2018. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.04.003.
- MA, L.; YANG, S.; PENG, Q.; ZHANG, J.; ZHANG, J. CRISPR/Cas9-based gene-editing technology for sickle cell disease. **Gene**, v. 12, p. 874:147480, may 2023. doi: 10.1016/j.gene.2023.147480.
- NEUMAYR, L. D.; HOPPE, C. C.; BROWN, C. Sickle cell disease: current treatment and emerging therapies. **Am J Manag Care**, v. 25, 18 Suppl, p. S335-43, 2019.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

EDIÇÃO GENÔMICA: UMA NOVA ESPERANÇA NO TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME?
Thalia Galvão Cardozo, Ana Júlia Ribeiro da Silva, Juliana Silva Alves, Mirela Aparecida Oliveira, Maria Eugênia Giraldi Solano

OSUNKWO, I.; ANDEMARIAM, B.; MINNITI, C. P.; INUSA, B. P.; EL RASSI, F.; FRANCIS-GIBSON, B.; JAMES, J. Impact of sickle cell disease on patients' daily lives, symptoms reported, and disease management strategies: Results from the international Sickle Cell World Assessment Survey (SWAY). **American Journal of Hematology**, v. 96, n. 4, p. 404-417, 2021.

PARK, S. H.; BAO, G. CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. **Transfus Apher Sci.**, v. 60, n. 1, p. 103060, feb. 2021. doi: 10.1016/j.transci.2021.103060.

PARK, S. H.; LEE, C. M.; DEVER, D. P.; DAVIS, T. H.; CAMARENA, J.; SRIFA, W.; ZHANG, Y.; PAIKARI, A.; CHANG, A. K.; PORTEUS, M. H.; SHEEHAN, V. A.; BAO, G. Highly efficient editing of the β -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. **Nucleic Acids Res.**, v. 47, n. 15, p. 7955-7972, 5 sep. 2019. doi: 10.1093/nar/gkz475.

PARK, So Hyun; BAO, G. "CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease." **Transfusion and Apheresis Science**, v. 60, n. 1, p. 103060, 2021.

PAYNE, A. B.; MEHAL, J. M.; CHAPMAN, C.; HABERLING, D. L.; RICHARDSON, L. C.; BEAN, C. J.; HOOPER, W. C. Mortality trends and causes of death in persons with sickle cell disease in the United States, 1979-2014. **Blood**, v. 130, p. 865, 2017.

RAMADIER, S.; CHALUMEAU, A.; FELIX, T.; OTHMAN, N.; AKNOUN, S.; CASINI, A.; MAULE, G.; MASSON, C.; DE CIAN, A.; FRATI, G.; BRUSSON, M.; CONCORDET, J. P.; CAVAZZANA, M.; CERESETO, A.; EL NEMER, W.; AMENDOLA, M.; WATTELLIER, B.; MENEGHINI, V.; MICCIO, A. Combination of lentiviral and genome editing technologies for the treatment of sickle cell disease. **Mol Ther.**, v. 30, n. 1, p. 145-163, 5 jan. 2021.

ROMERO, Z.; LOMOVA, A.; SAID, S.; MIGGELBRINK, A.; KUO, C. Y.; CAMPO-FERNANDEZ, B.; KOHN, D. B. Editing the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem cells: comparison of endonucleases and homologous donor templates. **Molecular Therapy**, v. 27, n. 8, 1389-1406, 2019.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-76, 2006.

VAKULSKAS, C. A.; DEVER, D. P.; RETTIG, G. R.; TURK, R.; JACOBI, A. M.; COLLINGWOOD, M. A.; BODE, N. M.; MCNEILL, M. S.; YAN, S.; CAMARENA, J.; LEE, C. M.; PARK, S. H.; WIEBKING, V.; BAK, R. O.; GOMEZ-OSPINA, N.; PAVEL-DINU, M.; SUN, W.; BAO, G.; PORTEUS, M. H.; BEHLKE, M. A. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. **Nat Med.**, v. 24, n. 8, p. 1216-1224, aug. 2018. doi: 10.1038/s41591-018-0137-0.

WU, Y.; ZENG, J.; ROSCOE, B. P.; LIU, P.; YAO, Q.; LAZZAROTTO, C. R.; CLEMENT, K.; COLE, M. A.; LUK, K.; BARICORDI, C.; SHEN, A. H.; REN, C.; ESRICK, E. B.; MANIS, J. P.; DORFMAN, D. M.; WILLIAMS, D. A.; BIFFI, A.; BRUGNARA, C.; BIASCO, L.; BRENDDEL, C.; PINELLO, L.; TSAI, S. Q.; WOLFE, S. A.; BAUER, D. E. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. **Nat Med.**, v. 25, n. 5, p. 776-783, may. 2019. doi: 10.1038/s41591-019-0401-y.