

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**

**Curso de Biomedicina**

**Bianca Prisco Machuca**

**OS BENEFÍCIOS DA APLICAÇÃO DA TERAPIA GÊNICA CRISPR/CAS9 NA  
ANEMIA FALCIFORME**

**São Paulo  
2022**

**Bianca Prisco Machuca – RA: SPGR011880**

**OS BENEFÍCIOS DA APLICAÇÃO DA TERAPIA GÊNICA CRISPR/CAS9 NA  
ANÊMIA FALCIFORME**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Profa. Dra. Juliana Vieira dos Santos Bianchi, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo**

Machuca, Bianca Prisco

Os benefícios da aplicação da terapia gênica CRISPR/CAS9 na anemia falciforme / Bianca Prisco Machuca. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2022.  
67 p.

Orientação de Juliana Vieira dos Santos Bianchi.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação),  
Centro Universitário São Camilo, 2022.

1. Anemia falciforme 2. Aloimunização 3. Terapêutica 4. Terapia gênica  
I. Bianchi, Juliana Vieira dos Santos II. Centro Universitário São Camilo  
III. Título

CDD: 573.21

**Bianca Prisco Machuca**

**OS BENEFÍCIOS DA APLICAÇÃO DA TERAPIA GÊNICA CRISPR/CAS9 NA  
ANEMIA FALCIFORME**

**São Paulo, 08 de Novembro de 2022.**

---

**Professora Orientadora (Juliana Vieira dos Santos Bianchi)**

---

**Professor Examinador**

**São Paulo  
2022**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha mãe, Ana Julia, que desde sempre se esforçou para que eu tivesse o melhor, e que me deu asas para correr atrás dos meus sonhos, e sempre persistir, independente da circunstância. À minha tia, Marli, que foi como uma segunda mãe para mim, sempre torcendo e vibrando por minhas conquistas. À minha irmã, Paula, e o meu cunhado, Rodrigo, que mesmo estando longe, me apoiaram, incentivaram e me fizeram pensar fora da zona de conforto.

A todos os meus amigos, Wesley, Bias, Vitoria e Amanda que apesar de minha ausência, permaneceram ao meu lado, trazendo mais alegria e esperança, apesar das angústias. À minha namorada, amiga e parceira, Camila, que esteve ao meu lado desde o início, me incentivando e acreditando em mim quando a insegurança se fazia presente, não permitindo que eu desanimasse ou deixasse de acreditar em mim.

À minha querida orientadora e professora, Juliana Bianchi, a qual criei um grande carinho durante toda essa jornada, me dando todo suporte, não somente para o TCC, como também para meu desenvolvimento pessoal e profissional, sendo um grande exemplo para mim, me impulsionando a amar hematologia e imunohematologia, e nunca deixar de buscar respostas.

Aos demais docentes do Centro Universitário São Camilo que estiveram presentes em minha trajetória, sendo fundamentais para a minha formação acadêmica.

À minha banca externa, Thamy Caroline, e minha banca interna, Marjorie Marini, que aceitaram participar da conclusão dessa etapa tão importante em minha vida.

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

A doença falciforme apresenta-se em 60 a 100 mil brasileiros, e foi descrita inicialmente em 1910, ocasionada pela mutação em homozigose c.20A>T, no gene da beta-globina humana (HBB) localizado no cromossomo onze, levando a substituição do Ácido Glutâmico (Glu) por uma Valina (Val) no sexto aminoácido da beta globina. Essa substituição produz uma molécula denominada hemoglobina S (HbS) alterando a morfologia da hemácia para a forma de foice, o que dificulta o transporte de oxigênio no corpo e ocasiona a obstrução dos vasos sanguíneos. Os tratamentos convencionais e rotineiros consistem na utilização de Hidroxiureia e transfusão de sangue, no entanto, as complicações agudas não são totalmente eliminadas, e os quadros podem ser agravados devido a aloimunização em prol de múltiplas transfusões. Dessa forma, o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas torna-se a única terapia curativa, todavia, poucos pacientes são elegíveis, além da baixa disponibilidade de doadores compatíveis, tornando indispensável que uma técnica menos invasiva e mais abrangente seja desenvolvida. A terapia gênica tornou-se alvo de estudos com o princípio de realizar modificações pontuais no genoma humano, por meio da correção de genes mutados. No mundo foram encontrados 40 protocolos clínicos na base de dados ClinicalTrial.gov, em que os editores CRISPR/Cas9, ZFN e TALEN são empregados em ensaios *in vitro* para avaliação da capacidade de correção da mutação no gene da HBB em culturas de células tronco hematopoiéticas. Conforme observado no protocolo NCT03745287 conduzido pela Vertex Pharmaceuticals Incorporated, iniciado em 2018, o CRISPR/Cas9 foi utilizado com o objetivo de induzir os níveis de HbF, por meio da edição em células-tronco hematopoiéticas e progenitoras, do gene BCL11A, um fator repressor da produção de HbF. Essa estratégia, uma vez que comparada às demais técnicas gênicas, mostra-se mais eficiente na correção monoalélica, ocorrendo a remissão da doença falciforme. A implementação dessa técnica deve ser analisada em prol do custo-benefício, ausência de histocompatibilidade obrigatória e redução de manifestações clínicas graves.

**Palavras-chave:** Doença falciforme, tratamento, aloimunização, terapia gênica.

## ABSTRACT

Sickle cell disease is present in 60 to 100 thousand Brazilians, and was first described in 1910, caused by a homozygous mutation, c.20A>T, in the human beta-globin (HBB) gene located on chromosome eleven, leading to the substitution of Glutamic Acid (Glu) for a Valine (Val) in the sixth amino acid of the beta globin. This substitution produces a molecule called hemoglobin S (HbS), changing the morphology of the red blood cell to a sickle shape, making it difficult to transport oxygen throughout the body and causing blockage of the blood vessels. The conventional and routine treatments consist of the use of Hydroxyurea and blood transfusion, however, the acute complications are not totally eliminated, and the conditions can be aggravated due to alloimmunization in favor of multiple transfusions. Thus, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation becomes the only curative therapy; however, few patients are eligible, besides the low availability of compatible donors, making it essential that a less invasive and more comprehensive technique be developed. Gene therapy has become the target of studies with the principle of making punctual modifications to the human genome by correcting mutated genes. Worldwide 40 clinical protocols were found in the ClinicalTrial.gov database, in which CRISPR/Cas9, ZFN and TALEN are employed in vivo trials to evaluate the ability to correct the mutation in the HBB gene in hematopoietic stem cell cultures. As noted in protocol NCT03745287 conducted by Vertex Pharmaceuticals Incorporated, initiated in 2018, CRISPR/Cas9 was used with the goal of inducing HbF levels by editing in hematopoietic stem and progenitor cells the BCL11A gene, a factor repressing HbF production. This strategy, once compared to other gene techniques, shows to be more efficient in monoallelic correction, with remission of sickle cell disease. The implementation of this technique should be analyzed in terms of cost-benefit, absence of obligatory histocompatibility and reduction of severe clinical manifestations.

**Keywords:** Sickle cell disease, treatment, alloimmunization, gene therapy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da molécula de Hemoglobina

Figura 2 - Diferenciação das hemoglobinas

Figura 3 - Curva de dissociação da Hemoglobina

Figura 4 - Formação dos genes da globina

Figura 5 - Presença da Doença Falciforme

Figura 6 - Número de nascidos com Doença falciforme em 2015

Figura 7 - Mutação c.20A>T no *locus* da  $\beta$ -globina

Figura 8 - Representação esquemática da Doença falciforme

Figura 9 - Alterações da membrana eritrocitária de um paciente falciforme

Figura 10 - Representação esquemática da eletroforese de hemoglobina nas variações de DF

Figura 11 - Fatores contribuintes para a aloimunização

Figura 21 - Processo de produção de CTH modificadas

Figura 13 - Mecanismos de reparação de DSB

Figura 14 - Mecanismo do Sistema CRISPR-Cas9

Figura 15 - Representação gráfica de aumento de HbF por meio da introdução de inserções ou deleções no *enhancer* de BCL11A

Figura 16 - Uso de CRISPR-Cas9 para a correção da mutação

## LISTA DE SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
AAV	Vírus adeno-associado
AVE	Acidente vascular encefálico
BCL11A	<i>B-cell lymphoma/leukemia 11A</i> /linfoma
bp	Par de bases
Cas9	Associated Proteins
crRNA	CRISPR RNA
CTH	Células-tronco hematopoéticas
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSB	Quebra de fita dupla do DNA
GLU	Glutamina
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HbA	Hemoglobina Humana
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina Falciforme
HDR	<i>Homology directed repair</i>
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana
HPFH	Persistência hereditária da HbF
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
HU	Hidroxiureia
IEF	Eletroforese por focalização isoelétrica
MMEJ	<i>Microhomology-mediated end joining</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RTHT	Reação transfusional hemolítica tardia
sgRNA	RNA guia
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas

VAL	Valina
ZFN	<i>Zinc finger nuclease</i>
$\gamma$	Gama
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. OBJETIVO .....	14
3. METODOLOGIA .....	15
4. DESENVOLVIMENTO .....	16
4.1. Hemoglobina .....	16
4.1.1. Síntese da Hemoglobina .....	18
4.1.2. Aspectos Moleculares da Hemoglobina .....	19
4.2. Hemoglobinopatias .....	21
4.2.1. Doença Falciforme .....	22
4.2.2. Incidência e hereditariedade da Doença Falciforme .....	22
4.2.3. Variantes da Doença Falciforme .....	24
4.2.4. Patofisiologia .....	25
4.2.5. Sinais e sintomas .....	28
4.2.6. Diagnóstico laboratorial .....	30
4.2.7. Tratamento .....	33
4.2.7.1. Tratamento farmacológico .....	33
4.2.7.2. Tratamento hemoterápico .....	35
4.2.7.2.1. Aloimunização .....	36
4.3. Aplicabilidade da terapia gênica .....	37
4.3.1. Edição de genes usando nucleases .....	40
4.3.1.1. CRISPR/Cas9 .....	43
4.3.1.2. Reativação da hemoglobina fetal usando edição gênica .....	46
4.4. Protocolos atuais em andamento .....	48
4.5. Futuras direções e desafios a terapia gênica .....	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
6. REFERÊNCIAS .....	56

## 1. INTRODUÇÃO

A anemia é definida como a deficiência de suprimento de oxigênio para os tecidos do organismo, seja pela diminuição de glóbulos vermelhos e/ ou da taxa de hemoglobina (AZEVEDO, 2019). Trata-se de um problema de saúde pública, o qual está relacionado a diversos fatores culturais e socioeconômicos, sendo estimado que atinja 27% da população mundial e, no Brasil, 10% da população (MACHADO *et al*, 2019).

Como consequência da anemia, obtém-se o desequilíbrio entre a produção e a destruição dos glóbulos vermelhos, sendo necessário uma adaptação na produção medular. Pode estar relacionada a fatores como perda de sangue, insuficiência da medula óssea, deficiência nutricional e destruição aumentada, caso das Anemias Hemolíticas (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

Dentre as anemias mais recorrentes, pode-se citar a Anemia Falciforme, uma beta hemoglobinopatia hereditária, a qual conta com a presença de uma hemoglobina anormal (HbS), decorrente da mutação no gene, que codifica a cadeia beta globina, e ocasiona em alterações estruturais da molécula, havendo a substituição de uma base nitrogenada no DNA, modificando o códon GAC para GTC no RNAm (RNA mensageiro); isso gera a troca de um ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val), na posição número 6 da cadeia beta (AZEVEDO, 2019).

Os genes das globinas ao serem alvo de alterações moleculares simples ou complexas podem sofrer consequências funcionais, devido ao tipo de lesão molecular ou o local afetado, provocando supressão da síntese ou redução do ritmo de produção de cadeias com alterações estruturais variadas (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

Essa mutação leva a deformidades nas hemácias, as quais adquirem o formato de foice e ocorrem sobretudo sob condições de baixa oxigenação, causando obstrução na microcirculação, em prol do acúmulo de eritrócitos falcizados e, conseqüente lesão tecidual (FERREIRA, GOUVÊA, 2018).

Os achados mais frequentes e característicos na anemia falciforme são as crises dolorosas, anemia, febre, acidente vascular cerebral, úlceras de

pernas, icterícia, dentre outros, os quais podem se destacar logo na segunda metade do primeiro ano de vida (AZEVEDO, 2019).

Não há tratamento específico para a anemia falciforme, no entanto medidas preventivas podem ser seguidas com o objetivo de minimizar as consequências da anemia, sendo fundamental o diagnóstico e terapêutica precoce; as transfusões sanguíneas devem ser utilizadas em casos excepcionais e uso de antibióticos e anti-inflamatório é recomendado para amenizar dores e quadros infecciosos (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

Dentre os pacientes portadores de doença falciforme, 50% recebem transfusão de concentrado de hemácia em algum estágio da vida, tendo como objetivo melhorar a capacidade de transporte de oxigênio e o fluxo de sangue. Todavia, os pacientes que recebem transfusão de forma crônica, tem como consequência a aloimunização, uma complicação que contribui para o aumento das comorbidades da doença (KATO *et al.*, 2018).

Atualmente, a única terapia curativa disponível para pacientes falciformes é o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), com o objetivo de restabelecer uma hematopoese normal e eliminar as hemácias falcizadas, que causam obstruções vasculares. Entretanto, 5 a 10% dos pacientes transplantados morrem devido a complicações, como a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (FERREIRA, GOUVÊA, 2018).

A Hidroxiureia (HU) é utilizada com o objetivo de elevar os níveis de hemoglobina fetal, tendo como consequência a diminuição do quadro clínico. Apesar dos resultados benéficos observados no perfil laboratorial, seu uso tornou-se questionável devido a toxicidade quando utilizada por longo prazo (SILVA, SANTOS, 2021).

Além dos tratamentos convencionais já utilizados, a aplicabilidade da terapia gênica CRISPR, sigla para Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) e Cas9, Proteínas Associadas-9 (*Associated Proteins-9*) para o tratamento de Anemia Falciforme está sendo estudada e testada. Seu mecanismo reconhece o material genético invasor, clivando-o em pequenos fragmentos e o integra em seu próprio DNA. Em uma segunda infecção pelo agente ocorre a transcrição do locus CRISPR e o processamento de CRISPR RNA (crRNA), que determina a sequência de corte do DNA alvo, ocasionando

na formação de complexos com as proteínas Cas, as quais reconhecem os ácidos nucleicos incomuns e finalmente o destroem (MARRAFFINI, SONTHEIMER, 2010).

CRISPR/Cas9 é uma técnica com grande potencial a ser explorado, devido a sua precisão e por possuir um custo relativamente menor em comparação às demais técnicas (SANTOS *et al.*, 2016). Apesar de ser alvo de discussões éticas, essa terapia vem sendo apoiada principalmente ao ser mensurado seu uso em doenças com desordens graves, e seu apoio vem crescendo gradativamente devido aos desenhos experimentais realizados e os retornos positivos obtidos (GONÇALVES, PAIVA, 2017).

## **2. OBJETIVO**

Realizar um levantamento bibliográfico em bases de dados e bibliotecas científicas, sintetizando e discutindo a aplicação inovadora da terapia gênica no tratamento da anemia falciforme, além de analisar os protocolos clínicos que estão em andamento.

### **3. METODOLOGIA**

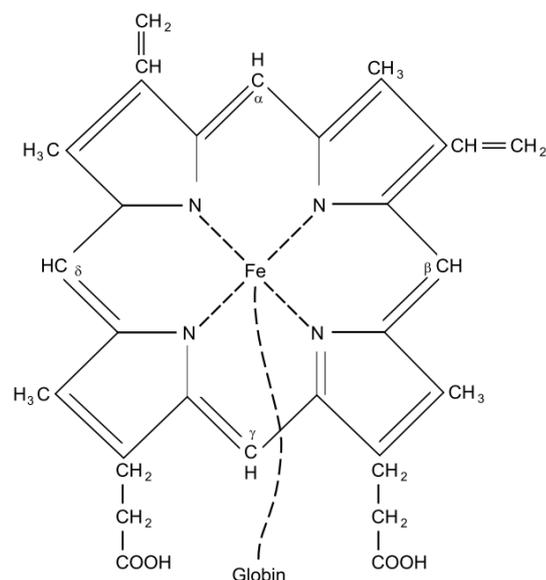
Este trabalho consiste em um estudo descritivo em forma de revisão bibliográfica. Foram realizadas pesquisas em bases de dados e bibliotecas científicas, tais como Pubmed, Scielo e Nature, e levantamento de dados epidemiológico no Clinical.Trials.gov, utilizando palavras-chave como “Anemia Falciforme”, “Terapia Gênica”, “Tratamento”, “CRISPR/Cas9” e “Aloimunização”. Ao todo, foram utilizados 90 trabalhos, entre livros e artigos científicos de revisão, dos quais as informações utilizadas foram cuidadosamente selecionadas, priorizando trabalhos mais recentes e não restritos apenas à língua portuguesa, a fim atender ao objetivo do trabalho.

## 4. DESENVOLVIMENTO

### 4.1. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é constituída por uma molécula heme formada por quatro núcleos pirrólicos, contendo em seu centro um átomo de  $Fe^{++}$ ; e uma porção protéica chamada globina, sendo formada por dois pares de cadeias polipeptídicas que possuem cerca de 140 aminoácidos cada, as quais não possuem ligações covalentes entre si e estão dispostas na forma de um tetrâmero em conformação helicoidal (Figura 1) (KATO *et al.*, 2018).

**Figura 1 - Estrutura da molécula de Hemoglobina**

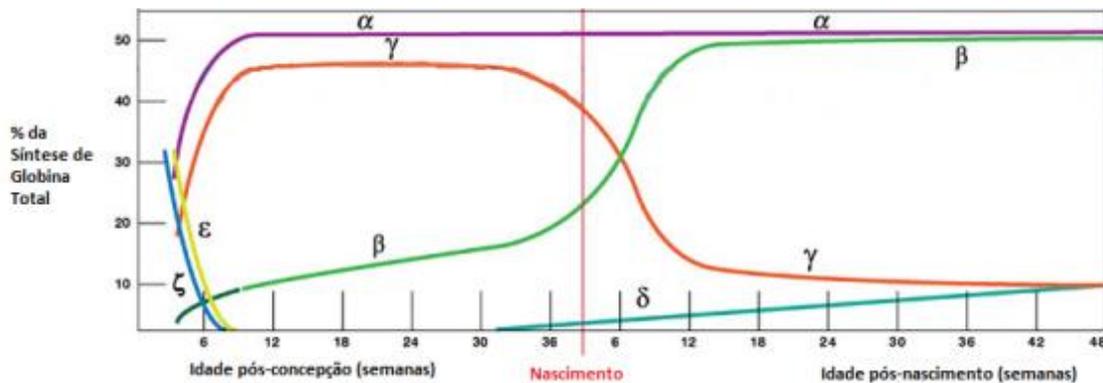


Fonte: Benfato, 2007. Estrutura da molécula de hemoglobina, proteína de estrutura globular e quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas e o grupo prostético.

Pode ser encontrada de diversas formas, estando presente em 95 a 98% da população na forma de HbA1 ( $\alpha_2\beta_2$ ), de 2,5 a 3% como HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ ) ou também, de 0 a 2% da população como HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) (VRETTUO *et al.*, 2018).

A hemoglobina fetal (HbF) está presente na fase embrionária e fetal, sendo gradualmente substituída pela HbA, até os seis meses de idade, em que ocorrerá a maturação total dos eritrócitos. Na Figura 2 é possível verificar o desenvolvimento das hemoglobinas no período pós-natal e pós-nascimento (AZEVEDO, 2019).

**Figura 2 – Diferenciação das hemoglobinas**



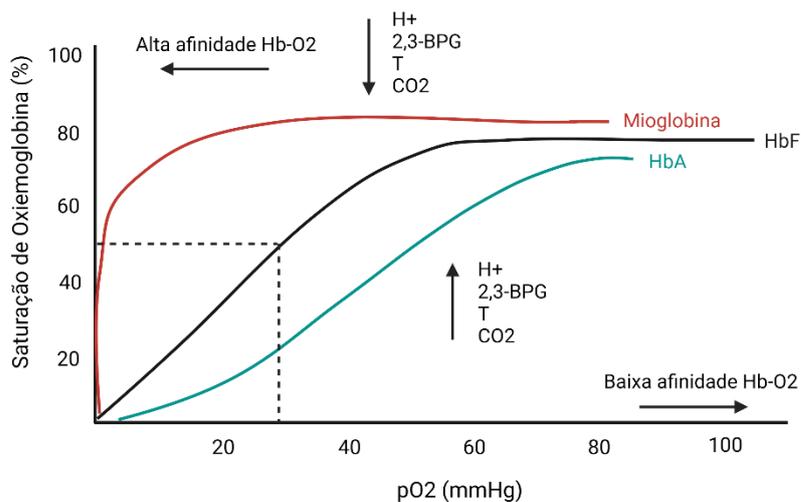
Fonte: King, 2014. Representação do desenvolvimento das hemoglobinas desde o desenvolvimento embrionário até as primeiras semanas de vida.

Ao passo que ocorre a maturação dos eritrócitos, será possível identificar a hemoglobina humana (HbA -  $\alpha\beta_2$ ), a qual contém duas cadeias alfas ( $\alpha$ ) e duas cadeias betas ( $\beta$ ). As alfas possuem 141 aminoácidos com valina-leucina na sequência terminal, e as betas possuem 146 aminoácidos com valina-histidina-leucina como sequência terminal. Ao ser modificada a sequência dos aminoácidos e suas interações, devido a mutações genéticas, haverá alterações na carga da hemoglobina e de sua função no organismo, como elasticidade eritrocitária e afinidade com o oxigênio (AZEVEDO, 2019).

A afinidade pelo oxigênio não depende apenas de fatores estruturais da molécula, havendo mecanismos de regulação externa, sendo estes o pH, pressão parcial do gás carbônico ( $pCO_2$ ) e o 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). A interação do 2,3-BPG com a hemoglobina ocorre apenas quando se encontra desoxigenada, resultando na diminuição da afinidade pelo oxigênio (STEINBERG, 2009).

A curva de dissociação (Figura 3) facilita a oxigenação nos níveis de pressão parcial de  $O_2$  nos pulmões, e a liberação de oxigênio para os tecidos periféricos dependem de pressão parcial, acarretando no afastamento das cadeias betas da globina e na entrada do 2,3 BPG na bolsa central, resultando em desoxi-hemoglobina. Já nos pulmões, a ligação com oxigênio aproxima as cadeias beta e o 2,3 BPG é liberado, permitindo maior afinidade do oxigênio à hemoglobina, formando assim a oxi-hemoglobina (RAMOS, 2017).

**Figura 3 - Curva de dissociação da Hemoglobina**



Fonte: Autoria própria. Curva de saturação e dissociação do oxigênio (O<sub>2</sub>) em relação aos fatores temperatura, pH, CO<sub>2</sub> e 2,3-BPG.

#### 4.2. Síntese da Hemoglobina

No adulto são formados e destruídos cerca de 8 gramas de hemoglobina diariamente, sendo 1g Hb equivalente a 1,3 mL de oxigênio. Sua síntese inicia-se após o pró eritroblasto, aumentando conforme maturação até a fase de reticulócito, sendo responsável por 35% da produção total de hemoglobina (KOURY *et al.*, 2013).

A normalidade da síntese depende de suprimento adequado de ferro, síntese das protoporfirinas e síntese da globina. A transferrina encaminha o ferro até os precursores eritróides, em que se ligará ao receptor da transferrina na membrana das células eritroblásticas e será endocitado para o interior da mitocôndria, unindo-se à protoporfirina, o que dará origem ao heme (ANDERSON *et al.*, 2009).

A síntese da globina ocorre nos ribossomos e inicia-se por meio da expressão de genes estruturais herdados; o gene alfa e zeta estão no cromossomo 16 e os demais no cromossomo 11, e cada um apresentará como produto um tipo de cadeia de globina que varia de acordo com o desenvolvimento do organismo. As cadeias se agrupam em pares, originando diferentes tipos de hemoglobinas, que podem ser divididas em embrionárias e adultas (HO, THEIN, 2000).

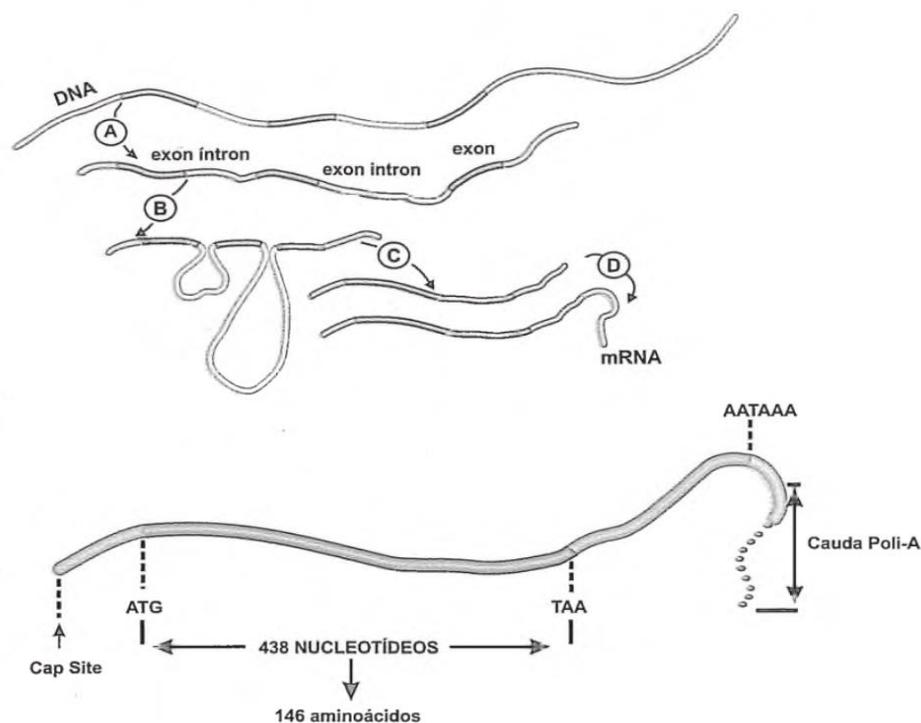
Diferente da globina, a síntese do heme ocorre na mitocôndria, sendo constituído pela protoporfirina IX, que se diferencia das demais em razão das cadeias laterais de carbono presente em seus anéis pirrólicos. A formação final do heme se dá por um anel tetrapirrólico contendo um átomo de ferro no seu interior (FAIRBANKS, BEUTLER, 2001).

A ligação covalente entre o heme e a globina ocorre entre a histidina da cadeias polipeptídicas e o radical propil dos anéis pirrólicos. O ferro se liga a globina por meio da histidina, sendo responsável por carregar uma molécula de oxigênio por meio de uma ligação fraca com a histidina distal, originando a oxi-hemoglobina (AZEVEDO, 2019).

#### 4.1.2. Aspectos Moleculares da Hemoglobina

Os genes da globina possuem três éxons, regiões codificantes, e dois íntrons, regiões não codificantes; ambos são copiados do DNA para o RNA na transcrição, mas durante o processamento do RNA, os segmentos correspondentes aos íntrons são removidos, restando apenas os éxons, sendo esse processo conhecido como *splicing*. Ao final do RNA é acrescentada uma sequência de adeninas, a qual proporcionará estabilidade ao mRNA (Figura 4) (HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2008).

**Figura 4 - Formação dos genes da globina**



Fonte: Zago, 2013. O DNA que contém o gene de globina é transcrito em RNA precursor (A) que contém regiões codificadoras (éxons) as não codificadoras (introns). A seguir (B) os intron são removidos (splicing), originando (C) uma sequência codificadora contínua. O RNA é então modificado pela adição (D) de uma cauda poli-A e do cap, formando o RNA mensageiro (mRNA) maduro, na parte inferior da figura.

Existem sequências importante para que o processo de transcrição ocorra, sendo essas: ATAA (*ATA-box* ou *TATA-box*), sinalizando o ponto onde a RNA-polimerase fixa-se à fita de DNA, desespiralizando-a e iniciando a transcrição; CCAAT e CACCC (*CAT-box* proximal e distal) pontos de reconhecimento da RNA-polimerase; e GATA, um sítio de ligação de fatores de transcrição chamados GATA-1 a GATA-4, que controlam muitos genes expressos em células eritroides (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

No processo de síntese da hemoglobina, ocorre a produção de globinas alfa e beta, juntamente com seus respectivos grupos heme, de forma equilibrada, resultando em hemoglobinas normais A, em maior quantidade e, em menor quantidade de A2 e Fetal. Alterações moleculares ocasionam em desequilíbrio na produção das cadeias globínicas, e, conseqüentemente, ineficácia na produção dos eritrócitos (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

O gene da cadeia  $\beta$  está no braço curto do cromossomo 11; o gene  $\epsilon$  (epsilon) é ativo durante o desenvolvimento embrionário, enquanto o gene  $\gamma$  (gama) predomina durante o desenvolvimento fetal, produzindo a HbF, enquanto os genes  $\delta$  (delta) e  $\beta$  são ativos no desenvolvimento da hemoglobina adulta. Já o gene da cadeia  $\alpha$  está localizado no braço curto do cromossomo 16, sendo necessário para a síntese de hemoglobinas presentes na fase fetal e na fase adulta, mantendo a estabilidade da molécula de hemoglobina (HARMENING, 2015).

Em ambos os genes existe uma região que controla a atividade genética de cada domínio, permitindo a ligação dos fatores de transcrição, sendo LCR (*Locus Contro Region*) e HS40 encontrados, respectivamente, no gene de  $\beta$  e  $\alpha$ -globina, os quais favorecem a ligação de fatores de transcrição e sua expressão (HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2008).

### 4.3. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são alterações estruturais e funcionais ocasionadas devido a mutações no gene que codificam as cadeias de globinas alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ), comprometendo assim a função desempenhada pela hemoglobina nos eritrócitos. Divide-se em dois principais grupos, a talassemia e as hemoglobinas variantes (NAOUM, 1997).

Em geral as mutações das hemoglobinas são raras e silenciosas clinicamente, sendo detectadas no laboratório, uma vez que não produz alteração funcional ou da estabilidade da molécula a ponto de produzir sintomas clínicos (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

Conforme a Organização Mundial da Saúde, estima-se o nascimento anual de cerca de 330 mil crianças com hemoglobinopatias, sendo 270 mil com doença falciforme (DF) e 60 mil com talassemias. Os distúrbios hereditários das hemoglobinas constituem problemas de saúde pública em 160 dos 230 países mundiais (71%) (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

Segundo o estudo de Rosenfeld *et al.*, 2019, foram coletados 8.952 exames na população adulta brasileira, sendo que 3,7% da população apresenta hemoglobinopatia; em 2,49% encontrou-se o traço falciforme, em 0,8% suspeitou-se de talassemia maior, em 0,3% de talassemia menor, em 0,04% de serem portadores de HbC e em 0,03% de HbF.

A talassemia foi descoberta na região do Mar Mediterrâneo, e atualmente, possui maior incidência em locais com grande fluxo migratório, como Estados Unidos, Canadá, Brasil, Índia entre outros. Essa hemoglobinopatia decorre da mutação nos genes alfa ou beta, promovendo a redução ou ausência de uma ou mais cadeias de globina, sendo classificada conforme a cadeia a qual teve sua síntese comprometida (ROSA *et al.*, 2012).

Conforme DOMINGOS *et al.*, 1997, as hemoglobinas variantes são fruto de alterações do gene estrutural, promovendo a formação de hemoglobinas com características bioquímicas diferentes das hemoglobinas normais.

Nesse grupo destaca-se a HbS, forma homozigota para a Anemia Falciforme, caracterizada como a hemoglobinopatia de maior significância clínica. O gene da HbS pode então combinar-se com outras anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD) e hemoglobina E (HbE), ocasionando em arranjos sintomáticas,

denominados, respectivamente, hemoglobina SC, hemoglobina SD e hemoglobina SE (SOARES *et al.*, 2017).

#### **4.2.1. Doença Falciforme**

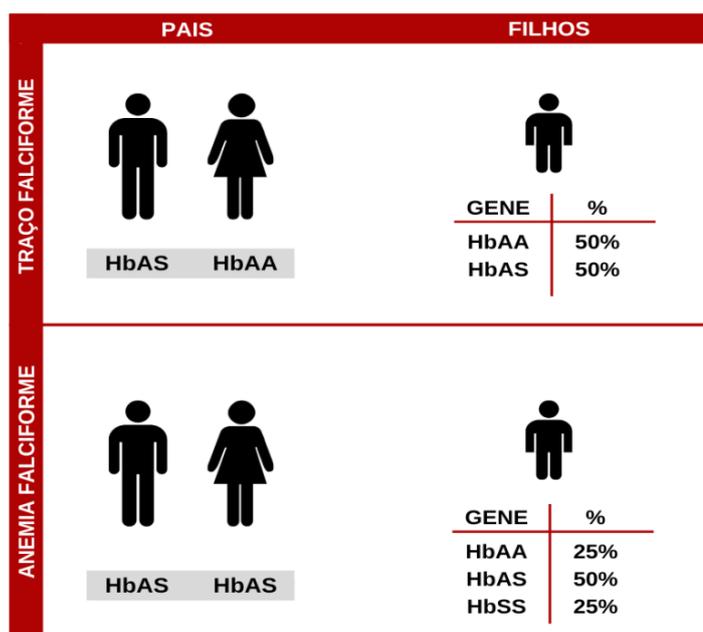
A doença falciforme é um termo usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio de HbS, sendo descrita por Herrick inicialmente em 1910, originária na África vindo para a América através do comércio de escravos, disseminando-se heterogeneamente pelo Brasil até metade do século XIX, sendo possivelmente responsável por casos de morbidade e mortalidade por milhares de anos (HERRICK, 1910).

Trata-se de uma anemia hemolítica crônica e hereditária, caracterizada por uma hemoglobina anormal, que ao ser desoxigenada torna-se insolúvel e no formato de foice, o que impede seu fluxo nos vasos sanguíneos (FIGUEIREDO, 2014).

#### **4.2.2. Incidência e hereditariedade da Doença Falciforme**

Transmitida por um gene semidominante, o qual pode se manifestar em homozigose (HbS/HbS), ou seja, a pessoa apresenta anemia falciforme (AF), uma vez que recebe de cada um dos pais um gene para hemoglobina S, sendo de maior manifestação clínica. Pode também se apresentar na forma de heterozigose (HbS/HbA), a qual se dá pela combinação dos genes de ambas as hemoglobinas A e S, sendo assim o indivíduo portador de traço falciforme, conforme representado na Figura 5 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

**Figura 5 - Presença da Doença Falciforme**



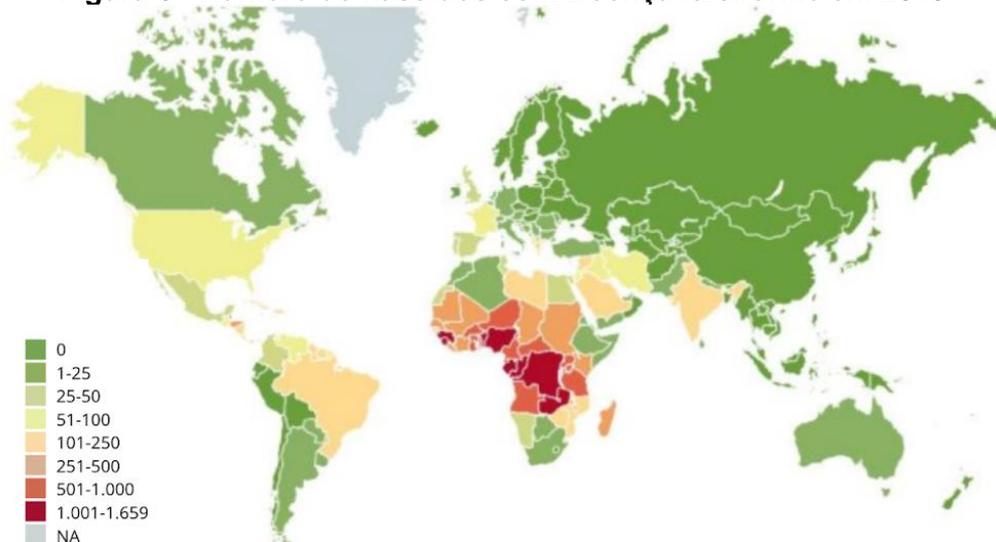
Fonte: Autoria própria. Representação da manifestação da Doença Falciforme, a depender do genótipo dos pais.

A incidência mundial de DF é mais elevada na África Subsaariana, representando aproximadamente 75%, já no Brasil, conforme dados obtidos do Ministério da Saúde, 60 a 100 mil brasileiros convivem com os casos de doença falciforme, sendo distribuída de forma heterogênea, dependendo da região e da composição étnica da população. A DF predomina entre negros e pardos, apresentando maior incidência na região Norte e Nordeste estando entre 6 a 10%; enquanto na região Sul e Sudeste a prevalência é menor, de 2 a 3%. No Sudeste, a prevalência média de heterozigotos é de 2%, valor que sobe a cerca de 6-10% entre negros. Estima-se que há mais de 2 milhões de portadores do gene da HbS, somente no Brasil, e que mais de 8.000 são afetados com a forma homozigota (MELNIKOF, ALUSI, SANTOS, 2021).

A expectativa de vida de pacientes portadores do traço falciforme se assemelha ao da população geral. Ao contrário dos pacientes com AF (HbSS), os indivíduos com traço falciforme não apresentam sintomas fisiológicos nem alterações hematológicas, devido a concentração de HbA mais elevada que HbS, reduzindo assim as chances de complicações clínicas; alguns sinais clínicos são manifestados somente sob condições que propiciem o processo de falcização, como hipóxia, acidose e desidratação (WARE *et al.*, 2017).

A DF está ligada à descendência de populações originárias principalmente da África subsaariana, e também da Índia, da Arábia Saudita e de países mediterrâneos. Atualmente, encontra-se presente em grande parte da população mundial em prol do crescente fluxo migratório e à miscigenação dos negros (GONZALEZ, 2017).

**Figura 6 - Número de nascidos com Doença falciforme em 2015**



Fonte: Adaptado de Kato, 2018. Prevalência de nascidos com Doença falciforme por 100.000 nascimentos no mundo em 2015.

Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde (PNTN), estima-se, por ano, o nascimento de 700-1.000 novos casos anuais de doenças falciformes no país (Figura 6).

#### **4.2.3. Variantes da Doença Falciforme**

Segundo a Linha de cuidados em Doença Falciforme de 2021, desenvolvida pela Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo, as variantes da DF incluem a Anemia Falciforme (HbSS), o traço falciforme (HbAS), as associações de HbS com outras variantes de hemoglobinas, como, HbD, HbC, e as interações com talassemias (HbS/  $\beta^0$ talassemia, HbS/ $\beta$ +talassemia, HbS/ $\alpha$  talassemia).

A HbC possui uma alteração estrutural da cadeia  $\beta$ , resultante da mutação no códon  $\beta 6$ , assim como a HbS, ocorrendo a substituição de GAG para AAG, em que o ácido glutâmico é substituído por lisina. O HbSC não possui a capacidade de formar polímeros, não participando assim na formação de polímero desoxi-HbS, reduzindo assim o potencial de falcização da

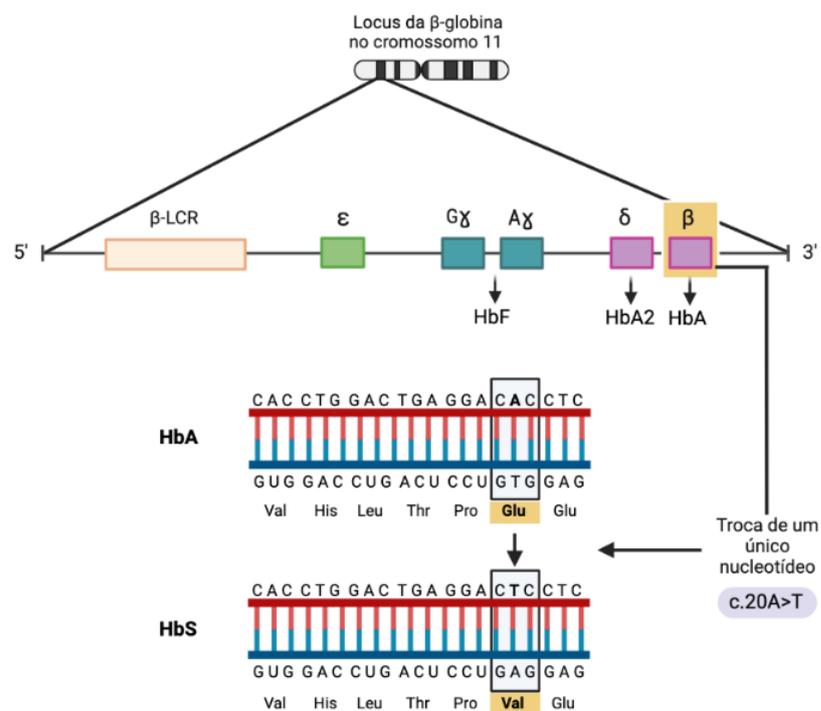
hemácia, e conseqüentemente, possuirá uma condição clínica benigna, apesar de possuir quase todas as complicações presentes na doença falciforme (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

Além dessas variações mais comuns, tem-se também a HbD, HbE, HbM e HbO, com menor frequência populacional. As duas primeiras sofrem substituição na cadeia  $\beta$  e do ácido glutâmico, mudando somente a posição e o aminoácido, e as duas últimas são exemplos de substituição da cadeia  $\alpha$  (SOARES *et al.*, 2017).

#### 4.2.4. Patofisiologia

Na Figura 7 pode-se observar uma representação esquemática da doença falciforme, ocasionada pela mutação c.20A>T em homozigose no gene da  $\beta$ -globina humana (HBB), em que ocorre uma alteração do códon de GAG para GTG, resultando na substituição do ácido glutâmico (Glu) por um aminoácido valina (Val) na sexta posição do gene, no cromossomo onze. Esta substituição produz uma molécula de hemoglobina anormal chamada hemoglobina S (HbS) (NUSSBAUM, MCINNES, WILLARD, 2016).

Figura 7 - Mutação c.20A>T no locus da  $\beta$ -globina



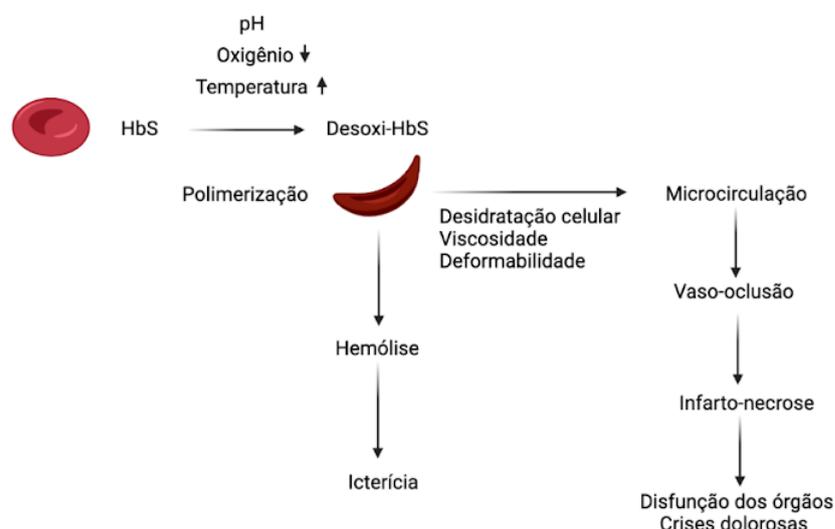
Fonte: Autoria própria. A hemoglobina normal A (HbA) é formada por duas subunidades  $\alpha$ -globina e duas subunidades de  $\beta$ -globina. Na HbS ocorre a substituição adenina-timina, o que resulta na troca ácido glutâmico por valina na posição 6 na cadeia  $\beta$ -globina.

A substituição de aminoácidos presente na HbS modifica a carga elétrica da molécula, pois a valina é um aminoácido de carga neutra e o ácido glutâmico apresenta carga negativa (PAULING *et al.*, 1949).

Essa troca abala a estrutura da molécula, em que o ácido glutâmico auxilia no afastamento das moléculas de hemoglobina desoxigenada, as quais se tornam agregados insolúveis no sangue indicando assim o impedimento do fluxo sanguíneo. E a entrada de valina favorece a polimerização e a formação de tactóides sob condições de baixo teor de oxigênio. Os tactóides são rígidos cristais capazes de deformar o eritrócito, fazendo com que assumam a forma de foice e ocasionando em quadros de hemólise intravascular (FIGUEIREDO, 2014).

No estado oxigenado, a molécula de HbS é solúvel, e nesta conformação estrutural as globinas estão mais separadas. No entanto, ao ser desoxigenada, a molécula de HbS torna-se alongada e as globinas aproximam-se. Essa mudança de conformação favorece o contato entre as regiões da desoxiemoglobina, o que não é possível no estado oxigenado; logo, vários tetrâmeros de HbS se unem e geram longos polímeros, alterando a morfologia do eritrócito para a forma de foice (Figura 8) (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

**Figura 8 - Representação esquemática da Doença falciforme**



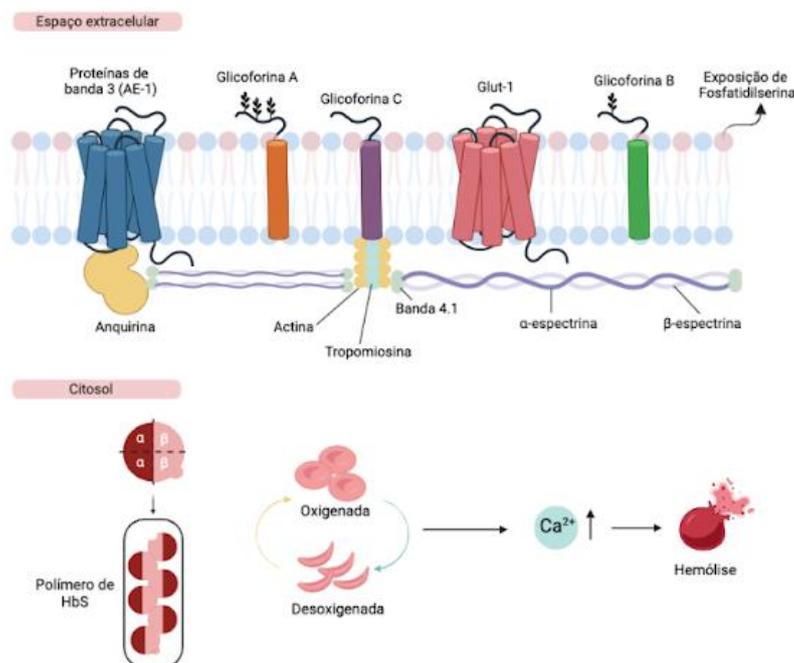
Fonte: Autoria própria. Fisiopatologia da anemia falciforme. A mutação no 6<sup>o</sup> códon do gene da  $\beta$  globina, leva a formação de uma hemoglobina anômala, a HbS, que pode sofrer polimerização reversível quando desoxigenada. O polímero falciforme danifica a hemácia e produz danos irreversíveis à membrana, diminuindo sua vida útil.

Ao perder seu formato discóide, conseqüentemente, a funcionalidade da bomba de sódio e potássio é prejudicada, havendo perda de potássio e água, e o aumento intracelular de cálcio, o que torna os eritrócitos mais densos e favorecendo o aumento de cristais de HbS e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

Essas alterações morfológicas e físico-químicas interferem na permeabilidade celular, além de provocarem lesões crônicas da membrana celular, a ponto do eritrócito tornar-se irreversivelmente falcizado, devido ao aumento da viscosidade e da obstrução mecânica dos vasos sanguíneos (AZEVEDO, 2019).

Conforme, BRUGNARA, 2003, na membrana ocorrem as seguintes alterações, como rearranjo das proteínas espectrina-actina, diminuição de glicoproteínas, geração de radicais livres, externalização da fosfatidilserina e aceleração da hemólise, devido ao aumento da atividade citosólica de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Figura 9).

**Figura 9 - Alterações da membrana eritrocitária de um paciente falciforme**



Fonte: Autoria própria. Representação da arquitetura da membrana eritrocitária, havendo no espaço extracelular, o rearranjo da espectrina-actina, diminuição de glicoproteínas, geração de radicais livres, externalização da fosfatidilserina. Já no citosol, devido as alterações na membrana, ocorrerá a polimerização de HbS, desencadeando no aumento da atividade de cálcio, o que acelera a hemólise, favorecendo, por conseqüência, a crise vaso-oclusiva.

#### 4.2.5. Sinais e sintomas

A principal manifestação da AF se dá por quadros de anemia crônica e a vaso-oclusão, sendo a frequência e severidade das crises vaso-oclusivas dolorosas a depender de cada paciente. Os polímeros formados podem lesar a estrutura da membrana do eritrócito levando a um fenômeno conhecido como hemólise, que se manifesta por quadros de palidez, icterícia, elevação dos níveis de bilirrubina indireta e do número de reticulócitos, e diminuição do número de eritrócitos, ocasionando, conseqüentemente, em um quadro de anemia (PICCIN, 2019).

Como resultado da hemólise, há o extravasamento do conteúdo citoplasmático do eritrócito e liberação de Hb e arginase, uma enzima responsável pela conversão de arginina em ornitina e ureia; a diminuição da concentração plasmática de arginina, que atua como substrato da enzima óxido nítrico sintase para produção de óxido nítrico (NO), juntamente, ao sequestro de NO pelo grupo heme presente na Hb liberada, promoverá a redução de seus níveis fisiológicos. Essa deficiência contribui para o caráter vasoconstritor, além de estar associada a diversas manifestações clínicas da AF, como hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de pernas e infarto (SILVA, CERCHIARO, HONÓRIO, 2011).

A vaso-oclusão é a responsável por grande parte das complicações, uma vez que é indicativa do aumento da adesão de células sanguíneas ao endotélio vascular, bloqueando a circulação nos microcapilares, causando isquemia dos tecidos. Na AF os eritrócitos contendo HbS apresentam maior adesão ao endotélio vascular ao serem comparados aos eritrócitos de indivíduos sadios, além de apresentarem formação de agregados leucocitários e células falciformes que contribuirão para a obstrução, resultando em hipóxia local, aumento da formação de polímeros de HbS e propagação da oclusão (SANTOS, CHIN, 2012).

O quadro inflamatório desencadeado pela injúria constante causada pelas células falciformes e agregados celulares à parede do endotélio vascular, contarão com a participação das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), os quais contribuirão para o aumento na expressão de moléculas de adesão que podem agravar o processo vaso-oclusivo. Esses fatores associados contribuem com os principais eventos

agudos que ocorrem na AF como síndrome torácica aguda, infarto esplênico, hipertensão pulmonar, retinopatia, priapismo, síndrome respiratória aguda, sequestro esplênico e dor. Nas crianças ocorre a síndrome das mãos e dos pés, também conhecida como dactilite, em que os dorsos das mãos e pés estão dilatados e extremamente dolorosos. Esses eventos diminuem a qualidade e a expectativa de vida dos portadores da doença (MELNIKOFF, ALUISI, SANTOS 2021).

Os pacientes falciformes apresentam períodos sem manifestações clínicas, podendo ser interrompida por manifestações agudas, como crises de falcização, crises vaso-oclusivas, episódios dolorosos, crises aplásticas, sequestro esplênico, além de suscetibilidade as infecções bacterianas, manifestações cutâneas, atraso no desenvolvimento físico e sexual, o qual pode ser aparente na primeira década de vida (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma complicação grave da anemia falciforme, afetando de 6 a 17% das crianças e adultos jovens. Pode ser resultante da oclusão dos principais vasos cerebrais ou hemorragia intracerebral ou subaracnóideo (SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019).

Quadros súbitos da anemia devem ser reconhecidos e tratados imediatamente, devido a rápida queda na concentração de hemoglobina, podendo ocasionar em manifestações cardíacas e pulmonares (TELEN, MALIK, VERCELLOTTI, 2018).

Podem ocorrer também crise de sequestro de sangue ocasionada pelo aumento do volume de sangue encontrado no baço, acarretando na hiperplasia compensatória da medula óssea e aumento rápido do baço. E crise aplásica, caracterizada pela insuficiência transitória da eritropoiese (MELNIKOFF, ALUISI, SANTOS 2021).

Com exceção dos sinais e sintomas já mencionados, podem haver demais complicações, como hepatobiliares, ocorrendo a formação de cálculos biliares consequentes da excreção contínua de bilirrubina proveniente de hemácias hemolisadas; lesões oculares resultantes da estase e oclusão dos pequenos vasos do olho pelos eritrócitos falcizados; ou condições constrangedoras ao paciente, como é o caso do priapismo, uma ereção

involuntária provocada pela vaso-oclusão dos corpos cavernosos e esponjosos do pênis (SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019).

Os rins de pacientes falciformes também são suscetíveis, devido a baixa tensão de oxigênio, pH ácido e alta tensão osmótica. Este tipo de ambiente facilita a ocorrência de falcização e infarto de medula renal, com consequente hematúria e incapacidade de concentrar urina, ocasionando na excreção reduzida de potássio e na elevação dos níveis de ácido úrico (TELEN, MALIK, VERCELLOTTI, 2018).

#### **4.2.6. Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico para a doença falciforme é realizado inicialmente por meio da triagem neonatal, estando associado ao aconselhamento genético, juntamente, a detecção de heterozigotos, tendo como finalidade esclarecer e conscientizar do risco reprodutivo, mesmo em casais heterozigotos (GUIMARÃES, COELHO, 2010).

O recém-nascido não necessita de cuidados específicos, uma vez que apresenta altos níveis de hemoglobina fetal (HbF), o qual o protegerá das manifestações da doença até o terceiro ou quarto mês. O diagnóstico precoce, como é o caso do teste do pezinho, reduz as crises da doença e a taxa de mortalidade, aumentando a expectativa de vida do paciente, sendo então encaminhado para o serviço de cuidados de atenção integral (REIS *et al.*, 2021).

Com esse objetivo, em 2001, o Ministério da Saúde incluiu em seu Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) a pesquisa de hemoglobinopatias, com o objetivo de identificar precocemente a prevalência de hemoglobinas variantes na triagem neonatal (MACEDA, 2018).

O Teste do Pezinho presente na triagem neonatal foi incorporada ao Sistema Único de Saúde (SUS) em 15 de janeiro de 1992 pela Portaria GM/MS n.º 22, exigindo a realização de testes para Fenilcetonúria e Hipotireoidismo Congênito a todos recém-nascidos (RN) vivos. Somente em 2001, a triagem para Hemoglobinopatias, principalmente a Anemia Falciforme foi incluída no programa.

O exame é realizado entre o terceiro ao sétimo dia de vida do recém-nascido, em que será coletada uma pequena quantidade de sangue da região

lateral do calcanhar, sendo predominante a presença de HbF, em 60 a 70% do total, o que não restringe a identificação do traço falcêmico ou da doença (SILVA, 2015).

A identificação precoce garante aos neonatos com diagnóstico positivo, tratamento e acompanhamento contínuo, tendo em vista reduzir as crises da doença, a morbidade e mortalidade, aumentar a expectativa de vida, além de evitar diagnósticos errôneos. Quando adultos, esses pacientes devem ter uma assistência especializada rotineira, além de realizarem uma avaliação da qualidade de vida por meio de uma escala Likert (REIS *et al.*, 2021).

As características básicas para o diagnóstico de AF são encontrados no hemograma, em que será avaliado a presença de eritroblastos, alteração do CHCM, presença de Corpúsculo de Howell Jolly e Pappenheimer, células em alvo, drepanócito, anisocitose, poiquilocitose, leucocitose indicativa de hemólise a qual ocasionará na atividade proliferativa compensatória da medula óssea, com conseqüente aumento na contagem microscópica de reticulócitos. O hematócrito e a hemoglobina estarão reduzidos visto que a HbS altera a forma da hemácia, o que culmina na diminuição do ciclo de vida. Na Tabela 1 é possível observar as alterações relatadas (ALMEIDA *et al.*, 2020).

**Tabela 1 - Alterações características da Anemia falciforme**

Exames laboratoriais	Valores esperados
Concentração de HbS	80 - 90%
Dosagem de HbF	2 - 20%
Dosagem de Hb	7 - 9 g/dL
Reticulócito	5 - 30%
Leucócitos	Acima de 10 mil
Plaquetas	Plaquetose
Fragilidade osmótica	Diminuída
Bilirrubina indireta	Acima de 5 mg/dL
Urobilinogênio	Elevado
Hematúria	Frequente
Ácido úrico sérico	Elevado
Ferro sérico	Normal ou aumentado
Ferritina	Elevado
Fosfatase alcalina sérica	Elevada nas crises

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2013.

O teste de falcização consiste na análise morfológica dos eritrócitos em baixa oxigenação, em uma solução de metabissulfito de sódio a 2%. O sangue

adicionado a essa solução será analisado na lâmina vedada com esmalte, em que as HbS sofrem deformação após algumas horas. Esse teste não é indicado devido a sua baixa sensibilidade, uma vez que diversos fatores podem interferir no resultado, como conservação de reagentes, execução da técnica, dentre outros (DUPSKI, 2017).

No teste de solubilidade é realizada a separação das hemoglobinopatias pela solubilidade uma vez que as HbA são solúveis e as HbS insolúveis, sendo visualizado por meio da opacidade que confere ao filtro de papel. Esse teste em neonatos é pouco utilizado devido a ocorrência de falsos negativos, uma vez que não houve a transição da HbF para HbA (ZANATTA, MANFREDINI, 2011).

A eletroforese de hemoglobina, retratada na Figura 10, é realizada em uma cuba com dois polos de cargas opostas, as quais estabelecerão uma corrente elétrica que impulsiona as proteínas a correrem em direção ao polo oposto, sendo assim, na HbS, há a troca de uma glutamina por uma valina, isto é, um aminoácido positivo por um neutro, o que leva à perda de uma carga positiva, causando mobilidade mais lenta da HbS em tampão alcalino, uma vez que comparada com a HbA; já na HbC ocorre a troca de uma glutamina por lisina, um aminoácido positivo por um negativo, ou seja, a perda de duas cargas positivas e, por isso, a HbC migra mais lentamente que a HbS (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

**Figura 10 - Representação esquemática da eletroforese de hemoglobina nas variações de DF**



Fonte: Manual Doença Falciforme, 2012.

A técnica realizada em tampão de pH alcalino é essencial para a detecção de hemoglobinopatias, no entanto, para a confirmação de quadros de HbS é necessário que outros métodos sejam realizados, como eletroforese em gel ácido, em que haverá a diferenciação da HbS e HbC que migram na mesma posição em pH alcalino; além dos testes de solubilidade e falcização, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou focalização isoeletrica (IEF) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A HPLC utiliza um princípio de troca catiônica entre a hemoglobina estuda e o tampão, e um sistema de alta voltagem automatizado que permite a separação nítida das bandas de hemoglobinas, identificando-as precisamente, permitindo um diagnóstico preciso. Já o IEF consiste em uma separação eletroforética, na qual as proteínas são separadas de acordo com as diferenças de seus pontos isoeletricos (pI), sendo submetidas a um campo elétrico, em que migrarão até atingirem uma posição estacionária, em que ficarão com carga total neutra. A utilização desses procedimentos em triagens de hemoglobinas anormais demonstra ótima resolução, nítida separação das bandas, além de apresentarem sensibilidade e especificidade elevadas (BERTHOLO, MOREIRA, 2006).

#### **4.2.7. Tratamento**

Os tratamentos profiláticos da doença falciforme possuem como objetivo evitar fatores que precipitam as crises, como anoxia, desidratação, infecções, estase da circulação, resfriamento da pele e infecções. Anti-inflamatório, analgésicos, ácido fólico, antibióticos e hidroxureia são as drogas indicadas, juntamente, a múltiplas transfusões (SILVA *et al.*, 2018).

##### **4.2.7.1. Tratamento farmacológico**

Dentre as condutas básicas de tratamento para a doença falciforme estabelecidas pelo Ministério da Saúde, de 2012, a hidroxureia (HU) tornou-se em 1995, o primeiro medicamento que, comprovadamente, previne complicações da DF.

A HU é um hidroxicarbonato inibidor que atua na inibição da enzima ribonucleotídeo redutase, induzindo a síntese de HbF e de óxido nítrico, e, conseqüentemente, a atividade da enzima guanilato ciclase, ocorrendo assim a elevação de níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc),

associada a redução de polímeros de HbS e na expressão de moléculas de adesão no endotélio, e conseqüente, queda dos quadros vaso-oclusivos (HOPPE; NEUMAYR, 2019).

Segundo a Portaria n.º 05, de 19 de fevereiro de 2018, a HU impacta positivamente na sobrevivência das pessoas com DF, reduzindo em 40% o risco de óbito, crises vaso-oclusivas, quadros de hospitalização e internação, e em 50% episódios de síndrome torácica aguda e da necessidade de transfusões constantes.

Apesar dos benefícios obtidos com o uso da HU, o mesmo se extingue após determinados períodos, tornando necessário o uso de doses mais elevadas, o que poderia aumentar o risco de toxicidade, além de também poder apresentar reações adversas e potencial risco carcinogênico, teratogênico e tóxico, sendo necessário o monitoramento de sinais e sintomas adversos após a utilização do fármaco (HIDROXIUREIA, 2017).

Devido a HbF não sofrer polimerização, o aumento de sua concentração previne a primeira etapa do processo fisiopatológico da doença, contribuindo para a prevenção das futuras complicações. Dessa forma, os agentes indutores de HbF com propriedades inibidoras da DNA metiltransferase, responsável pelo silenciamento do gene da  $\gamma$ -globina após o nascimento, são a 5-azacitidina e decitabina, derivados de ácido butírico, inibidores de histona deacetilase e agentes citotóxicos (FIGUEIREDO, 2007).

A 5-azacitidina foi uma das primeiras substâncias a demonstrar capacidade de promover aumento na síntese de HbF, entretanto, seu uso foi interrompido devido a efeitos deletérios graves como leucopenia, trombopenia, citopenia e potencial mutagênico induzido pelo fármaco. A 5-Aza-2'-deoxicitidina, conhecida como decitabina, apresentou capacidade similar de induzir à produção de HbF, com menor toxicidade e risco na indução de tumores, uma vez que comparada a 5-azacitidina (SANTOS *et al.*, 2012).

Ácidos graxos de cadeia curta, como ácido butírico também foram utilizados, porém após exposições prolongadas ao butirato, a produção de HbF diminuiu devido a problemas farmacocinéticos, como baixa absorção e meia-vida. A talidomida, usada na década de 60 como fármaco hipnótico e sedativo, assim como seus derivados, lenalidomida e pomalidomida, passaram a ser

estudados devido às suas propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias decorrentes da inibição do TNF- $\alpha$  (AERBANJINAI *et al.*, 2007).

#### **4.2.7.2. Tratamento hemoterápico**

Pacientes falciforme costumam apresentar quadros recorrentes de anemia, tolerando baixos níveis de hemoglobina; apesar desse quadro, a transfusão de sangue é realizada somente com condições específicas, como o caso de crise de sequestro esplênico, AVE (Acidente vascular encefálico), crise aplástica, preparação para cirurgia, gravidez, hipóxia com síndrome torácica aguda e priapismo; isso evita que o paciente seja exposto a agentes infecciosos e a sensibilização contra antígenos do concentrado de hemácias recebido (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

Preferencialmente, deve-se utilizar concentrados de hemácias filtrados e fenotipados para o sistema Rh e Kell, além de respeitar os antígenos contra os quais o paciente desenvolveu anticorpos. Na desleucocitação ocorre a remoção dos leucócitos presentes na unidade de hemácias. Esses procedimentos viabilizam a redução da incidência de reações febris transfusionais e aloimunização HLA (JESUS, ARAUJO, 2012)

Na sangria terapêutica parte do sangue do próprio paciente é removido, seguida de uma transfusão sanguínea; costuma ser requerida em casos de AVC, síndrome torácica aguda ou complicações da doença, visando evitar a hiperviscosidade sanguínea (GONZÁLEZ, 2021).

O objetivo da transfusão deve ser manter o nível de HbS abaixo de 30%, não ultrapassando o valor de 10,0 a 11,0 g/dL de hemoglobina, tendo em vista que o aumento da hemoglobina e hematócitos podem ocasionar no acúmulo de ferro e o aumento da viscosidade sanguínea, sendo assim uma desvantagem da técnica e um risco ao paciente (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2013).

Já o TCTH é considerado o tratamento mais eficaz no combate à doença falciforme, tendo como propósito restabelecer a hematopoese por meio da substituição de hemácias afetadas, evitando transfusões e a sobrecarga de ferro no sangue. O transplante pode ser feito a partir de células precursoras de medula óssea de um doador, sendo assim de forma alogênico; ou do sangue de cordão umbilical (JÚNIOR, 2015).

O risco do transplante está relacionado ao nível de mortalidade associado a infecções potencialmente graves, e a necessidade de doadores compatíveis, sendo que os índices de compatibilidade são reduzidos, tornando essencial a execução de métodos que auxiliem na seleção de doadores compatíveis (RODRIGUES *et al.*, 2010).

#### **4.2.7.2.1. Aloimunização**

A terapia transfusional vem sendo muito utilizada como tratamento de paciente com anemia falciforme desde a década de 1930, tendo como objetivo melhorar a capacidade de transporte de oxigênio e o fluxo sanguíneo na microcirculação, diminuindo assim a porcentagem de HbS e elevando o nível de hematócrito, prevenindo eventos de vaso-oclusão (STEINBERG, 1930).

A prevalência de aloimunização na população geral está entre 2 a 5%, já em pacientes com DF varia de 5 a 75%. Devido a constância de transfusões, complicações podem ser observadas como por exemplo, hemocromatose, aloimunização, aumentando assim a morbidade da doença (KARAFIN, WESTLAKE, HAUSER, 2018).

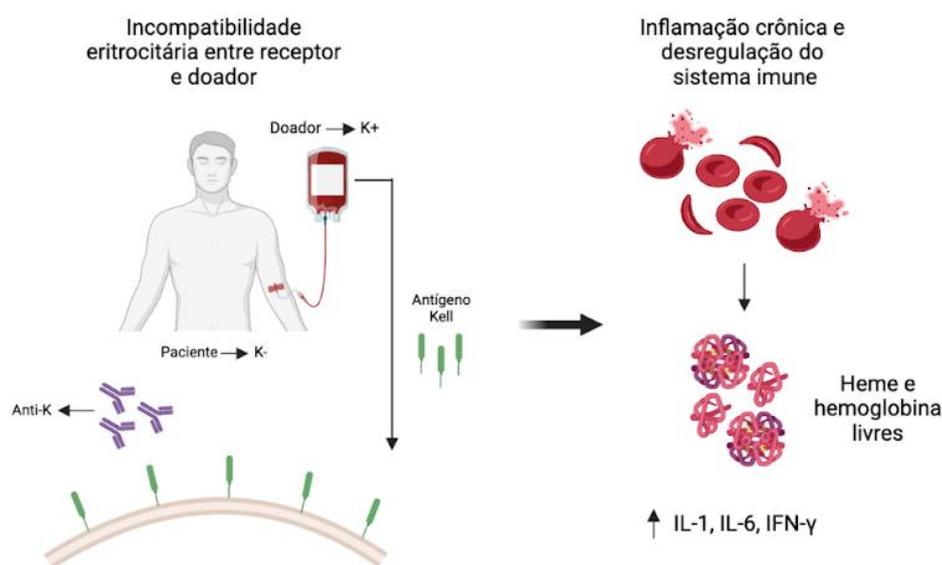
A aloimunização eritrocitária ocorre após uma transfusão, em que o paciente será sensibilizado, produzindo anticorpos direcionados contra antígenos das hemácias do doador, as quais são consideradas estranhas ao organismo. Sua ocorrência é o principal efeito adverso da transfusão eritrocitária, uma vez que aumenta o risco de reações transfusionais hemolíticas e leva a atrasos na identificação de unidades de hemácias compatíveis (FASANO *et al.*, 2019).

Isso implica que o concentrado de hemácia seja compatível em futuras transfusões, além da realização da fenotipagem dos grupos sanguíneos tornou-se fundamental para os pacientes com AF, com o objetivo de evitar casos de aloimunização e consequente reação transfusional hemolítica tardia (RTHT). Pacientes que contém anticorpos irregulares, isto é, anticorpos produzidos após estímulo antigênico por hemácias não próprias, devem receber concentrado de hemácias com fenótipo compatível (VIZZONI, MOREIRA, 2017).

Em um estudo realizado em 2012 destacou que o risco de aloimunização está associado ao número de transfusões sanguíneas

realizadas, devido à maior exposição dos pacientes aos antígenos eritrocitários. Os aloanticorpos mais prevalentes estão relacionados ao sistema Rh, Kell, por serem esses os mais imunogênicos, sendo obrigatório segundo a Portaria nº 473, de 26 de abril de 2013 a transfusão de concentrado de hemácia compatível em relação a esses sistemas. Além disso, recomenda-se quando possível respeitar também os antígenos Fy(a), Fy(b), Jk(a), Jk(b), S, e s, uma vez que esses também estão relacionados a aloimunização em DF (Figura 11) (BOATENG, CAMPBELL, DAVENPORT, 2019).

**Figura 11 - Fatores contribuintes para a aloimunização**



Fonte: Adaptado de Linder, Chou, 2021. A hemólise em pacientes falciformes conduz a níveis elevados de hemoglobina circulante e heme livre, ativando os macrófagos e neutrófilos, o que conduz à secreção de citocinas pró-inflamatórias, tornando-os mais suscetíveis a aloimunização.

### 4.3. Aplicabilidade da terapia gênica

A terapia gênica é entendida como a capacidade de melhoramento genético por meio da correção de genes ou sítios-específicos mutados, como é o caso de imunodeficiências, hemoglobinopatias, fibrose cística entre outras (GONÇALVES *et al.*, 2017).

A base da terapia gênica para hemoglobinopatias envolve a inserção de um transgene de globina nas células-troncos do paciente, a qual irá introduzir

uma cópia adicional de um gene de globina ou um gene de globina projetado para reduzir a gravidade da anemia falciforme (FORONI *et al.*, 2022).

A mesma tem se mostrado altamente eficaz, específica e de fácil manipulação, sendo possível substituir os genes mutados por meio de um carreador molecular denominado vetor; estes podem ser plasmidiais, nanoestruturados, virais ou não virais, sendo responsáveis por aumentar as funções normais, corrigir deficiências ou inibir atividades deletérias, além de realizarem modificações em múltiplos locais genômicos simultaneamente, utilizando RNAs guia em paralelo dentro de uma mesma célula (DOUDNA, CHARPENTIER, 2014).

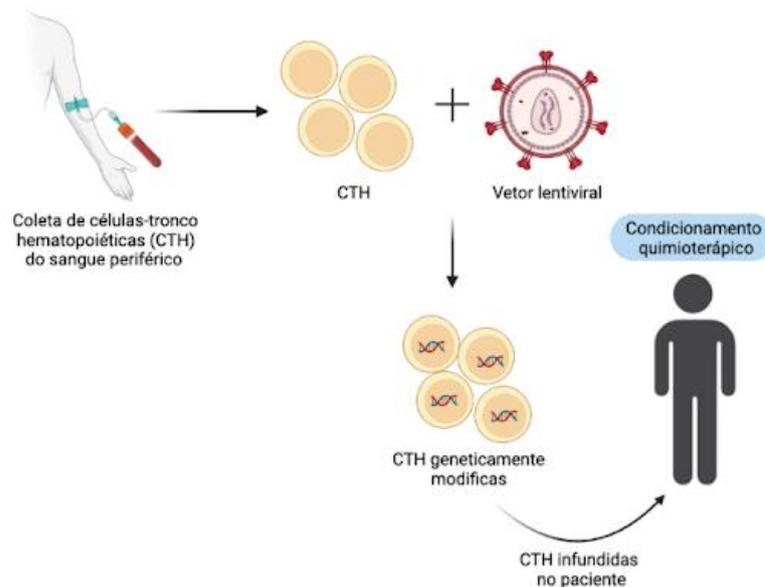
Utiliza-se comumente o vetor viral, o qual fornece material genético artificial com uma eficiência muito elevada, além de possuir uma alta variabilidade, como o gammaretrovírus, adenovírus, vírus adeno-associado (AAV) e o lentivírus. A depender da natureza da terapia, os vetores virais podem ser escolhidos com base na sua capacidade de integração no genoma das células hospedeiras, sendo dessa forma, os lentivirais os mais aplicados; baseados no vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), possuem genotoxicidade e oncogênese reduzida e são capazes de infectar células quiescentes (MALIK, 2016).

A anemia falciforme é causada por uma alteração no código de DNA do gene da beta-globina, sendo então, a terapia gênica utilizada como uma estratégia potencialmente curativa, em que a timina seria transformada em adenina no códon 6 do gene da beta globina mutado. O desafio inicia-se no desenvolvimento de uma estratégia eficiente de transferência de genes para as CTH que resulte em uma produção suficiente de células modificadas por genes que conduza à resolução de doenças (ABAHAM, JACOBSON, BOLLARD, 2017).

Segundo observado na Figura 12, o ponto focal da terapia gênica inicia-se na coleta de células-tronco hematopoiéticas do paciente, podendo ser da medula óssea, sangue periférico, ou sangue do cordão umbilical. As células são expostas a uma terapia que consiste na inserção de um gene adicional da globina  $\beta$  ou  $\gamma$  por meio de um vetor lentiviral que se integra no genoma da célula hospedeira. As células modificadas são transplantadas no paciente,

proliferando-se e reabastecendo o compartimento hematopoético (MALIK, 2016).

**Figura 12 - Processo de produção de CTH modificadas**



Fonte: Autoria própria. Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas modificadas geneticamente.

A terapia é realizada em três etapas, primeiramente é realizada a coleta de CTH, a qual será exposta a terapia gênica, em que as células falciformes serão modificadas; após o paciente ser condicionado ao tratamento quimioterápico, as células-tronco modificadas são transplantadas de volta ao paciente. A modificação das CTH ocasiona no repovoamento do compartimento hematopoético, produzindo correções nas hemácias falciformes (CHANDRAKASAN, MALIK, 2014).

Os vetores virais são a maneira mais eficiente de entregar os genes na CTH, sendo capazes de transcrever seu genoma e integrá-lo ao genoma hospedeiro, podendo ocorrer de duas formas, por meio da terapia com adição de globina anti-falcizante, ou revisão de genes, em que ocorre a correção mediada da mutação da foice ou ativação da HbF usando núcleos direcionados ao local (FINER, GLORIOSO, 2017).

Após a descoberta do vírus HIV, vantagens para transdução de células não divididas por meio dos vetores retrovirais, foram obtidas, como a capacidade de sustentar uma auto inativação sem perder seu potencial. A

expressão de transgenes ao ser impulsionada por promotores específicos, minimiza o potencial de oncogenes de inserção, resultando na expressão específica de tecido (GOODMAN, MALIK, 2016).

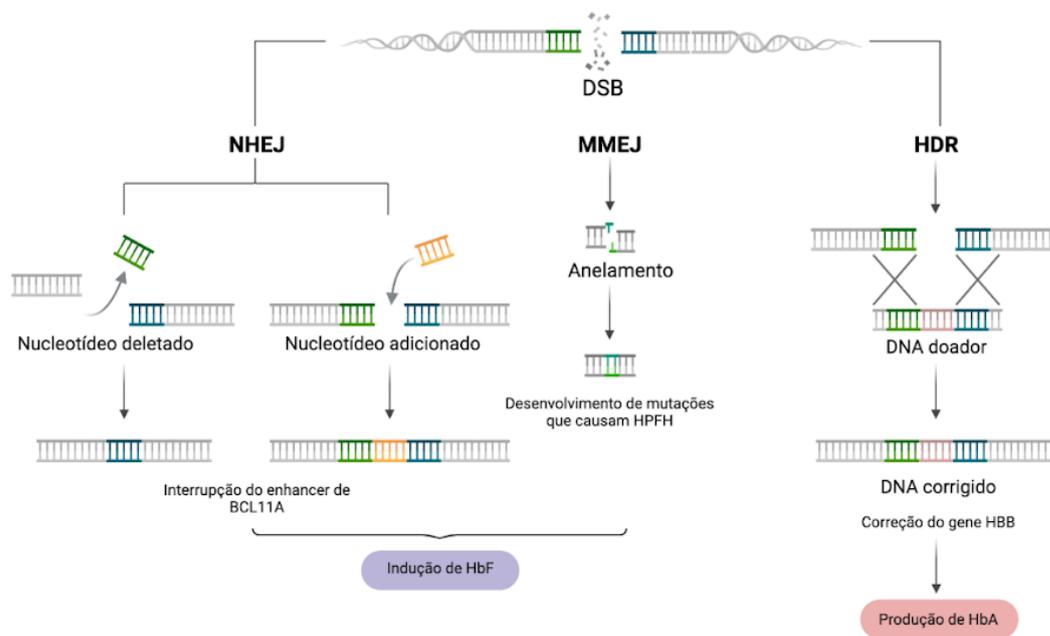
Com esse objetivo, foram desenvolvidos genes de b-globina humana sintética, simulando os aminoácidos anti-falcizantes da  $\gamma$ -globina. O gene bT87Q, desenvolvido pela *Bluebird Bio Company*, sofre uma alteração na 87<sup>a</sup> treonina para glutamina no gene da b-globina, por meio de uma lentiglobina, simulando a glutamina pré-enviada em  $\gamma$ -globina, ocorrendo a correção da AF em ratos. Já o gene bAS3 incorporou 3 substituições de aminoácidos na b-globina (T87Q, E22A e G16D), o que tornaria a b-globina com as mesmas propriedades anti-falcizantes da  $\gamma$ -globina, resultando na correção do fenótipo da foice em camundongos (URBINATTI *et al.*, 2015).

Embora conferindo propriedades anti-falcizantes à b-globina, um gene que naturalmente se expressa pós-natal, dois grupos desenvolveram um lentivírus capaz de expressar a própria  $\gamma$ -globina pós-natal, uma vez que a  $\gamma$ -globina não é imunogênica, está naturalmente presente, e possui grande potencial anti-falcizante. Jayavaradhan e Malik (2018) substituíram os éxons da b-globina por exons da  $\gamma$ -globina, e este vetor  $\gamma$ -globina, que continha as sequências não codificadoras de b-globina e b-promotor, mostrou expressões elevadas de HbF.

#### **4.3.1. Edição de genes usando nucleases**

Com o propósito de corrigir as mutações, diferentes nucleases dirigidas ao local foram utilizadas, uma vez que são capazes de realizar quebra de fita dupla do DNA (DSB), sendo estas as ZFNs, nucleases de dedo de zinco (*Zinc finger nuclease*), TALENs, nucleases efetoras semelhantes a ativador de transcrição (*Transcription activator-like effector nucleases*) e CRISPR/Cas9, sendo possível verificar a comparação desses sistemas na Tabela 2. Após a indução da DSB, a célula repara os DSBs geralmente por 3 mecanismos: NHEJ, união de extremidades não-homóloga (*Non-homologous end joining*), MMEJ, união final mediada por microhomologia (*Microhomology-mediated end joining*), e HDR, recombinação homóloga dirigida (*Homology directed repair*), representados na Figura 13 (FERREIRA; GOUVÊA, 2018).

**Figura 13 - Mecanismos de reparação de DSB**



Fonte: Adaptado de Jayavaradhan, 2018. Estratégias de edição de genoma para correção de mutação falciforme ou reativação da expressão endógena de  $\gamma$ -globina. As quebras de fita dupla de DNA (DSB) induzidas por TALEN, CRISPR/Cas9 ou ZFN podem ser reparadas principalmente pelos mecanismos de reparo de DSB das três células. O mecanismo de reparo de junção de extremidade não homóloga (NHEJ) é explorado para causar interrupção do intensificador de BCL11A ou junção de extremidade mediada por microhomologia (MMEJ) para gerar mutações que causam persistência hereditária da hemoglobina fetal (HPFH). Tanto a ruptura do intensificador BCL11A quanto as mutações HPFH induzem HbF. A correção gênica utiliza o reparo dirigido por homologia (HDR) para substituir a mutação que causa AF para a sequência normal, produzindo hemoglobina adulta normal.

As ZFNs reconhecem sequências de DNA específicas, em que por meio de uma enzima de restrição FokI o DNA será clivado após a dimerização. Ao direcionar ZFNs para ambos os lados do local de corte desejado, ocorre a dimerização de FokI, ativando sua atividade de nuclease e criando o DSB (SAHA *et al.*, 2018).

As ZFNs conferem ao fator de transcrição a capacidade de ligar sequências específicas em promotores de genes, de tal forma que as ZFNs visam uma sequência desejada no genoma, e ao se fundirem, criam um DSB no local, ligando assim o DNA. Para reduzir o DSB fora do alvo, os ZFNs foram projetados em dois conjuntos fundidos com a endonuclease FokI, para que cada uma reconheça uma sequência contínua de DNA. Somente quando a

ligação de ambos os conjuntos ocorrer, haverá o reconhecimento do DNA, e só então o FokI dimerizará e causará um DSB no local de ligação. Assim, os ZFNs combinam a capacidade de ligar sequências específicas de DNA e clivá-los (ZOU *et al.*, 2011).

Em 2015, foi demonstrado que os ZFNs corrigiam *in vitro* aproximadamente 18% dos alelos falciformes para alelos do tipo selvagem em CTH derivadas de pacientes falciformes. Apesar dos resultados positivos obtidos, somente 10% a 20% das modificações do gene nas CTHs, quando transplantados em ratos imunodeficientes, obteve 1% de gravação *in vivo*, o que sugere perda de potencial de repovoamento ao longo prazo (SEBASTIANO *et al.*, 2011).

As TALENs são proteínas diméricas, secretadas pelas bactérias *Xanthomonas*, as quais reconhecem sequências de DNA por meio de um domínio central que consiste em um número variável de repetições de aminoácidos. Os TALENs são semelhantes aos ZNFs na medida em que utilizam elementos de ligação de DNA, direcionando o mesmo nucleotídeo para clivar o genoma em um local específico, reconhecendo um único nucleotídeo (JOUNG, SANDER, 2013).

Os TALENs contêm vários domínios de ligação ao DNA organizados em tandem (repetições TALE), estando ligados a um domínio catalítico FokI. Cada domínio de ligação contém dois aminoácidos definidos que são capazes de reconhecer um par de bases de DNA específicas (BEDELL *et al.*, 2012).

A complexidade do desenvolvimento da terapia com ZFNs é uma desvantagem, o que torna a procura de outras técnicas mais viáveis e práticas, como é o caso dos TALENs, que possuem uma vantagem sobre os ZFNs, uma vez que as interações entre os domínios de ligação de DNA derivados de TALEN e seus núcleos alvo poderiam ser projetados modularmente, tornando sua construção muito mais simples do que projetar ZNFs (ARCHANJO *et al.*, 2021).

Entretanto, uma comparação entre ZFNs, TALENs e CRISPR/Cas9, mostrou que o CRISPR/Cas9 tem melhor eficiência de corte no locus HBB em comparação com os demais, podendo ser observado na tabela 2 uma análise entre as vantagens e desvantagens de cada técnica (XU *et al.*, 2015).

**Tabela 2 - Comparação entre as principais nucleases usadas na edição gênica**

<b>Nuclease</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>ZFN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• As quebras de fita dupla do DNA podem ser feitas tanto pelo HDR, quanto por NHEJ;</li> <li>• Pode ser usada em células-tronco pluripotentes ou somáticas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caro;</li> <li>• Trabalhoso;</li> <li>• Mutações induzidas;</li> <li>• Necessita de regiões ricas em guanina.</li> </ul>
<b>TALEN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• As quebras de fita dupla do DNA podem ser feitas tanto pelo HDR, quanto por NHEJ;</li> <li>• Customizável.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Difícil construção plasmática, devido ao tamanho;</li> <li>• Domínio FokI utilizado não é específico;</li> <li>• Mutações induzidas.</li> </ul>
<b>CRISPR-Cas9</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema simples;</li> <li>• Acessível;</li> <li>• As quebras de fita dupla do DNA podem ser feitas tanto pelo HDR, quanto por NHEJ.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutações induzidas;</li> <li>• Uso de vetores virais.</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Listik e Carmo, 2016.

#### 4.3.1.1. CRISPR/Cas9

Em 1980 foi identificado um locus com padrão incomum no genoma da bactéria *Escherichia coli*, constituído por sequências repetidas, espaçadas e intercaladas, sem função conhecida. Após estudos, constatou-se que as sequências eram de origem extracromossomal e atuavam como uma memória imunológica (MARRAFFINI, SONTHEIMER, 2010).

Emanuelle Charpentier e Jennifer Doudna iniciaram um projeto de pesquisa básico com o objetivo de desvendar como as bactérias atacam as infecções virais. Observaram que as bactérias possuem um sistema imunológico adaptativo, chamado *CRISPR* e *Cas9*, em que ocorre o reconhecimento de material genético invasor, clivando-o em fragmentos e integrando-o ao seu DNA. Em caso de reinfecção pelo mesmo agente, há transcrição do *locus* CRISPR, processamento do RNAm e criação de fragmentos de RNA sendo formados complexos com as proteínas Cas, que identificam e destroem os ácidos nucleicos estranhos (OLIVEIRA, 2016).

A Cas9 pode codificar uma família de proteínas que apresentam domínios funcionais típicos de nucleases, helicases, polimerases e proteínas de ligação a polinucleotídeos, contribuindo assim para o funcionamento integral do locus (CAETANO *et al.*, 2018).

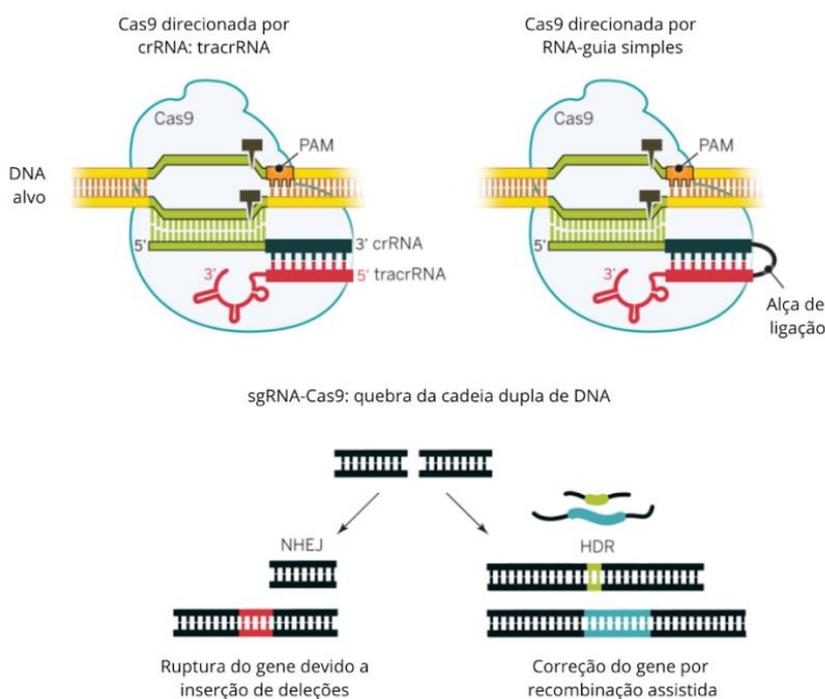
Dessa forma, o CRISPR é uma tecnologia que permite editar as sequências de DNA alvo-específica do genoma pela ação da nuclease Cas9, responsável por clivar o DNA dupla fita, o RNA que guiará o complexo ao alvo, e o DNA alvo. Por meio dessa edição, tornou-se possível que ocorra a substituição do DNA mutado em pacientes falciformes por uma versão saudável. O sistema CRISPR/Cas9 detecta o DNA viral e produz dois RNAs curtos, em que um deles será a sequência do vírus (GONÇALVES, PAIVA, 2017).

A edição de sequências de DNA alvo-específica do genoma torna-se viável pela ação de 3 moléculas, a nuclease Cas9, que será responsável pela clivagem do DNA dupla fita; um RNA guia, guiando o complexo até o alvo; e o DNA alvo (CONG *et al.*, 2013).

O sistema CRISPR/Cas9 é a mais recente ferramenta de edição de genoma devido a sua facilidade de uso. A Cas9 é guiada para um local específico no genoma por um único guia RNA (sgRNA), levando uma homologia de 20-bp para a sequência alvo. Assim, basta alterar a sequência de reconhecimento do sgRNA de 20-bp para a sequência do gene alvo desejado (XU *et al.*, 2015).

Ao contrário dos outros nucleases, o Cas9 utiliza o RNA para orientar o reconhecimento da sequência alvo. Após a clivagem, os subsequentes mecanismos endógenos de reparação eucariótica podem ser simplificados em 2 vias, NHEJ e HDR, conforme observado na Figura 14 (DEWITT *et al.*, 2016).

**Figura 14 - Mecanismo do Sistema CRISPR-Cas9**



Fonte: Adaptado de Doudna, Charpentier, 2014. Diferentes estratégias para a introdução de DNA, em que a quebra da fita dupla se torna alvo das máquinas de reparação de DNA celular endógeno que catalisam a união final não homóloga (NHEJ) ou a reparação dirigida por homólogos (HDR). O Cas9 funciona como uma proteína de ligação de DNA guiada por RNA quando projetada para conter mutações inativas em ambos os seus locais ativos.

Com o objetivo de projetar o CRISPR para atingir a mutação falciforme, foi realizada uma análise bioinformática detalhada do local de implantação do HBB. Os locais alvos mostraram que o direcionamento de introns poderia ter menos efeitos fora do alvo em comparação com os éxons, uma vez que os introns continham menos polimorfismos de nucleotídeos únicos, tornando um projeto CRISPR aplicável a mais pessoas (DEVER *et al.*, 2016).

Hoban *et al.*, 2015, mostrou que a correção da mutação da foice mediada por ZFN e TALEN foi de 10%, já as taxas de correção *in vitro* utilizando o sistema CRISPR/Cas9 no CD34+ derivado das células-tronco da medula óssea de pacientes falciformes foram as que obtiveram os maiores índices de correção monoalélica, em que a mutação foi corrigida em 20% das colônias de CTH, além de ter melhor eficiência de corte no *locus* HBB.

A aplicação dessa terapia no TCTH alogênico, segundo Nowogrodzki (2018), tem ganhado força devido às vantagens obtidas, como a não ocorrência de DECH, uma vez que os linfócitos derivados das CTH

reinfundidas toleram os antígenos do receptor, os quais são próprios, aumentando a sobrevida global ao transplante. Concomitantemente, em prol da ausência de DECH, o uso de imunossupressores não é necessário no pós-transplante, o que reduz o risco às infecções.

#### **4.3.1.2. Reativação da hemoglobina fetal usando edição gênica**

Em um estudo multicêntrico de 2008, englobando 3.578 pacientes, conduzido por Platt, foi observado que em grande maioria, a frequência de crises dolorosas estava relacionada com níveis de HbF mais baixos e que o aumento desse, mesmo pequeno, poderiam diminuir o número de crises dolorosas, e conseqüentemente, ocasionar em uma maior sobrevida. O HbF possui um potencial anti-falcizante, o que torna fundamental o encorajamento de estudos com hidroxiureia e outros indutores da síntese de HbF.

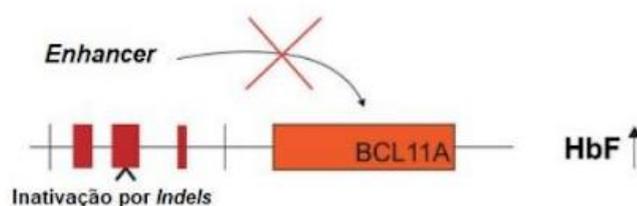
A célula produz a forma adulta de hemoglobina HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) ou a forma fetal HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ). A HbF é a principal proteína transportadora de oxigênio encontrada no feto humano em desenvolvimento e persiste no recém-nascido por aproximadamente 6 meses. Normalmente, a produção de HbF é desligada no recém-nascido e a HbA é ligada. Em crianças falciformes o HbA é substituído pelo HbS devido a uma mutação da cadeia b-globina. Os sintomas associados à AF são aliviados se a HbF continuar sendo a forma predominante de hemoglobina após o nascimento (FORONI *et al.*, 2022).

Foram experimentadas estratégias terapêuticas destinadas a induzir a síntese de HbF, sendo utilizado como alvo terapêutico o gene BCL11A, leucemia de células-B 11A (*B-cell lymphoma/leukemia 11A*/linfoma), um fator de transcrição que reprime a  $\gamma$ -globina pelo mecanismo de união de extremidades não homólogas, ocasionando dessa forma, no aumento da expressão do HbF nas CTH modificadas, obtidas pelo transplante alogênico (PIEL, STEINBERG, REES, 2017).

Uma abordagem alternativa para a indução de HbF, pode ser por meio de um RNA de interferência para realizar a inibição pós-transcricional do BCL11A, utilizando um vetor lentiviral contendo RNA direcionado, sendo possível assim derrubar o BCL11A nas células eritróides, resultando na expressão de HbF maior que 50% e na reversão do fenótipo da foice (GUDA *et al.*, 2015).

Canver *et al.*, 2015, concentrou em um trecho de DNA um sistema que reduz a expressão do repressor BCL11A, com o propósito de aumentar a expressão de HbF, segundo analisado na Figura 15. O sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para cortar sistematicamente pequenas seções de DNA ao longo de todo o comprimento das CHT, levando ao aumento na produção dos níveis de HbF em células adultas. O sistema oferece edição de genoma altamente flexível, em que o Cas9 requer uma homologia extensa para que a clivagem ocorra, minimizando a clivagem fora do alvo.

**Figura 15 - Representação gráfica de aumento de HbF por meio da introdução de inserções ou deleções no *enhancer* de BCL11A**



Fonte: Romero, Dewitt, Walterns, 2018. Introdução de *indels* no enhancer de BCL11A, promove *knockdown* de repressor e desinibe a transcrição de HBG, elevando os níveis de HbF.

Acerca disso, por meio de inserção de células CD34+ modificadas com vetor lentivírus espera-se diminuir a inibição do BCL11A em pacientes falciformes, levando a uma maior proteção contra eventos agudos ou crônicos da doença causados pela polimerização da HbS, uma vez que HbF evita o processo de afoijamento (BRENDDEL *et al.*, 2016).

Os pacientes que se submeteram à terapia gênica tiveram taxas estáveis e elevadas de HbF após a infusão comparadas ao período anterior da infusão; além disso, pacientes falciformes com altos títulos de HbF possuem menos crises vaso-oclusivas em razão da afinidade ao oxigênio. Esses resultados tornam a crer que o risco benefício se mostra favorável nessa modalidade de gene terapia (ESRICK *et al.*, 2021).

A transcrição de HBG pôde ser aumentada em até 30 vezes após a deleção do domínio de ligação de BCL11A no promotor de HBG. CTH de camundongos transgênicos foram transduzidos para o locus  $\beta$ -globínico com adenovírus codificando sgRNA e foram capazes de deletar a mutação

TGACCA em 50% das células tratadas após ação da nuclease e reparo NHEJ. A ausência dessa sequência impede a ligação de BCL11A ao promotor de HBG, sendo assim, a ação repressora inibida (LI *et al.*, 2018).

A persistência hereditária da HbF (HPFH) é uma condição benigna na qual as mutações ocorrem naturalmente na região que regula a expressão do gene HBG, resultando no aumento da expressão da HbF. O sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para gerar uma persistência induzida de HbF no promotor da  $\gamma$ -globina. A reativação de HbF foi associada com níveis reduzidos de HbS e melhoria da AF *in vitro*, entretanto, a eficiência da edição *in vivo* e os efeitos potenciais fora do alvo desta abordagem devem ser estudados (TRAXLER *et al.*, 2016).

Hoban *et al.* (2015) desenvolveu um projeto, empregando por meio da eletroporação a introdução do mRNA transcrito *in vitro* pelo ZFN, clivando a mutação da foice no locus  $\beta$ -globina. Utilizando um modelo de doador homólogo, obtiveram altos níveis de modificação genética no CD34+ de CHT em pacientes falciformes. As células CD34+ modificadas foram capazes de produzir tetrâmeros de hemoglobina do tipo selvagem tanto *in vitro* quanto *in vivo* quando implantadas em camundongos imunodeficientes.

Quando expressos em células, os ZFNs clivam o DNA de uma maneira específica de sequência e levam a quebra de fita dupla. Quando o ZFN é aplicado junto com um modelo de doador contendo a base corretiva, a célula pode realizar uma reparação homóloga dirigida para corrigir permanentemente o genoma da célula. Como resultado da análise genômica, obteve-se em 18% das leituras a correção genética da mutação falciforme (HOBAN *et al.*, 2015).

#### **4.4. Protocolos atuais em andamento**

Conforme pesquisas realizadas no ClinicalTrials.gov, em 2022, utilizando as palavras-chave "Anemia Falciforme", "Terapia Gênica", existem ao total 919 estudos em andamento sobre a doença falciforme, sendo 40 somente de terapia gênica aplicada no tratamento de AF; 12 protocolos encontram-se com status completo, 6 ativos, 21 com recrutamento em aberto, 1 aguardando início. Esses estudos clínicos estão distribuídos entre a Europa e os Estados Unidos, estando ausentes no Brasil. Na Tabela 3 é possível verificar o desenvolvimento dos principais protocolos envolvendo terapia gênica

utilizando lentivírus e CRISPR/Cas9 em potencial para o tratamento de pacientes falciformes.

**Tabela 3 – Principais protocolos clínicos utilizando terapia gênica**

	Protocolo	Participantes	Intervenção	Fase	Situação
Indução de HBG	NCT04443907	20	Inibição de BCL11A por CRISPR-Cas9	1/2	Recrutando
	NCT03745287	45	Inibição de BCL11A por CRISPR-Cas9	1/2	Ativo
Adição de genes globínicos	NCT04293185	35	Lentivírus codificador de globina $\beta$ T87Q	3	Recrutando
	NCT02247843	6	Lentivírus codificador de globina $\beta$ T87Q/ E22A/ G16D	1/2	Recrutando
	NCT02186418	7	Lentivírus codificador de globina $\beta$ T87Q	1/2	Ativo
	NCT04774536	9	Substituição da $\beta$ -globina por CRISPR/Cas9	1/2	Sem recrutamento no momento

Fonte: Adaptado de Clinical.Trials.gov

A eficácia e segurança são aspectos fundamentais a serem analisados nos estudos clínicos, sendo estabelecidos a marcação vetorial, expressão transgênica e reconstituição hematopoiética como medidas determinantes do sucesso da terapia genética em pacientes falciformes, além de sobrevivência, hospitalizações, crises dolorosas, e outros eventos associados a anemia (ARCHER, GALACTEROS, BRUGNARA, 2015).

Em 1994, McCune *et al.* apresentou os indícios de que uma hemoglobina recombinante teria a capacidade de inibir a falcização das hemácias de modo similar à HbF. Dessa forma, a adição de HbAS2 com mutação T87Q à solução de HbS, seria capaz de atrasar a formação de polímeros de HbS em ambiente hipóxico (5% de pO<sub>2</sub>) assim como a HbF.

Seguindo essa linha de raciocínio, em 2003, Levasseur *et al.* desenvolveu a ideia de que uma única dose de CTH autólogas transduzidas por vetor lentiviral contendo sequência codificadora para HbAS com mutações T871, E22A e G16D, seria capaz de corrigir o fenótipo falciforme em camundongos. O transplante autólogo aumentou a contagem total de eritrócitos e hemoglobina total.

A Bluebird Bio, uma empresa de biotecnologia, é a primeira a tratar um paciente falciforme com terapia gênica. Na França e nos Estados Unidos, o vetor LentiGlobin BB305 foi utilizado para tratar pacientes falciformes, com o objetivo de avaliar a sua segurança e eficácia. Esse vetor utiliza LCR modificado e elementos reguladores promotores da b-globina, transferindo um gene de beta globina artificial  $\beta A(T87Q)$ . Os pacientes são condicionados ao tratamento com busulfan seguido do transplante de células autólogas da medula óssea, as quais foram geneticamente modificadas (CAVAZZANA *et al.*, 2015).

A  $\beta$ -globina T87Q é um valioso biomarcador de eficácia biológica em ensaios clínicos em humanos, sendo suas propriedades anti-falcizantes comparáveis ou ligeiramente inferiores às da  $\gamma$ -globina. Sendo assim, é provável que a expressão de beta globina artificial  $\beta A(T87Q)$  entre 20% e 30%, preferencialmente com variação moderada na expressão, satisfaça o limiar mínimo para prevenir a maioria das manifestações clínicas e complicações da DF em homozigotos (NEGRE *et al.*, 2016).

As crianças com AF tratadas na França apresentaram benefícios clínicos durante o primeiro ano de tratamento, com quase metade das cadeias de globina compostas de  $\beta(T87Q)$ , e permanece completamente livre de sintomas de AF. Já os pacientes adultos tratados nos Estados Unidos, mostraram apenas aumentos modestos de  $\beta(T87Q)$ , e não tiveram um benefício clínico significativo, possivelmente devido ao menor número de células hematopoiéticas em adultos, e à gravação indevida das células modificadas geneticamente. Entretanto, o tratamento dentro de 12 meses após o transplante poderia ocasionar na seleção positiva de genes modificados (BERNAUDIN, VERLHAC, LATOUR, 2020).

O tratamento  $\beta(T87Q)$  foi utilizado em um paciente de 13 anos com histórico de múltiplas crises vaso-oclusivas, infarto silencioso e síndrome torácica aguda, obtendo-se resultados positivos, como a reconstituição policlonal, e interrupção das transfusões sanguíneas após 3 meses de terapia. Após 9 meses sua hemoglobina é de 11,4 g/dL, além de não apresentar sintomas graves (KANTER *et al.*, 2015).

Nos Estados Unidos, outros ensaios clínicos estão sendo desenvolvidos, como é o caso do NCT02247843, conduzido por Kohn e colegas, em que está

sendo investigada a eficácia do vetor Lenti-bAS3-FB40 usando condicionamento mieloablativo com busulfan. Já o ensaio NCT02186418 conduzido por Jayavaradhan e Malik está testando a eficácia do sGb GM  $\gamma$ -globina vetor lentiviral, por meio do uso de outro agente quimioterápico, o Melfalano, com intensidade reduzida (JAYAVARADHAN, MALIK 2018).

No ensaio NCT03745287, avaliou-se a segurança e eficácia de CTX001 em indivíduos com doença falciforme grave, os quais receberam o TCTH baseado na inibição de BCL11A por CRISPR-Cas9; estes apresentaram remissão da doença nos primeiros 6 meses de avaliação, com aumento dos níveis de HbF e não desenvolveu crise vaso-oclusiva. O sgRNA foi programado para que a Cas9 pudesse viabilizar a deleção do *enhancer* de BCL11A, isto é, o modulador da transcrição, para que assim, a transcrição do repressor de  $\gamma$ -globina fosse inibida (CORBACIOGLU *et al.*, 2020).

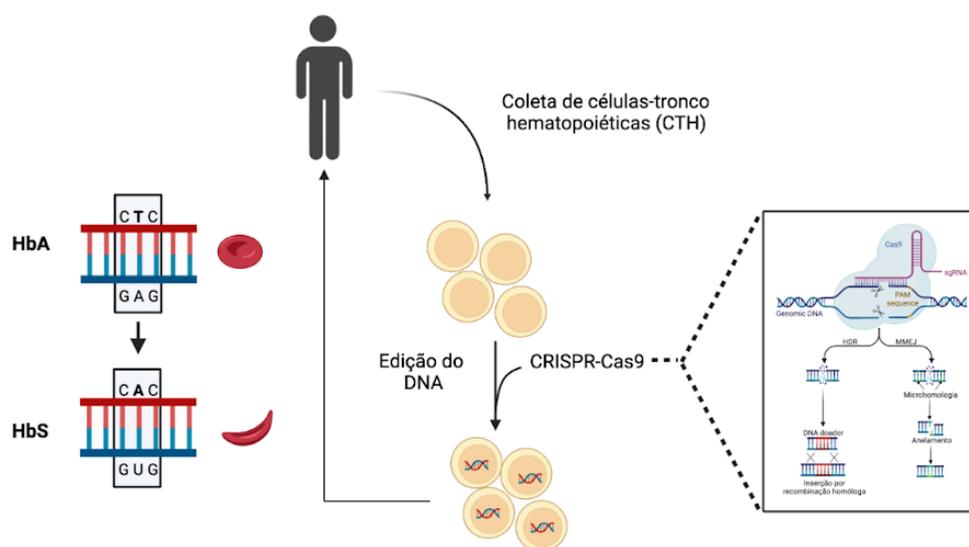
Em dezembro de 2022 será iniciado o protocolo NCT04774536 em parceria entre o Instituto do Genoma Inovador e a Universidade da Califórnia, em São Francisco. O estudo clínico de fase 1/2, possui como finalidade o transplante de células-tronco hematopoiéticas modificadas com o CRISPR/Cas9 que substituirá o gene defeituoso da beta-globina por uma versão reparada, em pacientes falciformes graves. O produto investigacional CRISPR\_SCD001 é administrado por infusão intravenosa após condicionamento mieloablativo com busulfan (HOBAN, ORKIN, BAUER, 2016).

A técnica requer que uma pequena porção das células-tronco hematopoiéticas do paciente, as quais possuem capacidade de auto-renovação e divisão ilimitada, sejam colhidas para a edição de genes fora do corpo. Ao serem removidas, a medula óssea restante é destruída com quimioterapia para criar espaço para que as células reparadas sejam reinfundidas. Essa retirada individual permite que cada paciente sirva como seu próprio doador de células-tronco, o que torna essa abordagem mais segura do que um transplante alogênico, uma vez que elimina a necessidade de encontrar um doador compatível (WALTERS, 2022).

Utiliza-se o CRISPR-Cas9 em conjunto com uma sequência de RNA guia que visa a região defeituosa do gene da beta-globina, acompanhada por um pequeno segmento de DNA que codifica a sequência apropriada, para estimular a reparação da mutação por meio da substituição do segmento de

DNA. As células-tronco do paciente são primeiramente tratadas com impulsos elétricos que criam poros nas suas membranas, permitindo à plataforma CRISPR-Cas9 entrar nas células e percorrer até os núcleos para corrigir a mutação, representado na Figura 17 (WALTERS, 2022).

**Figura 17 - Uso de CRISPR-Cas9 para a correção da mutação**



Fonte: Autoria própria.

#### 4.5. Futuras direções e desafios da terapia gênica

Apesar da diversidade de vetores capazes de carrear genes da  $\beta$ -globina com o propósito de garantir a expressão adequada de genes responsáveis pela transdução da hemoglobina, assegurando assim a reconstituição da hematopoiese, ainda é essencial que se estabeleça o mapeamento correto das posições em que os genes estão inseridos para que a transferência seja feita de forma segura, sem que ocorra a expressão ou o silenciamento de genes adjacentes (HOBAN, ORKIN, BAUER, 2016).

Os obstáculos iniciais da terapia gênica foram superados, visto que foram obtidos resultados positivos quanto a sua aplicabilidade, entretanto, restam algumas dúvidas acerca de sua eficiência, segurança, durabilidade e custo-benefício. Os vetores lentivirais têm sido usados como alvos em potencial para a transdução de Células Tronco Hematopoiéticas, porém, a produção de vetores de alto título capazes de oferecer uma elevada transdução dos genes tem sido um desafio (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Seu uso clínico ainda está em análise, devido a dificuldades que impedem seu uso, como a eficiência da transferência, o direcionamento do gene para atuar especificamente nas células-alvo, a duração da expressão e a segurança do método, que englobando efeitos fora do alvo (*off-target*) e mutações por inserção. Em razão das barreiras na eficiência da terapia, torna-se crucial a necessidade do desenvolvimento de um sistema que resulte em uma expressão duradoura (RABELO, JUNIOR, 2018).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os impactos negativos da doença falciforme estão atrelados a estigmas populacionais e a qualidade de vida física e emocional, tornando fundamental o desenvolvimento de terapias alternativas, menos agressivas e mais efetivas a longo prazo. Dessa forma, ensaios clínicos baseados na modificação genética de células-tronco hematopoéticas autólogas têm sido alvos de uma futura terapia curativa, sem que a função normal do gene seja afetado ou ocorra um evento de expansão clonal.

Os resultados preliminares dos ensaios clínicos demonstram que a aplicação dos produtos investigacionais são capazes de reverter as complicações da doença, a partir do aumento da expressão de globinas com propriedades anti-falcizantes. No entanto, apesar dos benefícios, essa modalidade terapêutica apresenta limitações, estando, no momento, disponível apenas em ensaios clínicos. As reações adversas a longo prazo ainda são desconhecidas, por mais que a genotoxicidade do tratamento tenha sido trabalhada ao longo dos ensaios clínicos, o risco está presente.

Dessa maneira, em prol da segurança e eficácia terapêutica a longo prazo, o número de estudos clínicos utilizando terapia gênica vem crescendo, tornando-se indicativo de um potencial curativo, mais conveniente que o TCTH-alo, uma vez que o procedimento dispensa o uso de imunossupressores pós-transplante, e a busca por doadores histocompatíveis por se tratar de uma modalidade de transplante autólogo. Além desses fatores, a doença do enxerto contra o hospedeiro, que é uma doença secundária ao transplante alogênico, não ocorre nas abordagens de terapia gênica pois os linfócitos derivados das CTH reinfundidas toleram os antígenos do receptor, que são próprios, aumenta a sobrevida; isso torna mínimo ou ausente o risco de rejeição do receptor às CTH devido sua constituição ser reconhecida como própria pelo sistema imune.

As estratégias gênicas utilizando o sistema CRISPR-Cas9 foram as que obtiveram os maiores índices de correção monoalélica em relação a colônias tratadas com ZFN ou TALEN, uma vez que as colônias de CTH tiveram a mutação corrigida após a associação de eletroporação de mRNA da Cas9 e transdução por lentivírus em integrase codificando o sgRNA e molde do gene HBB nativo.

Acredita-se que em um futuro próximo, pacientes portadores de anemia falciforme possam usufruir da terapia gênica como tratamento menos agressivo e mais acessível, com o propósito de uma melhor qualidade de vida e sobrevida, sem que haja a necessidade da exposição constante às transfusões e provável sensibilização.

## 6. REFERÊNCIAS

AERBAJINAI, Wulin *et al.* Thalidomide induces  $\gamma$ -globin gene expression through increased reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetylation in adult erythropoiesis. **Blood**, [S.L.], v. 110, n. 8, p. 2864-2871, 15 out. 2007. American Society of Hematology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-01-065201>.

ALMEIDA, P.C. *et al.* ANEMIA FALCIFORME: principais alterações laboratoriais e métodos de diagnóstico. **Hematology, Transfusion And Cell Therapy**, [S.L.], v. 42, p. 29, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.048>.

ALVES, Vitor Mendonça. *et al.* Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 206-211, 2012. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (RBHH). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20120051>.

ANDERSON, Gregory J.; FRAZER, David M.; MCLAREN, Gordon D. Iron absorption and metabolism. **Current opinion in gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 129-135, 2009.

ARCHER, Natasha; GALACTEROS, Frédéric; BRUGNARA, Carlo. 2015 Clinical trials update in sickle cell anemia. **American Journal Of Hematology**, [S.L.], v. 90, n. 10, p. 934-950, 21 set. 2015. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.24116>.

AZEVEDO, Maria Regina Andrade de. Hematologia Básica: Fisiopatologia e Diagnóstico Laboratorial. 6. Ed. Rio de Janeiro, RJ. Thieme Revinter Publicações, 438 p., 2019.

BATISTA, Gabriela Silva *et al.* Hemoglobinopatias. **Revista de Medicina**, [S.L.], v. 99, n. 3, p. 246-250, 12 jun. 2020. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v99i3p246-250>.

BEDELL, Victoria M. *et al.* In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. **Nature**, [S.L.], v. 491, n. 7422, p. 114-118, 23 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11537>.

BERNAUDIN, Françoise *et al.* Association of Matched Sibling Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation With Transcranial Doppler Velocities in Children With Sickle Cell Anemia. **Jama**, [S.L.], v. 321, n. 3, p. 266, 22 jan. 2019. American Medical Association (AMA). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2018.20059>.

BERTHOLO, Luciane Cristina; MOREIRA, Haroldo Wilson. Focalização isoelétrica na identificação das hemoglobinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 163-168, jun. 2006. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442006000300004>.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. Doença falciforme: diretrizes básicas da linha de cuidado / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 82 p. il.

BRUGNARA, Carlo. Sickle Cell Disease: from membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. **Journal Of Pediatric Hematology/Oncology**, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 927-933, dez. 2003. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/00043426-200312000-00004>.

BOATENG, Lilian A. *et al.* Red blood cell alloimmunization and minor red blood cell antigen phenotypes in transfused Ghanaian patients with sickle cell disease. **Transfusion**, [S.L.], v. 59, n. 6, p. 2016-2022, 13 fev. 2019. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/trf.15197>.

CALVO-GONZALEZ, Elena *et al.* Hemoglobinas variantes na área médica e no discurso cotidiano: um olhar sobre raça, nação e genética no Brasil contemporâneo. **Saúde e Sociedade**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 75-87, mar. 2017.

FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-12902017157821>.

CAMPBELL-LEE, Sally A. *et al.* Red Blood Cell Alloimmunization in Sickle Cell Disease: listen to your ancestors. **Transfusion Medicine And Hemotherapy**, [S.L.], v. 41, n. 6, p. 431-435, 2014. S. Karger AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1159/000369513>.

CANVER, Matthew C. *et al.* BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. **Nature**, [S.L.], v. 527, n. 7577, p. 192-197, 16 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature15521>.

CASTRIGNANO, S.B. Enzimas em biologia molecular. III. Tecnologia CRISPR-Cas9. Núcleo de Doenças Respiratórias - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz. **BolInst Adolfo Lutz**, v. 27: art.3, 2017

CAVAZZANA, Marina *et al.* Outcomes of Gene Therapy for Severe Sickle Disease and Beta-Thalassemia Major Via Transplantation of Autologous Hematopoietic Stem Cells Transduced Ex Vivo with a Lentiviral Beta AT87Q-Globin Vector. **Blood**, [S.L.], v. 126, n. 23, p. 202-202, 3 dez. 2015. American Society of Hematology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v126.23.202.202>.

CHANDRAKASAN, Shanmuganathan; MALIK, Punam. Gene Therapy for Hemoglobinopathies. **Hematology/Oncology Clinics Of North America**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 199-216, abr. 2014. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2013.12.003>.

CONG, Le *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819-823, 2013.

CORBACIOGLU, S. *et al.* Initial safety and efficacy results with a single dose of autologous crispr-cas9 modified CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease. [S.I.], 2020.

DE FIGUEIREDO, A. K. B. et al. Anemia falciforme: abordagem diagnóstica laboratorial. *Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança*, v. 12, n. 1, p. 98-105, 2014.

DEMIRCI, Selami; UCHIDA, Naoya; TISDALE, John F. Gene therapy for sickle cell disease: An update. **Cytotherapy**, v. 20, n. 7, p. 899-910, 2018.

DEVER, Daniel P. et al. CRISPR/Cas9  $\beta$ -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. **Nature**, [S.L.], v. 539, n. 7629, p. 384-389, 7 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature20134>.

DEWITT, Mark A. et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. **Science Translational Medicine**, [S.L.], v. 8, n. 360, 12 out. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9336>.

DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, [S.L.], v. 346, n. 6213, 28 nov. 2014. American Association for the Advancement of Science (AAAS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1258096>.

DUPSKI, Daiara Shmitz. **Anemia Falciforme: diagnóstico e tratamento**. 2017. 32 f. Monografia (Especialização) - Curso de Farmácia, Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, 2017.

FASANO, Ross M. et al. Impact of Red Blood Cell Antigen Matching on Alloimmunization and Transfusion Complications in Patients with Sickle Cell Disease: a systematic review. **Transfusion Medicine Reviews**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 12-23, jan. 2019. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2018.07.003>.

FERREIRA, Reginaldo; GOUVÊA, Cibele Marli Cação Paiva. Recent advances in the sickle cell anemia treatment. **Revista Médica de Minas Gerais**, [S.L.], v. 28, 2018. GN1 Genesis Network. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/2238-3182.20180006>.

FIGUEIREDO, Maria Stella. Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 313-315, 2007.

FINER, M; GLORIOSO, J. A brief account of viral vectors and their promise for gene therapy. **Gene Therapy**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 1-2, jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2016.71>.

FORONI, Heloisa Garcia Rocha *et al.* Terapia gênica e transplante de células tronco como alternativas de cura para pacientes com anemia falciforme / Gene therapy and stem cells as cure alternatives for sickle cell disease patients. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 31053-31074, 27 abr. 2022. South Florida Publishing LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv8n4-542>.

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel de Melo Alves. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. **Einstein** (São Paulo), São Paulo, v. 15, n. 3, p. 369-375, jul. 2017.

GOODMAN, Michael A.; MALIK, Punam. The potential of gene therapy approaches for the treatment of hemoglobinopathies: achievements and challenges. **Therapeutic Advances In Hematology**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 302-315, 31 jul. 2016. SAGE Publications. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/2040620716653729>.

GUDA, Swaroopa *et al.* MiRNA-embedded shRNAs for Lineage-specific BCL11A Knockdown and Hemoglobin F Induction. **Molecular Therapy**, [S.L.], v. 23, n. 9, p. 1465-1474, set. 2015. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2015.113>.

GUIMARÃES, Cínthia Tavares Leal; COELHO, Gabriela Ortega. A importância do aconselhamento genético na anemia falciforme. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1733-1740, jun. 2010. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232010000700085>.

HARMENING, D. M. Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4. ed. **Revinter**, 2015.

HERRICK, James B.. Peculiar Elongated and Sickle-Shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. **Jama**, [S.L.], v. 312, n. 10, p. 1063, 10 set. 2014. American Medical Association (AMA). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.11011>.

HO, P.Joy; THEIN, S.L.. Gene regulation and deregulation: a  $\beta$  globin perspective. **Blood Reviews**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 78-93, jun. 2000. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1054/blre.2000.0128>.

HOBAN, Megan D. *et al.* Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. **Blood**, [S.L.], v. 125, n. 17, p. 2597-2604, 23 abr. 2015. American Society of Hematology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-12-615948>.

HOBAN, Megan D.; ORKIN, Stuart H.; BAUER, Daniel E.. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. **Blood**, [S.L.], v. 127, n. 7, p. 839-848, 18 fev. 2016. American Society of Hematology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-09-618587>.

JOUNG, J. Keith; SANDER, Jeffry D.. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 49-55, 21 nov. 2012. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3486>.

KANGIWA, Umar *et al.* Pattern and prevalence of alloimmunization in multiply transfused patients with sickle cell disease in Nigeria. **Biomarker research**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2015.

KANTER, J. *et al.* Initial Results from Study Hgb-206: A Phase 1 Study Evaluating Gene Therapy By Transplantation of Autologous CD34+ Stem Cells Transduced Ex Vivo with the Lentiglobin BB305 Lentiviral Vector in Subjects with Severe Sickle Cell Disease. **Blood**. 2015; 126(23):3233.

KARAFIN, Matthew S. *et al.* Risk factors for red blood cell alloimmunization in the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) database. **British Journal Of Haematology**, [S.L.], v. 181, n. 5, p. 672-681, 19 abr. 2018. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.15182>.

KAVANAGH, Patricia L.; FASIPE, Titilope A.; WUN, Ted. Sickle Cell Disease. **Jama**, [S.L.], v. 328, n. 1, p. 57, 5 jul. 2022. American Medical Association (AMA). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2022.10233>.

LI, C. *et al.* Reactivation of g-globin in adult B-YAC mice after ex vivo and in vivo hematopoietic stem cell genome editing. **Blood**, [S.L.] v. 131, n. 26, p. 2915–2928, 2018.

MACEDA, Maicon Fernando. **Prevalência de Hemoglobinas Variantes no Teste do Pezinho no Brasil**: uma revisão integrativa. 2018. 49 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Mato Grosso, Sinop, 2018.

MACHADO, Ísis Eloah. *et al.* Prevalência de anemia em adultos e idosos brasileiros. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.L.], v. 22, n. 2, 2019. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1980-549720190008.supl.2>.

MANFREDINI, V. *et al.* A fisiopatologia da anemia falciforme. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 19, n. 1/2, p. 3-6, 2013.

MARRAFFINI, Luciano A.; SONTHEIMER, Erik J.. CRISPR interference: rna-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 181-190, 2 fev. 2010. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2749>.

MURAO, Mitiko; FERRAZ, Maria Helena C.. Traço falciforme: heterozigose para hemoglobina s. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 29, n. 3, set. 2007. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842007000300006>.

NAOUM, Paulo Cesar. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: **Sarvier** Ed. Livros Médicos, 1997.

NOWOGRODZKI, Anna. Gene therapy targets sickle-cell disease. **Nature**, [S.L.], v. 564, n. 7735, p. 12-13, dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/d41586-018-07646-w>.

OLIVEIRA, Bárbara de Alencar *et al.* Vetores virais para uso em terapia gênica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [S.L.], v. 9, n. 2, set. 2018. Instituto Evandro Chagas. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232018000200008>.

OLIVEIRA, Thais Campos. Metodologias para a geração de mutantes funcionais em *Metarhizium Anisopliae*: CRISPR/Cas9e RNAi; Programa de pós-graduação em Biologia celular e molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2016.

PAULING, Linus *et al.* Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. **Science**, [S.L.], v. 110, n. 2865, p. 543-548, 25 nov. 1949. American Association for the Advancement of Science (AAAS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.110.2865.543>.

PICCIN, A. *et al.* Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. **Eur J Haematol**, v. 102, n. 4, p. 319-330, 2019.

PONKA, Prem; KOURY, Mark J.; SHEFTEL, Alex D. Erythropoiesis, hemoglobin synthesis, and erythroid mitochondrial iron homeostasis. **Handbook of Porphyrin Science: erythropoiesis, Heme, and Applications to Biomedicine**, v. 27, p. 41-84, 2013.

RAMOS, Roberta Pulcheri *et al.* How can anemia negatively influence gas exchange? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 1-2, fev. 2017. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37562017000100001>.

REIS, Carolina Dias *et al.* A Importância da Triagem Neonatal para a Detecção Precoce da Anemia Falciforme. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 8, 14 jul. 2021. Research, Society and Development. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17539>.

RODRIGUES, Celso A. *et al.* Transplante de sangue de cordão umbilical - SCU. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, p.08-12, maio 2010.

ROSENFELD, Luiz Gastão *et al.* Prevalência de hemoglobinopatias na população adulta brasileira: pesquisa nacional de saúde 2014-2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.L.], v. 22, n. 2, 2019. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1980-549720190007.supl.2>.

SAHA, Subbroto Kumar *et al.* Programmable molecular scissors: Applications of a new tool for genome editing in biotech. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s. l.], v. 14, n. March, p. 212–238, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2162253118303123>.

SANTOS, Jean Leandro dos; CHIN, Chung Man. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Química Nova**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 783-790, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422012000400025>.

SANTOS, Macedônia Pinto *et al.* PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE CASOS NOTIFICADOS DA DOENÇA FALCIFORME NO CEARÁ / EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF NOTIFIED CASES OF SICKLE CELL DISEASE IN CEARÁ. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 6840-6852, 2021. *Brazilian Journal of Development*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n1-462>.

SANTOS, Sandna Larissa Freitas, *et al.* CRISPR uma nova era na Biologia molecular; *Revista Biotecnologia & Ciência*. 2016; v.5 (2): 40-48.

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**, [S.L.], v. 29, n. 11, p. 1717-1726, 25 out. 2011. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.718>.

SHRIVASTAV, Meena; HARO, Leyma P de; A NICKOLOFF, Jac. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. **Cell Research**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 134-147, 24 dez. 2007. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.111>.

SILVA, C. A. et al. Triagem neonatal de hemoglobinopatias no município de São Carlos, São Paulo, Brasil: análise de uma série de casos. **Rev. Paul. Ped.**, 2015, v. 33, n 1, p. 19-27.

SILVA, Danielle da Costa; CERCHIARO, Giselle; HONÓRIO, Káthia M.. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000200024>.

SILVA, Maria Priscila Peixoto e; SILVA, Kenia Cristina Paulo Ferreira da; SANTOS, Walquiria Lene dos. ATUALIZAÇÕES SOBRE ANEMIA FALCIFORME – HIDROXIUREIA. **Revista Jrg de Estudos Acadêmicos**, [S.L.], 30 mar. 2021. Zenodo. <http://dx.doi.org/10.5281/ZENODO.4648381>.

SILVA, R.F. et al. Atividade Farmacológica Hidroxiuréia em Pacientes com Anemia Falciforme/Hydroxyurea Pharmacological Activity in Patients with Falciform Anemia. **Saúde em Foco**, 2018, p. 104-117.

SOARES, Leonardo Ferreira *et al.* Prevalência de hemoglobinas variantes em comunidades quilombolas no estado do Piauí, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 22, n. 11, p. 3773-3780, nov. 2017. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172211.04392016>.

SOMMER, Camila K. *et al.* Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do rio grande do sul, brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.L.], v. 22, n. 8, p. 1709-1714, ago. 2006. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x2006000800019>.

STEINBERG, Bernhard. Sickle Cell Anemia. **Arch. Pathol**, Toledo, v. 9, n. 4, p. 876-897, 1930.

STEINBERG, Martin H. *et al.* Pathobiology of the Human Erythrocyte and Its Hemoglobins. **Hematology**, [S.L.], p. 447-457, 2018. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-35762-3.00033-0>.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annu Rev Pathol**, v. 14, p. 263-292, 2019.

TELEN, M. J.; MALIK, P.; VERCELLOTTI, G. M. Therapeutic strategies for sickle cell disease: towards a multi-agent approach. **Nat Rev Drug Discov**, v. 18, p. 139-158, 2018.

URBINATI, Fabrizia *et al.* Potentially therapeutic levels of anti-sickling globin gene expression following lentivirus-mediated gene transfer in sickle cell disease bone marrow CD34+ cells. **Experimental Hematology**, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 346-351, maio 2015. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2015.01.009>.

VIZZONI, Alexandre Gomes; MOREIRA, Heladya Maria Matos. Prevalência de aloimunização eritrocitária em pacientes portadores de anemia falciforme. **Abcs Health Sciences**, [S.L.], v. 42, n. 1, 26 abr. 2017. NEPAS. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7322/abcshs.v42i1.950>.

VOIT, Richard A. *et al.* Nuclease-mediated gene editing by homologous recombination of the human globin locus. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 1365-1378, 23 out. 2013. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt947>.

VRETTOU, C. *et al.* Prenatal and preimplantation diagnosis of hemoglobinopathies. **International Journal Of Laboratory Hematology**, [S.L.], v. 40, p. 74-82, maio 2018. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12823>.

WARE R. E., DE MONTALEMBERT M., TSHILOLO L., *et al.* Sickle cell disease. **Lancet**. v. 390, n. 10091, p. 311–23, 2017.

XU, Peng *et al.* Both TALENs and CRISPR/Cas9 directly target the HBB IVS2–654 (C>T) mutation in  $\beta$ -thalassemia-derived iPSCs. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 5, n. 1, 9 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep12065>.

ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.

ZANATTA, T.; MANFREDINI, V. Comparação entre métodos laboratoriais de diagnóstico de Doenças Falciformes. **NewsLab**. 2011; 94: 180-194.

ZOU, Jizhong *et al.* Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. **Blood**, [S.L.], v. 118, n. 17, p. 4599-4608, 27 out. 2011. American Society of Hematology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-02-335554>.