

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Eliza Eufrazio Storer

TERAPIA GÊNICA PARA PACIENTES TRANSFUSIONAIS DE β -TALASSEMIA

São Paulo

2023

Eliza Eufrazio Storer

TERAPIA GÊNICA PARA PACIENTES TRANSFUSIONAIS DE β -TALASSEMIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Ronaldo Luis da Silva como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Storer, Eliza Eufrazio

Terapia gênica para pacientes transfusionais de β -Talassemia / Eliza Eufrazio Storer. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

26 p.

Orientação de Ronaldo Luis da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. Edição de genes 2. Hemoglobina fetal 3. Proteína 9 associada à CRISPR 4. Talassemia beta 5. Terapia genética I. Silva, Ronaldo Luis da II. Centro Universitário São Camilo III. Título

Eliza Eufrazio Storer

TERAPIA GÊNICA PARA PACIENTES TRANSFUSIONAIS DE β -TALASSEMIA

São Paulo, de outubro de 2023.

Professor Orientador (Ronaldo Luis da Silva)

Professor Examinador Externo

Professor Examinador Interno

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado aos meus pais, por ser graças aos seus esforços que hoje posso concluir o meu curso.

Também dedico este trabalho a todos que contribuíram para a minha trajetória acadêmica.

E o dedico a todas as mulheres na ciência, que mesmo diante de todas as dificuldades impostas, temos nos mostrado fortes e prontas para contribuir com a saúde de todos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a minha família por todo o auxílio durante esses quatro anos, um agradecimento em especial para minha mãe, Ana Lúcia, por todo amor, carinho, paciência e compreensão. Obrigada por sempre acreditar constantemente no meu potencial. Ao meu pai, Ildo, pelo apoio e sempre afirmar que sou capaz, confiando que me tornarei uma ótima profissional. Também agradeço a ajuda que me proporcionou no início da redação deste trabalho. Agradeço a minha irmã, Thaís, por ser um exemplo excepcional de uma mulher forte e independente. Sou grata também por todos os conselhos que me deu e muitas vezes ser meu refúgio emocional. E agradeço ao meu padrasto, Oscar, por sempre estar ao lado da minha mãe e de mim, apoiando-nos nas decisões que tomamos. Sou profundamente grata por tê-los ao meu lado; meu eterno agradecimento.

Obrigada ao meu orientador, Ronaldo, por aceitar me acompanhar nesse projeto e por toda a calma, paciência, e ajuda durante a redação do trabalho. Suas sugestões, conselhos e feedbacks foram inestimáveis para condução desse estudo. Sou grata pelas suas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar meu melhor desempenho.

Gostaria também de expressar minha sincera gratidão aos meus amigos, em especial o Jeferson, que contribuiu durante a longa jornada do curso. Obrigada pelo apoio, dedicação e prontidão ao longo desse processo. O seu conhecimento foi fundamental para moldar este trabalho e agradeço por estar ao meu lado nos momentos difíceis.

Agradeço a instituição São Camilo pela incrível infraestrutura, aos meus professores pelo ensino fenomenal e por me fornecerem todas as bases necessárias para a realização deste trabalho. E obrigada a minha coordenadora de curso, Renata, pelo apoio, ajuda e incentivo durante os problemas que me deparei durante o curso.

Por último, mas não menos importante, agradeço a mim mesma por sempre manter a fé nas horas de desconfiança acerca da minha própria capacidade e por sempre superar os obstáculos encontrados ao longo do curso. Aqui registro o meu muito obrigada.

RESUMO

A β -talassemia é uma doença genética que causa anemia crônica e dependência de transfusões sanguíneas, afetando a qualidade de vida dos pacientes. A terapia gênica emergiu como uma promissora abordagem terapêutica para corrigir a causa subjacente da doença. Neste contexto, esta revisão bibliográfica tem como objetivo analisar as pesquisas mais recentes relacionadas à terapia gênica para β -talassemia, destacando avanços, desafios e perspectivas futuras. Realizou-se uma busca sistemática na base de dados do PubMed, incluindo artigos publicados nos últimos cinco anos, usando palavras-chave relacionadas à β -talassemia e terapia gênica. Foram selecionados 18 artigos relevantes para análise qualitativa. Vários estudos exploraram a terapia gênica, com foco na edição genética, especialmente no gene BCL11A, para aumentar a produção de hemoglobina fetal (HbF). A tecnologia CRISPR-Cas9 foi amplamente utilizada para editar genes específicos, resultando em melhorias significativas na independência transfusional e na qualidade de vida dos pacientes. A edição multiplex e a modulação de elementos reguladores também foram estratégias promissoras. Portanto, é notório que a terapia gênica para β -talassemia demonstrou avanços significativos, mas ainda enfrenta desafios, como questões de segurança, regulamentação e acessibilidade. No entanto, essa abordagem oferece esperança para uma cura eficaz e duradoura, representando uma revolução potencial no tratamento da β -talassemia.

Palavras-chave: β -talassemia. Terapia gênica. Edição genética. Hemoglobina fetal. CRISPR-Cas9. Dependência de Transfusão.

ABSTRACT

Beta-thalassemia is a genetic disease that causes chronic anemia and dependence on blood transfusions, affecting the quality of life of patients. Gene therapy has emerged as a promising therapeutic approach to correct the underlying cause of the disease. In this context, this literature review aims to analyze the latest research related to gene therapy for beta-thalassemia, highlighting advances, challenges, and future prospects. A systematic search was conducted in the PubMed database, including articles published in the last five years, using keywords related to beta-thalassemia and gene therapy. Eighteen relevant articles were selected for qualitative analysis. Several studies explored gene therapy, focusing on genetic editing, especially in the BCL11A gene, to increase fetal hemoglobin (HbF) production. The CRISPR-Cas9 technology was widely used to edit specific genes, resulting in significant improvements in transfusion independence and patients' quality of life. Multiplex editing and modulation of regulatory elements were also promising strategies. Therefore, it is evident that gene therapy for beta-thalassemia has demonstrated significant advances but still faces challenges, such as safety, regulation, and accessibility issues. However, this approach offers hope for an effective and lasting cure, representing a potential revolution in beta-thalassemia treatment.

Keywords: beta-thalassemia, gene therapy, genetic editing, fetal hemoglobin, CRISPR-Cas9. Transfusion Dependence.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

BCL11A	Proteína BCL11A
Cas9	Enzima Cas9
CD34+	Células-tronco hematopoiéticas que expressam a proteína CD34
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DF	Doença Falciforme
DNMT1	DNA Metiltransferase 1
GVHD	Graft Versus Host Disease (Doença do Enxerto versus Hospedeiro)
HBB	β -globin (beta globina)
HbF	Hemoglobina fetal
HPFH	Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin
HRI	Quinase Regulada pelo Heme
HSCs	Hematopoietic Stem Cells (Células-tronco hematopoiéticas)
iPSCs	Induced Pluripotent Stem Cells (Células-tronco Pluripotentes Induzidas)
KLF1	Erythroid Krüppel-like Factor
MOI	Multiplicidade de Infecção
NFI	Fator de Transcrição NFI (NFIA e NFIX)
RNP	Ribonucleoproteínas
TDT	Transfusion Dependent Thalassemia (Talassemia Beta Maior)
β -Talassemia	Beta-talassemia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO.....	14
2.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	14
3	METODOLOGIA.....	15
4	DESENVOLVIMENTO	16
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
6	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A β -talassemia é uma doença genética hereditária, de herança autossômica recessiva, observada na presença de mutações no gene HBB presente no braço curto do cromossomo 11, que afeta a produção de hemoglobina, resultando em anemia crônica e, frequentemente, uma dependência vitalícia de transfusões de sangue. Essa condição debilitante impacta significativamente a qualidade de vida daqueles que possuem a doença e representa um fardo emocional, físico e financeiro para eles e suas famílias (ROCHA; MARTINS; GONÇALVES, 2010).

Segundo Silbermins e Metjian (2011), essa doença se manifesta em três tipos principais, cada um com características distintas. A β -talassemia menor, a forma mais branda, geralmente não apresenta sintomas notáveis, afetando indivíduos que possuem apenas um alelo mutado do gene. Em contrapartida, a β -talassemia intermediária é mais grave, potencialmente resultando em anemia moderada a grave, devido à presença de dois alelos mutados do gene. Já a β -talassemia maior, também chamada de talassemia dependente de transfusão (TDT), a manifestação mais severa, pode ser fatal se não tratada, visto que os portadores têm ambos os alelos do gene mutados, impedindo a produção de hemoglobina A, a variedade mais eficaz.

As mutações frequentemente associadas à β -talassemia incluem aquelas que causam a perda de função da globina beta, inibindo a produção de hemoglobina A e desencadeando anemia, e as mutações resultando na produção de uma forma anormal da globina beta, que pode ocasionar problemas adicionais, como complicações ósseas e cardíacas (PERUMBETI *et al.*, 2010).

O diagnóstico da β -talassemia é estabelecido por meio de exames de sangue, que avaliam os níveis de hemoglobina e a presença de anormalidades na estrutura das células sanguíneas (BRANCALEONI *et al.*, 2016). Ressalta-se que o tratamento da doença é diversificado, adaptando-se ao tipo e à gravidade da condição, e pode envolver transfusões de sangue, terapia com hidroxureia para estimular a produção de hemoglobina A e, em casos mais extremos, a clonagem de células-tronco como uma terapia experimental promissora para a cura da β -talassemia (GARANEGO; ORIGA, 2010).

Até recentemente, as opções de tratamento para a β -talassemia eram limitadas a transfusões regulares de sangue e terapias de quelantes de ferro, com suas próprias complicações e desvantagens. No entanto, a terapia gênica apareceu como uma abordagem terapêutica promissora para corrigir a causa subjacente da doença, oferecendo a esperança de uma cura eficaz e duradoura para os pacientes transfusionais de beta talassemia. Os principais avanços nesse campo estão ancorados em estudos que utilizam a tecnologia CRISPR-Cas9 para corrigir as mutações genéticas subjacentes e, assim, restabelecer a produção adequada de hemoglobina (KHOSRAVI *et al.*, 2020; GONG *et al.*, 2021).

A tecnologia CRISPR-Cas9, consiste em uma endonuclease guiada por RNA direcionada ao DNA. Ela tem uma alta eficiência, precisão e facilidade de uso, tem sido a melhor escolha para edição de genoma, conseguindo adicionar os alelos desejáveis e remover os alelos indesejáveis, isso simultaneamente em apenas um único evento. (MANGHWAR *et al.*, 2019)

A terapia gênica da β -talassemia se baseia na transferência de um gene humano da β -globina para HSCs (células tronco hematopoiéticas) autólogas, abordagem que supera a escassez de doadores compatíveis e elimina os riscos de GVHD (doença do enxerto contra o hospedeiro) e do insucesso do enxerto associado ao transplante alogênico (SERPELONI *et al.*, 2021). O propósito fundamental da terapia genética com HSCs autólogas na β -talassemia é restabelecer a expressão normal da proteína β -globina.

Sabe-se que células-tronco, especialmente as HSCs ou células CD34+, se apresentam como alvos altamente atrativos para a terapia gênica devido a sua capacidade de regenerar tecidos ao longo da vida. Por isso, a maioria das abordagens de terapia gênica para distúrbios hematológicos se concentra na inserção do gene terapêutico nas HSCs para o repovoamento de tecidos sanguíneos. Isso é importante porque, se as HSCs forem capazes de se replicar e se diferenciar em células sanguíneas saudáveis, elas poderão substituir as células sanguíneas doentes ou deficientes. Isso pode levar à cura ou ao controle de uma variedade de distúrbios hematológicos, incluindo doença falciforme (DF), talassemia e leucemia (OLIVEIRA; SERPELONI; SIMION, 2021; PSATHA *et al.*, 2021).

O tratamento da β -talassemia por meio da terapia gênica é uma área em rápido crescimento da pesquisa médica, mas ainda enfrenta desafios significativos. É fundamental compreender a eficácia, segurança e viabilidade dessa abordagem terapêutica, bem como avaliar seu potencial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir sua dependência de transfusões de sangue.

Ressalta-se que a β -talassemia exerce um impacto significativo na saúde global, com uma prevalência estimada em cerca de 1 em cada 100 pessoas em regiões endêmicas. Além disso, a incidência da doença nessas áreas é aproximadamente de 1 em cada 2.000 a 3.000 nascimentos, indicando uma preocupante disseminação (WEATHERALL, 2018).

A distribuição geográfica da β -talassemia revela padrões interessantes, com uma correlação notável entre a prevalência da doença e a prática de casamentos consanguíneos. Regiões que têm historicamente tido uma alta taxa de casamentos entre parentes, como os países do Mediterrâneo, Oriente Médio, Sudeste Asiático, África e Oceania, frequentemente apresentam as maiores prevalências de β -talassemia (ABU-SHAHEEN *et al.*, 2020).

Dessa forma, não é apenas uma preocupação epidemiológica, mas também uma condição que impõe um problema de saúde pública considerável. A mortalidade associada à β -talassemia atinge aproximadamente 5% das crianças que sofrem com a forma mais grave da doença, conhecida como β -talassemia maior (ANGASTINIOTIS; LOBITZ, 2019). Esse dado ressalta a urgente necessidade de diagnóstico precoce e tratamento adequado para melhorar a qualidade de vida e as perspectivas de sobrevivência dos afetados.

Neste cenário, compreender o estado atual da pesquisa nesse campo é crucial para direcionar futuros desenvolvimentos terapêuticos e garantir que os pacientes tenham acesso às opções mais avançadas e eficazes de tratamento. Portanto, o objetivo desta revisão bibliográfica foi analisar e sintetizar as pesquisas mais recentes relacionadas à terapia gênica aplicada à β -talassemia, destacando seus avanços, desafios e perspectivas futuras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Analisar o estado atual da terapia gênica como uma abordagem terapêutica promissora para pacientes transfusionais de β -talassemia, identificando os avanços, desafios e perspectivas futuras.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar os diferentes vetores de terapia gênica utilizados no tratamento da β -talassemia quanto a suas eficácias e limitações.
- Investigar os resultados clínicos mais recentes relacionados à terapia gênica em pacientes com β -talassemia, quanto à eficácia e à durabilidade das respostas terapêuticas.
- Evidenciar eventuais desafios referentes à eficácia e à durabilidade das respostas terapêuticas da terapia gênica para β -talassemia apresentados na literatura científica vigente.

3 METODOLOGIA

O estudo foi conduzido por meio de uma abordagem sistemática da literatura. Utilizou-se a base de dados *PubMed* para buscar artigos publicados nos últimos cinco anos (2018 a 2023), empregando as palavras "genetic therapy", "gene therapy" e "CRISPR", unidas pelo conectivo booleano OR para definir o universo da intervenção, "beta talassemia", "beta-thalassaemia", "beta thalassaemia" e "β-thalassemia", também unidas por OR para definir o universo da doença e "transfusion-dependent" e "transfusion-dependency", também unidas pelo conectivo OR para especificar o tipo de doença.

Cada um dos três grupos de palavras foi unido pelo conectivo AND, o que resultou em um total de 44 artigos. Os títulos e resumos destes artigos foram analisados para avaliar sua relevância preliminar em relação aos critérios de inclusão. Artigos não diretamente pertinentes à terapia gênica para beta talassemia ou não disponíveis em inglês, espanhol ou português foram excluídos do estudo.

Os artigos restantes, que atendiam aos critérios de inclusão, foram submetidos a uma avaliação mais aprofundada por meio da leitura integral. Durante esta fase, aplicaram-se os critérios mencionados previamente, resultando na exclusão daqueles que não se alinhavam com o escopo da terapia gênica para beta talassemia.

Após a análise completa dos textos, um total de 15 artigos foi considerado pertinente e incorporado a esta revisão bibliográfica. Estes abordavam várias abordagens da terapia gênica, incluindo a inserção de genes funcionais, a correção de genes defeituosos e a indução da produção de hemoglobina fetal. Além disso, discutiram os sistemas de entrega de genes empregados e os desfechos dos ensaios clínicos.

Uma análise qualitativa dos estudos selecionados foi realizada. Os resultados desta análise foram consolidados narrativamente, destacando as principais estratégias de terapia gênica investigadas, os avanços tecnológicos alcançados, os resultados obtidos nos ensaios clínicos e as implicações críticas desses resultados.

4 DESENVOLVIMENTO

O estudo de Frangoul e seus colaboradores (2021), descreveu a aplicação da tecnologia CRISPR-Cas9 em dois pacientes, um com TDT e outro com DF. Ambos os pacientes foram submetidos ao tratamento com CTX001, que consiste em células-tronco hematopoiéticas e progenitoras CD34+ autólogas editadas geneticamente para reativar a produção de hemoglobina fetal. As células CD34+ utilizadas foram obtidas de doadores saudáveis e, em seguida, editadas com a tecnologia CRISPR-Cas9, sendo direcionada para o intensificador eritroide BCL11A. Notavelmente, cerca de 80% da sequência dos alelos nesse locus foi modificada, sem evidência de edições fora do alvo. Posteriormente, após a mieloablação, ambos os pacientes receberam infusões de células CD34+ autólogas editadas com CRISPR-Cas9, editando especificamente o intensificador BCL11A. Os resultados observados após mais de um ano de acompanhamento incluíram altos níveis de edição alélica na medula óssea e no sangue, aumento na hemoglobina fetal em todas as células, independência de transfusões sanguíneas e ausência de episódios vaso-oclusivos.

Assim como Frangoul (2021), Zeng e seus colaboradores (2020) usaram a tecnologia CRISPR-Cas9 em células-tronco hematopoiéticas CD34+ e células progenitoras hematopoiéticas de sangue periférico humano mobilizado. No caso deles, a edição genética foi realizada com a proteína A3A (N57Q)-BE3, que foi purificada e utilizada para editar ribonucleoproteínas (RNP). Durante o experimento, foram observadas edições frequentes de base de citosina no intensificador eritroide BCL11A +58, com poucas inserções ou deleções (indels). Esta edição de base resultou em uma indução da hemoglobina fetal semelhante aos efeitos da edição de nucleases. Uma descoberta significativa foi a demonstração de que uma única edição de base terapêutica no intensificador BCL11A conseguiu evitar a falcização e melhorar o equilíbrio da cadeia de globina em células eritroides de pacientes com Doença Falciforme (SCD) e em células progenitoras hematopoiéticas de pacientes com β -talassemia. Além disso, o estudo mostrou que a edição multiplex eficiente poderia ser alcançada através da interrupção combinada do intensificador eritroide BCL11A e da correção da mutação do promotor HBB-28A>G.

A tecnologia CRISPR-Cas9 foi o meio escolhido por Qin e seus colegas (2022) para realizar uma triagem genética a fim de avaliar o papel de dois membros da família do fator de transcrição, NFI-NFIA e NFIX, como repressores da expressão dos genes HBG1/2, responsáveis pela produção de hemoglobina fetal. NFIA e NFIX foram encontrados em níveis elevados em células eritroides adultas em comparação com células fetais, e eles atuaram em conjunto para reprimir HBG1/2. Isso foi confirmado por meio de estudos de cultura celular e xenotransplantes. O estudo também investigou o mecanismo subjacente a essa regulação e revelou que NFIA e NFIX estimularam a expressão do repressor de HBG1/2, o gene BCL11A, enquanto suprimiam diretamente a expressão de HBG1/2. Portanto, os fatores NFI foram identificados pelos autores como reguladores versáteis da transição na produção de globina, de fetal para adulta.

Na pesquisa de Wu e colaboradores (2019), os autores otimizaram as condições de edição alvo em HSCs derivadas de pacientes com Doença Falciforme e pacientes com β -talassemia. A principal descoberta foi que eles alcançaram uma reação quase completa de edição genética nessas células, sem evidência de genotoxicidade detectável ou impacto deletério na função das células-tronco. Essas HSCs editadas demonstraram preferência por reparos de extremidades não homólogos em comparação com reparos de extremidades mediados por micro homologia. As células eritroides resultantes das HSCs editadas mostraram expressão de níveis terapêuticos de HbF e resistência à falcização em pacientes com SCD. Além disso, as células de pacientes com β -talassemia exibiram um equilíbrio restaurado da cadeia globina. A edição do intensificador BCL11A através de reparo de extremidade não homóloga, que se aproximou da ruptura alélica completa em HSCs, foi considerada uma estratégia terapêutica viável para a indução duradoura de HbF.

Agora na pesquisa de Gong e seus corroboradores (2021), eles preferiram optar por explorar sistematicamente as associações entre variantes no gene DNMT1 e fenótipos em pacientes com β -talassemia. Eles identificaram uma nova mutação missense (c.2633G>A, S878F) no domínio BAH1 de DNMT1. Funcionalmente, essa mutação resultou na perda da atividade catalítica de DNMT1, afetando suas interações com BCL11A, GATA1 e HDAC1/2, além de reduzir o recrutamento de DNMT1 para os promotores do gene γ -globina (HBG). Nesse estudo, eles

demonstraram que a mutação S878F aumentou a expressão de γ -globina, contribuindo para a produção de hemoglobina fetal (HbF).

Uma investigação visando os promotores próximos do gene HBG, que estão envolvidos na regulação da produção de HbF foi conduzida por Ravi e seus colaboradores (2022). Eles agruparam esses promotores com alta homologia e utilizaram editores de base de adenina e citosina para identificar novas regiões reguladoras, incluindo um cluster na região -123. A edição de base em -123 e -124 pb do promotor HBG resultou em uma expressão mais elevada de HbF em comparação com a quebra do local de ligação BCL11A bem conhecido em células eritroblastos derivadas de células-tronco hematopoiéticas CD34+ humanas. Eles demonstraram que mutações do tipo -123T>C e -124T>C do tipo HPFH aumentaram a expressão da gama-globina, criando um sítio de ligação de novo para KLF1. No geral, essas descobertas identificaram elementos reguladores previamente desconhecidos no promotor HBG e alvos adicionais para a regulação positiva da HbF, semelhantemente ao que fora encontrado por Gong e seus colaboradores (2021).

A fim de identificar RNA-binding proteins (RBPs) que regulam a expressão de HbF, Wakabayashi e seus colaboradores (2022) realizaram uma triagem utilizando a CRISPR-Cas9 para identificar RBPs que regulam a expressão de HbF.. Eles identificaram RBM12 como um novo supressor da HbF e mostraram que a depleção da expressão de RBM12 resultou na indução da expressão de HbF e atenuou a falcização celular em células eritroides de pacientes com DF. O RBM12 funcionou independentemente dos principais reguladores conhecidos de HbF, ligando-se preferencialmente às regiões 5' não traduzidas de transcritos. Essas descobertas identificaram o domínio RRM1 como essencial para a regulação mediada por RBM12 da HbF, corroborando com achados de outros estudos aqui discutidos (Zeng *et al.*, 2020; Frangoul *et al.*, 2021).

A fim também de explorar a reativação da expressão da γ -globina em β -hemoglobinopatias, como a β -talassemia, Lu e seus colaboradores (2022), utilizaram a tecnologia de edição de genoma Cas9/AAV6, eles introduziram mutações naturais de HPFH em células HUDEP-2 e HSPCs primários de pacientes com β -talassemia. Os resultados indicaram uma edição precisa no alvo, com expressão significativamente aumentada de γ -globina durante a diferenciação eritroide, sem

comprometer a reconstituição hematopoiética a longo prazo. Essa abordagem oferece implicações terapêuticas promissoras para pacientes com β -talassemia.

Mudando um pouco de abordagem, o estudo de Psatha junto com seus colaboradores (2021) acabou envolvendo o cultivo de células HUDEP-2, que foram traduzidas com vetores adenovirais em diferentes concentrações de multiplicidades de infecção (MOI). A diferenciação eritroide foi induzida em meio sem dexametasona, mas com doxiciclina e fator de células-tronco. Células CD34⁺ de pacientes com β -talassemia foram coletadas, transduzidas com o vetor HD-Ad-dualCRISPR e avaliadas em meio de expansão ou metilcelulose. Em estudos de xenotransplante em camundongos NBSGW, as células foram transplantadas e avaliadas quanto ao enxerto, reconstituição e expressão de HbF. Esse estudo empregou análises estatísticas, como testes t de Student e ANOVA, para avaliar os resultados. Os principais achados incluíram a tolerância bem-sucedida da mutagênese multiplex em células CD34⁺ adultas, sem afetar a proliferação e diferenciação celular, tanto in vitro quanto in vivo. A combinação de mutações cis e trans resultou em alta retenção de edição in vivo e expressão quase pancelular de HbF em camundongos NBSGW. Essas descobertas sugerem que a combinação de mutações cis e trans pode aumentar significativamente a HbF em pacientes com β -talassemia.

Na pesquisa de Grevet junto com seus colaboradores (2018), a tecnologia CRISPR-Cas9 foi aplicada para identificar reguladores da HbF em células eritroides humanas maduras. A proteína quinase é regulada pela heme, HRI (EIF2AK1), foi identificada como um potencial alvo terapêutico. A depleção da expressão de HRI resultou em um aumento na produção de HbF e uma redução na falcização em células eritroides cultivadas. Isso ocorreu principalmente devido à expressão reduzida do repressor de HbF, BCL11A, que desempenhou um papel fundamental nos efeitos observados após a depleção do HRI. Portanto, o estudo deles sugerem que o HRI pode ser um alvo terapêutico potencial para o tratamento de distúrbios relacionados à hemoglobina, como as hemoglobinopatias.

Han e colaboradores (2022) se concentraram nas beta-hemoglobinopatias e na reativação da expressão da γ -globina também usando a tecnologia CRISPR-Cas9. Mas nesse estudo, eles abordaram especificamente o intensificador eritroide BCL11A e o sítio de ligação BCL11A no promotor do gene γ -globina. Foram realizadas edições de genes únicos e múltiplos em células HUDEP-2 e células CD34⁺ humanas maduras.

Os resultados indicaram que a edição multiplex resultou em um aumento mais significativo na expressão de γ -globina em comparação com a edição de gene único, sem comprometer a diferenciação eritroide das células. A otimização da eficiência de edição de DNA nos locais-alvo demonstrou alta porcentagem de células F em células HUDEP-2. Além disso, não foram detectadas mutações fora do alvo em células progenitoras hematopoiéticas. Isso destacou a precisão e a eficácia da abordagem CRISPR-Cas9 para a edição genética em células relacionadas à hemoglobina.

De maneira semelhante, Thuret e seus colaboradores (2022) focaram seus estudos avaliando abordagens de terapia genética em pacientes sem doador HLA idêntico. A terapia gênica incluiu a adição de um gene funcional da beta-globina e a edição genética usando a tecnologia Cas9 para direcionar a expressão eritroide BCL11A. Os resultados obtidos mostraram promissoras melhorias na independência transfusional em diferentes faixas etárias e genótipos de β -talassemia. No entanto, também foram discutidos os obstáculos ao acesso à terapia genética, incluindo o risco de malignidades hematológicas secundárias complexas e multifatoriais, não limitadas ao risco de mutagênese insercional.

É notório que muitas das abordagens terapêuticas estão relacionadas com a reativação da hemoglobina fetal, através da inativação do gene BCL11A (GREVET *et al.*, 2018; KHOSRAVI *et al.*, 2020; FRANGOUL *et al.*, 2021). Khosravi e seus colaboradores (2020) identificaram uma sequência intensificadora eritroide associada a esse gene e demonstraram que, através da tecnologia CRISPR-Cas9, a sua desativação levou à supressão de BCL11A e induziu a da γ -globina na linhagem eritroide. O estudo enfatizou a eficácia da modificação do intensificador de BCL11A na reversão da supressão do gene γ -globina, oferecendo dados importantes para o desenvolvimento de terapias genéticas para a β -talassemia.

Ressalta-se que a supressão ou modificação proteína BCL11A pode levar ao aumento da produção de HbF, como discutido em diversos outros trabalhos (GREVET *et al.*, 2018; KHOSRAVI *et al.*, 2020; FRANGOUL *et al.*, 2021). Além disso, a edição multiplex, que envolve a modificação de múltiplos locais no genoma, é explorada em estudos como o de Han e seus colaboradores (2022). Essa abordagem visa alcançar resultados mais significativos na expressão de HbF. A edição multiplex, que envolve a modificação de múltiplos locais no genoma, é explorada em estudos como o de Han

e seus colaboradores (2022). Essa abordagem visa alcançar resultados mais significativos na expressão de HbF.

Diversos autores (ZENG *et al.*, 2020; KHOSRAVI *et al.*, 2020; FRANGOUL *et al.*, 2021) compartilham semelhanças e conexões em suas abordagens, embora cada um contribua com informações únicas para o campo da terapia genética de hemoglobinopatias. Todos esses estudos recorrem à tecnologia CRISPR-Cas9 como a base de suas pesquisas. Seu objetivo comum é editar genes específicos relacionados à produção de hemoglobina fetal, fundamental para pacientes com hemoglobinopatias, como doença falciforme e β -talassemia.

Os estudos também compartilham uma ênfase na avaliação de resultados, tanto em modelos *in vitro* quanto em modelos *in vivo*. Isso inclui experimentos em camundongos ou xenotransplantes em modelos animais para testar a eficácia das terapias propostas (WU *et al.*, 2019; THURET *et al.*, 2022; HAN *et al.*, 2022). Ressalta-se que os referidos estudos abordam o potencial da terapia gênica como uma abordagem curativa para pacientes com hemoglobinopatias, destacando os desafios e as oportunidades dessa abordagem.

Os estudos discutidos se complementam, fornecendo uma visão abrangente e multidisciplinar das estratégias de edição genética para tratar hemoglobinopatias, desde a identificação de alvos terapêuticos até a avaliação de resultados em modelos relevantes. Cada pesquisa contribui de maneira única para o avanço do campo da terapia genética nessas condições médicas.

No entanto, é importante notar que, apesar dos avanços promissores, alguns estudos, como o de Loucari e seus colaboradores (2018), que mencionam obstáculos relacionados à terapia genética, como o risco de malignidades hematológicas secundárias, destacando a necessidade de mais pesquisas e testes clínicos para avaliar completamente a segurança e eficácia dessas abordagens.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa no campo da terapia genética para hemoglobinopatias representa um avanço notável na busca por tratamentos eficazes e seguros para pacientes que sofrem dessas condições médicas desafiadoras. Os estudos discutidos nesta revisão bibliográfica não apenas contribuíram para uma compreensão mais profunda dessas doenças, mas também abriram caminho para novas abordagens terapêuticas promissoras.

O estudo liderado por Frangoul e seus colaboradores (2021) é digno de destaque, pois demonstrou com sucesso a viabilidade de reativar a produção de hemoglobina fetal em pacientes com distúrbios hematológicos. Os resultados notáveis deste estudo, que incluíram a independência de transfusões sanguíneas e a ausência de episódios vaso-oclusivos, fornecem evidências sólidas do potencial da terapia genética (FRANGOUL *et al.*, 2021). Isso é particularmente encorajador para os pacientes que sofrem com essas condições, pois oferece a perspectiva de uma qualidade de vida melhorada e uma redução significativa nas complicações associadas.

Outro estudo importante é o conduzido por Zeng e seus colaboradores (2020) que ampliaram as perspectivas da terapia genética para hemoglobinopatias ao destacar a indução da hemoglobina fetal por meio da edição de base de citosina. Essa abordagem inovadora oferece novas possibilidades de tratamento para pacientes com doença falciforme e β -talassemia, proporcionando um vislumbre da capacidade da edição genética de corrigir as anormalidades nas cadeias de hemoglobina (ZENG *et al.*, 2020). Essa pesquisa pode ser um passo importante em direção a terapias mais eficazes e personalizadas para indivíduos com essas condições.

A pesquisa apontou para uma eficácia da edição multiplex como uma estratégia promissora para a reativação sustentável da γ -globina. Ao modificar múltiplos locais no genoma, o estudo de Han e colaboradores (2022) ofereceu uma abordagem mais robusta e eficiente para induzir a produção de hemoglobina fetal. Essa descoberta tem implicações profundas para o desenvolvimento de terapias genéticas duradouras e eficazes para hemoglobinopatias.

Além disso, a literatura desempenha um papel fundamental na identificação de alvos terapêuticos essenciais para o tratamento das hemoglobinopatias. A

identificação da proteína quinase regulada por heme (HRI) e dos promotores próximos ao gene HBG como alvos potenciais abre novas oportunidades para abordagens terapêuticas direcionadas e eficazes (GREVET *et al.*, 2018; KHOSRAVI *et al.*, 2020; RAVI *et al.*, 2022). Essas descobertas fornecem uma base sólida para futuras investigações e desenvolvimentos terapêuticos.

No entanto, é importante reconhecer que, apesar desses avanços promissores, há preocupações legítimas relacionadas ao risco de malignidades hematológicas secundárias associadas à terapia genética. Essas preocupações ressaltam a necessidade contínua de pesquisas adicionais, testes clínicos rigorosos e monitoramento de longo prazo para avaliar completamente a segurança e eficácia dessas abordagens (LOUCARI *et al.*, 2018). O equilíbrio entre os benefícios potenciais e os riscos associados à terapia genética permanece como um desafio crítico a ser abordado à medida que essa pesquisa avança.

6 CONCLUSÃO

Este estudo buscou analisar à luz da literatura vigente o *state-of-art* da terapia gênica como uma abordagem promissora no tratamento da β -talassemia, destacando seu potencial para superar as limitações dos tratamentos convencionais. Os avanços recentes nessa área demonstram a capacidade de corrigir as causas genéticas subjacentes da doença, oferecendo uma alternativa viável às transfusões frequentes. No entanto, permanecem desafios significativos, incluindo questões de segurança, eficácia, acessibilidade e regulamentação, que precisam ser abordados para que a terapia gênica seja amplamente adotada na prática clínica.

À medida que avançamos para uma era de medicina personalizada e terapias de precisão, a terapia gênica para a β -talassemia representa um desenvolvimento que pode potencialmente transformar a vida dos pacientes. No entanto, é importante ressaltar que a pesquisa contínua, ensaios clínicos rigorosos e colaborações interdisciplinares serão essenciais para traduzir os avanços científicos em benefícios clínicos tangíveis.

REFERÊNCIAS

ABU-SHAHEEN, Amani et al. Epidemiology of thalassemia in Gulf Cooperation Council countries: a systematic review. **BioMed research international**, v. 2020, 2020.

ANGASTINIOTIS, Michael; LOBITZ, Stephan. Thalassemias: an overview. **International Journal of Neonatal Screening**, v. 5, n. 1, p. 16, 2019.

BRANCALEONI, V. et al. Laboratory diagnosis of thalassemia. **International journal of laboratory hematology**, v. 38, p. 32-40, 2016.

FRANGOUL, Haydar et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 3, p. 252-260, 2021.

GALANELLO, Renzo; ORIGA, Raffaella. Beta-thalassemia. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 5, p. 1-15, 2010.

GONG, Yi et al. A natural DNMT1 mutation elevates the fetal hemoglobin level via epigenetic derepression of the γ -globin gene in β -thalassemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 137, n. 12, p. 1652-1657, 2021.

GREVET, Jeremy D. et al. Domain-focused CRISPR screen identifies HRI as a fetal hemoglobin regulator in human erythroid cells. **Science**, v. 361, n. 6399, p. 285-290, 2018.

HAN, Yuanyuan et al. CRISPR/Cas9-based multiplex genome editing of BCL11A and HBG efficiently induces fetal hemoglobin expression. **European Journal of Pharmacology**, v. 918, p. 174788, 2022.

KHOSRAVI, Mohammad Ali et al. Expression analysis data of BCL11A and γ -globin genes in KU812 and KG-1 cell lines after CRISPR/Cas9-mediated BCL11A enhancer deletion. **Data in brief**, v. 28, p. 104974, 2020.

LOUCARI, Constantinos C. et al. Rapid and sensitive assessment of globin chains for gene and cell therapy of hemoglobinopathies. **Human gene therapy methods**, v. 29, n. 1, p. 60-74, 2018.

LU, Dian et al. Induction of Fetal Hemoglobin by Introducing Natural Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin Mutations in the γ -Globin Gene Promoters for Genome Editing Therapies for β -Thalassemia. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 881937, 2022.

MANGHWAR, H. et al. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 12, p. 1102–1125, 1 dez. 2019.

OLIVEIRA, Luíza Nayara M. de; SERPELONI, Beatriz Bonvicini; SIMION, Patrícia Ucelli. Terapia Gênica Para Portadores de Talassemia Beta através do Sistema

CRISPR/CAS 9. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 13, n. edespmulti, 2022.

PERUMBETI, Ajay et al. Genetic correction of sickle cell anemia and β -thalassemia: progress and new perspective. **The Scientific World Journal**, v. 10, p. 644-654, 2010.

PSATHA, Nikoletta et al. Enhanced HbF reactivation by multiplex mutagenesis of thalassemic CD34+ cells in vitro and in vivo. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 138, n. 17, p. 1540-1553, 2021.

QIN, Kunhua et al. Dual function NFI factors control fetal hemoglobin silencing in adult erythroid cells. **Nature Genetics**, v. 54, n. 6, p. 874-884, 2022.

RAVI, Nithin Sam et al. Identification of novel HPFH-like mutations by CRISPR base editing that elevate the expression of fetal hemoglobin. **Elife**, v. 11, p. e65421, 2022.

ROCHA, Lilianne Brito da Silva; MARTINS, Michelle Freitas; GONÇALVES, Romélia Pinheiro. Distribuição das mutações da β -talassemia em Fortaleza, Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 437-441, 2010.

SILBERMINS, Damian; METJIAN, Ara D. Iron Metabolism And Iron Overload. **Medical Secrets**, v. 151, p. 404, 2011.

THURET, Isabelle et al. Hurdles to the Adoption of Gene Therapy as a Curative Option for Transfusion-Dependent Thalassemia. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 11, n. 4, p. 407-414, 2022.

WAKABAYASHI, Aoi et al. Identification and characterization of RBM12 as a novel regulator of fetal hemoglobin expression. **Blood Advances**, v. 6, n. 23, p. 5956-5968, 2022.

WEATHERALL, David J. The evolving spectrum of the epidemiology of thalassemia. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 32, n. 2, p. 165-175, 2018.

WU, Yuxuan et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. **Nature medicine**, v. 25, n. 5, p. 776-783, 2019.

ZENG, Jing et al. Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells. **Nature medicine**, v. 26, n. 4, p. 535-541, 2020.