

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Jéssica Dias Lopes

Marina das Neves Silva

**A APLICAÇÃO DA TERAPIA GÊNICA POR CRISPR/CAS9 NO TRATAMENTO DE
ANEMIA FALCIFORME**

São Paulo

2023

Jéssica Dias Lopes – RA: 014778

Marina das Neves Silva – RA: 017851

A aplicação da terapia gênica por CRISPR/Cas9 no tratamento de anemia falciforme

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Profa. Dra. Leide de Almeida Praxedes, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Lopes, Jéssica Dias

A aplicação da terapia gênica por CRISPR/Cas9 no tratamento de anemia falciforme / Jéssica Dias Lopes, Marina das Neves Silva. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

53 p.

Orientação de Leide de Almeida Praxedes.

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

1. Anemia falciforme 2. Hemoglobinopatias 3. Proteína 9 associada à CRISPR 4. Terapia genética I. Silva, Marina das Neves II. Praxedes, Leide de Almeida III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 573.21

Jéssica Dias Lopes

Marina das Neves Silva

**A APLICAÇÃO DA TERAPIA GÊNICA POR CRISPR/CAS9 NO TRATAMENTO DE
ANEMIA FALCIFORME**

São Paulo, 23 de outubro de 2023.

Professora Orientadora Leide de Almeida Praxedes

Dra. Larissa Vilela Nascimento

Professora Dra. Juliana Vieira dos Santos Bianchi

São Paulo

2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe, meus padrinhos, minha tia Simone e meu primo Matheus que sempre me apoiaram, torceram e acreditam em mim.

Jéssica Dias Lopes

Aos meus pais e irmãos, que não soltaram a minha mão em momento algum. Sem vocês, não somente esse trabalho aconteceria, mas tudo na minha vida. Amo vocês eternamente.

Marina das Neves Silva

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha mãe que sempre esteve ao meu lado, que me apoiou, me levantou e me ajudou a caminhar em todos os momentos da minha vida. Se estou aqui hoje é graças a ela e tudo que faz por mim. Muito obrigada por ser meu ponto seguro e o que de melhor eu tenho na vida.

Jéssica Dias Lopes

Em primeiro lugar, gratidão a Deus e minha mãe Aparecida por tudo.

A minha mãe e meu pai que, com todos os esforços, fazendo o possível e o impossível, sempre cuidaram de mim e me deram o mais importante: o amor.

A todos os meus professores, desde o ensino básico até o superior, e o Ismart, pela transformação em minha vida através da educação.

Aos meus amigos, da escola, da faculdade e do estágio na polícia científica (NEE), por estarem comigo e me ajudarem, cada um a seu modo. Especialmente, Camila e Lucas, obrigada por tudo. Vocês foram essenciais nessa reta final.

Marina das Neves Silva

Agradecemos a nossa professora orientadora Prof^a Dra. Leide Praxedes pelo acompanhamento para a produção deste trabalho, assim como a nossa coordenadora Prof^a Dra. Renata Baida, pelos aconselhamentos e atenção durante esses anos de graduação.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

RESUMO

De acordo com o Ministério da Saúde, dentre as doenças hereditárias mais prevalentes no Brasil, a anemia falciforme (AF) ocupa o primeiro lugar, atingindo entre 25.000 e 30.000 habitantes, e cerca de 8% da população negra. O termo falciforme refere-se ao formato de foice que as hemácias adquirem a partir de uma mutação no gene da β -globina, localizada em 11p15.5. Dentro do grupo das doenças falciformes (DF), a AF é considerada como a variação mais grave, por conta da homozigose HbSS. O transplante de medula óssea a única opção corretiva para a enfermidade. A terapia gênica está em estudo para a aplicação na AF sendo uma das técnicas com a utilização da CRISPR/Cas9 já foi testado diferentes protocolos, tanto em roedores, como em humanos. Compreende uma revisão bibliográfica do tipo expositiva. Para o seu desenvolvimento, foram pesquisados artigos nos sites de busca: Google Acadêmico, SciELO e PubMed. O presente trabalho tem como objetivo analisar e compreender como o desenvolvimento da terapia gênica utilizando a CRISPR/Cas9, pode auxiliar no tratamento da anemia falciforme. Em 2016, utilizou-se um conjunto de RNP Cas9 e sistema de entrega AAV de um doador homólogo para atingir o gene da β -globina em células-tronco hematopoiéticas. Foram projetados dois tipos de doadores, um com modelo de AAV6 recombinante contendo SNP e outro com DNAC enriquecido, em ambas a edição gênica da mutação ocorreu eficientemente. Há estudos utilizando protocolos diferentes, tanto de entrega, como do design dos vetores, e apresentaram sucesso quanto às expectativas dos pesquisadores. Assim, demonstrou-se que a introdução dessas terapias em humanos é promissora, apesar de ainda necessitarem de um acompanhamento mais detalhado a longo prazo. Até o presente momento, nenhum protocolo de terapia gênica está aprovado no Brasil para o tratamento da DF. Por fim, com os dados obtidos dos trabalhos já realizados e com esta releitura bibliográfica, pode-se concluir que a CRISPR/Cas9 pode fazer parte ou até mesmo se tornar uma forma única de tratamento, trazendo resultados positivos.

Palavras-chave: Anemia falciforme, CRISPR/Cas9, terapia gênica e hemoglobinopatias.

ABSTRACT

According to the Ministry of Health, among the most prevalent hereditary diseases in Brazil, sickle cell anemia (SCA) ranks first, affecting between 25,000 and 30,000 inhabitants, and around 8% of the black population. The term sickle cell refers to the sickle shape that red blood cells acquire from a mutation in the β -globin gene, located at 11p15.5. Within the group of sickle cell diseases (SCD), SCA is considered the most serious variation, due to HbSS homozygosity. Bone marrow transplantation is the only corrective option for the disease. Gene therapy is being studied for application in AF and one of the techniques using CRISPR/Cas9 has already been tested in different protocols, both in rodents and in humans. - Includes an expository bibliographical review. For its development, articles were searched on the following search engines: Google Scholar, SciElo and PubMed. The present work aims to analyze and understand how the development of gene therapy using CRISPR/Cas9 can help in the treatment of sickle cell anemia. In 2016, a set of RNP Cas9 and AAV delivery systems from a homologous donor were used to target the β -globin gene in hematopoietic stem cells. Two types of donors were designed, one with a recombinant AAV6 model containing SNP and the other with enriched cDNA, in both of which gene editing of the mutation occurred efficiently. There are studies using different protocols, both for delivery and vector design, and they have shown success in terms of researchers' expectations. Thus, it was demonstrated that the introduction of these therapies in humans is promising, although they still require more detailed long-term monitoring. To date, no gene therapy protocol has been approved in Brazil for the treatment of FD. Finally, with the data obtained from the work already carried out and with this bibliographic review, it can be concluded that CRISPR/Cas9 can be part of or even become a unique form of treatment, bringing positive results.

Keywords: Sickle cell anemia, CRISPR/Cas9, gene therapy and hemoglobin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Deslocamento humano no período de 60 mil e 40 mil anos atrás	17
Figura 2 – Representação da estrutura tetramérica da hemoglobina	23
Figura 3 – Fisiopatologia da anemia falciforme.....	25
Figura 4 – Drepanócitos observados ao microscópio óptico	26
Figura 5 – Exemplos de IEF e HPLC de um paciente de 17 anos.....	31-32
Figura 6 – Outros achados em esfregaço sanguíneo de paciente falciforme....	32
Figura 7 – Exemplo de teste de solubilidade	33
Figura 8 – Radiografia simples da perna em paciente falciforme.....	34
Figura 9 – Tomografia computadorizada do abdome com contraste oral (adulto com AF).....	34
Figura 10 – Mecanismo de reconhecimento por CRISPR/Cas9	37
Figura 11 – Sistema CRISPR/Cas9 – Mecanismo de reconhecimento do alvo ..	38
Figura 12 – Esquema da edição alvo com RNP e rAAV6	40
Figura 13 – Marcadores de superfície associados aos eritrócitos	41
Figura 14 – Estrutura do vetor BB305	42
Figura 15 – Frações de hemoglobina da paciente.....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Valores de referência da concentração de hemoglobina.....	25
Quadro 2 – Relação de estudos recentes na página do <i>Clinical Trials</i>	40
Quadro 3 – Valores laboratoriais mensurados após a terapia gênica.....	45
Quadro 4 – Outros parâmetros laboratoriais analisados da paciente 2.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Evolução cronológica da mutação do gene para HbS18..... 19

Tabela 2 – Doenças correspondentes às fases de implantação do PNTN30 30

LISTA DE SIGLAS

AAV	Vírus adeno-associado
AF	Anemia Falciforme
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
AV	Adenovírus
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i>
CTH	Células-Tronco Hematopoiéticas
DF	Doença Falciforme
DSBs	<i>Double Stranded Breaks</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPA	Glicoforina A
HbA	Hemoglobina A
HbBart	Hemoglobina de Bart
HbC	Hemoglobina C
HbD	Hemoglobina D
HbE	Hemoglobina E
HbF	Hemoglobina F
HbH	Hemoglobina H
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média

HDR	<i>Homology Directed Repair</i>
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IEF	Focalização Isoelétrica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LDH	Lactato desidrogenase
NHEJ	<i>Nonhomologous end joining</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLA₂	Fosfolipase A₂
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PS	Fosfatidilserina
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
REDOME	Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea
RNAg	RNA guia
RNAm	RNA mensageiro
RNP	Ribonucleoproteínas
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STA	Síndrome Torácica Aguda
SUS	Sistema Único de Saúde
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i>

tNGFR *truncated Nerve Growth Factor Receptor*

VCM **Volume Corpuscular Médio**

ZFN *Zinc Finger Nuclease*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4 DESENVOLVIMENTO	23
4.1 Fisiopatologia da Anemia Falciforme	25
4.2 Sinais e Sintomas	28
4.3 Diagnóstico	30
4.3.1 O Programa Nacional de Triagem Neonatal	30
4.3.2 Hemograma e bioquímica	32
4.3.3 Teste de falcização e de solubilidade da hemoglobina normal	33
4.3.4 Diagnóstico por imagem	34
4.4 Abordagem terapêutica atuais	35
4.5 Terapia gênica	37
4.5.1 Abordagem geral de mecanismos de edição gênica	37
4.6 Terapia gênica na anemia falciforme	40
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Ministério da Saúde, dentre as doenças hereditárias mais prevalentes no Brasil, a anemia falciforme (AF) ocupa o primeiro lugar, atingindo entre 25.000 e 30.000 habitantes, e cerca de 8% da população negra (BRASIL, 2010).

No ano 1910, o pesquisador inglês James B. Herrick descreveu, pela primeira vez, um caso de anemia falciforme, em um artigo intitulado "*Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles corpuscles in a case of severe anemia*" em tradução livre, "glóbulos vermelhos peculiares em formato de foice em um caso de anemia grave" (HERRICK, 1910).

Entretanto, foi somente em 1946 que o estudante alagoano de medicina Jessé Accioly descreveu os mecanismos genéticos e hereditários da doença e publicou seu artigo em 1947, em uma revista local, denominada "Arquivos da Universidade da Bahia". No mesmo ano, na Universidade de Michigan (EUA), o geneticista James Neel obteve as mesmas conclusões, mas por ter publicado suas observações na revista *Medicine*, conseguiu maior notoriedade que Accioly, além do reconhecimento como o primeiro a descrever tais mecanismos (TAVARES NETO, 2010).

A AF está inserida nas Doenças Falciformes (DF), hemoglobinopatias em que a hemoglobina S (HbS) se encontra pareada com diferentes hemoglobinas variantes, como a hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD), hemoglobina E (HbE), hemoglobina de Bart (HbBart) e hemoglobina H (HbH), associadas à talassemia, dentre outras (KEOHANE, 2016).

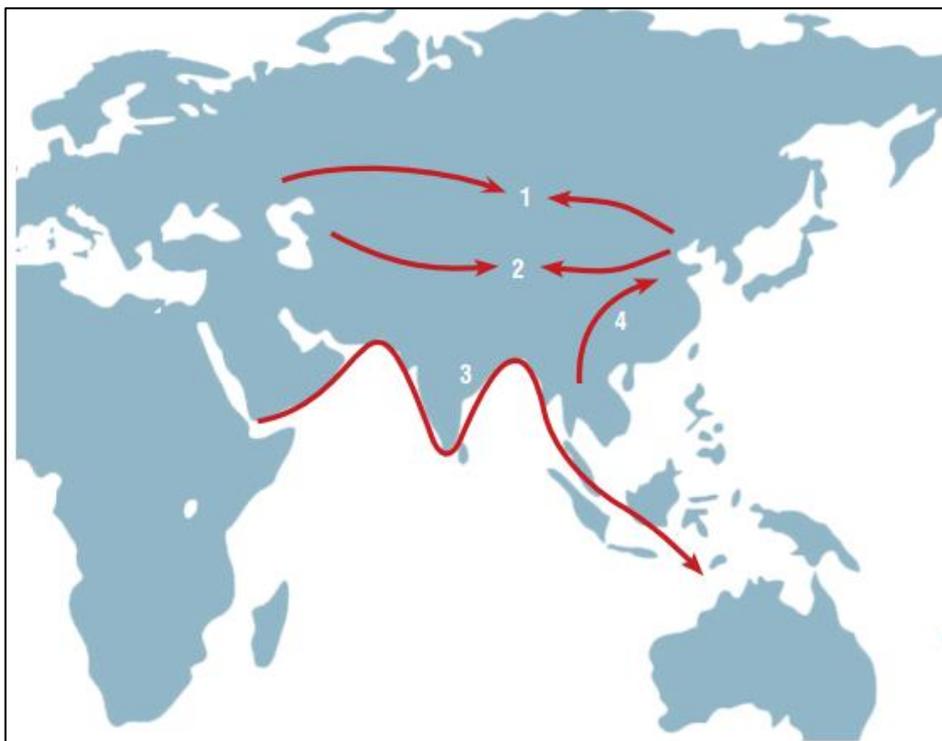
A AF é causada por duas mutações presentes no gene da β -globina, localizado em 11p15.5. Na posição de número 6, nesta mutação a sequência GAG é substituída pela sequência GTG, resultando, na proteína, a troca do aminoácido ácido glutâmico por uma valina (SUNDD *et al.*, 2019).

Cada hemoglobina normal adulta, denominada hemoglobina A (HbA), é formada por duas cadeias de globinas betas e duas de globinas alfa. As hemoglobinas alteradas (HbS), ao serem desoxigenadas, se associam formando polímeros de HbS que em grandes quantidades alteram a estrutura dos glóbulos vermelhos, formando os drepanócitos ou "células em foice", sendo denominadas "falciforme", evento chamado falcização (SILVA, 2022).

Acredita-se que a dispersão da mutação no gene originando a HbS possa ter acontecido durante a deslocação dos ancestrais humanos do continente africano, para

o sudeste da Ásia e o norte da Austrália nos períodos de 60 mil e 40 mil anos atrás. Portanto a sua origem ocorreu na África, nas regiões de Benin, Senegal, Bantu e Camarões e na Ásia nas regiões da Arábia e Índia. (ALVES *et al.*, 2015) e está relacionada a endemicidade da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*. Os indivíduos heterozigotos, ou seja, com o traço falcêmico (AS) mostram-se 90% mais protegidos da malária e de desenvolver sintomas graves de ambas as enfermidades, devido ao valor adaptativo (GERVÁSIO, 2019).

Figura 1: Deslocamento humano no período de 60 mil e 40 mil anos atrás.



Fonte: BRASIL, Ministério da Saúde, 2015.

Nota: Mapa ilustrativo da movimentação humana entre 60 mil e 40 mil anos atrás. Há cerca de 60 mil anos a migração se deu no sentido Ásia e Austrália (seta 3), e há 40 mil anos a movimentação ocorreu para diversas regiões da Ásia (setas 1 e 2), com destaque ao Oriente Médio e à Sibéria (seta 4).

A DF surgiu nas Américas com o fluxo migratório de povos africanos retirados de suas regiões e trazidos pelos europeus para trabalho escravo. Indígenas brasileiros não miscigenados não possuem hemoglobinas S. A introdução do gene mutado da β -globina S ocorreu, no Brasil, em regiões específicas e durante a colonização, no decorrer dos 300 anos de tráfico de pessoas escravizadas, nos séculos XVI e XVIII (tabela 1). A distribuição heterogênea do gene mutado na população brasileira ocorre sobretudo aos processos de miscigenação racial (ALVES *et al.*, 2015).

Tabela 1: Evolução cronológica da mutação do gene para HbS

Período	Ano	Evento
Paleolítico/Mesolítico	50 mil – 100 mil a.C.	Ocorrência da mutação do gene HbA para HbS em três regiões da África.
Pré-Neolítico	10 mil – 2 mil anos a.C.	Crescimento populacional no Saara com marcante miscigenação entre os povos.
Neolítico	3 mil – 500 anos a.C.	O aumento da transmissão da malária acompanha a revolução agrícola e exerce possível pressão seletiva para o gene HbS.
Neolítico Posterior	2 mil – 500 anos a.C.	A desertificação do Saara promove intensa migração populacional para todas as direções e, conseqüentemente, ocorre a dispersão de gene HbS.
Medieval	700 anos d.C. – século XV	Dispersão do gene HbS para o sudeste e o leste europeu.
Moderno	Séculos XV – XVIII	Dispersão do gene HbS pelo tráfico de negros africanos escravizados para as Américas e o Caribe.
Contemporâneo	Século XIX	Fase final do tráfico de africanos escravizados (1880) e início da imigração europeia para o Brasil. Tem início o processo de expressiva miscigenação da população brasileira.

Fonte: NAOUM & NAOUM. São Paulo: Sarvier, 2004.

As hemácias em forma de foice, perdem sua função, são destruídas causando anemia hemolítica e prejudicam o fluxo sanguíneo por possuírem maior densidade, serem pouco flexíveis e atraírem os monócitos e macrófagos que destruirão essas células, alterando, assim, diversos índices hematimétricos como a taxa de hemoglobina, o hematócrito, os reticulócitos e as células precursoras da eritropoiese (ZAGO *et al.*, 2004).

Com a diminuição e/ou obstrução dos vasos sanguíneos, os afetados apresentam complicações como dores ósseas frequentes e altamente intensas, acidente vascular cerebral e sua expectativa de vida é menor que a da população geral. São frequentemente hospitalizados, necessitam receber constantes transfusões de sangue e possuem como única opção curativa, atualmente, o transplante de medula óssea, disponível apenas para 15% dos pacientes (PARK *et al.*, 2021).

A terapia gênica, por meio do sistema CRISPR/Cas9, utilizando lentivírus como vetor é uma das novas alternativas para o tratamento da AF, no estudo de Ribeli *et al.*

(2017) foi avaliado o primeiro paciente testado, havendo sucesso no protocolo estabelecido e os níveis de β -globina aumentaram significativamente 15 meses após o tratamento feito. A descoberta do sistema CRISPR/Cas9, acrônimo para “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”, em português “Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas”, rendeu o prêmio Nobel de Química de 2020 a duas mulheres pesquisadoras, Emmanuelle Charpentier (FRA) e Jennifer A. Doudna (EUA) (JINEK *et al.*, 2012).

Em 2012, as duas pesquisadoras publicaram na revista Science sobre o sistema funcionar como um editor de genoma, utilizando além da proteína Cas9 outras proteínas nucleares como, TALEN (*TAL-effector nucleases*), ZFN (*zinc finger nucleases*), Fok2 etc. Em conjunto, poderiam formar um mecanismo capaz de “consertar” constantemente as células mutadas, mostrando resultados relevantes, apesar das dificuldades de serem programadas (PARK *et al.*, 2021).

Sendo assim, mesmo que ainda tenha alto custo e não seja completamente adotada, mas por ser menos invasiva que o transplante de medula óssea, com protocolos já elaborados em teste e ter eficácia demonstrada em alguns estudos, é possível traçar os caminhos que seguirão no desenvolvimento desta tecnologia e sua possível, futura aplicação em massa para pacientes ao redor do mundo, tornando assim de extrema relevância a abordagem desse tema.

2 OBJETIVOS

Os objetivos compreendem realizar o levantamento bibliográfico em bases de dados e bibliotecas científicas, sintetizando, analisando e discutindo as informações mais recentes sobre o desenvolvimento da terapia gênica, por meio do sistema CRISPR/Cas9, para a anemia falciforme.

Juntamente, compreender a estrutura e funcionalidade da hemoglobina, sua relevância no organismo e como a alteração da hemoglobina S altera a qualidade de vida do indivíduo através de trabalhos científicos produzidos até o momento.

3 MÉTODOS

O presente trabalho compreende uma revisão bibliográfica do tipo expositiva. Para o seu desenvolvimento, foram selecionados e utilizados cerca de 28 artigos publicados nos últimos 25 anos, com as palavras-chave: “anemia falciforme”, “terapia gênica”, “tratamento” e “CRISPR/Cas9”. As principais fontes de artigos foram: Google Acadêmico, SciElo e PubMed. Além disso, também foram utilizados livros acadêmicos e portarias do Ministério da Saúde como fonte de pesquisa.

4 DESENVOLVIMENTO

As hemoglobinas são formadas durante a hematopoese, processo de formação, diferenciação e maturação das células sanguíneas. A partir do 5º mês do desenvolvimento fetal, a hematopoese inicia na medula óssea e, após o nascimento, se estabelece como único local do processo. Além da medula, em adultos, o tecido hematopoiético também se encontra no baço, fígado, linfonodos e timo (KEOHANE, 2016).

Entretanto, em sua maioria, está presente no interior de ossos chatos, como o crânio, na epífise de ossos longos, como o fêmur e o úmero, além das vértebras, ossos do quadril, costelas e o esterno. Ao nascer, todos os ossos são capazes de produzir medula óssea vermelha, tipo medular ativo da hematopoese. Em torno de 5 e 7 anos, a medula óssea vermelha de alguns ossos tem parte de sua extensão substituída por medula óssea amarela, nomenclatura devido à presença de adipócitos (KEOHANE, 2016).

As células pluripotentes presentes na medula se diferenciam, primeiramente, em células progenitoras, as Unidades Formadoras de Colônia (CFU) que, então, originam as células precursoras. Em seguida, pode dar origem a duas linhagens principais, a mieloide e a linfóide (OLIVEIRA, 2004).

Como a hematopoese contempla a produção de todas as células do sangue, estímulos diferentes são responsáveis pela diferenciação de cada linhagem. Particularmente, a eritroide advém da linhagem mieloide e precisa da ação da eritropoetina, hormônio glicocorticoide produzido, nos rins, pelas células mesangiais, fibroblastos e células peritubulares, cujo estímulo principal é a hipóxia (KEOHANE, 2016).

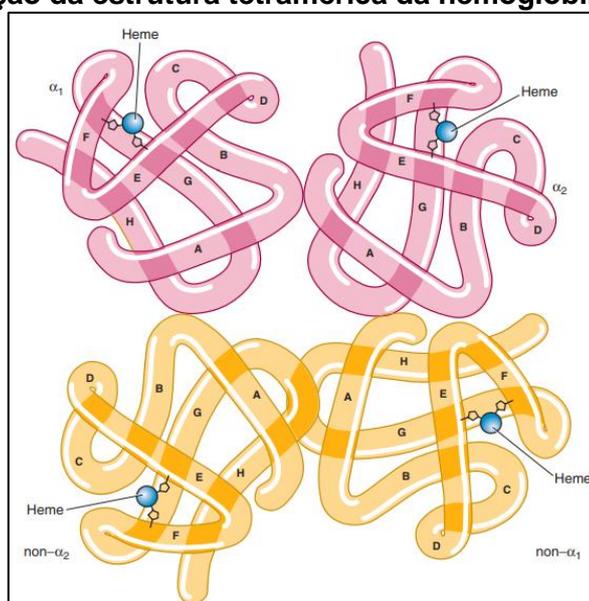
Durante as fases da eritropoese, as células se diferenciam, gradualmente em pró-eritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, eritroblasto ortocromático, reticulócitos e eritrócitos maduros. Em linhas gerais, até a produção dos reticulócitos, o processo se dá no interior da medula e, depois, no sangue periférico. A fase de hemoglobinização, isto é, o desenvolvimento das hemoglobinas, inicia desde a formação do eritroblasto policromático até ser completado nos reticulócitos (LORENZI, 2003).

As hemácias são formadas principalmente por hemoglobinas, cuja função principal é o transporte de oxigênio. Do ponto de vista estrutural, as hemoglobinas são

tetraméricas, composta por quatro globinas, duas de cadeias α e duas cadeias que podem ser β , δ ou γ que formam, respectivamente, os três tipos de hemoglobinas fisiológicas, a HbA ($2\alpha 2\beta$), HbA2 ($2\alpha 2\delta$) e HbF ($2\alpha 2\gamma$) (THOM *et al.*, 2013).

Cada monômero possui, além da porção proteica representada pelas cadeias das globinas, uma outra fração de um grupo prostético, o heme (figura 2). Essa porção não-proteica é formada pela protoporfirina IX que, por sua vez, é composta de quatro anéis pirrólicos com um ferro ao centro. Esse ferro, no estado divalente ou ferroso (Fe^{2+}), permite que o oxigênio se ligue reversivelmente à hemoglobina de acordo com a sua disponibilidade (GERVASIO, 2019).

Figura 2: Representação da estrutura tetramérica da hemoglobina



Fonte: adaptado de KEOHANE, 2016.

Nota: Molécula de hemoglobina ilustrando o dobramento terciário das quatro cadeias polipeptídicas. O heme está suspenso entre as hélices E e F de cada cadeia polipeptídica. As cadeias polipeptídicas formam primeiro $\alpha 1$ – não- $\alpha 1$ e dímeros $\alpha 2$ – não- $\alpha 2$ e, em seguida, montam-se em um tetrâmero (estrutura quaternária) com ligações $\alpha 1$ – não- $\alpha 2$ e $\alpha 2$ – não- $\alpha 1$.

A principal função das hemácias é o transporte de oxigênio pelo corpo e a hemoglobina tem grande importância nesta atividade. Como visto, o Fe^{2+} presente no heme interfere na troca gasosa. A entrada do O_2 em um grupo heme aumenta a interação das outras cadeias ao propiciar uma mudança conformacional na estrutura, facilitando, assim, a entrada das outras três moléculas de oxigênio nos outros grupos heme da hemoglobina, fenômeno denominado cooperatividade da hemoglobina (KEOHANE, 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, configura-se como anemia a quantidade diminuída de eritrócitos e/ou hemoglobina, ou seja, abaixo do normal (SANTIS, 2019). Os valores de referência para concentrações normais de hemoglobina variam de acordo com a idade, sexo e, para mulheres, se estão gestantes ou não (quadro 1).

Quadro 1: Valores de referência da concentração de hemoglobina

IDADE E SEXO	VALORES DE REFERÊNCIA (g/dl)
Recém-nascido	13,5 – 18,5
2 a 6 meses	9,5 – 13,5
6 meses a 6 anos	11,0 – 14,0
6 a 12 anos	11,5 – 15,5
Homens adultos	13,0 – 17,0
Mulheres adultas não grávidas	12,0 – 15,0

Fonte: adaptado de GERVÁSIO, 2019.

Assim como a concentração, a variedade das hemoglobinas também compreende diferentes proporções ao longo da vida; um indivíduo em seus seis primeiros meses de vida possui cerca de 50% de hemoglobina fetal (HbF) e 50% de hemoglobina adulta (HbA), já o adulto possui entre 96 e 98% de HbA, 2 a 3% de HbA2 e cerca de 0 a 2% de HbF (DYBAS *et al.*, 2020).

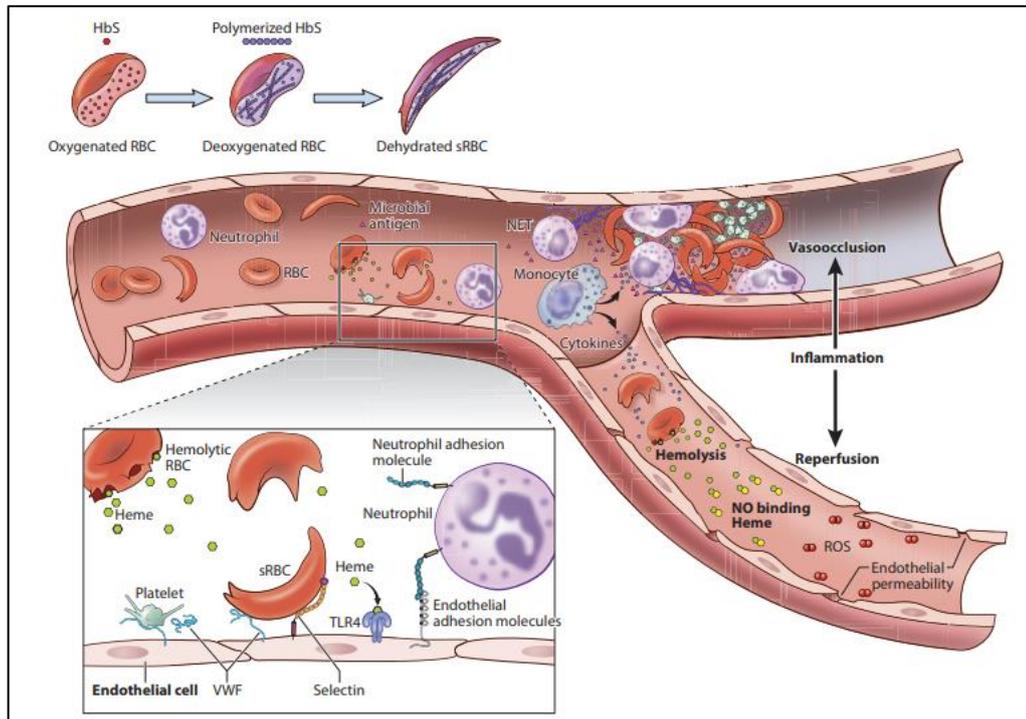
4.1 Fisiopatologia da Anemia Falciforme

Denomina-se “Doença Falciforme” as hemoglobinopatias que apresentem mutação no gene da β -globina. Esse grupo de hemoglobinopatias, causado por alterações autossômicas recessivas afeta cerca de 3,2 milhões de pessoas pelo mundo, especificamente, a AF é uma homozigose do alelo mutado β -S localizada em 11p15.5 (SUNDD *et al.*, 2019).

A mutação da AF ocorre no códon 6 (rs334) do gene, onde a base nitrogenada adenina é substituída por uma timina, levando à alteração do aminoácido de ácido glutâmico (codificada pelo códon GAG) para uma valina (GTG), um resíduo hidrofóbico. Assim, ao invés de serem formados tetrâmeros de HbA, são gerados tetrâmeros de hemoglobina S (HbS) (WILLIAMS, THEIN, 2018).

A mutação, embora pontual, confere à HbS e suas variantes uma propriedade única de polimerizar quando desoxigenada (figura 3). Desta forma, os polímeros de HbS vão se acumulando no interior do eritrócito, ocasionando sua mudança de um formato arredondado e bicôncavo para algo similar a uma foice (figura 4), evento denominado “falcização” (STEINBERG, 2008).

Figura 3: Fisiopatologia da anemia falciforme.

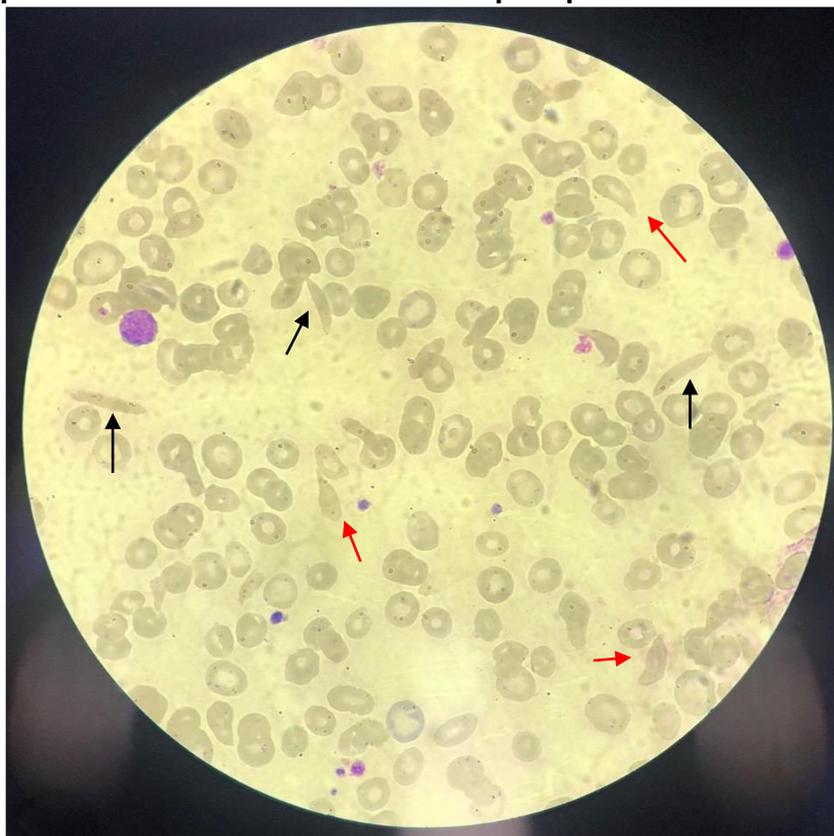


Fonte: WILLIAMS, 2018.

Em média, uma hemácia possui um diâmetro de 8 micras, enquanto um capilar sanguíneo possui em torno de 4 micras, e é devido a sua biconcavidade que a hemácia é capaz de circular nestes vasos com diâmetro inferior (MATTHEWS *et al.*, 2022).

Quando expostas à baixa tensão de oxigênio, a polimerização acontece e, por sua vez, causa desidratação mediada pelo influxo de cálcio, elevando a concentração de hemoglobinas intraeritrocitárias. Assim, a célula torna-se mais rígida e alongada e o sangue mais viscoso, fatores que impedem a livre passagem do fluxo pelos vasos sanguíneos mais estreitos. Como resultado, ocorre a vaso-oclusão e, conseqüentemente, infarto tecidual, além de estimular uma resposta inflamatória (figura 3) (STEINBERG, 2008).

Figura 4: Drepanócitos observados ao microscópio óptico.



Fonte: autoria própria.

Nota: Indicados pelas setas pretas, os drepanócitos estão sendo observados através da microscopia óptica com aumento de 1000x. Também é observável o momento da falcização, pois, como apontado pelas setas vermelhas, nota-se algumas hemácias apresentando a mudança em seu formato.

Além disso, a redistribuição dos fosfolipídios de membrana das hemácias contribui para a hemólise. A polimerização pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, juntamente com o cálcio intracelular, pode contribuir à exposição da fosfatidilserina (PS), um aminofosfolipídeo que se encontra voltada para o citoplasma em condições normais (KEOHANE, 2016).

Os fosfolipídeos se distribuem na membrana celular de eritrócitos de forma assimétrica. Assim, localizam-se de forma quase exclusiva na superfície interna da membrana. O movimento "flip-flop", realizado pela enzima flipase, mantém esta disposição. Porém, com a alteração da membrana dos drepanócitos, há uma significativa mudança na assimetria dos fosfolipídeos, exteriorizando a PS (STYPULKOWSKI & MANFREDINI, 2010).

A exposição anormal deste fosfolipídeo ocorre como consequência de repetidos ciclos de falcização e desfalcização do eritrócito falciforme. Correlacionam-se o aparecimento da PS na membrana do eritrócito com a progressão da DF, além da PS

ativar proteínas da coagulação, plaquetas, aumentar a expressão de moléculas de adesão do endotélio vascular e da anemia. (STYPULKOWSKI & MANFREDINI, 2010).

Ademais, macrófagos circulantes podem reconhecer a PS fagocitando, assim, a célula falciforme. Esse processo, com atuação do sistema mononuclear fagocitário ou sistema reticuloendotelial, leva à remoção precoce das hemácias na circulação, caracterizando o quadro hemolítico da doença (KEOHANE, 2016).

Além disso, a PS interage com glicoproteínas de células endoteliais aumentando a aderência aos vasos e obstruindo-os além de ativar a coagulação e diminuir o tempo de vida dos eritrócitos. Ademais, a PS torna-se também vulnerável à fosfolipase A₂ (PLA₂), gerando danos vasculares pela produção de ácidos graxos, contribuindo para a Síndrome Torácica Aguda (STA), significativa complicação da DF (KEOHANE, 2016).

4.2 Sinais e Sintomas

Visto que a porcentagem da HbS começa a superar a de HbF a partir do 6^o mês de vida, os primeiros sinais e sintomas surgem após essa idade. As hemácias já estão suscetíveis à hemólise intensa, causando a anemia hemolítica e o aumento do baço, relacionado ao sequestro esplênico (KEOHANE, 2016).

Em geral, devido a atuação do baço, a hemólise ocorre, principalmente, extravascularmente. Entretanto, a hemólise intravascular também pode acontecer e, nesses casos, podendo variar de acordo com cada paciente, pode ser 30% ou mais da hemólise total (STEINBERG, 2008).

A ação do Sistema Mononuclear Fagocitário é importante, pois os drepanócitos tendem a ficar retidos na microcirculação esplênica, hepática e pulmonar. Em termos comparativos, enquanto um eritrócito saudável dura cerca de 120 dias, um eritrócito falciforme dura entre 10 e 20 dias (GERVÁSIO, 2019).

Vale ressaltar que a crise do sequestro esplênico reduz a função do órgão à medida que ocorrem infartos no baço e, assim, adultos podem sofrer de hipoesplenismo ou até mesmo asplenismo (LORENZI, 2003).

A vaso-oclusão é responsável por causar intensa dor articular e óssea no paciente, um dos sintomas clássicos e principal motivo de internações. As crises, geralmente, iniciam espontaneamente e é antecedida por alguma infecção, o que

contribui para a atribuição de alguns estressores como febre, desidratação, exposição a baixas temperaturas, dentre outros (LOBO, 2007).

Aproximadamente 25% dos pacientes adultos com a DF sofrem um Acidente Vascular Cerebral (AVC), devido à estenose e a oclusão dos vasos. O AVC é considerado a complicação de maior preocupação clínica a longo prazo, podendo se estender a anormalidades cognitivas, mesmo não havendo comprometimento neurológico evidente (NEUMAYR *et al.*, 2019; STEINBERG, 2008).

Outra complicação relevante da DF, em geral, é a STA, caracterizada por tosse, febre, dor no peito, taquipneia e dores generalizada, que pode acontecer em crianças, jovens e adultos. Está ligada a embolia pulmonar, infecção bacteriana e pode levar ao óbito (LORENZI, 2003).

Outras complicações relacionadas à DF foram descritas por Keohane (2016):

I. Vaso-oclusão

a. Causas

- Acidose
- Hipóxia
- Desidratação
- Infecção
- Febre
- Frio extremo

b. Manifestações clínicas

- | | | |
|---------------------------|---|---------|
| • Dor | } | Osso |
| • Dactilia em mãos e pés | | |
| • Infecção (osteomielite) | | |
| • Pneumonia | } | Pulmões |
| • Síndrome Torácica Aguda | | |
| • Hepatomegalia | } | Fígado |
| • Icterícia | | |
| • Sequestro esplênico | } | Baço |
| • Autoesplenectomia | | |
| • Priapismo (pênis) | } | Olhos |
| • Hemorragia de retina | | |
| • Sistema Nervoso Central | | |

- Necrose Papilar Renal
 - Úlceras nas pernas
- II. Infecção bacteriana
 - a. Sepses
 - b. Pneumonia
 - c. Osteomielite
 - III. Disfunções hematológicas
 - a. Anemia hemolítica crônica
 - b. Episódios megaloblásticos
 - c. Episódios aplásticos
 - IV. Disfunções cardíacas
 - a. Cardiomegalia
 - b. Sopro cardíaco
 - V. Outras complicações clínicas
 - a. Comprometimentos no crescimento
 - b. Gravidez de alto risco

4.3 Diagnóstico

4.3.1 O Programa Nacional de Triagem Neonatal

No Brasil, a portaria Nº 822, de 06 de junho de 2001, estabelece que é obrigatória a execução do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) tanto através do Sistema Único de Saúde (SUS), quanto de estabelecimentos particulares, sob responsabilidade do Ministério da Saúde e das Secretárias de Saúde estaduais e do Distrito Federal. O PNTN tem por objetivo diagnosticar certas doenças (tabela 2) de maneira pré-sintomática, assim como o tratamento e acompanhamento dos recém-nascidos, de acordo com as fases descritas.

Tabela 2: Doenças correspondentes às fases de implantação do PNTN

FASE DE IMPLANTAÇÃO	DOENÇAS CONGÊNITAS CORRESPONDENTES
Fase I	Fenilcetonúria e Hipotireoidismo Congênito

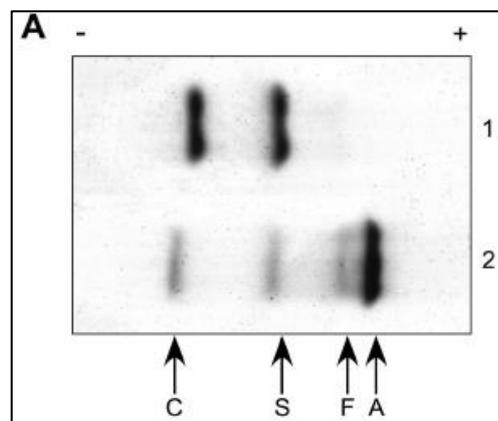
Fase II	Fenilcetonúria e Hipotireoidismo Congênito + Doenças Falciformes e outras Hemoglobinopatias
Fase III	Fenilcetonúria, Hipotireoidismo Congênito, Doenças Falciformes e outras Hemoglobinopatias + Fibrose Cística
Fase IV*	Fenilcetonúria, Hipotireoidismo Congênito, Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias, Fibrose Cística, Hiperplasia Adrenal Congênita e Deficiência de Biotinidase

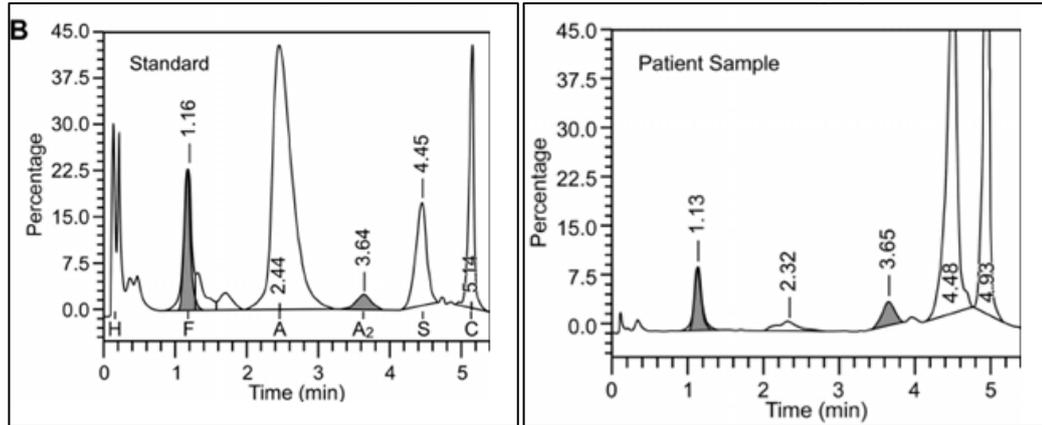
Nota: A fase IV foi instituída posteriormente sob a portaria nº 2.829 de 14 de dezembro de 2012.

A realização ideal da triagem neonatal é entre o 3º e o 5º dia de vida, com amostra de sangue coletada da região do calcanhar e aplicada em papel filtro adequado. Dois métodos são utilizados (figura 5), a Focalização Isoelétrica (IEF, do inglês *“Isoelectric Focusing”*) e a Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (HPLC, do inglês *“High-Performance Liquid Chromatography”*) (MENDES, 2019).

O IEF permite a separação das bandas de hemoglobinas por meio de uma voltagem automatizada, assim, analisa de forma quantitativa e qualitativa, podendo identificar as hemoglobinopatias. Já a HPLC, por se tratar de um método cromatográfico, baseia-se na separação de componentes de acordo com seu tamanho e carga elétrica, sendo uma técnica bastante eficiente para uma alta demanda de diagnósticos, visto ser um teste quantitativo realizado de forma rápida e precisa (ALMEIDA, 2017).

Figura 5: Exemplos de IEF e HPLC de um paciente de 17 anos





Fonte Adaptado de O'KEEFFE *et al.*, 2009.

Nota: Em A, observa-se IEF, sendo a linha 1 com amostra do paciente 2 e com os controles. Em B vê-se o gráfico de HPLC.

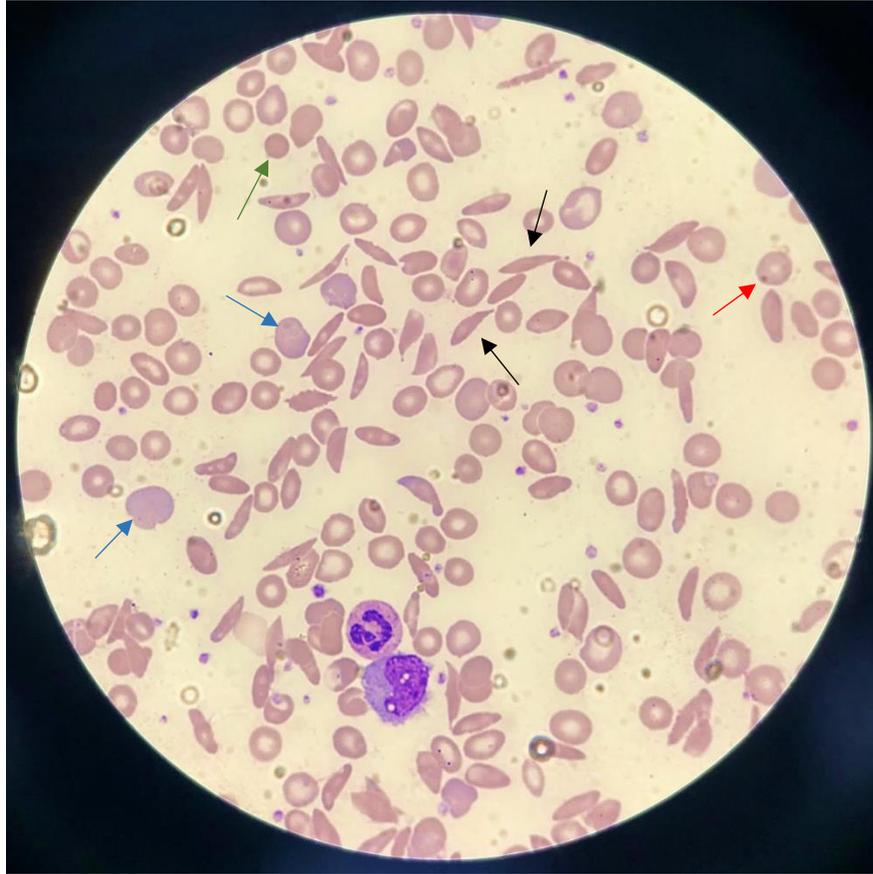
4.3.2 Hemograma e bioquímica

Quanto ao diagnóstico tardio, isto é, quando não realizado na triagem neonatal, a investigação pode começar pelo hemograma. Por analisar a série vermelha, a branca e as plaquetária, o exame é fundamental para o diagnóstico de diversas doenças relacionadas ao sangue (LORENZI *et al.*, 2003).

Para pacientes falciformes, observa-se uma anemia morfologicamente classificada como normocítica normocrômica, com elevação do RDW e reticulocitose (policromasia). No esfregaço sanguíneo, há poiquilocitose com presença de drepanócitos (patognomônico) e eritrócitos normais, mas também podem aparecer codócitos, esferócitos e pontilhado basófilo, corpos de Pappenheimer e Howell-Jolly. A policromasia indica que se trata de uma anemia regenerativa, visto que a medula óssea busca compensar a perda celular. Devido à resposta inflamatória, pode haver leucocitose e trombocitose (KEOHANE, 2016).

Quanto aos achados bioquímicos, por conta da hemólise extravascular, a análise do soro pode apresentar aumento da bilirrubina total assim como da bilirrubina indireta, explicando a icterícia no paciente, e da lactato desidrogenase (LDH) (KEOHANE, 2016).

Figura 6: Outros achados em esfregaço sanguíneo de paciente falciforme



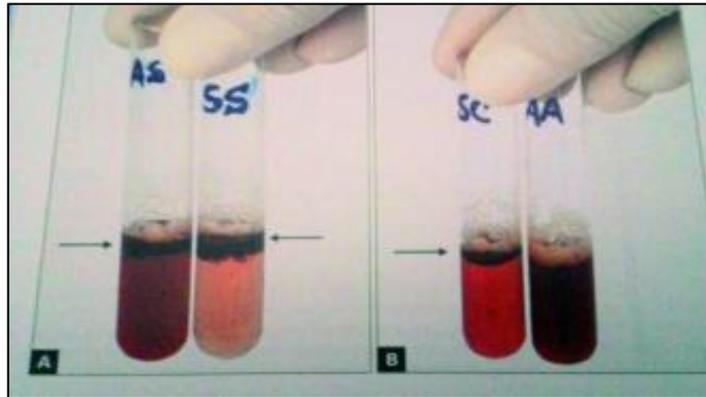
Fonte: autoria própria.

Nota: Imagem obtida a partir de microscopia óptica (x1000) e editada artificialmente (aumento da saturação) para melhorar a visualização da policromasia. Setas pretas: drepanócitos; setas azuis: policromasia; seta vermelha: corpúsculo de Howell-Jolly; seta verde: esferócito.

4.3.3 Teste de falcização e de solubilidade da hemoglobina normal

O teste de falcização é um exame microscópico que consiste em submeter os eritrócitos a desoxigenação. A falcização pode ser induzida por agentes que provocam uma desoxigenação química, quando uma solução de metabissulfito de sódio é adicionada ao sangue total, os eritrócitos contendo HbS se deformam. Já a prova de solubilidade (figura 7) para a hemoglobina anormal baseia-se na precipitação da hemoglobina em S em meio redutor, que ocorre por meio do decréscimo da solubilidade da forma deoxi-HbS. A hemoglobina S insolúvel precipita-se em solução, tornando-a turva (WOITOWICZ, 2010).

Figura 7: Exemplo de teste de solubilidade



Fonte: RODRIGUES *et al.*, 2017.

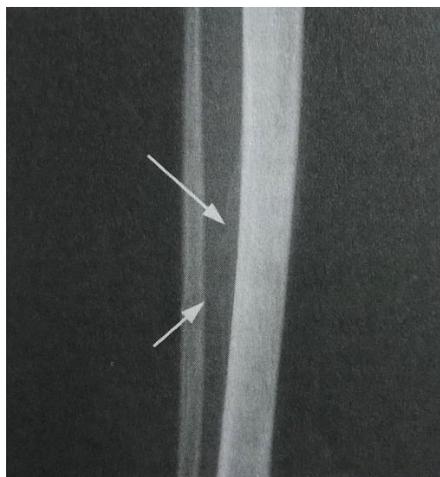
Nota: Normal: AS, SS, SC e AC são diferentes fenótipos de HbS

4.3.4 Diagnóstico por imagem

Visto que a falcização leva também ao infarto ósseo e à osteonecrose, uma radiografia simples é capaz de mostrar essas alterações, mesmo entre os 6 meses de idade e 2 anos, faixa etária que infartos nos pequenos ossos tubulares ocasiona ocupação de tecido fibroso na medula óssea, característica da “síndrome da mão-pé” (LORENZI, 2003).

Na radiografia, calcificações na medula óssea e no baço, por exemplo, representam o infarto crônico (figura 8 e 9b). Além disso, é possível visualizar cardiomegalia (figura 9b), hepatomegalia (figura 9b) e focos de hematopoese extramedular (figura 9c) (LORENZI, 2003).

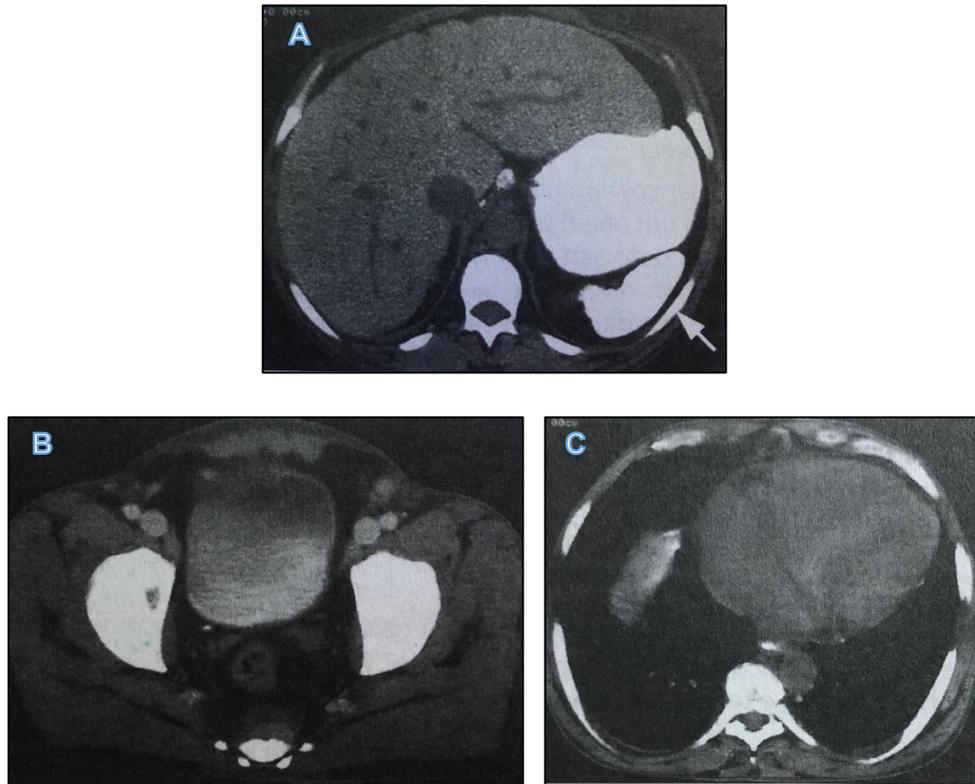
Figura 8: Radiografia simples da perna em paciente falciforme



Fonte: LORENZI, 2003.

Nota: Espessamento periosteal no terço médio da tíbia causado por sangramento local simulando tumor, indicado pelas setas brancas.

Figura 9: Tomografia computadorizada do abdome com contraste oral (adulto com AF)



Fonte: LORENZI, 2003.

Nota: (A) imagem ao nível da região torácica baixa demonstrando cardiomegalia; (B) imagem ao nível do fígado demonstrando hepatomegalia, as setas brancas indicam calcificações esplênicas extensas; (C) massa pré-sacral, provável foco de hematopoese extramedular.

4.4 Abordagens terapêuticas atuais

Visto que a dor intensa é marcante nos pacientes em crise, o tratamento indicado é, principalmente, a administração de opioides, podendo ser oral ou intravenoso. Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) podem ser utilizados como tratamento complementar (RANG & DALE, 2016).

As transfusões de sangue mensais são necessárias para algumas crianças com AF. Alguns trabalhos demonstraram que o risco de AVC, em crianças, reduziu cerca de 92% com as transfusões sanguíneas recorrentes (BRANDOW, 2022).

A transfusão regular de hemácias demonstra redução do risco de evento isquêmico cerebral, além de melhoras como redução do número e intensidade de crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e quantidade de hospitalizações, assim melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Entretanto estudando vinte pacientes com anemia falciforme em transfusão sanguínea crônica, resultados

demonstraram que repetidas transfusões acarretam à sobrecarga de ferro, com aumento da concentração de hemácias filtradas sendo esses fatores determinantes de maior risco de morbidade e mortalidade nestes pacientes (CANÇADO, 2007).

Outra abordagem farmacológica é a hidroxiureia (hidroxicarbamida), administrada em doses diárias, com ação citotóxica relacionada, também, a efeitos anti-inflamatórios secundários, benéfico nas crises dolorosas, além disso, induzem a produção de HbF e seu metabolismo gera óxido nítrico que possui importante ação vasodilatadora. Quanto aos efeitos adversos deste medicamento, são descritos a neutropenia, trombocitopenia, náuseas, erupção cutânea e mielossupressão (RANG & DALE, 2016; BRANDOW, 2022).

Por já ter demonstrado relação com a ativação da coagulação a hipercoagulabilidade é observada nos pacientes com DF em geral. Contudo, agentes anticoagulantes e antiplaquetários, analisados em ensaios clínicos, não demonstraram benefício convincente para a prevenção ou até mesmo para o tratamento de consequências da vaso-oclusão (STYPULKOWSKI & MANFREDINI, 2010).

Em termos curativos, o transplante alogênico de medula óssea é a única opção possível, podendo atingir entre 91 e 93% de cura. Entretanto, a compatibilidade necessária depende do sistema HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*) que é relativamente baixa para doadores alternativos, visto que os doadores ideais são familiares próximos, principalmente irmãos (BRANDOW, 2022).

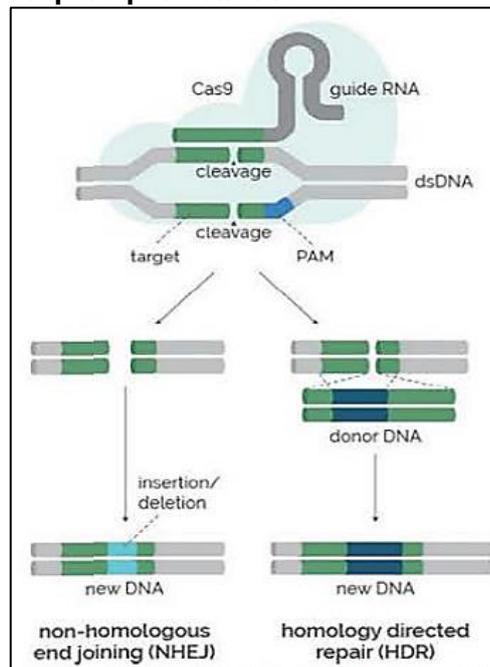
No Brasil, é possível realizar o cadastro voluntário para doação de medula óssea através do sistema REDOME, o Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea do Instituto Nacional de Câncer (INCA), vinculado ao Ministério da Saúde, ocupa o terceiro lugar mundial, precedido pelos Estados Unidos e a Alemanha, contando com o cadastro de mais 5,5 milhões de brasileiros. Esse número permite que um paciente à procura de doador compatível tem uma chance de 88% de o encontrar ainda na fase inicial de procura e 64% a chance da confirmação do doador ao final do processo (INCA, 2023).

4.5 Terapia gênica

4.5.1 Abordagem geral de mecanismos de edição gênica

Os mecanismos para edição gênica envolvem basicamente duas maneiras de reparo (figura 10), o reparo direcionado por homologia (do inglês, *homology-directed repair* – HDR) ou por junção de extremidades não homólogas (do inglês, *nonhomologous end-joining* – NHEJ). Quando há uma quebra direcionada da dupla fita de DNA (do inglês, *double strand breaks* – DSBs), esses dois sistemas podem atuar, demonstrando aos pesquisadores que as DSBs podem estimular o autorreparo da maquinaria celular (DEVER *et al.*, 2016).

Figura 10: Mecanismos de reparo por CRISPR/Cas9



Fonte: Adaptado de FRANGOUL *et al.*, 2021.

Nota: Imagem retirada do protocolo do estudo.

De maneira geral, o que diferencia a atuação de HDR e NHEJ é a sequência-alvo, visto que a primeira age sobre extremidades homólogas e a segunda não obrigatoriamente necessita de extremidades que possam se religar diretamente. Ademais, a recombinação homóloga demanda uma molécula doadora, para que sirva como um modelo homólogo ao reparar a quebra (MAEDER, 2016; DEVER *et al.*, 2016).

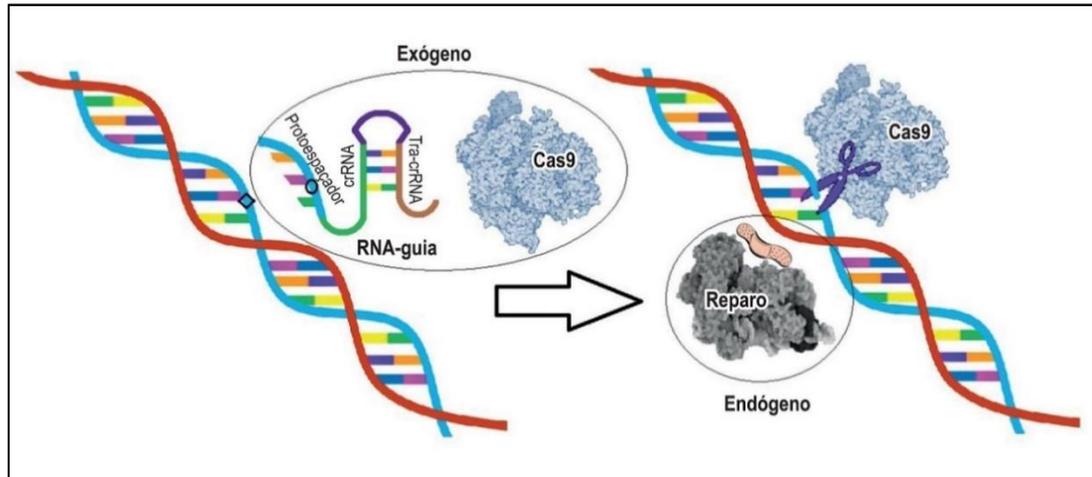
Visto que a engenharia por trás de DSBs induzidas está relacionada à reparação endógena da célula, pode-se inferir que sua aplicação para qualquer tipo celular ou organismo é possível, entretanto, uma das limitações é a introdução específica da DSB guiada. Atualmente, quatro mecanismos de nucleases são conhecidos para essa indução, as nucleases ZFN, TALEN, meganucleases e o sistema CRISPR/Cas (MAEDER, 2016).

O CRISPR junto com uma endonuclease, a Cas9 (CRISPR *associated protein* 9) e um RNA guia (RNAg), possuindo uma sequência única de 100 nucleotídeos, e possibilitando a edição do genoma através da clivagem do DNA, sendo capaz de se parear com as bases de uma sequência-alvo (figura 11). O reconhecimento é baseado na identificação da sequência PAM (do inglês, *protospacer adjacent motif*), com três pares de base e então, a hibridização ocorre entre o alvo e cerca de 20 nucleotídeos do RNAg (DEVER, 2016).

Como o sistema CRISPR/Cas foram primitivamente descobertos no sistema imune inato de bactérias, diferentes variantes de Cas9 já foram identificadas. Dentre elas, a mais utilizada em processos moleculares é a advinda do *Streptococcus pyogenes* expressas em *Escherichia coli* como uma proteína recombinante. Em geral, na natureza, as Cas9 necessitam de dois RNAs diferentes, crRNA (RNA CRISPR) e tracrRNA (RNA transativador), assim, a descoberta do RNAg poder atuar como substituinte único simplificando e aumentando a especificidade do processo de clivagem (LUTHER, 2018).

Tanto a proteína Cas9, quanto o RNAg, podem ser introduzidos *in vitro* em outras células e direcionados a locais específicos do genoma, para que provoquem quebras na fita dupla. Após esta clivagem, a maquinaria molecular é utilizada para alterar a sequência de DNA, adotando a modificação no sistema podendo tanto reparar mutações como introduzir novas. Conciliando sofisticadas técnicas moleculares e biotecnológicas, o sistema CRISPR/Cas9 foi proposto para aplicação em edição genômica (AREND *et al.*, 2017).

Figura 11: Sistema CRISPR/Cas9 - Mecanismo de reconhecimento do alvo.



Fonte: AREND *et al.*, 2017.

Nota: Quando o pareamento de bases nitrogenadas ocorre, algumas modificações são adicionadas, representadas pelo círculo, e a enzima Cas9 é acionada, causando quebras na dupla-fita de DNA.

A versatilidade do sistema CRISPR/Cas9 permite diversas aplicações quanto à engenharia genética e sua efetividade em métodos *in vivo* e *ex vivo*. Entretanto, *in vivo*, algumas barreiras ainda são enfrentadas, como os sistemas de entrega, o trabalho de Luther *et al.* (2018), descreve os modelos de apresentação: virais, plasmídeos, mRNA (RNA mensageiro) e de proteínas.

O método viral é o mais amplamente utilizado, podendo ser com lentivírus, adenovírus (AV) e adenovírus associado (AAV), uma desvantagem associada é o estímulo de resposta imune no hospedeiro, mas estudos *in vivo* com vetores virais em tumores hepáticos demonstraram eficiência interessante. Por outro lado, os AAVs demonstraram, por alguns fatores, que são o método mais seguros de vetor viral, portanto, mais adequados para aplicações *in vivo* (LUTHER *et al.*, 2018).

O uso de plasmídeos mostra-se interessante por não conter o fator imunogênico que é associado aos vetores virais, mas possui baixa eficiência nas transfecções comparadas aos vetores virais (LUTHER *et al.*, 2018).

Os ácidos nucleicos, RNAm, apresentam vantagens como a capacidade de gerar uma remoção eventual da nuclease, evitando sua inserção no genoma hospedeiro, e a agilidade do processo visto rápida transcrição em minutos. Mas também traz suas desvantagens, como a necessidade de entregas individuais de cada componente, pois o RNAm é mais frágil e propenso a degradar prematuramente (LUTHER *et al.*, 2018).

O método utilizando o complexo da Cas9 e o RNAg, que formam a ribonucleoproteína Cas9-RNP. Com essa técnica, os resultados demonstram direcionamento adequado ao alvo, baixa mutagênese e pouca resposta imune relativa. Quanto aos obstáculos, destaca-se a captura pelos endossomos e dificuldades na capacidade de tradução e o pouco tempo de sobrevivência (LUTHER *et al.*, 2018).

O sistema CRISPR/Cas9 apresenta alta versatilidade, eficácia, especificidade e a facilidade de uso, que demonstrou uma grande vantagem na produção de vetores para atingir locais-alvo ou mesmo genomas extensos. Benefícios de sua utilização podem ser observados como, após induzir uma quebra de cadeia dupla, a proteína Cas9 se mantém inalterada e podendo ainda modificar múltiplos locais genômicos ao mesmo tempo.

A simplicidade do CRISPR/Cas9, o exclusivo mecanismo de clivagem de DNA, a capacidade de reconhecimento de alvos multiplexados e a existência de muitas variantes do sistema CRISPR- Cas9 permite o desenvolvimento de notáveis avanços usando esta técnica e de fácil utilização. Sendo possível usar esse método para direcionar, editar, modificar, regular e marcar de maneira precisa e eficiente os *loci* genômicos de uma ampla variedade de células e organismos além de possuir um custo relativamente menor em comparação as outras técnicas (CAETANO *et al.*, 2016).

4.6 Terapia gênica na anemia falciforme

Ao fazer uma busca geral, pela base de dados online *Clinical Trials* (NCBI - EUA), são apresentados sete estudos, em diferentes status de procedimento, como demonstrado no quadro 2. Para os filtros de pesquisa, inseriu-se apenas nos campos “*Condition/disease*” as palavras-chave “*sickle cell*” e, em “*Intervention/treatment*”, “CRISPR Cas 9”. Outros critérios foram desconsiderados.

Quadro 2: Relação de estudos recentes na página do *Clinical Trials*

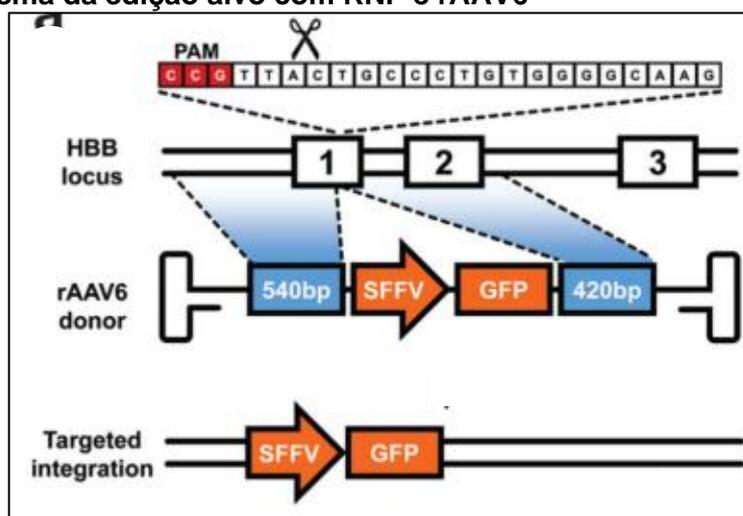
TÍTULO	ID	STATUS
Gene Correction in Autologous CD34+ Hematopoietic Stem Cells (HbS to HbA) to Treat Severe Sickle Cell Disease	NCT04819841	Finalizado

A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Severe Sickle Cell Disease	NCT03745287	Ativo, não recrutando
Evaluation of Efficacy and Safety of a Single Dose of CTX001 in Participants With Transfusion-Dependent β -Thalassemia and Severe Sickle Cell Disease	NCT05477563	Recrutando
Evaluation of Efficacy and Safety of a Single Dose of Exa-cel in Participants With Severe Sickle Cell Disease, β S/ β C Genotype	NCT05951205	Ainda não recrutou
Transplantation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Modified Hematopoietic Progenitor Stem Cells (CRISPR_SCD001) in Patients With Severe Sickle Cell Disease	NCT04774536	Ainda não recrutou
Evaluation of Safety and Efficacy of CTX001 in Pediatric Participants With Severe Sickle Cell Disease (SCD)	NCT05329649	Recrutando
A Long-term Follow-up Study in Subjects Who Received CTX001	NCT04208529	Matrícula por convite

No trabalho realizado por Denver *et al.* (2016), foi utilizado o conjunto de RNP Cas9 e sistema de entrega AAV de doador homólogo para atingir o objetivo no gene da β -globina em células-tronco hematopoiéticas (CTH), cujo marcador foi a glicoproteína CD34⁺. Os pesquisadores projetaram um modelo de AAV6 recombinante (rAAV6) contendo a mutação que origina a alteração falciforme (Glu6Val) e outros polimorfismos para impedir que a Cas9 clivasse novamente as estruturas recombinadas.

O estudo ocorreu *in vivo* com ratos diabéticos severos, não obesos, com imunodeficiência, entre 6 e 8 semanas de vida, adquiridos comercialmente. A figura 12 representa, esquematicamente, a edição realizada. As DSBs são geradas principalmente entre os nucleotídeos 17 e 18 dos 20 pb da sequência alvo, seguida pela sequência PAM. Quando criada, a DSB estimula o reparo e então, a recombinação homóloga com base no rAAV6 é feita (DENVER *et al.*, 2016).

Figura 12: Esquema da edição alvo com RNP e rAAV6



Fonte: Adaptado de DENVER *et al.*, 2016.

Nota: Em vermelho está a sequência PAM; em azul, regiões homólogas; nas caixas brancas, os éxons; e a tesoura representa a Cas9. SFFV é o promotor (*spleen focus-forming virus*), GFP é um marcador fluorescente (*Green Fluorescent Protein*), RH é recombinação homóloga e HBB é o gene da β -globina.

Os RNAs do HBB e da nuclease *IL2RG* também usada no processo, foram adquiridos comercialmente e possuíam modificações quanto às posições terminais nas extremidades 5' e 3', sendo respectivamente do HBB e da *IL2RG*, 5'-CTTGCCCCACAGGGCAGTAAC**CGG**-3' e 5'-TGGTAATGATGGCTTCAACAT**TGG**-3', e a sequência PAM está destacada em negrito. Após os procedimentos de preparo, as CTH CD34+ tiveram o vetor rAAV6 adicionado e foram incubadas (DENVER *et al.*, 2016).

Como resultado, as células expressaram diferentes níveis de GFP e foram submetidas a cultura. Das células que continham altos níveis de GFP, a cultura apresentou mais de 95% de fluorescência demonstrando que a modificação havia ocorrido com sucesso. Então, seguiram para a testagem para a correção direta da mutação nas células CD34+ adquiridas de pacientes com DF, com dois tipos de doadores (DENVER *et al.*, 2016).

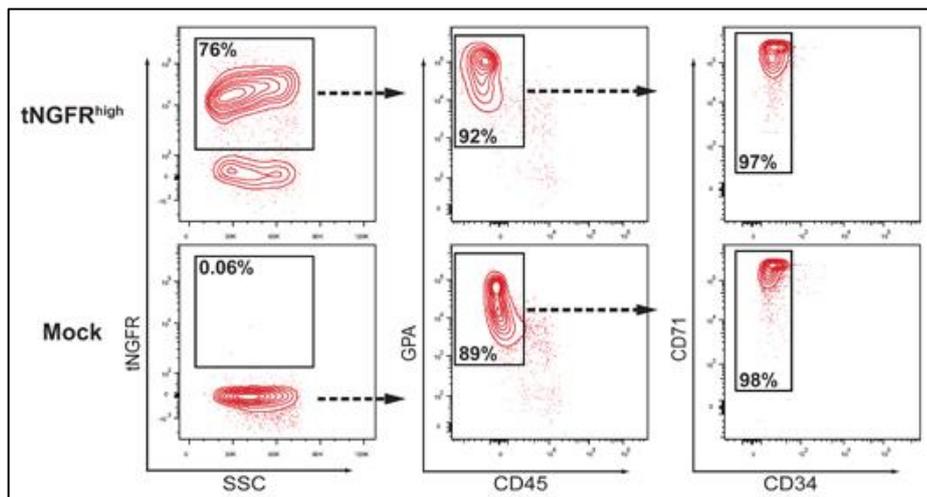
O primeiro foi um doador de rAAV6 que contém um polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphism*, SNP) corretivo. Para que não correr o risco de a Cas9 cortar novamente o alvo ou então sofrer *crossover* precoce, foram inseridas mutações silenciosas no vetor. Com ele, houve cerca de 50% de correção dos alelos mutados de HbS para alelos saudáveis de HbA e cerca de 45% dos clones analisados tinham, pelo menos, um alelo de HbA (DENVER *et al.*, 2016).

O segundo tipo de doador continha um doador terapêutico de DNA complementar (DNAC) anti-falciforme do gene da β -globina (HbAS3), seguido de um promotor específico, o EF1 α , a fim de garantir a expressão das células corrigidas a partir do fator tNGFR (do inglês, *truncated nerve growth factor receptor*). Como resultado, 11% das CTH com DF apresentaram ótima integração, através da análise por PCR (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*) (DENVER *et al.*, 2016).

Além de concluir que os dois tipos de doadores eram eficientes para corrigir a mutação, ao final, foi investigado se a diferenciação da linhagem eritróide seria mantida com a edição gênica. A partir de um estímulo controlado de 21 dias, as células passaram por citometria de fluxo, que identificou a presença de células maduras, diferenciadas (os eritrócitos expressavam RNAm de β -globina adulta, HbA, o que confirma a regulação transcricional intacta de alelos HBB editados) (figura 13) (DENVER *et al.*, 2016).

Finalmente, procedeu-se a análise da transcrição de RNAm das HbA e HbAS3 dos alelos editados. Por RT-qPCR (do inglês, *reverse transcriptase quantitative PCR*), as células corrigidas com o primeiro doador, SNP, expressaram 56% de RNAm de HbA, enquanto as que utilizaram o DNAC expressaram 20% de RNAm de HbAS3 e as de DNAC enriquecidas expressaram 70% de RNAm HbAS3 (DENVER *et al.*, 2016).

Figura 13: Marcadores de superfície associados aos eritrócitos



Fonte: Adaptado de Denver *et al.*, 2016.

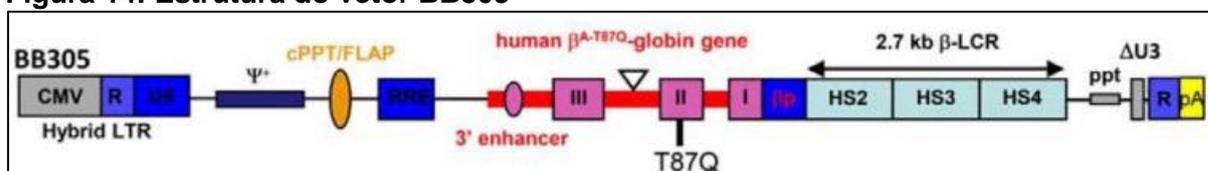
Nota: Mock indica células controle e GPA, glicoforina A.

Ribeli *et al.* (2017) acompanharam um paciente do sexo masculino com anemia falciforme, genótipo homozigoto (SS), histórico de diversas crises vaso-oclusivas e

dois episódios de STA, além de osteonecrose bilateral do quadril, com esplenectomia e colecistectomia realizadas. Entre seus 2 e 9 anos de idade, foi administrado hidroxiureia que não foi capaz de reduzir seus sintomas expressivamente e então, iniciou-se as transfusões sanguíneas e quelação de ferro durante 4 anos.

Aos seus 13 anos, o paciente recebeu infusão da droga estudada por Ribeli *et al.* (2017), a *LentiGlobin® BB305* (figura 14) que utiliza o vetor viral de lentivírus que é capaz de se auto-inativar, nele continha em sua estrutura uma modificação na cadeia que expressa a HbA, a T87Q, para permitir sua quantificação diferenciada até que a porcentagem de 25-30% de HbA^{T87Q} fosse detectada, mas as transfusões sanguíneas após a infusão da droga deveriam continuar.

Figura 14: Estrutura do vetor BB305



Fonte: RIBELI *et al.*, 2017.

Previamente, o paciente foi submetido à mielossupressão com administração intravenosa de Busulfano. Sua medula óssea foi coletada duas vezes para que a quantidade suficiente de células CD34⁺ fosse obtida para a transferência gênica e não foram relatadas sequelas associadas. Depois do período necessário, as células CD34⁺ modificadas foram infundidas numa dose de $5,6 \times 10^6$ cel. /kg (RIBELI *et al.*, 2017).

Após o 6^o mês, os níveis de hemoglobina total estavam estabilizados. A partir do 15^o mês, a HbS já mostrava um decaimento relevante acima de 45% e a HbF se manteve abaixo de 1,0 g/dl. Com a terapia imunossupressora prévia, justifica-se a neutropenia acentuada (4+). O paciente também apresentava anemia (3+) e trombocitopenia (3+) enquanto hospitalizado, recebeu tratamento padronizado. Ao 50^o dia de internação, recebeu alta hospitalar e relatou dor grau 2 em membros inferiores após dois meses. Entretanto, todos os relatos foram solucionados de forma espontânea e, no 88^o dia, as transfusões foram dispensadas (RIBELI *et al.*, 2017).

De maneira geral, os pesquisadores consideraram que os resultados obtidos (alguns parâmetros estão relacionados no quadro 3) com a terapia gênica foram satisfatórios e puderam oferecer embasamento e evidências relevantes para a droga,

e que a observação contínua ao longo dos anos é necessária para verificar a eficácia do produto (RIBELI *et al.*, 2017).

Quadro 3: Valores laboratoriais mensurados após a terapia gênica

Parâmetro	Valores de Referência	3º mês	9º mês	15º mês
Hemoglobina (g/dL)	13,0 – 18,0	12,0	11,4	11,8
Eritrócitos/mm ³	4,5 mi – 6,2 mi	3,9mi	4,0 mi	4,3 mi
HCM (pg/eritróc.)	25 - 30	31	28	28
CHCM (g/dL)	31 – 34	34	36	35
Plaquetas/mm ³	150.000 – 450.000	52.000	157.000	201.000
Neutrófilos/mm ³	1500 - 7000	2400	2500	2200
Ferro (µmol/L)	12 - 30	18	NR	17
Ferritina (µg/L)	22 - 275	869	NR	363
Transferrina (g/L)	1,9 – 3,2	1,6	NR	1,7
Sat. de transferrina (%)	16 – 35	NR	35	40

Fonte: Adaptado de RIBELI, 2017.

Nota: NR = não realizado. Além dos parâmetros mostrados, os considerados relativos às funções renal e hepática estavam normais.

Em outro estudo, publicado em 2021 por Frangoul *et al.*, o alvo principal era o fator transcricional, BCL11A, responsável por reprimir a expressão de γ -globina. O complexo terapêutico em questão é o CTX001 que contém células CD34+, adquiridas do paciente por aférese, modificadas geneticamente, através de CRISPR/Cas9, para reativar a produção de HbF.

O artigo de Frangoul *et al.* envolve o tratamento de dois pacientes, uma com beta-talassemia menor (β^0/β^+) dependente de transfusão e outra paciente com AF e uma deleção de α -globina e cada uma teve um protocolo terapêutico diferente. A paciente com AF, 33 anos, relatou ter passado por cerca de sete crises vasculares, 3,5 hospitalizações e cinco transfusões de hemácias anuais.

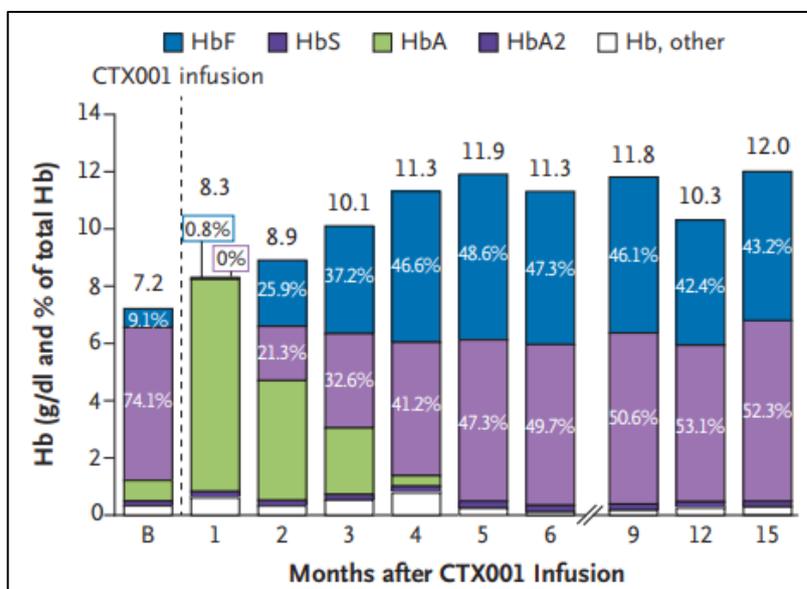
Previamente à infusão de CTX001, em uma dose de $3,1 \times 10^6$ células/kg, a paciente também foi submetida a mielossupressão com Busulfan. A figura 15 relaciona as frações de hemoglobinas antes e depois da infusão, sendo possível

observar que embora a porcentagem de HbS tenha se mantido em cerca de 50% ao longo dos meses, a porcentagem de HbF cresceu consideravelmente, ultrapassando 40% a partir do 4º mês (FRANGOUL *et al.*, 2021).

Durante 16 meses, a paciente foi acompanhada e apresentou cerca de 114 eventos adversos, dos quais três foram considerados, pelos pesquisadores, como graves, 1) sepse, no 16º dia, devido à neutropenia; 2) colelitíase no 49º dia; 3) dor abdominal no 56º dia, sendo todos devidamente tratados com sucesso. Por outro lado, enquanto esteve sendo observada, nenhum episódio de vaso-oclusão ocorreu e a última transfusão de hemácias foi realizada no 19º após a infusão (FRANGOUL *et al.*, 2021).

Com os resultados encontrados (quadro 4), os pesquisadores consideraram que as expectativas com o uso do CTX001 foram alcançadas e podem auxiliar no desenvolvimento de futuros testes envolvendo CRISPR/Cas9, mas que é importante considerar a individualidade de cada tratamento assim como as sintomatologias de cada paciente (FRANGOUL *et al.*, 2021).

Figura 15: Frações de hemoglobinas da paciente



Nota: B denomina “baseline”, ou seja, dados anteriores ao tratamento.

Quadro 4: Outros parâmetros laboratoriais analisados da paciente 2

Parâmetro	Valores de referência	Início do estudo	3º mês	6º mês	12º mês

Hematócrito (%)	36 - 46	29,9	30,9	34,0	32,3
Hemoglobina total (g/dL)	12 -16	10,2	10,3	11,4	11,1
VCM (fL)	80 - 100	85,3	92	89,8	86,7
HCM (pg)	27 -35	29,1	30,6	30,1	29,8
CHCM (g/dL)	31 - 37	34,1	33,2	33,5	34,4
Leucócitos (10⁹/L)	3,9 – 10,6	11,7	6,2	4,7	3,8
Plaquetas (10⁹/L)	150 – 450	326	268	256	272
CD-19⁺, Linfócitos B (10⁶/L)	91 - 610	595	206	310	392

Fonte: adaptado de FRANGOUL *et al.*, 2021.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A AF é considerada, dentro do grupo das DFs, como a variação mais grave, por conta da homozigose SS. Com isso, a sintomatologia apresentada pode se mostrar mais severa, reduzindo a qualidade e a expectativa de vida do paciente. O transplante de medula óssea é a única opção corretiva para a enfermidade.

Nesse cenário, a terapia gênica vem recebendo muita atenção voltada para o tratamento de algumas doenças, sendo a AF uma delas e testes utilizando a CRISPR/Cas9 vêm sendo realizados atualmente com sucesso. O CRISPR junto com uma endonuclease, a Cas9 e o RNAg uma sequência única de 100 nucleotídeos, possibilita a edição do genoma através da clivagem do DNA, que é capaz de se parear com as bases de uma sequência-alvo. O reconhecimento é baseado na identificação da sequência PAM, com três pares de base e então, a hibridização ocorre entre o alvo e cerca de 20 nucleotídeos do RNAg. Tanto a proteína Cas9, quanto o RNAg, podem ser introduzidos *in vitro* em outras células e direcionados a locais específicos do genoma para que provoquem quebras na fita dupla. Após esta clivagem, a maquinaria molecular é utilizada para alterar a sequência de DNA.

A utilização na anemia falciforme já foi estudada por diferentes protocolos, tanto em roedores, como em humanos. O grupo de Denver *et al.*, em 2016, utilizou um conjunto de RNP Cas9 e sistema de entrega AAV de um doador homólogo para atingir o objetivo no gene da β -globina em células-tronco hematopoiéticas. Foram projetados dois tipos de doadores, um com modelo de AAV6 recombinante (rAAV6) contendo SNP e outro com DNAC enriquecido. Com as duas técnicas, o grupo observou que a edição gênica da mutação ocorreu eficientemente.

Já os estudos de Ribeli *et al.* (2017) e Frangoul *et al.* (2021) foram aplicados a humanos e, também utilizando protocolos diferentes, tanto de entrega, como do design dos vetores, apresentaram sucesso quanto às expectativas dos pesquisadores. Assim, demonstrou-se que a introdução dessas terapias em humanos é promissora, apesar de ainda necessitarem de um acompanhamento mais detalhado à longo prazo. Até o presente momento, nenhum protocolo de terapia gênica está aprovado no Brasil para o tratamento da DF.

Por fim, com os dados obtidos dos trabalhos já realizados e com esta releitura bibliográfica, pode-se concluir que a CRISPR/Cas9 pode vir a fazer parte de um tratamento fixo para a doença, assim como o transplante de medula, por trazer resultados positivos e em altas taxas para a anemia falciforme. Apesar de seus protocolos de aplicação serem muito específicos de acordo com cada caso a utilização da terapia gênica com a CRISPR/Cas9 pode vir a curar muitas pessoas portadoras da doença quando um transplante compatível não for possível.

REFERÊNCIAS

ADAMS, Robert J. *et al.* Prevention of a First Stroke by Transfusions in Children with Sickle Cell Anemia and Abnormal Results on Transcranial Doppler Ultrasonography; **The New England Journal of Medicine**; v. 339, p. 5-11, 1998. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199807023390102> Acesso em: 01 ago 2023.

ALMEIDA, Renata Araujo de; BERETTA, Ana Laura Remédio Zeni. Anemia Falciforme e abordagem laboratorial: uma breve revisão de literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 2017. Disponível em: <https://www.rbac.org.br/artigos/anemia-falciforme-e-abordagem-laboratorial-uma-breve-revisao-de-literatura/> Acesso em: 24 ago 2023.

AREND, Marcela Corso; PEREIRA Jessica Olivaes; MARKOSKI Melissa Medeiros. O sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 108, n. 1, p. 81-83, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/abc.20160200> Acesso em: 14 ago 2023.

BRANDOW, Amanda M.; LIEM, Robert I. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. **Journal of Hematology & Oncology**; v. 15, n. 20, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01237-z>. Acesso em: 01 ago 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Doença falciforme: conhecer para cuidar**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados, DAET, SAS, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015. Disponível em: https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/39506/mod_resource/content/4/Doenca%20Falciforme_SEM.pdf/. Acesso em: 30 set 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 2.829, de 14 de dezembro de 2012. Brasília, 2012**. Acesso em 01 ago 2023. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt2829_14_12_2012.html. Acesso: em 01 ago 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 822, de 06 de junho de 2001. Brasília, 2001**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822_06_06_2001.html. Acesso: em 01 ago 2023.

CAETANO, G. C. G. *et al.* Técnica CRISPR-Cas9 e sua utilização na área laboratorial. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 25, n. 2, p. 96-99, 2019. Disponível em: <http://www.mastereditora.com.br/bjscr> Acesso em: 25 out 2023.

CANÇADO, Rodolfo D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 316-326. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/vVBBhtXR47NMZhpv9qb8Znk/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 25 out 2023.

DE SANTIS, G. C. Anemia: definição, epidemiologia, fisiopatologia, classificação e tratamento. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 52, n. 3, p. 239-251, 2019. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/156726>. Acesso em: 16 out 2023.

DYBAS, Jakub et al. Probing the structure-function relationship of hemoglobin in living human red blood cells. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**; v. 239, p. 118530, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118530>. Acesso em: 13 dez 2022.

FERRAZ, Maria Helena C.; MURAO, Mitiko. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**; v. 29, n. 3, p. 218-222, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300005> Acesso em: 14 ago 2023.

FRANGOUL, H. *et al.* CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 384, p. 252-260, 2021. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2031054> . Acesso em: 20 jul 2023

GERVÁSIO, S. **Anemia falciforme e outras síndromes falciformes: etiologia, fisiopatologia, diagnóstico e terapêutica**. Tese (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa. Lisboa, p. 66. 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10451/43422>. Acesso em 27 ago 2023.

GISDENILTON, Carlos Gonzaga Caetano. *et al.* Técnica CRISPR-Cas9 e sua utilização na área laboratorial, 2018. Disponível em https://www.mastereditora.com.br/periodico/20190103_214255.pdf Acesso em 30 nov 2023.

HERRICK, James B. Peculiar Elongated and Sickle-shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. **Yale Journal of Biology and Medicine**; v. 74, p. 179-184, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588723/>. Acesso em: 11 dez 2022.

INCA. Registro Brasileiro de doadores voluntários de medula óssea, **REDOME**, 2023. Disponível em: <https://redome.inca.gov.br/institucional/dados/>. Acesso em: 20 set 2023.

JINEK, M. *et al.* Endonuclease de DNA dupla fita guiada por RNA programável na imunidade adaptativa bacteriana. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, jun, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1225829>. Acesso em: 15 dez 2022.

KEOHANE, E. M.; SMITH, L. J.; WALENGA, J. M. **Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications**. 5ª ed. St. Louis (Missouri - EUA), 2016.

LOBO, Clarisse; MARRA, Vera N.; SILVA, Regina, M. G. Crises dolorosas na doença falciforme. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**; v. 29, n. 3, p. 247-258, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300011> Acesso em: 20 jul 2023.

LORENZI, Therezinha F. *et al.* **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MAEDER, Morgan; GERSBACH, Charles. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. **Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy**; v. 24, n. 3, p. 430-446, 2016. Disponível em: 10.1038/mt.2016.10 Acesso em: 19 ago 2023.

MATTHEWS, Kerryn et al. Technologies for measuring red blood cell deformability. **Lab Chip**; v. 22, p. 1254-1274, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d1lc01058a>. Acesso em: 20 jul 2023.

MENDES, Isadora C. *et al.* Aspectos Gerais da Triagem Neonatal no Brasil: Uma Revisão. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 30 e-3008, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/2238-3182.20200019> Acesso em 01 ago 2023.

NEUMAYR, Lynne D.; HOPPE, Carolyn C.; BROWN, Clark. Sickle Cell Disease: Current Treatment and Emerging Therapies. **The American Journal of Managed Care**; v. 25, n. 18, s. 335-343, 2019. Disponível em: <https://www.ajmc.com/view/sickle-cell-disease-current-treatment-and-emerging-therapies>. Acesso em: 20 jul 2023.

OLIVEIRA, R. A. G.; NETO POLI, A. **Anemias e Leucemias: Conceitos Básicos e Diagnóstico por Técnicas Laboratoriais**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2004.

O'KEEFFE, Elizabeth; RHODES, Melissa; WOODWORTH, Alison. A Patient with a Previous Diagnosis of Hemoglobin S/C Disease with an Unusually Severe Disease Course. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 1228-31, 2009. Disponível em: 10.1373/clinchem.2008.112326. Acesso em: 10 set 2023.

PARK, S. H.; BAO, G. (2021). CRISPR/Cas9 Gene Editing for Curing Sickle Cell Disease. **Transfusion and apheresis**, v. 60, n. 1, p. 103060, fev 2021. Disponível em: [CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease - PMC \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34011111/). Acesso em: 11 dez 2022.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RIBELI, J. A. *et al.*, Terapia Gênica em um paciente com anemia falciforme. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 9, p. 848-855, mar 2017. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1609677>. Acesso em: 12 dez 2022.

RODRIGUES, Douglas *et al.* Recorte bibliográfico da prevalência e diagnóstico da anemia falciforme. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 1, 2017. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/patologia/article/view/2245>. Acesso em: 16 out 2023.

SAÚDE, Ministério da. **Tratamento potencialmente curativo para anemia falciforme por meio da correção genética e transplantes autólogos**. PROADI-SUS. Disponível em: <http://hospitais.proadi-sus.org.br/projeto/tratamento-inovador-para-anemia-falciforme-uma-doenca-negligenciada-de-alta-relevancia-social>. Acesso em: 12 dez 2022.

SILVA, W. J. da. **Anemia falciforme: características fisiopatológicas, diagnóstico e tratamento**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em

Biomedicina) – Faculdade São Judas. São Paulo, f. 23. 2021. Disponível em: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/20208>. Acesso em: 11 dez 2022.

STEINBERG, Martin H. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. **The Scientific World Journal**; v. 8, p. 1295–1324, 2008. Disponível em: 10.1100/tsw.2008.157. Acesso em: 06 mai 2023.

STYPULKOWSKI, Jaíne; MANFREDINI, Vanusa. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**; v. 32, n. 1, fev, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/qZNkVBCmvpchbLtytZLNcdv/>. Acesso em 17 out 2023.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Fisiopatologia da Anemia Falciforme. **Annual review of pathology**, v. 14, p. 263-292, jan 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838>. Acesso em: 11 dez 2022.

TAVARES NETO, José. Descobridor brasileiro do mecanismo de herança da anemia falciforme. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 80, n. 3, p. 5-7, ago-out, 2010. Disponível em: <https://gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/1101/1057> Acesso em: 11 dez 2022.

THOM, Christopher S. et al. Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates. **Cold Spring Harb Perspect Med**; v. 3, p. a011858, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a011858>. Acesso em: 20 jul 2023.

WILLIAMS, Thomas N.; THEIN, Swee Lay. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. **Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.**; v. 19, p. 113-147, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1146%2Fannurev-genom-083117-021320>. Acesso em: 06 mai 2023.

WOITOWICZ, Erika Janz *et al.* Traço Falciforme: Estudo comparativo de técnicas laboratoriais utilizadas para a triagem da doença. **Artigo UFPR**, v.11, n.2, jul. – dez., 2010. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/download/21371/14091> Acesso em 24 ago 2023.

ZAGO, M. A. *et al.* **Hematologia**: fundamentos e prática. 1. ed. rev. e atualizada. São Paulo: Atheneu, 2004.