

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**

**Curso de Biomedicina**

**Mayara Hidalgo de Almeida**

**Tatiana Massari Tucci**

TA - 24

**TERAPIA GÊNICA COMO INOVAÇÃO NO TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME**

**São Paulo**

**2024**

**Mayara Hidalgo de Almeida**

**Tatiana Massari Tucci**

## **TERAPIA GÊNICA COMO INOVAÇÃO NO TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina ao Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Professor Doutor Fabio Mitsuo Lima, como requisito parcial para obtenção do título de Biomédico.

**São Paulo**

**2024**

## TERAPIA GÊNICA COMO INOVAÇÃO NO TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME

### RESUMO

A Doença Falciforme engloba um grupo de anemias hemolíticas caracterizadas por uma mutação no gene que codifica a hemoglobina A, sendo o fenótipo mais grave a Anemia Falciforme, com a mutação em homozigose. Essa variante compromete a função da hemoglobina, altera a forma das hemácias e causa a polimerização dessas células, então chamadas drepanócitos, o que prejudica o fluxo sanguíneo e causa diversos sintomas agudos e crônicos ao paciente. Os tratamentos convencionais, como a Hidroxiureia, mitigam esses sintomas, mas não possibilitam cura na grande maioria dos casos. A terapia gênica representa uma nova perspectiva de resolução completa da doença ao atuar na causa genética, em geral com células tronco hematopoéticas. Em 2023, foram aprovados dois tratamentos com essa tecnologia para o quadro: Casgevy, que utiliza edição gênica por CRISPR-Cas9 para promover a expressão da hemoglobina fetal, e Lyfgenia, que utiliza um vetor viral para adição de um gene que codifica uma molécula de hemoglobina semelhante à fisiológica. Ambos os medicamentos apresentaram ótimos resultados nos estudos clínicos na resolução de crises de dor; pacientes tratados com Casgevy apresentaram efeitos adversos leves ou moderados e nos estudos de Lyfgenia houve dois casos de câncer no sangue. A aprovação desses tratamentos representa uma revolução na perspectiva de cura de doenças genéticas e, apesar de ainda não ter ocorrido no Brasil, deve inspirar o avanço dos estudos *in vitro* e clínicos que culminem em medicamentos disponíveis e acessíveis para a população.

### ABSTRACT

Sickle Cell Disease involves a group of hemolytic anemias characterized by a mutation in the gene that codes for hemoglobin A, the most severe phenotype being Sickle Cell Anemia, with the homozygous mutation. This variant compromises the function of hemoglobin, alters the shape of red blood cells and causes the polymerization of these cells, then called drepanocytes, which impairs blood flow and causes various acute and chronic symptoms for the patient. Conventional treatments, such as Hydroxyurea, mitigate these symptoms, but do not lead to a cure in the vast majority of cases. Gene therapy represents a new perspective for the complete resolution of the disease by acting on the genetic cause, usually with hematopoietic stem cells. In 2023, two treatments with this technology were approved for the condition: Casgevy, which uses CRISPR-Cas9

gene editing to promote the expression of fetal hemoglobin, and Lyfgenia, which uses a viral vector to add the gene that codes for a hemoglobin molecule similar to physiological hemoglobin. Both drugs showed excellent results in clinical studies by resolving pain crises; patients treated with Casgevy had mild or moderate adverse effects and in the Lyfgenia studies there were two cases of blood cancer. The approval of these treatments represents a revolution in the prospect of curing genetic diseases and, although it has not yet happened in Brazil, it should inspire progress in *in vitro* and clinical studies that culminate in drugs that are available and accessible to the population.

**PALAVRAS-CHAVE:** Doença falciforme; Anemia falciforme; Terapia gênica; CRISPR-Cas9; Vetor lentiviral

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença Falciforme (DF) é um grupo de doenças genéticas hereditárias que alteram a forma dos glóbulos vermelhos, fazendo com que eles adquiram uma conformação de foice. Essa doença impõe um fardo significativo aos pacientes pois suas complicações são agudas e crônicas uma vez que compromete a oxigenação dos tecidos, levando a dores intensas, infecções frequentes e danos sistêmicos, sintomas que afetam a qualidade de vida dos pacientes (1). Embora existam tratamentos disponíveis, como a hidroxiureia, transfusões sanguíneas e transplantes de medula óssea, que ajudam a aliviar os sintomas, suas limitações evidenciam a necessidade de intervenções que possam alterar de forma mais eficaz o prognóstico da doença.

Neste cenário, a terapia gênica tem se destacado como uma abordagem promissora que busca tratar doenças genéticas atuando na raiz do problema por meio da correção ou substituição do gene defeituoso. Com o avanço das tecnologias, como a edição gênica CRISPR-Cas9 e o desenvolvimento de vetores virais mais eficientes, novas perspectivas têm surgido para o tratamento de hemoglobinopatias como a DF, mudando o paradigma do manejo da doença (2). Recentes aprovações de medicamentos com terapia gênica nos Estados Unidos e na Europa mostram o potencial dessas estratégias para o tratamento da doença, além da urgência de expandir o acesso a essas tecnologias. A análise das abordagens mais modernas e de resultados obtidos em ensaios clínicos fornece uma base essencial para compreender o potencial e os desafios futuros da terapia gênica e incentivar o desenvolvimento de estudos que possam viabilizar esses tratamentos no Brasil.

Neste trabalho, foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa, utilizando artigos científicos publicados entre 2018 e 2024, em língua inglesa, disponíveis em plataformas como Pubmed, Scielo e Google Scholar, relacionados ao tema. As palavras-chave foram: *“Sickle cell disease”*, *“Gene Therapy”*, *“CRISPR/Cas9”*, *“Lentiviral vectors”*.

## **2. OBJETIVO**

Realizar uma revisão bibliográfica narrativa sobre os principais avanços nas técnicas de terapia gênica como tratamento promissor para a Doença Falciforme, apresentando também características fisiopatológicas da doença e os modelos de tratamento atualmente existentes no mercado, comparando-os com as novas opções terapêuticas e a perspectiva dessas tecnologias no Brasil.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Doença Falciforme**

A Doença Falciforme compreende um grupo de anemias hemolíticas congênitas cujos fenótipos mais frequentes são a Anemia Falciforme (genótipo HbSS), a Talassemia (HbS $\beta^0$  ou HbS $\beta^+$ ) e a Hemoglobina C (HbSC). Essa doença é causada por alterações qualitativas na hemoglobina e em seu funcionamento, e afeta cerca de 100.000 pessoas nos Estados Unidos, sendo aproximadamente 1 a cada 365 afro-americanos e 1 a cada 16.300 hispano-americanos (3). Estima-se também que cerca de 70% dos casos do mundo se concentrem na África Subsaariana (4), e no Brasil os dados indicam entre 60.000 e 100.000 pessoas portadoras de DF (5).

Fisiologicamente, mais de 90% da hemoglobina presente nas hemácias circulantes no adulto é a hemoglobina A, ou HbA (6), uma proteína tetramérica composta por duas subunidades de  $\alpha$ -globina, codificadas no cromossomo 16, e duas de  $\beta$ -globina, codificadas no cromossomo 11. Essa estrutura, associada ao cofator heme, é capaz de transportar uma molécula de oxigênio e promover a perfusão sanguínea. Na DF, mutações pontuais herdadas causam alterações estruturais na hemoglobina, prejudicando seu funcionamento e a qualidade de vida do paciente, podendo reduzir sua expectativa de vida.

A principal alteração genética descrita na DF causa a formação de um alelo chamado  $\beta^S$ . Essa condição é causada por uma mutação no gene da  $\beta$ -globina, HBB, que se dá pela substituição de um único nucleotídeo adenina por uma timina, alterando o códon de GAG para GTG (4). Tal alteração causa uma troca no sexto aminoácido da cadeia globínica, de um ácido glutâmico por uma valina, e

a caracterização do alelo  $\beta^S$ , que codifica uma hemoglobina alterada chamada de hemoglobina S (HbS). (4,6). Quando o paciente herda somente um alelo mutado, diz-se que ele é portador de traço falciforme. Caso a mutação esteja presente em ambos os pais e seja herdada em homozigose, o paciente, com os dois alelos, apresenta a hemoglobina HbS em quantidades variáveis, em detrimento da HbA. Assim, esse paciente é portador de Anemia Falciforme (AF), que compreende a maior parcela dos casos de DF e os quadros clínicos mais graves.

Outro genótipo relativamente frequente que ocorre na DF é o HbSC, associado ao fenótipo da Doença da Hemoglobina C. O portador dessa doença apresenta um alelo do gene HBB com a alteração  $\beta^S$  e o outro alelo com uma substituição diferente de nucleotídeos: de GAG para AAG. Essa alteração causa a troca de um ácido glutâmico por uma lisina no sexto aminoácido da cadeia, e a formação da hemoglobina C, que também apresenta alteração estrutural (4). A doença da HbC geralmente causa um quadro clínico mais leve, com complicações agudas e crônicas menos graves do que a AF (6). Também é possível encontrar pacientes portadores de um alelo  $\beta^S$  e o outro alelo  $\beta^0$  ou  $\beta^+$ , caracterizando um traço falciforme coexistindo com traço de talassemia. Esses quadros causam, respectivamente, a talassemia HbS $\beta^0$ , cujos sinais e sintomas em geral se assemelham à AF, e a talassemia HbS $\beta^+$ , que em geral causa um quadro mais leve. (6)

### **3.2 Anemia Falciforme**

A Anemia Falciforme é o principal fenótipo da Doença Falciforme e caracteriza os quadros clínicos mais graves, pela presença dos dois alelos mutados no gene HBB. A mutação pontual que causa a formação da hemoglobina S altera a estrutura e função da hemoglobina fisiológica, pois, sob condições de desoxigenação, ou seja, quando a hemoglobina não está ligada ao oxigênio, ela sofre polimerização entre suas cadeias (6). Essa polimerização altera a forma dos eritrócitos; estes passam a ser chamados de drepanócitos, ou hemácias falciformes, e são mais sujeitos a hemólise, pois ocorrem alterações na membrana, como uma maior exposição da fosfatidilserina. Em geral o processo da hemólise é extravascular e realizado pelos macrófagos, mas também uma parcela da destruição das hemácias ocorre dentro dos vasos sanguíneos, na hemólise intravascular. (6).

Desse modo, os eritrócitos falciformes são removidos da circulação sanguínea antes de 120 dias, tempo de vida dos eritrócitos normais. O processo hemolítico contribui para o aumento do estresse oxidativo, principalmente a hemólise intravascular, que libera fatores que interferem na ação da enzima responsável pela síntese de óxido nítrico, que tem papel vasodilatador (6). A polimerização das hemácias também diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico, com uma

consequente vasoconstrição, e causa a ativação de leucócitos e plaquetas, o que intensifica ainda mais a obstrução dos vasos (6).

Esse conjunto de fatores gera um estado inflamatório grave, associado à vaso-oclusão, o que causa crises de dor aguda, em geral, nas extremidades, tórax e costas, principal queixa e motivo de hospitalização dos pacientes com AF (6,7). Outras complicações agudas podem ser a síndrome torácica, AVC, eventos anêmicos, coledite (6,7) e comprometimentos a longo prazo incluem a dor crônica, necrose avascular do quadril, doença renal, priapismo e retinopatia, além da maior propensão a depressão e ansiedade (6,7). Estudos revelam que adultos com DF sentem dor em 55% do tempo e que a qualidade de vida do paciente é pior que a de portadores de fibrose cística ou em tratamento de câncer (6,7).

Dessa forma, faz-se extremamente necessário otimizar os processos de triagem, rastreamento, diagnóstico e prevenção de complicações de pacientes com DF e AF, além do maior acesso aos tratamentos disponíveis e evolução da ciência em direção a novas opções que possam melhorar ao máximo essa condição, visando uma possível cura.

### **3.3 Tratamentos estabelecidos para Doença Falciforme**

Para o tratamento dos sintomas da DF, principalmente, as complicações agudas das Crises Vaso-Oclusivas (CVOs) e suas dores associadas, existem algumas estratégias já estabelecidas. Nas crises de dor, em geral associadas a algum gatilho como frio ou desidratação (8) costumam ser administrados anti-inflamatórios não esteroidais ou opióides. Para o quadro geral, existem quatro medicamentos aprovados pelo FDA e têm sido considerados tratamentos combinando mais de um medicamento (9).

A primeira estratégia aprovada e a mais comum é o tratamento por Hidroxiureia. Um estudo que acompanhou pacientes adultos que foram tratados por até 9 anos revela que a Hidroxiureia foi associada a uma redução de 40% na mortalidade (7). Essa droga reduz a frequência das CVOs ao induzir o aumento da hemoglobina fetal, HbF, que em geral representa 0,5% da hemoglobina circulante, e potencializar processos como a redução da adesão dos eritrócitos ao endotélio e a diminuição dos glóbulos brancos (7,8).

Outros tratamentos estabelecidos incluem a L-glutamina, que tem benefícios para o quadro geral ao penetrar a membrana eritrocitária e diminuir o estresse oxidativo (8,9). O Crizanlizumab é um anticorpo monoclonal contra a P-selectina, que inibe a adesão dos eritrócitos falciformes, plaquetas e leucócitos ao endotélio, e tem demonstrado redução na dor por CVOs (8,9). Também

existe o Voxelotor, que pode estabilizar a hemoglobina oxigenada e prevenir a sua polimerização em formato de foice, diminuindo a concentração de desoxi-Hb, a hemoglobina não ligada ao oxigênio (8,9). Estudos têm sido realizados com o fármaco Mitapivat, baseado em uma molécula ativadora da enzima piruvato-quinase, que nas hemácias aumenta a síntese de ATP e reduz a produção de espécies reativas de oxigênio e de 2,3-BPG, melhorando a oxigenação e reduzindo a polimerização da HbS (8,9).

Destes medicamentos, o único aprovado pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é a Hidroxiureia. O Crizanlizumab, sob o nome de Adakveo®, foi aprovado em 2020 para a prevenção de CVOs em pacientes com DF com no mínimo 16 anos de idade. Entretanto, em 2023, segundo nota divulgada pela agência na época, o registro foi cancelado por falha na comprovação da eficácia do produto, devido ao acompanhamento inadequado do Termo de Compromisso estabelecido entre a empresa e a Anvisa.

O transplante de células tronco hematopoéticas apresenta ótimos resultados em pacientes da DF, mas a imensa maioria foi realizada em pacientes com os doadores sendo irmãos HLA idênticos, e nesses casos foram relatadas ótimas taxas de sobrevida e até cura; estudos têm sido realizados para expandir as possibilidades de doação (9). A transfusão de glóbulos vermelhos alivia os sintomas e reduz o risco de complicações, melhorando a capacidade de oxigenação ao reduzir a quantidade de HbS circulante (10). Entretanto, é necessária atenção aos riscos de aloimunização, sobretudo devido ao estado inflamatório constante do paciente, e deve-se sempre obter o painel completo de antígenos e um histórico atualizado de anticorpos do paciente; também há risco de sobrecarga de ferro e de reações hemolíticas transfusionais (10).

Além das terapias já comumente conhecidas para tratar os sintomas da DF, a terapia gênica representa uma abordagem terapêutica inovadora e promissora para hemoglobinopatias, como a DF, e tem como objetivo corrigir a mutação genética responsável pela deformação e polimerização das hemácias, e os sintomas associados (11).

### **3.4 Terapia Gênica**

O conhecimento dos genes associados a características fisiológicas e patológicas é essencial para aplicar os conceitos da medicina genômica. A abordagem de terapia gênica foca em modificar, nos pacientes afetados por doenças genéticas, genes responsáveis por proteínas ou fenótipos maléficos para o prognóstico da condição. Então, a introdução de um gene normal ou envolvido em

processos fisiológicos, a correção de uma mutação ou outras estratégias podem ter o potencial de reverter os sintomas clínicos, principalmente da DF (12).

Existem duas principais estratégias de terapia gênica: a *ex vivo* e *in vivo* (8). A terapia *ex vivo* consiste na coleta de células-tronco hematopoiéticas do paciente, que são geneticamente modificadas em laboratório e reintroduzidas após a mielobalação permitindo a produção de hemácias saudáveis. A terapia *in vivo* utiliza, normalmente, um vetor viral que carrega o material genético corretivo e é introduzido diretamente no organismo do paciente (11,12).

Nas terapias gênicas em estudo para DF, a metodologia pode ser a adição de genes por um vetor viral ou a edição gênica, que envolve a substituição de sequências de DNA que expressam genes mutados para uma sequência nova e saudável (13). O uso de nucleases, que editam genomas de vários modelos animais e células humanas, interrompe genes em *loci* definidos e elas podem ser usadas para promover o reparo dirigido por homologia (HDR). São conhecidas como endonucleases, que quebram a dupla fita em local específico do gene e levam à ativação do sistema de maquinaria de auto-reparo. As principais ferramentas de edição gênica são Nucleases de dedos de zinco (ZFNs), Nucleases efetoras do tipo ativador transcricional (TALENs), Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas e Regularmente Espaçadas em associação com a nuclease Cas9 (CRISPR/Cas9) (14).

### **3.5 Terapia gênica para Doença Falciforme**

A terapia gênica tem sido considerada uma possível cura para a DF, sendo principalmente estudada na forma mais grave e sintomática da doença, a AF. A maioria dos tratamentos atualmente disponíveis no mercado tem como foco a mitigação dos sintomas e consegue melhorar consideravelmente a qualidade de vida do paciente, mas não atua na causa fundamental da doença, a mutação pontual monogênica (15). As principais abordagens de terapia gênica são a adição e a edição de genes, com testes e otimizações em diversos modelos e a realização de estudos clínicos.

Em uma triagem feita no site [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), em abril de 2024, foram identificados 37 estudos clínicos de terapia gênica para a AF em andamento em todo o mundo, dos quais 6 estão ativos com recrutamento fechado, 5 ainda não estão com recrutamento aberto, 13 ainda estão em recrutamento, 7 foram completados, 3 são por inscrição por convite - em que apenas pessoas específicas de um grupo determinado pelo pesquisador que são aptas a entrar no estudo - e 3 foram encerrados por decisões dos patrocinadores. Esses ensaios clínicos visam avaliar a segurança e eficácia de diferentes abordagens de terapia gênica para a correção da mutação responsável pela produção da hemoglobina defeituosa. Dos 15 estudos filtrados, 7 envolvem o uso de células-tronco

hematopoiéticas CD34+ autólogas e que são modificadas *ex vivo* por meio de transdução com vetores lentivirais que visam corrigir ou modular genes específicos associados a AF (16).

### 3.6 Técnicas de terapia gênica para Doença Falciforme

Existem duas principais técnicas de terapia gênica sendo utilizadas para o tratamento da DF, a adição e a edição de genes, sobretudo pelo método *ex vivo*. A adição de genes se dá pela transferência de um gene funcional por meio de um vetor lentiviral, na maioria dos casos (11). Já a edição de genes conta com as ferramentas de edição do genoma, como ZFNs, TALENs e CRISPR para a clivagem do DNA em um sítio específico e ativação dos mecanismos de reparo celulares (11).

Um dos principais estudos clínicos de terapia gênica realizada em paciente ocorreu nos Estados Unidos, iniciado em 2015 e finalizado em janeiro de 2024, patrocinado pela BlueBird Bio, com 50 participantes e em fases 1/2. (Clinical trials - NCT 02140554). Esse estudo utilizou uma técnica de adição de genes com vetor lentiviral e com o transplante de células-tronco hematopoiéticas CD34+ com o vetor BB305, que expressa a globina  $\beta$ A-T87Q, o que resulta na produção de uma hemoglobina anti-falciforme, HbAT87Q (11). O estudo pode ser identificado pelo código HGB-206 (inicialmente 205) e o produto como bb1111 ou *LentiGlobin BB305 Drug Product for SCD*.

Esta hemoglobina tem a substituição de um aminoácido treonina para glutamina na posição 87, e por efeito estérico inibe a polimerização dos eritrócitos e mantém a identidade de hemoglobina adulta em 99,9%, como a afinidade de ligação ao oxigênio. Desse modo, os pacientes podem reconstituir uma hematopoese policlonal e alcançar a independência transfusional, com diminuição da frequência de CVOs além da alteração do nível absoluto de hemoglobina total e nos marcadores de hemólise. (11,17).

Outro importante estudo clínico foi iniciado em 2018 e tem previsão para ser concluído ainda em 2024, sendo realizado nos Estados Unidos, Canadá e Europa pela Vertex Pharmaceuticals Incorporated. Esse estudo conta com 45 participantes, está na fase 3, e utiliza CRISPR-Cas9 para edição gênica; o produto pode ser identificado como CTX001 e o estudo como CTX001-121. (Clinical trials - NCT03745287)

A edição se dá especificamente no gene BCL11A, um repressor do gene da  $\gamma$ -globina, responsável por silenciar a produção de hemoglobina fetal (HbF) no corpo humano após cerca de um ano de vida (18). Dessa forma, o gene da HbF continua sendo expresso pelas células eritroides e os resultados incluem expressão estável de hemoglobina fetal, que possui grande afinidade pelo

oxigênio, melhora geral no quadro clínico de DF, menor necessidade de transfusões e menor ocorrência de CVOs (18,19). Em alguns outros estudos realizados, também foram utilizados shRNA para silenciar o gene, além da ferramenta CRISPR-Cas9 para remover a sequência de DNA do intensificador específico desse gene na linhagem eritróide (11,18).

### **3.7 Evolução dos tratamentos até a aprovação**

No dia 16 de novembro de 2023, a agência regulatória do Reino Unido, a MHRA (*UK Medicines and Healthcare products Regulatory Agency*), aprovou o primeiro tratamento baseado em terapia gênica para Doença Falciforme e  $\beta$ - Talassemia dependente de transfusão do mundo, o Casgevy. (20,21). Este tratamento foi aprovado para pessoas com 12 anos ou mais e utiliza a técnica de CRISPR/Cas9 para a edição do gene BCL11A. Esse gene, funcionalmente, interromperia a expressão de HbF, mas, ao ser silenciado, não causa esse efeito e, assim, o processo permite a continuidade da produção dessa hemoglobina, que auxilia na estabilização da circulação sanguínea e melhora na qualidade de vida do paciente. (20,21)

O maior estudo clínico que culminou na aprovação desse tratamento ainda está em aberto pela plataforma Clinical Trials (NCT03745287). A MHRA divulgou em comunicado à imprensa que, dos 29 pacientes com DF tratados com Casgevy e acompanhados por tempo adequado para observação de resultados, 28 não apresentaram crises de dor severas por pelo menos 12 meses (21). O processo se dá pela administração de um medicamento de mobilização das células tronco hematopoéticas e há a separação das células por aférese (20,22). Em seguida, as células CD34+ removidas do paciente são editadas em laboratório com CRISPR/Cas9, o que pode levar até 6 meses. Depois desse período, o paciente recebe outra medicação para condicionamento da medula e as células são reinfundidas nele, que permanece no hospital por cerca de 4-6 semanas (20,22).

No dia 08 de dezembro de 2023, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou dois tratamentos baseados em terapia gênica para a DF, o Casgevy e o Lyfgenia, também para pacientes com no mínimo 12 anos (23). O Lyfgenia é baseado em um vetor lentiviral para entrega do gene que produz a hemoglobina HbAT87Q e tem funcionamento semelhante à HbA funcional (20,23).

O principal estudo clínico que utiliza a tecnologia do Lyfgenia foi encerrado em 2024 no Clinical Trials (NCT02140554) e o FDA divulgou que 28 dos 32 pacientes de DF tratados com o medicamento não apresentaram CVOs entre 6 e 18 meses após o tratamento (23). Dos 36 pacientes que receberam a infusão, 31 conseguiram atingir a resposta esperada da globina, que foi avaliada após 6 meses de tratamento. Para que essa resposta fosse considerada satisfatória, era necessário

que a hemoglobina total não transfundida, ou seja, aquela produzida pelo próprio organismo sem transfusões, fosse de pelo menos 30%. Destes 31 pacientes, todos conseguiram manter o nível de hemoglobina estável. (24). O protocolo se dá pela mobilização e aférese das células tronco hematopoéticas, e as células CD34+ são enviadas ao laboratório responsável pela inserção do vetor responsável pela codificação da HbAT87Q (20,24). Após um período de 10 até 22 semanas, o paciente recebe a medicação de condicionamento da medula óssea e a infusão de suas células modificadas, permanecendo no hospital por 3-6 semanas (24).

No dia 13 de fevereiro de 2024, a EMA (*European Medicines Agency*) divulgou a aprovação do Casgevy (25) após a decisão ficar em aberto desde dezembro de 2023 (26).

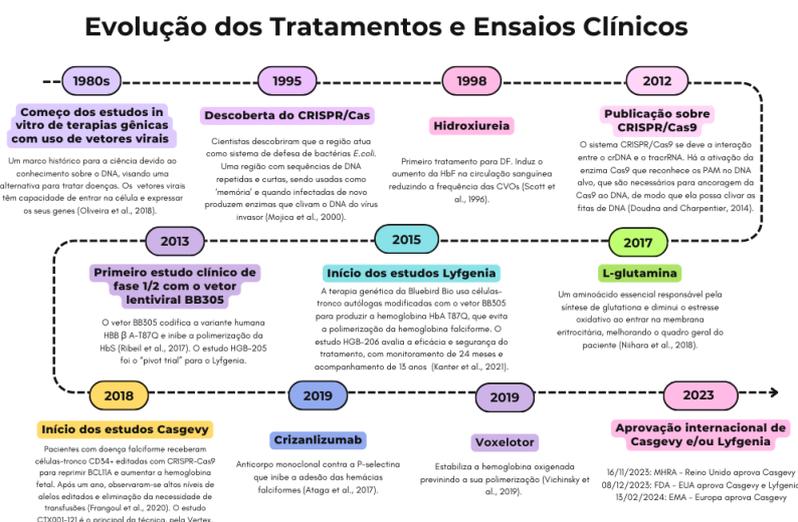


Figura 1 - Representação da linha do tempo da evolução dos tratamentos médicos, destacando os marcos desde os primeiros métodos terapêuticos, ensaios clínicos até a aprovação das terapias gênicas.

### 3.8. Benefícios e riscos

O site oficial do medicamento Casgevy (22), mantido pela farmacêutica Vertex, informa que os efeitos adversos mais prováveis após o uso da terapia são a plaquetopenia e a leucopenia, que podem influenciar na capacidade de coagulação sanguínea e na função do sistema imunológico. Na nota de divulgação do FDA (23) também constam os efeitos de feridas na boca, náusea, dor musculoesquelética, dor abdominal, vômito, neutropenia febril (febre e baixa contagem de glóbulos brancos), dor de cabeça e coceira. Os resultados positivos dos estudos clínicos que levaram à aprovação do Casgevy foram mencionados neste trabalho no tópico 4.5, e incluem a ausência de CVOs graves por pelo menos 12 meses e a não ocorrência de rejeições ou falhas no enxerto (23).

No que diz respeito ao Lyfgenia, os resultados positivos dos estudos clínicos também foram citados no item 3.5 e destaca-se a resolução completa das CVOs até 18 meses após o tratamento

(23). A nota do FDA (23) citou como principais efeitos colaterais a ocorrência de estomatite na boca e garganta, plaquetopenia, leucopenia, anemia e neutropenia febril, a possibilidade de resultados falso-positivos em testes de HIV e alertou sobre casos de pacientes tratados com o medicamento que desenvolveram câncer no sangue.

O risco de malignidade hematológica está indicado em uma caixa na bula do produto e o site oficial, mantido pela farmacêutica Bluebird bio (24) também frisa esse risco e a importância do monitoramento dos resultados de exames de sangue a cada 6 meses por pelo menos 15 anos, além dos possíveis sintomas associados a esse quadro. Esse risco pode ser associado ao chamado efeito *off-target*, que ocorre quando um medicamento ou molécula se liga a alvos diferentes daqueles que deveria, assim resulta em efeitos inesperados (27), como o desenvolvimento de câncer no sangue em protocolos de terapia gênica com vetores virais.

Entre fevereiro e junho de 2021, houve a suspensão temporária do estudo que deu origem ao medicamento Lyfgenia, uma vez que foram relatados dois casos de complicações malignas no andamento do estudo: um paciente teve uma Síndrome Mielodisplásica (SMD) que evoluiu para Leucemia Mieloide Aguda (LMA); outro paciente desenvolveu LMA após 5 anos e meio da aplicação do medicamento (28).

Para os dois casos foram realizados testes e sequenciamentos para verificar o evento adverso. A conclusão foi que o primeiro caso não teve a presença do transgene nos blastos da LMA, os resultados levaram os pesquisadores a apontar o bussulfano, medicamento citotóxico e utilizado para o condicionamento da medula óssea, como responsável pela indução pelos danos ao DNA nas células hematopoiéticas. No segundo caso o vetor foi encontrado integrado ao gene VAMP4 - gene que não tem relação com SMD nem LMA, mapeado em uma região de íntrons, e o paciente apresentava mutações nos genes TNX1 e PTPN11, estes associados a casos de LMA (28).

Apesar de uma mutagênese insercional ter ocorrido, pacientes falciformes no geral têm um risco de 2 a 11 vezes maior para doenças onco-hematológicas do que a população saudável, devido ao estresse hematopoiético, como o mecanismo da hipóxia crônica, a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), o dano endotelial e a inflamação crônica (29). O tratamento com hidroxíureia já foi sugerido como um fator de risco (29) e principalmente o processo de transplante pode contribuir para o acúmulo de mutações somáticas e estresse proliferativo, podendo aumentar a probabilidade de mutações que predisponham ao desenvolvimento de LMA (29). Após esses casos, modificações no protocolo do estudo foram realizadas visando a diminuição do risco de LMA.

	<b>LYFGENIA™</b>	<b>CASGEVY™</b>
<b>Tipo de Terapia Gênica</b>	Adição de genes por vetor lentiviral	Edição gênica por CRISPR-Cas9
<b>Mecanismo de ação</b>	As células-tronco hematopoiéticas CD34+ são coletadas e modificadas pela transdução com o vetor lentiviral BB305. O vetor expressa a globina $\beta^{A-T87Q}$ , que inibe estericamente a polimerização da HbS e produz a HbA <sup>-T87Q</sup> que tem maior afinidade pelo oxigênio.	As células-tronco hematopoiéticas CD34+ são coletadas e o gene BCL11A é silenciado. Assim, o gene da $\gamma$ -globina é expresso e a HbF é produzida, e tem grande afinidade pelo oxigênio.
<b>Benefícios</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Resolução completa das CVOs</li> <li>· Independência de transfusões</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Resolução completa das CVOs</li> <li>· Melhora geral do quadro clínico</li> </ul>
<b>Efeitos Adversos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Plaquetopenia</li> <li>· Leucopenia</li> <li>· Anemia</li> <li>· Riscos de desenvolver doenças onco-hematológicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Plaquetopenia</li> <li>· Leucopenia</li> <li>· Feridas na boca</li> <li>· Náusea e vômitos</li> <li>· Neutropenia febril</li> </ul>
<b>Eficácia nos estudos clínicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Dos 32 indivíduos avaliáveis, 28 não apresentaram CVOs entre 6 e 18 meses após o tratamento.</li> <li>· Dos 36 pacientes infundidos, 31 atingiram a resposta esperada da globina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Dos 29 indivíduos avaliáveis, 28 não apresentaram CVOs por pelo menos 12 meses após o tratamento.</li> </ul>

Tabela 1 – Comparação entre as terapias gênicas Lyfgenia™ e Casgevy™ para o tratamento da Doença Falciforme aprovadas pelo FDA.

### 3.9. Perspectivas no Brasil

No Brasil, um estudo multicêntrico indicou que o genótipo HbSS, do fenótipo AF, compreende 70,7% dos casos de DF; 23% é HbSC, do fenótipo em geral mais leve da hemoglobina C, e cerca de 6% dos casos inclui o traço de beta-talassemia, sendo o genótipo HbS $\beta$ 0 ou HbS $\beta$ + (30). Dados do Ministério da Saúde revelam que cerca de 60.000-100.000 pessoas no Brasil possuem DF, com a taxa de mortalidade sendo de 1,12/100.000 habitantes (5). Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, a doença gera um fardo para o Sistema de Saúde e a população brasileira, sendo estimado em cerca de 400 milhões de dólares por ano (5).

Em 2018 foi divulgado pelo Ministério da Saúde o documento “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme” (32), que atualiza as informações sobre a doença. A triagem neonatal é feita por meio do “teste do pezinho” e também é oferecido pelo SUS o exame de eletroforese de hemoglobina para diagnóstico. O tratamento é focado na prevenção de crises e complicações, com hidroxiureia, e prevenção de infecções, visto que pacientes com DF podem apresentar comprometimento do baço devido à hemólise, o que aumenta a susceptibilidade a infecções bacterianas, sendo 70% por *Streptococcus pneumoniae* (31). Essa prevenção é realizada por penicilina V via oral (fenoximetilpenicilina potássica) ou penicilina G por injeção (benzilpenicilina benzatina); se o paciente apresentar alergia a penicilina é indicada a eritromicina.

No que diz respeito à possibilidade de cura da DF, o transplante de células tronco-hematopoéticas é a única opção oferecida pelo SUS, indicado para pacientes HbSS ou HbS $\beta$ , que façam uso de hidroxiureia e apresentem complicações graves, mas pode ser realizado apenas em pacientes com doador familiar HLA idêntico (31). Os tratamentos com técnicas de terapia gênica aprovados entre 2023 e 2024 já estão sendo utilizados nos EUA e na Europa, mas ainda não têm previsão de aprovação no Brasil.

O Hospital Israelita Albert Einstein, em parceria com o Ministério da Saúde e o Hospital das Clínicas de São Paulo via PROADI-SUS (projetos de hospitais de referência em conjunto com o SUS) está desenvolvendo um estudo em estágio pré-clínico de transplante autólogo de células modificadas por CRISPR-Cas9, com alguns estágios e verificações sendo necessários até a fase clínica (32,33). O principal desafio, além da evolução dos tratamentos realizados *in vitro* para a fase clínica com pacientes, será a acessibilidade desses medicamentos. O medicamento Casgevy está sendo comercializado a 2,2 milhões de dólares e o Lyfgenia a 3,1 milhões (34).

#### 4. CONCLUSÃO

A DF é uma condição complexa caracterizada por uma mutação pontual no gene que codifica a hemoglobina A adulta, herdada em heterozigose, nos pacientes com traço falciforme, ou em homozigose, nos pacientes com quadro clínico mais grave, a AF. Essa hemoglobina mutada, em condições de desoxigenação, forma polímeros e altera a conformação da hemácia, que passa a ser chamada de drepanócito. O processo de polimerização causa oclusão dos vasos sanguíneos, inflamação constante, hemólise, crises de dor, síndromes torácicas e outras complicações agudas; também gera comprometimentos crônicos como insuficiência renal, priapismo e retinopatia.

Em conclusão, a DF representa um grande fardo para os pacientes, o sistema de saúde, tanto público quanto particular, e, portanto, para a população brasileira no geral. Os tratamentos atualmente disponíveis são eficazes para a mitigação dos sintomas, mas a cura só é possível em raros casos de doadores compatíveis para o transplante. A aprovação de medicamentos com técnicas de terapia gênica e excelente perspectiva de cura, embora muito caros também para a população de países desenvolvidos, deve servir como inspiração para novos projetos *in vitro* e *in vivo* que um dia levem à medicamentos acessíveis para a população em geral, que promovam grande melhora na qualidade de vida dos pacientes e possibilitem a cura dessa condição tão limitante.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kavanagh PL, Fasipe TA, Wun T. Sick cell disease: a review. *JAMA*. 2022 Jul 5;328(1):57-68. doi: 10.1001/jama.2022.10233.
2. Leonard A, Tisdale JF, Bonner M. Gene therapy for hemoglobinopathies: beta-thalassemia, sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2022 Aug;36(4):769-795. doi: 10.1016/j.hoc.2022.03.008.
3. Neumayr LD, Hoppe CC, Brown C. Sick cell disease: current treatment and emerging therapies. *Am J Manag Care*. 2019 Nov;25(18 Suppl)
4. Elendu C, Amaechi DC, Alakwe-Ojimba CE, Elendu TC, Elendu RC, Ayabazu CP, Aina TO, Aborisode O, Adenikinju JS. Understanding sickle cell disease: causes, symptoms, and treatment options. *Medicine (Baltimore)*. 2023 Sep 22;102(38). doi: 10.1097/MD.00000000000035237.

5. Silva-Pinto AC, Costa FF, Gualandro SFM, Fonseca PBB, Grindler CM, Souza Filho HCR, Bueno CT, Cançado RD. Economic burden of sickle cell disease in Brazil. *PLoS One*. 2022 Jun 16;17(6). doi: 10.1371/journal.pone.0269703.
6. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF, Vichinsky EP. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Mar 15;4:18010. doi: 10.1038/nrdp.2018.10.
7. Neumayr LD, Hoppe CC, Brown C. Sickle cell disease: current treatment and emerging therapies. *Am J Manag Care*. 2019 Nov;25(18 Suppl).
8. Hardouin G, Magrin E, Corsia A, Cavazzana M, Miccio A, Semeraro M. Sickle cell disease: from genetics to curative approaches. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2023 Aug 25;24:255-275. doi: 10.1146/annurev-genom-120122-081037.
9. Pace BS, Starlard-Davenport A, Kutlar A. Sickle cell disease: progress towards combination drug therapy. *Br J Haematol*. 2021 Jan 20;194(2):240-251. doi: 10.1111/bjh.17312.
10. Linder GE, Chou ST. Red cell transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. *Haematologica*. 2021 Apr 1;106(7):1805-1815. doi: 10.3324/haematol.2020.270546.
11. Cavazzana M, Mavilio F. Gene therapy for hemoglobinopathies. *Hum Gene Ther*. 2018 Oct;29(10):1106-1113. doi: 10.1089/hum.2018.122.
12. Nardi NB, Teixeira LAK, Silva EFA. Terapia gênica. *Gene therapy*. *Ciênc. saúde coletiva*. 2002;7(1):10.1590/S1413-81232002000100010. doi: 10.1590/S1413-81232002000100010.
13. Furtado RN. Edição genética: riscos e benefícios da modificação do DNA humano. *Rev. Bioét*. 2019;27(2):10.1590/1983-80422019272304. doi: 10.1590/1983-80422019272304.
14. Demirci S, Uchida N, Tisdale JF. Gene therapy for sickle cell disease: an update. *Cytotherapy*. 2018 Jul;20(7):899-910. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.04.003. Epub 2018 May 30.
15. Abraham AA, Tisdale JF. Gene therapy for sickle cell disease: moving from the bench to the bedside. *Blood*. 2021 Jul 7;138(11):932-941. doi: 10.1182/blood.2019003776.
16. ClinicalTrials.gov. Sickle Cell Disease, Sickle Cell Anemia, Gene Therapy Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/search?cond=Sickle%20Cell%20Disease&term=Sickle%20Cell%20Anemia&intr=gene%20therapy&aggFilters=status:com%20act%20ter&page=1> Acesso em 28/04/2024.
17. Kanter J, Walters MC, Krishnamurti L, Mapara MY, Kwiatkowski JL, Rifkin-Zenenberg S, Aygun B, Kasow KA, Pierciey FJ Jr, Bonner M, Miller A, Zhang X, Lynch J, Kim D, Ribeil J-A, Asmal M, Goyal S, Thompson AA, Tisdale JF. Biologic and clinical efficacy of LentiGlobin for sickle cell

- disease. N Engl J Med. 2022 Feb 17;386(7):617-628. doi: 10.1056/NEJMoa2117175. Epub 2021 Dec 12.
18. Esrick EB, Lehmann LE, Biffi A, Achebe M, Brendel C, Ciuculescu MF, Daley H, et al. Post-transcriptional genetic silencing of BCL11A to treat sickle cell disease. N Engl J Med. 2021;384:205-215. doi: 10.1056/NEJMoa2029392.
  19. Laurent M, Geoffroy M, Pavani G, Guiraud S. CRISPR-based gene therapies: from preclinical to clinical treatments. Cells. 2024 May 8;13(10):800. doi: 10.3390/cells13100800.
  20. Parums DV. Editorial: first regulatory approvals for CRISPR-Cas9 therapeutic gene editing for sickle cell disease and transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. Med Sci Monit. 2024 Mar 1;30–e944204-4. doi: 10.12659/MSM.944204.
  21. UK Government. MHRA authorises world-first gene therapy that aims to cure sickle cell disease and transfusion-dependent thalassemia. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/news/mhra-authorises-world-first-gene-therapy-that-aims-to-cure-sickle-cell-disease-and-transfusion-dependent-thalassemia> Acesso em 25/07/2024
  22. Vertex Pharmaceuticals. Casgevy: Gene therapy for sickle cell disease and transfusion-dependent thalassemia. Disponível em: <https://www.casgevy.com/> Acesso em 25/07/2024
  23. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA approves first gene therapies to treat patients with sickle cell disease. Disponível em : <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease> Acesso em 28/07/2024
  24. Lyfgenia. Gene therapies for hereditary diseases. Disponível em: <https://www.lyfgenia.com/> Acesso em 25/07/2024
  25. Vertex Pharmaceuticals. European Commission approves first CRISPR/Cas9 gene-edited therapy. Disponível em:: <https://news.vrtx.com/news-releases/news-release-details/european-commission-approves-first-crispcas9-gene-edited> Acesso em 25/07/2024
  26. European Medicines Agency (EMA). Meeting highlights from the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) 11-14 December 2023. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/news/meeting-highlights-committee-medicinal-products-human-use-chmp-11-14-december-2023> Acesso em 01/08/2024
  27. National Cancer Institute. Off-target effect. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/off-target-effe>

28. Jones RJ, DeBaun MR. Leukemia after gene therapy for sickle cell disease: insertional mutagenesis, busulfan, both, or neither. *Blood*. 2021 Sep 16;138(11):942-947. doi: 10.1182/blood.2021011488.
29. Goyal S, Tisdale J, Schmidt M, Kanter J, Jaroscak J, Whitney D, Bitter H, Gregory PD, Parsons G, Foos M, Yeri A, Gioia M, Voytek SB, Miller A, Lynch J, Colvin RA, Bonner M. Acute myeloid leukemia case after gene therapy for sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2022 Jan 13;386(2):138-147. doi: 10.1056/NEJMoa2109167. Epub 2021 Dec 12.
30. Araújo AdS, Silva Pinto AC, Lopes de Castro Lobo C, Figueiredo MS, Menosi Gualandro SF, Olalla Saad ST, Cançado RD. Sickle cell disease in Brazil: current management. *Hemoglobin*. Published online: 25 Apr 2024. doi: 10.1080/03630269.2024.2344790.
31. Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da doença falciforme. Portaria conjunta nº 05, de 19 de fevereiro de 2018. Secretaria de Atenção à Saúde; Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Disponível em: [https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/pcdt\\_doencafalciforme\\_2018-1.pdf](https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/pcdt_doencafalciforme_2018-1.pdf). Acesso em: 18/10/2024.
32. Hospital Israelita Albert Einstein. Estudo inovador do Hospital Israelita Albert Einstein avalia tratamento potencialmente curativo para a anemia falciforme. Disponível em: <https://www.proadi-sus.org.br/noticias/detalhe/estudo-inovador-do-hospital-israelita-albert-einstein-avalia-tratamento-potencialmente-curativo-para-a-anemia-falciforme1>. Acesso em 18/10/2024.
33. Garcia R. Brasil estuda terapia gênica inovadora contra anemia falciforme para incorporar ao SUS. *O Globo*. 2024 Jan 2. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/saude/medicina/noticia/2024/01/02/brasil-estuda-terapia-genica-inovadora-contra-anemia-falciforme-para-incorporar-ao-sus.ghtml>. Acesso em: 18/10/2024.
34. Pagliarulo N. Pricely new gene therapies for sickle cell pose access test. *BioPharma Dive*. 2023 Dec 8. Disponível em: <https://www.biopharmadive.com/news/crispr-sickle-cell-price-millions-gene-therapy-vertex-bluebird/702066/>. Acesso em: 18/10/2024.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradecemos ao nosso orientador prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima, pelo auxílio durante toda a graduação e no processo de desenvolvimento deste trabalho;

Agradecemos pela nossa parceria e colaboração como dupla, o que fez o trabalho ser muito mais leve, equilibrado e divertido. Este trabalho é resultado do esforço conjunto e do comprometimento que ambas dedicaram;

Agradecemos às nossas respectivas famílias, pelo apoio em todas as fases da vida, inclusive nos momentos de desafio durante essa jornada, sempre nos demonstrando carinho e compreensão;

Por fim, agradecemos ao corpo docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, pelas aulas e orientações que contribuíram muito para nossa formação, e à coordenadora prof. Dra. Renata Baida por sua disponibilidade e incentivo ao longo desses anos.