

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Amós Eduardo da Silva

**TERAPIA GÊNICA COMO ALTERNATIVA AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIAS PARA O TRATAMENTO DA ANEMIA
FALCIFORME**

São Paulo

2020

Amós Eduardo da Silva

**TERAPIA GÊNICA COMO ALTERNATIVA AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIAS PARA O TRATAMENTO DA ANEMIA
FALCIFORME**

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

São Paulo

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Silva, Amós Eduardo da

Terapia gênica como alternativa ao transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas para o tratamento da anemia falciforme / Amós Eduardo da Silva. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2020.
119 p.

Orientação de Fabio Mitsuo Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2020.

1. Anemia falciforme 2. Terapia genética 3. Transplante homólogo I. Lima, Fabio Mitsuo II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 573.21

Amós Eduardo da Silva

**TERAPIA GÊNICA COMO ALTERNATIVA AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS PARA O TRATAMENTO DA ANEMIA
FALCIFORME**

São Paulo, 03 de novembro de 2020.

Professor Orientador (Fabio Mitsuo Lima)

Professora Examinadora (Juliana Vieira dos Santos Bianchi)

São Paulo

2020

DEDICATÓRIA

“Agradeço à Deus por ter me provido de todas as coisas necessárias para a realização deste trabalho, incluindo Sua força e Sua presença. Sou grato pela vida que me deu, e por tê-la sustentado, mesmo durante um início de século tão conturbado para a humanidade.

Agradeço ao governo brasileiro pela criação do Programa Universidade para Todos, por meio do qual pude ter acesso a um ensino superior de qualidade.

Também agradeço a meus pais, por terem me apoiado em todos os meus sonhos e por todos os dias moverem montanhas para ver a felicidade de seus filhos Amós e Henrique. São a vocês, Marcelo Eduardo e Claudinéia Fernandes, aos quais dedico este trabalho.”

(O autor)

AGRADECIMENTOS

“Agradeço à minha amiga Abiqueila, pelo fornecimento de materiais enriquecedores sobre o manejo de pacientes com anemia falciforme.

Sou grato a todos os docentes e colaboradores do Centro Universitário São Camilo pelo compartilhamento de conhecimentos que tornaram essa empreitada mais proveitosa.

Por fim, não poderia deixar de agradecer ao meu professor e orientador Fabio Mitsuo Lima pelo suporte, paciência e instruções valiosas que contribuíram para a realização deste trabalho.”

(O autor)

EPÍGRAFE

“Não há gene para o destino.”

(GATTACA)

RESUMO

A anemia falciforme é uma doença genética hereditária causada pela mutação c.20A>T em homozigose no gene da beta-globina humana (HBB). Essa mutação resulta na produção da variante hemoglobínica HbS com propriedades físico-químicas distintas das hemoglobinas funcionais. Isso leva a uma mudança da forma do eritrócito para uma similar a foice. Os afetados apresentam anemia hemolítica crônica, crises álgicas intensas e infartos em múltiplos órgãos que se agravam com o avanço da idade. A doença requer diagnóstico e tratamento precoce. Do contrário, a sobrevida nos primeiros 5 anos de vida é inferior à 20%. Isso torna a doença um problema de saúde pública em todos os países onde é prevalente, como o Brasil. Atualmente, a transfusão de sangue e a hidroxiureia são as opções terapêuticas padrão para diminuir as complicações da doença. Apesar disso, o tratamento não elimina totalmente a incidência de complicações agudas potencialmente fatais nem a progressão dos danos em diversos órgãos. Para afetados com complicações clínicas graves e recorrentes é indicado a realização do transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (TCTH-alo). Essa é a única terapia curativa para anemia falciforme disponível atualmente. Entretanto, menos de 30% dos afetados são elegíveis ao procedimento, devido à baixa disponibilidade de doadores aparentados HLA-compatíveis. Nesse contexto, a terapia gênica, baseada na modificação da informação genética dos precursores hematopoéticos do próprio doente, surge como uma alternativa interessante para corrigir a disfunção dos eritrócitos de indivíduos com anemia falciforme que não possuem doador histocompatível e, que, de outra forma, não teriam acesso à terapia curativa. Esta pesquisa teve como objetivo identificar as principais evidências científicas do potencial curativo da terapia gênica para a anemia falciforme e compreender as vantagens desse procedimento sobre o TCTH-alo. Este trabalho é uma revisão bibliográfica narrativa. O levantamento de dados foi realizado por meio de consultas a livros didáticos e artigos científicos contidos em bases de dados virtuais como *Pubmed* e *Science Direct*. Em ensaios pré-clínicos a aplicação de terapia gênica foi associada a redução expressiva da eritrofalcização, inibição de infarto esplênico, pulmonar, e melhora da função renal e de marcadores hemolíticos. Em ensaios clínicos recentes, o tratamento levou a remissão da anemia falciforme, independência transfusional e ausência de hospitalizações em dois participantes após tratamento com lentivírus codificando para uma beta-globina recombinante (β^{A-T87Q}) ou deleção do *enhancer* do repressor de HBG (BCL11A) após ação de CRISPR-Cas9. Em ambos, não houve reações adversas associadas a intervenção gênica. Os principais benefícios da terapia gênica em relação ao TCTH-alo identificados foram a ausência de desenvolvimento de DECH, dispensabilidade de imunossupressão pós-transplante, risco mínimo de rejeição do enxerto. Assim, os resultados preliminares de ensaios clínicos indicam que a terapia gênica é capaz de curar a anemia falciforme. A confirmação da eficácia e segurança a longo prazo, somada a redução do custo associado, poderão fazer dessa, em breve, uma alternativa curativa ao TCTH-alo. Assim, a terapia gênica poderá beneficiar, sobretudo, pacientes com manifestações graves da doença que, de outra forma, não teriam acesso à terapia curativa, devido histoincompatibilidade com doadores aparentados.

Palavras-chave: Anemia falciforme. Terapia genética. Transplante homólogo.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary genetic disease caused by the homozygous c.20A>T mutation in the human beta-globin gene (HBB). This mutation leads to the production of an abnormal hemoglobin type, known as HbS. This hemoglobin presents distinct physicochemical properties that cause erythrocyte to acquire a sickle shape. Chronic hemolytic anemia, severe pain crises, and multiple organ infarctions are the main clinical manifestations. Both early diagnosis and treatment are essential. Otherwise, the five-year life expectancy is inferior to 20%. For this reason, SCA is a health problem in all countries in which its prevalence is high, such as Brazil. Currently, blood transfusion and hydroxyurea are the standard therapeutic options for decreasing disease complications. Despite the efforts, neither life-threatening acute complications nor progressive organ damage are completely eliminated by these approaches. For those severely affected by frequent vaso-occlusive crisis, transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells (allo-HSCT) might be suggested, once it is the only curative treatment currently available. Only a minority of patient benefits from allo-HSCT due to a shortage of HLA-compatible related donors. So that finding a less restrictive curative option, the gene therapy, based on genetic modification of hematopoietic precursors that carry the sickle mutation, emerges as a potentially curative option to correct the erythrocyte dysfunction of patients with sickle cell disease who lack compatible donor, people who, otherwise, would not have access to the current curative treatment. This research aimed to identify the main scientific evidence of gene therapy's curative potential and to understand the associated benefits of this procedure. This study is a narrative literature review. The data were gathered from textbooks and scientific articles indexed in virtual databases (such as Pubmed, Science Direct) or the university library. In preclinical trials, the use of gene therapy was associated with a significant reduction in erythrocyte sickling. Also, inhibition of splenic and pulmonary infarction, improvement of renal function, and hemolytic markers were observed. Recent clinical trials showed that the employment of gene therapy in two participants resulted in remission of sickle cell anemia symptoms. These individuals had their hematopoietic stem cells genetically modified by either a lentivirus carrying the sequence for a recombinant beta-globin (β^{A-T87Q}) synthesis or a CRISPR-Cas9 complex to delete the enhancer of HBG gene repressor (BCL11A). In both cases, adverse effects were not observed after the genetic intervention. When compared to allo-HSCT, the main benefits of gene therapy are minimal rejection risk to the autologous stem cells, dispensable post-transplant immunosuppression, absent risk of developing graft-versus-host disease (GVHD). Thus, the preliminary results of clinical trials indicate that the cure of sickle cell disease can be achieved by gene therapy approaches and the current promising evidence suggest that it might be clinically available in a not distant future. However, both long term safety and efficacy remain to be assessed and associated costs also need to be reduced. Finally, gene therapy may benefit especially those with severe clinical conditions that, otherwise, would not have access to a cure due to a lack of compatible donors.

Keywords: Sickle cell anemia. Gene therapy. Allogeneic transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de eritrofalção.	28
Figura 2 – Representação esquemática de oclusão vascular.....	29
Figura 3 – Representação da esplenomegalia.	31
Figura 4 – Complicações clínicas da anemia falciforme.	33
Figura 5 – Representação esquemática do traçado eletroforético característico de traço falciforme e anemia falciforme por IEF.	36
Figura 6 – Componentes básicos do sistema de HPLC.	37
Figura 7 – Representação dos fenótipos FA e FS por HPLC.	38
Figura 8 – Linha do tempo contendo os principais fatos históricos do TCTH	52
Figura 9 – Representação gráfica dos métodos moleculares utilizados na tipagem HLA.....	55
Figura 10 – Representação esquemática do processo de TCTH.	57
Figura 11 – Principais modalidades de transferência gênica.....	67
Figura 12 – Métodos químicos empregados na transferência gênica.....	68
Figura 13 – Processo de construção de vetor viral para terapia gênica.	69
Figura 14 – Terapia gênica in vivo e ex vivo.	70
Figura 15 – Representação esquemática dos três principais mecanismos de modificação genética utilizados na terapia gênica.....	71
Figura 16 – Representação esquemática de mecanismos de reparo do DNA.....	72
Figura 17 – Representação esquemática do mecanismo de ação de nucleases dedo de zinco.	73
Figura 18 – Representação esquemática da estrutura das TALENs.	74
Figura 19 – Representação esquemática do mecanismo de ação do complexo CRISPR-Cas9.....	75

Figura 20 – Visão geral das etapas necessárias para a terapia gênica para anemia falciforme.	77
Figura 21 – Representação esquemática das principais estratégias de terapia gênica para anemia falciforme.....	78
Figura 22 – Representação esquemática de construção lentiviral contendo como inserto o gene da γ -globina humana.	81
Figura 23 – Fases dos ensaios clínicos.....	82
Figura 24 – Fotomicrografias de esfregaço de sangue de camundongos Berkeley evidenciando o impacto do tratamento com vetor V5m3 no grau de poiquilocitose. .	84
Figura 25 – Representação esquemática da correção de HBB por HDR após ação de nucleases.....	86
Figura 26 – Representação gráfica de aumento de HbF por meio da introdução de inserções ou deleções (indels) em motivos de enhancer de BCL11A.	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Interpretação do resultado da triagem neonatal para hemoglobinopatias.	39
Quadro 2 – Exames indicados para o diagnóstico diferencial de doença falciforme após o sexto mês de vida.....	40
Quadro 3 – Indicações transfusionais para adultos e crianças com anemia falciforme em eventos clínicos agudos.	46
Quadro 4 – Critérios para o TCTH-alo na anemia falciforme.....	54
Quadro 5 – Informações farmacológicas dos princípios ativos mais utilizados para o condicionamento mieloablativo no TCTH.	58
Quadro 6 – Comparação entre vetores virais utilizados na terapia gênica.	70
Quadro 7 – Terapias gênicas para anemia falciforme sob investigação clínica (julho de 2020).....	89
Quadro 8 – Vantagens da terapia gênica em relação ao TCTH-alo.	93
Quadro 9 - Limitações da terapia gênica em relação ao TCTH-alo	94

LISTA DE ABREVIATURAS

crRNA	<i>CRISPR RNA</i>
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina do adulto
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
indels	Inserções ou deleções
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
PaO ₂	Pressão parcial de gás oxigênio no sangue arterial
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto isolétrico
pO ₂	Pressão parcial de gás oxigênio
RNAi	RNA de interferência
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
tracrRNA	<i>Transactivating CRISPR RNA</i>

LISTA DE SIGLAS

AF	Anemia falciforme
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AVE	Acidente vascular encefálico
BCL11A	<i>B-cell lymphoma/leukemia 11A</i>
CH	Concentrado de hemácias
CMV	Citomegalovírus
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTH	Células-tronco hematopoéticas
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EUA	Estados Unidos da América
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GMPc	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
HBB	<i>Hemoglobin subunit beta</i>
HBG	<i>Hemoglobin subunit gama</i>
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>
HDR	<i>Homology directed repair</i>
HEPA	<i>High efficiency particulate air</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leucocyte antigen system</i>
HPFH	<i>Hereditary persistence of fetal hemoglobin</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HU	Hidroxiureia
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%

IEF	<i>Isoelectric focusing</i>
IPS	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
NHEJ	<i>Nonhomologous end-joining</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCR SSOP	<i>PCR sequence specific oligonucleotide probes</i>
PCR SSP	<i>PCR sequence specific primer</i>
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
Redome	Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RVD	<i>Repeat variable diresidue</i>
SBT	<i>Sequence based typing</i>
SBTMO	Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea
STA	Síndrome torácica aguda
SUS	Sistema Único de Saúde
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoéticas
TCTH-auto	Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas
TCTH-alo	Transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas
VFSA	Velocidade de fluxo sanguíneo das artérias
VPC10	Vacina pneumocócica conjugada 10 valente
VPP23	Vacina pneumocócica polissacarídica 23 valente
ZFN	<i>Zinc-finger nucleases</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4 DESENVOLVIMENTO	24
4.1 ANEMIA FALCIFORME COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL	24
4.2 PATOGÊNESE	27
4.3 SINTOMATOLOGIA	30
4.3.1 Sinais e sintomas na infância	30
4.3.2 Sinais e sintomas na vida adulta	32
4.4 DIAGNÓSTICO.....	35
4.4.1 Diagnóstico neonatal.....	35
4.4.2 Diagnóstico após os seis meses de idade	39
4.5 TRATAMENTO	42
4.5.1 Imunoprofilaxia.....	42
4.5.2 Antibioticoprofilaxia	43
4.5.3 Hidroxiureia	44
4.5.4 Transfusão de sangue.....	45
4.5.4.1 Transfusão terapêutica	46
4.5.4.2 Transfusão crônica	47
4.6 HISTÓRICO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS.....	49
4.7 PRINCÍPIOS DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS EM DOENTES FALCIFORMES.....	53

4.7.1 Critérios de elegibilidade	53
4.7.2 Seleção de doador	54
4.7.3 Fonte de células-tronco hematopoéticas	56
4.8 FASES DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS	57
4.8.1 Pré-transplante.....	57
4.8.2 Transplante propriamente dito	58
4.8.3 Pós-transplante imediato.....	59
4.8.4 Pós-transplante mediato.....	59
4.8.5 Pós-transplante tardio	60
4.9 SEGURANÇA E EFICÁCIA DO TCTH-ALO	62
4.9.1 Eficácia	62
4.9.2 Segurança.....	64
4.10 PRINCÍPIOS DA TERAPIA GÊNICA	67
4.10.1 Métodos de transferência gênica.....	67
4.10.1.1 Métodos físicos.....	68
4.10.1.2 Métodos químicos.....	68
4.10.1.3 Métodos biológicos	69
4.10.2 Modificação genética <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	70
4.10.3 Mecanismo de ação da terapia gênica	71
4.11 EDITORES GENÔMICOS.....	72
4.11.1 Nucleases dedos de zinco	73
4.11.2 TALEN.....	74
4.11.3 CRISPR-Cas9	75
4.12 TERAPIA GÊNICA PARA ANEMIA FALCIFORME.....	77
4.12.1 Estratégias de terapia gênica	78
4.12.1.1 Adição de genes	79

4.12.1.2 Correção de genes	80
4.12.1.3 Indução de genes	80
4.13 AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DA TERAPIA GÊNICA PARA ANEMIA FALCIFORME	82
4.13.1 Adição de genes.....	83
4.13.2 Correção da mutação falciforme.....	85
4.13.3 Indução do gene HBG	87
4.14 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DA TERAPIA GÊNICA PARA ANEMIA FALCIFORME EM ENSAIOS CLÍNICOS.....	89
4.15 VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA TERAPIA GÊNICA EM RELAÇÃO AO TCTH-ALO	93
5 CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma doença multissistêmica grave de herança autossômica recessiva (PIEL; STEINBERG; REES, 2017; OMIM, 2020). Foi descrita pela primeira vez pelo médico estadunidense James B. Herrick em 1910, após a observação de hemácias com uma forma peculiar de foice, em uma amostra de sangue colhida de um estudante caribenho com anemia (HERRICK, 2001).

Os afetados requerem muitos cuidados desde a primeira infância. Sem assistência à saúde, o índice de mortalidade nos primeiros 5 anos de vida é próximo de 80%, fator que cria uma demanda por atendimento médico especializado em todos os países onde a doença é comum. (REGIONAL COMMITTEE FOR AFRICA, 2010). O quadro clínico é caracterizado, principalmente, por anemia hemolítica crônica, crises álgicas e dano progressivo em múltiplos órgãos (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A doença é causada pela mutação pontual c.20A>T em homozigose no gene da beta-globina humana (HBB, do inglês, *hemoglobin subunit beta*) (BAI *et al.*, 2017; CLINVAR, 2020). Essa é a forma mais prevalente e grave de doença falciforme, um grupo de disfunções genéticas associadas a mutações no gene HBB (BRASIL, 2015a).

Em decorrência da mutação, os eritrócitos dos afetados sintetizam uma variante de hemoglobina chamada hemoglobina S (HbS), que desempenha um papel central na patogênese. Essa hemoglobina forma polímeros sob baixa pressão parcial de oxigênio (pO₂) que alteram a forma do eritrócito de disco bicôncavo para uma forma de foice (drepanócito), num processo conhecido como falcização. Esse último contribui para a fragilização da membrana eritrocítica e hemólise (CHARACHE *et al.*, 1996; BUNN, 1997). Além disso, concentrações elevadas de HbS nos eritrócitos tornam essas células aderentes ao endotélio, sobretudo, quando há aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais, como na inflamação (TELEN, 2012). Isso resulta em episódios isquemia em diversos órgãos, em razão da formação de agregados de eritrócitos no endotélio em diferentes pontos da vasculatura, o que, a curto prazo, está associado a crises álgicas intensas, e, a longo prazo, lesões orgânicas progressivas (CHANG *et al.*, 2017).

No mundo, estima-se que nasçam cerca de 350.000 afetados pela doença falciforme todos os anos. Desses casos, 75% ocorrem na África Subsaariana (região ao sul do deserto do Saara, composta por 47 países) (KATO *et al.*, 2018). A doença também é prevalente em partes do Oriente Médio, Índia e bacia do mediterrâneo. A prevalência da anemia falciforme é favorecida nessas regiões pelo fato de abrigarem áreas endêmicas para a malária, fator que seleciona positivamente portadores da mutação falciforme em heterozigose, que confere resistência a malária causada por *Plasmodium falciparum* (PIEL; STEINBERG; REES, 2017). Devido a isso, a prevalência da doença também é significativa em países que receberam grande aporte de africanos escravizados (KATO *et al.*, 2018).

No Brasil, a anemia falciforme é considerada a forma mais comum de doença monogênica hereditária, sobretudo, entre indivíduos pretos e pardos (CANÇADO; JESUS, 2007). Estima-se que 4% da população brasileira seja heterozigota para a mutação falciforme (assintomáticos) e que 50.000 indivíduos tenham a doença falciforme (BRASIL, 2017). A incidência é de 1 afetado a cada 1000 nascidos vivos. Entretanto, a distribuição geográfica da enfermidade é heterogênea e essa aumenta no sentido sul-nordeste do país, de modo que o estado da Bahia apresenta o maior número de afetados por nascidos vivos: 1 a cada 650 (CANÇADO; JESUS, 2007). Por ser comum, a anemia falciforme é um problema de saúde pública no país e é alvo de diversas políticas de saúde nacionais, como a triagem neonatal para hemoglobinopatias e medicação de alto custo, ambas oferecidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2018a).

O tratamento da anemia falciforme é desafiador. Mesmo sob os melhores cuidados de saúde, a expectativa de vida dos afetados é reduzida em até 30 anos em relação a população geral (PIEL; STEINBERG; REES, 2017). Um dos fármacos preconizados para o tratamento da enfermidade é a hidroxiureia (HU), uma medicação de uso contínuo que é prescrita, geralmente, a partir dos dois anos de idade. Suas ações antifalcizante e imunossupressora contribuem para a redução de grande parte dos sintomas (BRASIL, 2018a). Entretanto, apesar de minimizar, o uso não elimina o desenvolvimento de eventuais episódios agudos de vasclusão, que, quando complicados, são potencialmente fatais (HULBERT; SHENOY, 2018).

Durante esses eventos agudos, a transfusão terapêutica de concentrado de hemácias é realizada para minimizar o agravamento do quadro clínico. O

procedimento permite a redução temporária de drepanócitos circulantes e melhora a perfusão sanguínea (MARSELLA; BORGNA-PIGNATTI, 2014). Entretanto, a exposição recorrente ao procedimento traz riscos ao paciente, como a possibilidade de desenvolvimento de reação hemolítica transfusional (decorrente de aloimunização), desenvolvimento de hemocromatose e infecções virais, como as causadas pelos vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês, *human immunodeficiency virus*) e hepatite B (HBV, do inglês, *hepatitis B virus*) (KATO *et al.*, 2018).

Atualmente, a única terapia disponível na prática clínica capaz de curar a doença é o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (TCTH-alo), também conhecido como transplante de medula óssea (apesar do primeiro termo ser mais abrangente) (PIERONI *et al.*, 2007). O procedimento está associado a níveis elevados de cura (sobrevida livre de doença em 5 anos >95%) (BERNAUDIN *et al.*, 2020). Apesar disso, uma minoria dos afetados se beneficiam do tratamento. Segundo a Sociedade Europeia de Transplantes de Medula e Sangue, apenas 18% dos afetados tem um irmão saudável e compatível para os genes do sistema do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês, *human leucocyte antigen system*), necessário para minimizar o risco de rejeição. Assim, a baixa acessibilidade ao TCTH-alo pode ser considerada como a principal limitação do procedimento (ANGELUCCI *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a terapia gênica, baseada na modificação da informação genética para curar ou atenuar doenças, surge como uma alternativa curativa em potencial ao TCTH-alo (GONÇALVES; PAIVA, 2017). Nessa abordagem, precursores hematopoéticos do paciente são colhidos, geralmente, por punção aspirativa da medula óssea, são cultivados e modificados fora do corpo (*ex vivo*) e, em seguida, reinfundidos, de modo que as células retornam a medula óssea e o indivíduo passa a produzir eritrócitos contendo um tipo de hemoglobina funcional e antipolimerizante. A principal diferença desse procedimento em relação ao TCTH-alo é o fato de ser um transplante autólogo, onde o doador é o próprio receptor, o que torna todos indivíduos virtualmente compatíveis com o enxerto (HOBAN; ORKIN; BAUER, 2016).

Por se tratar de um procedimento experimental, vários questionamentos surgem sobre a aplicação da terapia gênica para o tratamento de doentes falciformes como a eficácia do procedimento, possíveis reações adversas associadas, duração

do efeito curativo e as vantagens em relação a terapia curativa atual (ROMERO; DEWITT; WALTERS, 2018).

Partindo desse pressuposto, esta pesquisa tem por objetivo, por meio de uma revisão bibliográfica narrativa, identificar as principais evidências do potencial terapêutico da terapia gênica para anemia falciforme, bem como, os possíveis benefícios associados a essa modalidade terapêutica.

Os resultados obtidos permitirão congrega parte do conhecimento científico produzido sobre o tema em questão, como também poderá servir de material de consulta sobre essa terapia avançada para anemia falciforme.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar as principais evidências científicas da capacidade da terapia gênica em curar a anemia falciforme e compreender as vantagens desse procedimento sobre o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever dados epidemiológicos, patogênese, sintomatologia, tratamento e diagnóstico laboratorial da anemia falciforme;
- Descrever as etapas do TCTH-alo para anemia falciforme e atuais indicadores de segurança/eficácia do procedimento;
- Identificar as evidências de segurança e eficácia da terapia gênica para anemia falciforme, bem como as vantagens e limitações dessa intervenção terapêutica sobre o TCTH-alo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho é uma revisão bibliográfica narrativa. As informações que compõem a revisão foram obtidas por meio de consultas a livros físicos e virtuais de Hematologia, Patologia Básica e Genética Médica da biblioteca Padre Inocente Radrizzani, mantida pelo Centro Universitário São Camilo, e artigos científicos contidos nas bases de dados BVS, Google Acadêmico, SciELO, Periódicos CAPES, Pubmed e Science Direct, nos idiomas português e inglês, publicados entre 1900 e 2020. O levantamento de artigos foi direcionado pelo uso dos descritores “anemia falciforme”, “doença falciforme”, “transplante”, “terapia gênica”, “sickle cell anemia”, “sickle cell disease”, “transplantation”, e “gene therapy”.

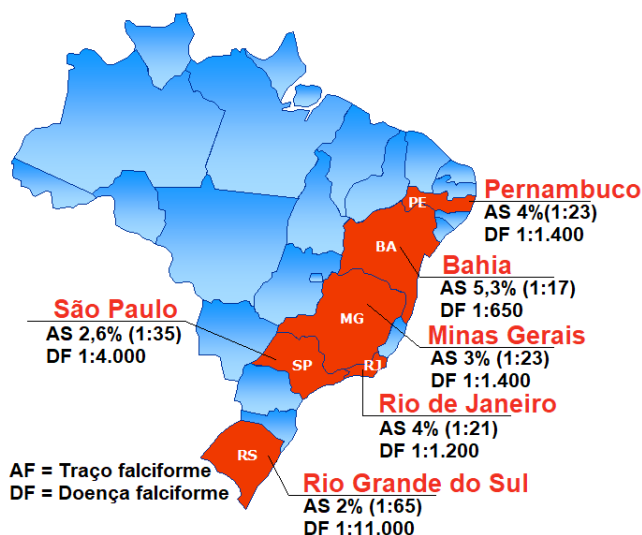
4 DESENVOLVIMENTO

4.1 ANEMIA FALCIFORME COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL

No Brasil, a doença hereditária monogênica mais comum é a anemia falciforme, sendo essa mais prevalente em pretos e pardos do que em brancos (SIMÕES *et al.*, 2010). Estima-se que mais de 200 mil brasileiros sejam portadores heterozigóticos da mutação pontual no gene HBB e que exista cerca de 50.000 afetados pela doença no país (homozigotos) (BRASIL, 2009, 2017). A doença é grave e requer uma organização especial do sistema público de saúde voltada para o diagnóstico e tratamento precoce, uma vez que a mortalidade durante os primeiros 5 anos de vida é superior a 80% em países onde a atenção especializada é precária ou inexistente (REGIONAL COMMITTEE FOR AFRICA, 2010).

A mutação foi introduzida no país pelo tráfico de seres humanos durante a escravatura. Uma grande quantidade de indivíduos africanos que estava sendo selecionada positivamente pela malária a séculos, chegou de forma forçada ao país, e muitas dessas pessoas trouxeram em seu genoma a mutação pontual que em homozigose resulta na AF e em heterozigose confere resistência à infecção por *Plasmodium falciparum*. Essa última é assintomática. (REGIONAL COMMITTEE FOR AFRICA, 2010). Assim, devido aos fatores históricos e ao perfil de distribuição étnica no país, a incidência da doença no Brasil apresenta uma estratificação geográfica peculiar: essa cresce no sentido sul-nordeste (mapa 1) (CANÇADO; JESUS, 2007).

Mapa 1 – Incidência da mutação falciforme em regiões do Brasil no ano de 2007.



Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2007 apud Santa Casa de Misericórdia, 2018

Devido a essa carga genética ter associação com a ancestralidade africana, estados da federação com maior componente de indivíduos pretos e pardos apresentam incidências maiores, tanto de portadores heterozigóticos (traço falciforme) quanto de afetados, como é o caso da Bahia, cuja incidência de traço e de doentes falciformes é de 1:17 e 1:650 nascidos vivos, respectivamente. Por sua vez, estados com maior componente de indivíduos brancos, tem índices mais baixos como o Rio Grande do Sul, cuja incidência de traço e de doentes falciformes é de 1:65 e 1:11.000 nascidos vivos, respectivamente (BRASIL, 2009). As incidências para outros estados estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 1 – Incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme e traço falciforme em 14 estados que participaram da fase II do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN).

Estados	Incidência de Doença Falciforme	Incidência de Traço Falciforme
Bahia	1:650	1:17
Rio de Janeiro	1:1200	1:21
Pernambuco	1:1400	1:23
Maranhão	1:1400	1:23
Minas Gerais	1:1400	1:23
Goiás	1:1400	1:25
Espírito Santo	1:1800	1:28
Rondônia	1:2540	1:34
Acre	1:3480	1:40
São Paulo	1:4000	1:35
Mato Grosso do Sul	1:8360	1:70
Rio Grande do Sul	1:11000	1:65
Santa Catarina	1:13500	1:65
Paraná	1:13500	1:65

Fonte: PNTN, [2007?] apud Brasil, 2009

Apesar de grave, a doença é tratável. Quando adotadas as medidas de diagnóstico neonatal, tratamento profilático precoce e tratamento das complicações agudas e crônicas, a letalidade infantil cai para cerca de 1,8% e a média de vida chega aos 48 anos (BRASIL, 2015a).

Um agravante que reitera a necessidade de políticas de saúde voltada para a atenção à saúde para a anemia falciforme é a de que o estrato populacional mais

acometido pela doença são indivíduos com menor escolaridade e menor poder aquisitivo, e que, portanto, dependem de serviços de saúde pública para serem tratados. Mais que uma questão de saúde pública, o acesso ao tratamento da anemia falciforme é uma questão de equidade social (BRASIL, 2015b; FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010).

Sendo assim, quando se considera os determinantes biológicos da doença somado a vulnerabilidade social em que uma porção considerável dos afetados se encontra é essencial a elaboração de políticas voltadas ao Sistema Único de Saúde para o tratamento da anemia falciforme que visem reduzir os índices nacionais de morbimortalidade da doença e proporcionar uma maior qualidade de vida aos afetados (BRASIL, 2015b).

4.2 PATOGÊNESE

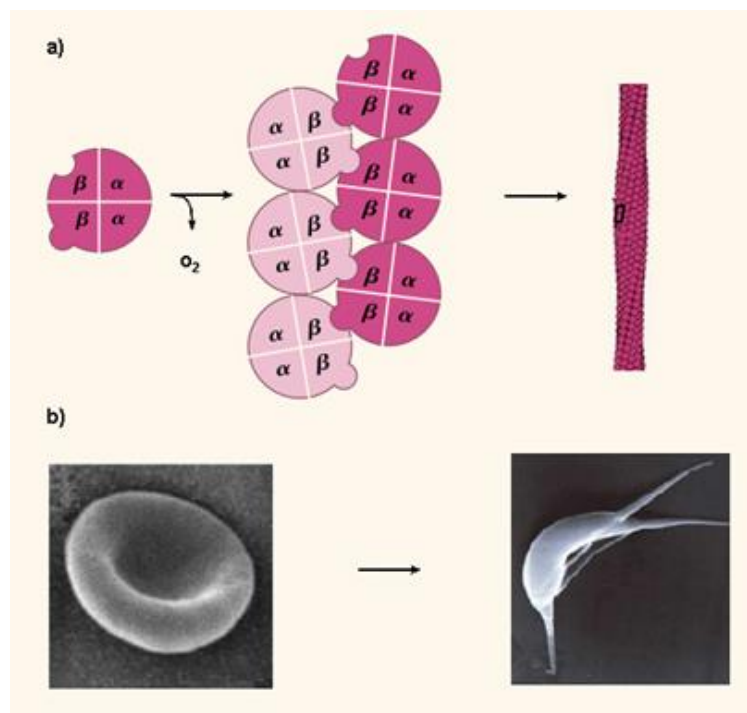
A anemia falciforme é resultante do pleiotropismo do gene HBB que carrega a mutação c.20A>T tanto no alelo materno quanto no paterno. Isso significa que a mutação monogênica provoca disfunções em diversos sistemas, nem sempre obviamente relacionadas (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016). As principais manifestações clínicas decorrentes da alteração genética são a anemia, as crises álgicas e lesão orgânica crônica. A primeira decorre da hemólise, já as duas últimas, da isquemia por oclusão dos vasos sanguíneos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013b).

Devido a troca de um único aminoácido na estrutura da beta-globina, a hemoglobina do adulto (HbA), que é um tetrâmero composto por duas subunidades α e duas subunidades β , é substituída por uma variante com propriedades físico-químicas distintas na anemia falciforme, chamada de hemoglobina falciforme ou hemoglobina S (HbS), que é um tetrâmero composto por duas subunidades α e duas subunidades β^s (AZEVEDO, 2019).

A HbS modifica a forma e a composição da membrana eritrocítica. As hemácias duram menos que os habituais 120 dias, resultando em anemia. A HbS é mais suscetível a oxidação e depleta os sistemas antioxidantes dos eritrócitos, levando a lesões na membrana eritrocítica e expressão de fosfatidilserina, um marcador de senescência celular responsável por sinalizar a retirada precoce do eritrócito da circulação pelo sistema mononuclear fagocitário (NEIDLINGER *et al.*, 2006). Embora a maior parte da hemólise seja extravascular, cerca de 1/3 ocorre dentro da vasculatura (CROSBY, 1955).

A falcização é outro mecanismo que contribui para retirada precoce dos eritrócitos da circulação. A HbS é menos solúvel que a HbA. Em condições de baixa pO_2 (como nos capilares não-pulmonares), as HbS tendem a se associar umas as outras por interações hidrofóbicas entre os resíduos de aminoácidos aceptores (valina, posição 6) e resíduos receptores (fenilalanina e leucina, posições 85 e 88, respectivamente) contidos na estrutura da beta-globínica (CHARACHE *et al.*, 1996). Tais interações levam a formação de extensos polímeros no interior celular que distendem a membrana e fazem o eritrócito perder a forma de disco bicôncavo e assumir uma forma de foice, como pode ser visto a seguir, na figura 1 (BUNN, 1997).

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de eritrofalciamento.



Fonte: Adaptado de Bunn, 1997; Hayakawa; Matsuoka, 2016. a) Representação do tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ da HbS e formação do tactoide por interação hidrofóbica mediante desoxigenação. b) Perda da forma esférica bicôncava do eritrócito e aquisição da forma de foice após o fenômeno da falcização.

Durante muitas décadas após a primeira descrição científica da anemia falciforme por Herrick em 1910, acreditou-se que a falcização de eritrócitos no interior dos capilares, seria responsável não só pela hemólise, mas causariam a vasclusão (HERRICK, 2001; SINGER, 1951). Os drepanócitos lentificariam o fluxo sanguíneo, devido a menor deformabilidade ao passar no capilar, o que levaria a desoxigenação e falcização dos eritrócitos precedentes, resultando em aumento da viscosidade do sangue, seguida de estase e hipóxia tecidual (DIGGS; BRUEGGE, 1954).

O paradigma atual atribui os episódios de oclusão vascular às interações adesivas entre eritrócitos, leucócitos e endotélio. Estes, ao se agregarem, bloqueiam o fluxo sanguíneo e causam lesão tecidual (TELEN, 2007). Sabe-se que a inflamação e situações de estresse precipitam a vasclusão, devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão pelo endotélio e por aumento da afinidade de antígenos eritrocitários por essas moléculas (TELEN, 2012; ZENNADI *et al.*, 2004).

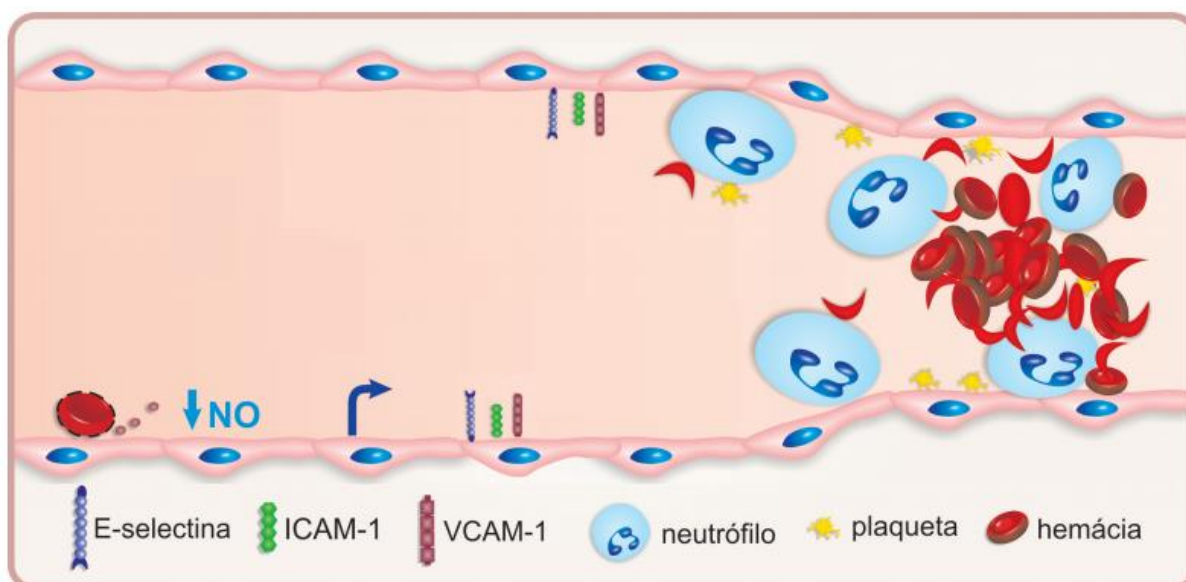
Tanto o endotélio, quanto os eritrócitos são hiperadesivos na doença. Parte disso se deve a depleção do vasodilatador óxido nítrico (NO) causado pela hemólise

intravascular (MORRIS, 2008). A hemólise leva a liberação de arginase no plasma e a redução de arginina, precursora do óxido nítrico. Reduzido o substrato da NO sintase, a produção endotelial de NO cai e ocorre ativação da transcrição de moléculas de adesão nessas células, como VCAM-1 e E-selectina (MORRIS *et al.*, 2005; ROTHER *et al.*, 2005).

A epinefrina é o estímulo endógeno mais bem caracterizado que pode aumentar adesividade dos eritrócitos com HbS (TELEN, 2012). Uma vez liberada, a epinefrina ativa receptores adrenérgicos no eritrócito que suprarregulam a atividade da adenilato ciclase e aumentam os níveis intracelulares de AMPc, o que ativa a PKA e leva a fosforilação de resíduos dos antígenos B-CAM e LU (integrantes do sistema Lutheran), aumentando a afinidade pela integrina $\alpha 4\beta 1$ leucocitária; a fosforilação de resíduos do antígeno LW aumenta sua afinidade pela integrina $\alpha v\beta 3$ endotelial (GAUTHIER *et al.*, 2005; HINES *et al.*, 2003; ZENNADI *et al.*, 2004).

Visto isso, o conjunto desses eventos torna o indivíduo suscetível às crises vasoclusivas. O mecanismo básico envolvido na vasclusão inclui, ativação endotelial (VCAM-1, E-Selectina) por depleção de NO (hemólise) ou inflamação, recrutamento e adesão de leucócitos, interação dos eritrócitos com endotélio ativado e leucócitos aderidos, bloqueio vascular pelo agregado heterocelular (Figura 2), isquemia, inflamação e intensificação vasclusão. (MANWANI; FRENETTE, 2013).

Figura 2 – Representação esquemática de oclusão vascular.



Fonte: Adaptado de Costa; Conran; Fertrin, 2013.

4.3 SINTOMATOLOGIA

A apresentação clínica da anemia falciforme é variada entre indivíduos. É comum que o paciente apresente anemia hemolítica grave, com hemoglobina (Hb) entre 7 e 8 g/dL. Como relatado, em decorrência da forma alterada, os drepanócitos são reconhecidos e removidos da circulação antes do período habitual de 120 dias pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário e essa destruição precoce, em conjunto com episódios de hemólise intravascular, leva a anemia. Os sintomas da anemia incluem cansaço, taquicardia ante esforços moderados e icterícia (AZEVEDO, 2019).

4.3.1 Sinais e sintomas na infância

Os sintomas da doença se manifestam a partir dos 6 meses de vida, momento em que a expressão de hemoglobina fetal (HbF) reduz e a expressão de HbS começa a aumentar (AZEVEDO, 2019). Nessa fase iniciam-se os primeiros episódios de oclusão vascular. A dactilite (fotografia 1), inflamação aguda dos ossos dos dedos dos pés e das mãos, é uma das primeiras manifestações clínicas que ocorre no lactente. A região fica edemaciada, com motilidade reduzida e sensível ao toque. A dor é intensa e é acompanhada de irritabilidade e choro (ANVISA, [2005?]).

Fotografia 1 – Dedos edemaciados e dolorosos em criança com anemia falciforme.



Fonte: Hoffbrand; Moss; Pettit, 2008a

Os pequenos ossos dessa região são especialmente suscetíveis a infartos provocados pela oclusão vascular devido ao suprimento vascular incompleto nesse estágio do desenvolvimento (RAPAPORT, 1989). O fenômeno inflamatório pode

comprometer o crescimento ósseo e causar encurtamento dos dedos (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008b).

Devido a isquemia gerada pelas oclusões vasculares, as lesões orgânicas são múltiplas. O baço é um dos primeiros órgãos acometido por esse fenômeno. A asplenia funcional (ausência de função normal do baço) ocorre após inúmeros infartos no órgão, de forma que, por volta dos 5 anos de idade, esse órgão torna-se atrófico e não palpável (BRASIL, 2012).

Devido a asplenia funcional, as infecções são as principais causas de morte em crianças afetadas. A perda do maior órgão linfóide do organismo faz com que os indivíduos tenham menor capacidade de depurar microrganismos da corrente sanguínea de forma que crianças menores de 3 anos que têm susceptibilidade aumentada a septicemias e meningites causadas por *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Para evitar o quadro, a antibioticoterapia profilática é indicada até os 5 anos de idade, bem como a adesão a um modelo vacinal mais robusto (BRASIL, 2016).

Após as infecções, a crise de sequestro esplênico é uma das principais causas de morte na infância. Caracterizada por retenção dos eritrócitos na polpa vermelha do baço, o evento leva a uma queda abrupta da volemia e da concentração de Hb e o baço aumenta de volume rapidamente (figura 3). A rápida identificação e transfusão de concentrado de hemácias são necessárias para evitar o choque hipovolêmico e óbito (KATO *et al.*, 2018). Nesses casos, a remoção cirúrgica do baço pode ser indicada para evitar recidivas (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008b).

Figura 3 – Representação da esplenomegalia.



Fonte: ABRASTA, 2007. Durante o sequestro esplênico o baço aumenta rapidamente de tamanho.

4.3.2 Sinais e sintomas na vida adulta

Na adolescência e na vida adulta uma complicação grave e potencialmente fatal é a síndrome torácica aguda (STA). Além de febre intensa, os indivíduos acometidos apresentam tosse, dor torácica e dispneia. As causas variam entre infecção, embolia gordurosa por infarto da medula óssea e oclusão da vasculatura pulmonar ou combinação desses eventos. Treze por cento dos indivíduos requerem ventilação mecânica e 3% vão a óbito (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Antibioticoterapia empírica e oxigenoterapia são indicadas no tratamento imediato. Sob piora do quadro ($\text{PaO}_2 < 70 \text{ mmHg}$), a transfusão de sangue simples ou de troca pode ser feita para reduzir o nível de HbS e a falcização nos pulmões (BRASIL, 2009).

Devido ao caráter hemolítico da doença, a produção hepática de bilirrubina é excessiva. Além de causar icterícia ao se depositar nos tecidos, a bilirrubina precipita em sais de bilirrubinato de cálcio na vesícula biliar e causa a litíase biliar, uma condição que acomete cerca de 75% dos adultos com anemia falciforme. A alteração promove algia abdominal, especialmente após o consumo de alimentos com elevado teor lipídico e, nesses casos, apesar de controversa, a colecistectomia pode ser indicada para resolução do sintoma (KATO *et al.*, 2018).

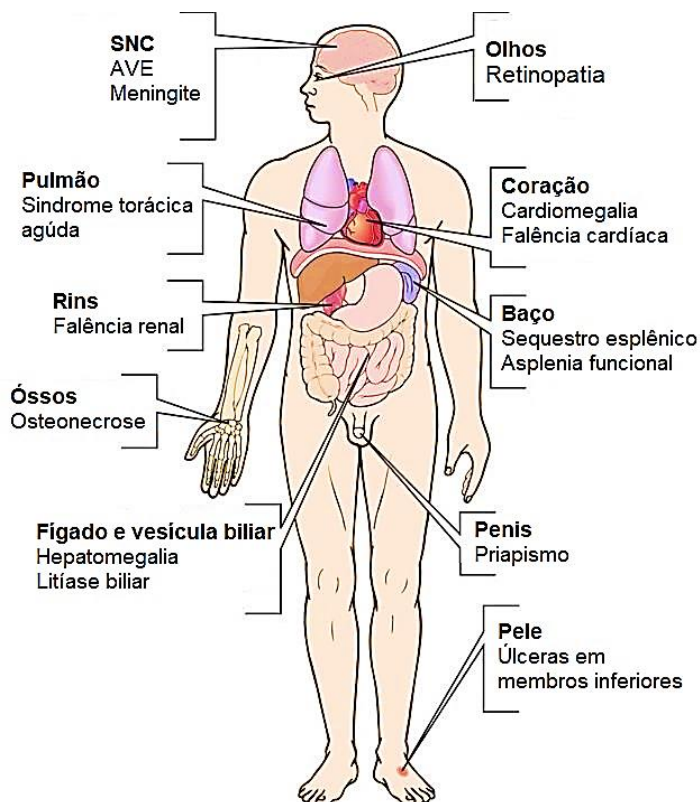
A doença também tem repercussões na vida sexual dos indivíduos. É comum que ocorra nos homens, ao menos um episódio de priapismo a partir da puberdade. A ereção dolorosa e prolongada do pênis ocorre devido oclusão vascular nos corpos cavernosos causada pelos drepanócitos. Na ausência de autorresolução do quadro, em 24 horas, é indicado transfusão simples ou exsanguineotransfusão parcial para reduzir os níveis de HbS e a falcização e, em alguns casos, pode ser necessário a punção dos corpos cavernosos. Devido a episódios recorrentes ou demasiadamente prolongados, cerca de 46% desses indivíduos têm disfunção erétil (BRASIL, 2009).

A função renal dos portadores de anemia falciforme é gravemente afetada pela doença. Cerca de 33% desenvolvem doença renal crônica devido à infartos na papila renal, em decorrência da baixa pO_2 , baixo pH e elevada osmolaridade, o que favorece a falcização dos eritrócitos na região e a oclusão vascular. Cerca de 20% desses necessitam de hemodiálise ou transplante renal, o que contribui para redução da expectativa de vida dos afetados (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; KATO *et al.*, 2018).

No sistema nervoso central, o acidente vascular encefálico (AVE) é uma causa importante de lesões irreversíveis que podem dificultar a realização de tarefas cotidianas. Enquanto o AVE hemorrágico é mais frequente em adultos entre 20 e 29 anos, a forma isquêmica é mais comum em crianças (OHENE-FREMPONG *et al.*, 1998). Os sintomas mais frequentes incluem a hemiparesia, afasia, confusão mental e convulsões. As recidivas de AVE isquêmico são comuns e podem ser evitadas com transfusão crônica (mantém HbS < 30%). Quanto ao AVE hemorrágico, ainda não há um protocolo definido para evitar a sua ocorrência (STROUSE, 2016).

Devido a essas lesões agudas e crônicas cumulativas (figura 4), a expectativa de vida dos indivíduos com anemia falciforme é reduzida em cerca de 30 anos, se comparada com a população geral. Segundo um estudo clínico estadunidense, que levantou dados de cerca de 16.000 indivíduos que faleceram em decorrência de doença falciforme entre 1979 e 2005, a idade média de morte foi de 42 anos para homens e de 48 anos para mulheres com a doença (LANZKRON; CARROLL; HAYWOOD, 2013).

Figura 4 – Complicações clínicas da anemia falciforme.



Fonte: Adaptado de Bamford-Perkins, [2010-2020]. As complicações agudas, como crises de dor, levam a busca por atendimento médico. Com o passar dos anos o indivíduo desenvolve lesões orgânicas crônicas que contribuem para redução da expectativa de vida.

Vale ressaltar, entretanto, que a apresentação clínica da doença é heterogênea devido a diversos fatores que podem atenuar sua manifestação, como, por exemplo, o nível de expressão HbF $>8,6\%$ e contagem de leucócitos dentro dos valores de referência. Em todos os casos, a doença inspira muitos cuidados desde os primeiros meses de vida, sendo indispensável a adoção de intervenções precoces e acompanhamento médico contínuo para que o indivíduo possa ter uma vida funcional (PLATT *et al.*, 1994).

4.4 DIAGNÓSTICO

A recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o diagnóstico de doença falciforme é que em países onde a doença é comum seja instituído um programa nacional de rastreio neonatal (WORLD HEALTH ASSEMBLY, 2006). O intuito dessa recomendação é que seja possível detectar a doença ainda na fase subclínica nos recém-nascidos. Com isso, intervenções precoces que modifiquem o curso da doença podem ser adotadas para reduzir os índices de mortalidade infantil e as complicações clínicas da enfermidade (UNITED STATES OF AMERICA, 2002).

4.4.1 Diagnóstico neonatal

No Brasil, o rastreio anemia falciforme e outras hemoglobinopatias em recém-nascidos foi instituído no país em 2001, juntamente a testes para detecção de fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito e fibrose cística, pela portaria de nº 822 do Ministério da Saúde. A portaria cria o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) que tem por objetivo reduzir a mortalidade e morbidade de doenças congênitas no país, por meio do acesso gratuito e universal aos testes de detecção precoce, acompanhamento e tratamento dessas condições clínicas no SUS (BRASIL, 2001).

Visto que a anemia falciforme é assintomática nos primeiros meses de vida, o diagnóstico precoce depende de análises laboratoriais contempladas na triagem neonatal. Essa é conhecida popularmente como “teste do pezinho”, isso, em razão da coleta de sangue que, geralmente, é feita a partir punção do calcanhar do recém-nascido entre o 2º e 7º dia e impregnação da amostra em papel-filtro. Após a coleta, as amostras são encaminhadas para laboratórios especializados em triagem neonatal, onde são processadas (HELENA; FERRAZ; MURAO, 2007).

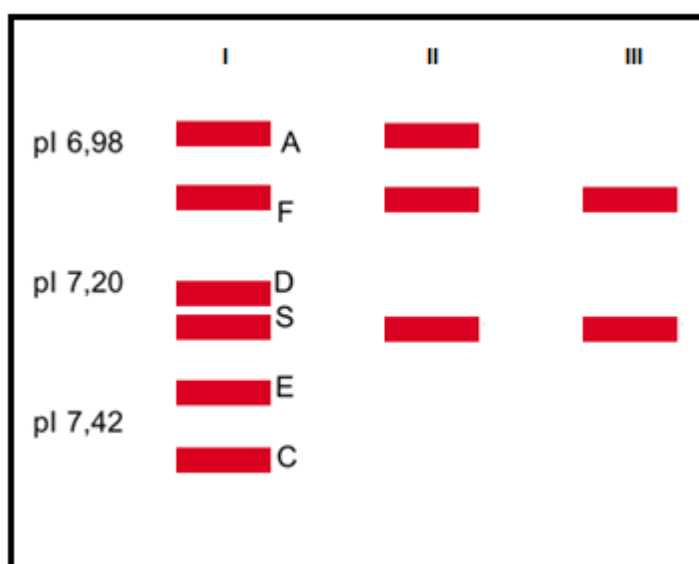
As técnicas empregadas atualmente na triagem neonatal de hemoglobinopatias são a focalização isoelétrica (IEF, do inglês, *isoelectric focusing*) e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês, *high performance liquid chromatography*) por troca catiônica. Essas técnicas substituíram a eletroforese de Hb por serem mais específicas e detectarem facilmente (maior sensibilidade) concentrações reduzidas de variantes de Hb (HbS, HbC, HbD, HbE) no sangue do recém-nascido. Tanto a IEF quanto HPLC também são capazes de detectar as frações normais de Hb (HbF, HbA, HbA2) (MASON *et al.*, 2015).

A focalização isoelétrica é uma técnica eletroforética que separa proteínas pelo ponto isoelétrico (pI) (JENKINS; RATNAIKE, 1999). A amostra hemolisada é aplicada sobre um gel que contém um gradiente de pH, gerado pela adição prévia de uma mistura de anfólitos. A amostra é submetida a um campo elétrico, o que faz com que as hemoglobinas migrem pelo gel (SILVA; NETO; SANTOS, 2017).

A separação ocorre a medida em que cada hemoglobina entra na região de pH que corresponde ao pI, momento em que a molécula fica neutra e perde a mobilidade. A partir da coloração do gel é possível identificar bandas das Hb separadas nas faixas de pH conhecidos. Como cada Hb possui um pI característico, o perfil hemoglobínico do paciente pode ser identificado com elevada especificidade (BERTHOLO; MOREIRA, 2006; RIGHETTI, 2000).

Na figura 5, há a representação de um resultado indicativo de traço falciforme (coluna II, presença de HbA e HbS) e outro indicativo de anemia falciforme (coluna III, presença de HbS e ausência de HbA) (ANVISA, 2002).

Figura 5 – Representação esquemática do traçado eletroforético característico de traço falciforme e anemia falciforme por IEF.



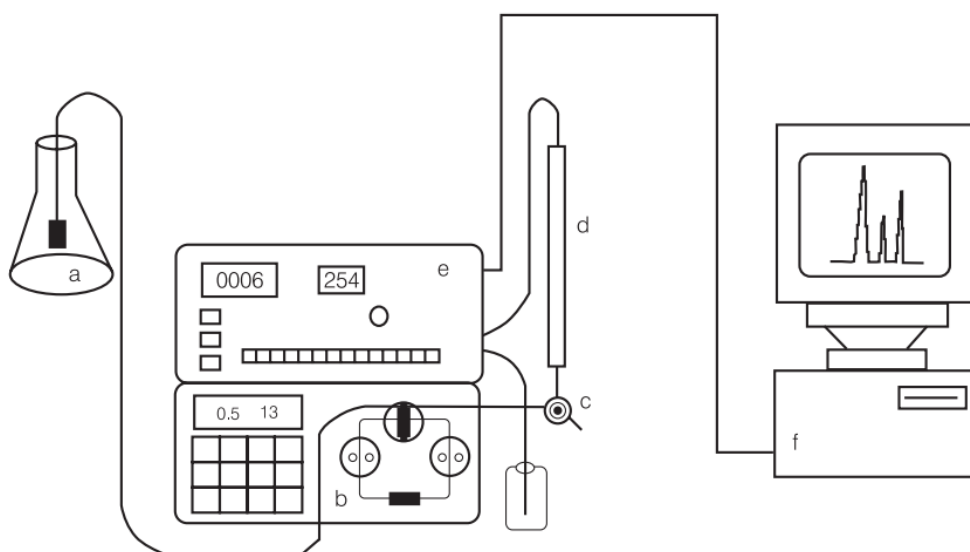
Fonte: Adaptado de ANVISA, 2002. (I) Controle AFDSEC, (II) traço falciforme, (III) anemia falciforme.

Na HPLC por troca catiônica, por sua vez, as hemoglobinas são separadas segundo o grau de afinidade pela fase estacionária (figura 6). As Hb adquirem carga líquida positiva ao serem misturadas a um tampão ácido (pH 6,4), logo após a injeção

no sistema. Em seguida são bombeadas para a coluna cromatográfica, onde se ligam à fase estacionária (sílica carregada com grupos carboximetil, de carga negativa) (BAIN, 2006).

A separação ocorre à medida que cargas positivas de um tampão salino com concentração crescente (0 – 0,15 M) são injetadas na coluna e competem pela ligação com a sílica, o que provoca a eluição das Hb segundo o grau de afinidade pela coluna (isto é, Hb com menos cargas positivas eluem primeiro). Ao final da coluna, um espectrofotômetro ajustado para emissão de luz a 415 nm detecta as hemoglobinas (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; HUISMAN, 1987).

Figura 6 – Componentes básicos do sistema de HPLC.

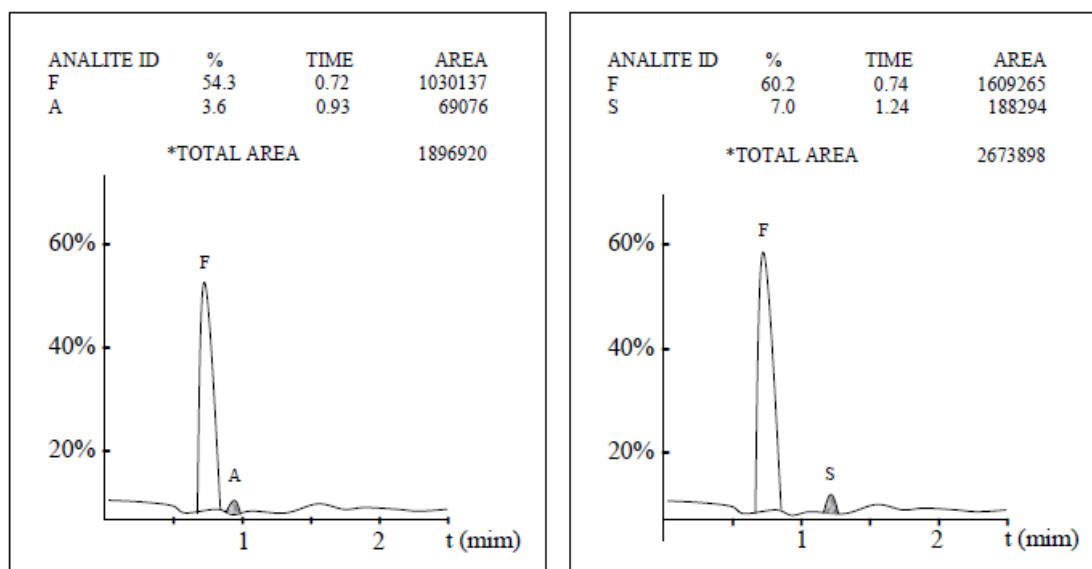


Fonte: Degani; Cass; Vieira, 1998. Composição do sistema cromatográfico: a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) injetador de amostra; d) coluna cromatográfica; e) detector e f) registrador.

O resultado é liberado na forma de um gráfico de percentual de Hb em função do tempo de retenção (figura 7). Cada hemoglobina possui um tempo de retenção conhecido (tempo entre injeção da amostra e eluição da coluna cromatografia), o que permite a formação de picos distintos no gráfico e a caracterização de diferentes Hb. No caso de um fenótipo normal é esperado a presença de HbF e HbA (essa última em percentual relativo baixo, devido a predominância de HbF nesse período de vida). Em indivíduos com anemia falciforme o pico de HbA é ausente e é substituído pela HbS. Quanto a quantificação, essa é feita segundo a absorbância das Hb a 415 nanômetros

e é representada pela amplitude de cada pico (BAIN, 2006; BIO-RAD, 2005; HUISMAN, 1987).

Figura 7 – Representação dos fenótipos FA e FS por HPLC.



Fonte: Adaptado de BIO-RAD, 2005. À esquerda, um fenótipo normal (FA). À direita, o fenótipo de anemia falciforme (FS). Esse último é caracterizado pela ausência do pico de Hb A e presença do pico de maior tempo de retenção, a HbS. Nesse caso, a grande amplitude de HbF é um forte indicador que a amostra provém de um neonato.

O resultado da triagem neonatal caracteriza as Hb encontradas na amostra de sangue segundo sua concentração, a saber, de forma decrescente. Sendo assim, um perfil FA indica a presença de HbF e HbA e é normal, sendo a concentração da primeira maior do que a segunda. O perfil FAS indica presença de (além de HbF) HbA e HbS e é o fenótipo do traço falciforme, portador assintomático. Já o perfil FS, devido ausência de HbA e presença de HbS, é indicativo de anemia falciforme. Os resultados atribuídos a formas sintomáticas precisam ser confirmados após o sexto mês de vida pois podem estar associados a doenças distintas. O fenótipo FS, por exemplo, também está presente nas heterozigoses compostas com talassemia β^0 (S/ β^0) ou com a persistência hereditária de hemoglobina fetal (S/HPFH, sendo HPFH sigla em inglês para *hereditary persistence of fetal hemoglobin*) (BRAGA *et al.*, 2016).

Os demais resultados da triagem neonatal e suas interpretações encontram-se no descritas no quadro 1, a seguir.

Quadro 1 – Interpretação do resultado da triagem neonatal para hemoglobinopatias.

RESULTADO	INTERPRETAÇÃO	CONDIÇÃO CLÍNICA
FA^a	Normal	Assintomática
FAS	Traço falciforme	Assintomática
FS	Anemia falciforme (Hb SS) ou Hb S/Beta ⁰ -talassemia ou Hb S/HPFH	Anemia hemolítica
FSA ou FS^b	Hb S/Beta ⁺ -talassemia	Anemia hemolítica
FSC	Hb SC	Anemia hemolítica
FSD	Hb SD	Anemia hemolítica
FSA + Hb Bart	Hb S/alfa-talassemia	Anemia hemolítica
FSE	Hb SE	Anemia hemolítica
FSV^c	Hb SV	Anemia hemolítica
FAC	Traço Hb C	Assintomática
FC	Hb C ou Hb C/beta ⁰ -talassemia	Anemia hemolítica
FCA	Hb C/beta ⁺ -talassemia	Anemia hemolítica
FAD	Traço Hb D	Assintomática
FD	Hb D	Anemia hemolítica
FDA	Hb D/beta ⁺ -talassemia	Anemia hemolítica
FA + Hb Bart (1–5%)	Portador silencioso de alfa-talassemia	Assintomática
FA + Hb Bart (5–10%)	Traço alfa-talassêmico	Anemia leve
FA + Hb Bart (25–50%)	Doença de HbH	Anemia hemolítica
F	β^0 -talassemia (talassemia maior) – por HPLC	Anemia hemolítica

Fonte: Adaptado de Braga et al., 2016. Em amarelo, resultado indicativo de traço falciforme e anemia falciforme. HPFH: Persistência Hereditária de HbF. a) O resultado de talassemia menor também é FA. b) Hb FSA é HbS associada com beta-talassemia. Entretanto, caso a porcentagem de HbA seja muito baixa, o fenótipo neonatal pode ser Hb FS. c) Hb FSV indica variantes diferentes de HbA, HbS, HbC, HbD e HbE.

4.4.2 Diagnóstico após os seis meses de idade

Os indivíduos com resultado positivo para doença falciforme devem ser testados novamente após o sexto mês de vida segundo os exames do quadro 2. Nesse período os analitos sanguíneos são mais próximos do perfil do adulto, sendo possível estabelecer o diagnóstico diferencial entre doenças falciformes. Como dito, os fenótipos de doença falciforme indicados pela triagem neonatal podem estar associados a diferentes genótipos e manifestações clínicas, de forma que um novo conjunto de testes são necessários para estabelecer o diagnóstico definitivo e, com isso, o tratamento mais adequado para cada caso (HELENA; FERRAZ; MURAO, 2007).

Quadro 2 – Exames indicados para o diagnóstico diferencial de doença falciforme após o sexto mês de vida.

ENSAIO	OBJETIVO
Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino (acetato de celulose)	Detecção de Hb normais e variantes
Eletroforese de hemoglobina em pH ácido (ágar citrato ou gel de agarose)	
Teste de falcização com metabissulfito de sódio	Pesquisa de drepanócitos
Teste de solubilidade com agente de elevada molaridade	Pesquisa de HbS
Quantificação de HbF e HbA2 por HPLC	Diagnóstico diferencial de anemia falciforme e HbS /talassemia $\beta 0$
Hemograma e contagem de reticulócitos	Gravidade clínica, características hematimétricas e hematoscópicas

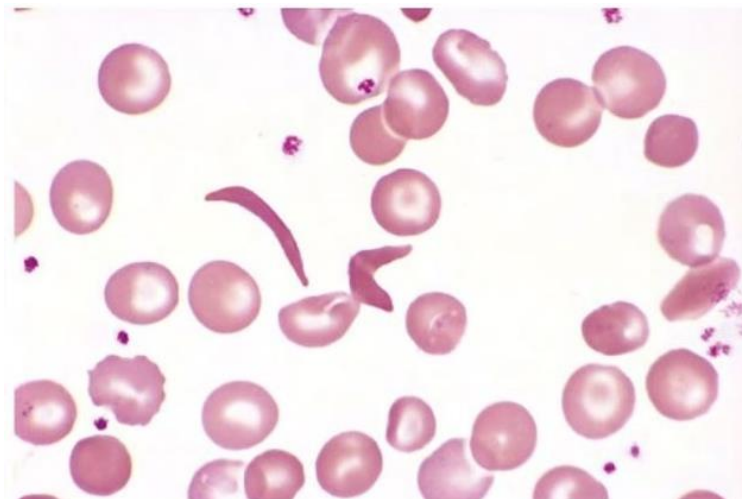
Fonte: Brasil, 2009.

Os principais achados nessa segunda avaliação, característicos de anemia falciforme são: anemia normocítica normocrômica, com Hb entre 6-9 g/dL e RDW elevado; o esfregaço sanguíneo revela a presença de eritroblastos em diferentes graus de maturação e poiquilocitoses como drepanócitos (achado patognomônico que podem ser observados na fotografia 2) e codócitos (AZEVEDO, 2014).

Devido a hipóxia crônica, há reticulocitose, geralmente > 15%. Quanto ao perfil hemoglobínico, a Hb S predomina e varia de 80 – 90%; HbA é ausente (exceto em caso de transfusão recente), HbF 2-15% e HbA2 < 3,5%. Pode haver leucocitose moderada (12.000-15.000/uL) e plaquetose (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008b; RAPAPORT, 1989).

Na eventual realização de exames bioquímicos, é possível verificar alterações laboratoriais indicativas do caráter hemolítico da doença, a saber, bilirrubina indireta, lactato desidrogenase (LDH) e urobilinogênio urinário elevados, juntamente com baixos níveis de haptoglobina (ANVISA, 2002).

Fotografia 2 – Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo de paciente com anemia falciforme contendo poiquilocitoses (grande aumento).



Fonte: Kumar; Abbas; Aster, 2013a. Presença de drepanócitos ao centro e codócitos na periferia.

Confirmado o diagnóstico de anemia falciforme, os familiares são acolhidos por um serviço de atenção básica para receber informações iniciais sobre a doença, idealmente por meio de médico pediatra, psicólogo e assistente social. Essas orientações devem ser transmitidas em linguagem acessível e informar sobre o cuidado geral do afetado, tratamentos e aconselhamento genético. Deve-se oferecer a testagem para hemoglobinopatias aos familiares próximos (pai, mãe, irmã, irmão) para estabelecimento do risco de recidivas no núcleo familiar (BRASIL, 2001).

A partir de então o indivíduo é inserido num programa de atenção integral e continuada para pessoas com doença falciforme. O acompanhamento da condição clínica, orientações específicas, imunizações básicas e especiais, antibioticoprofilaxia, dispensação de analgésicos e anti-inflamatórios é feito no nível da atenção primária, na unidade básica de saúde mais próxima da residência do indivíduo (BRASIL, 2009, 2018).

O indivíduo também mantém vínculo com um centro de referência de média e alta complexidade (hemocentro, hospital geral ou hospital universitário) por meio de visitas anuais regulares na atenção especializada (hematologia, endocrinologia, cardiologia, pneumologia e outros) e, se necessário, para realização de procedimentos indisponíveis na atenção primária (exames de imagem, transfusão sanguínea), permitindo o tratamento de danos crônicos ou resultantes de eventos agudos (BRASIL, 2009).

4.5 TRATAMENTO

A essência do tratamento da anemia falciforme é a adoção precoce de medidas profiláticas que devem ser iniciadas nos primeiros dois meses de vida. A transmissão dessas medidas aos cuidadores nas primeiras consultas médicas e a adesão a essas contribui para redução das manifestações da doença e para a melhora da qualidade de vida do afetado (BRAGA; APARECIDA; BRAGA, 2007; BRASIL, 2009) .

Essas medidas incluem manter uma boa hidratação com aporte elevado de líquidos, uma vez que a desidratação pode precipitar crises, devido a hemoconcentração; evitar temperaturas elevadas, pois essas contribuem para desidratação; usar vestimentas quentes durante baixas temperaturas, pois essas promovem vasoconstrição nas extremidades e podem precipitar vasclusão; manter boa higiene oral, o que evita infecções odontogênicas que poderiam se complicar na forma de crises vasclusivas; suplementação com ácido fólico, para evitar anemia megaloblástica devido a demanda aumentada pelo micronutriente, em razão do quadro hemolítico e da eritropoese acentuada; manutenção dessas medidas conforme o indivíduo cresce, pelo estímulo ao autocuidado (ANVISA, 2002; BRAGA; APARECIDA; BRAGA, 2007).

Outros importantes modificadores do curso da doença são a imunoprofilaxia, antibioticoprofilaxia, farmacoterapia com hidroxiureia e hemoterapia. Devido ao grande impacto na redução da morbimortalidade da doença, esses serão detalhados a seguir (HOPPE; NEUMAYR, 2019) . O transplante de células-tronco hematopoéticas será abordado nos capítulos subsequentes a esse.

4.5.1 Imunoprofilaxia

A infecção é a principal causa de morte entre indivíduos de 0 a 5 anos com anemia falciforme, em especial as meningites e sepses por *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo). Essas infecções podem se complicar em poucas horas e culminar em morte por choque séptico. Assim, as imunizações ativas (vacinas) são estratégias essenciais para prevenir esses quadros e reduzir os índices de mortalidade nos primeiros anos de vida. (BRASIL, 2009; DIGGS apud PEARSON, 1977).

Segundo a Sociedade Brasileira de Imunizações (2019), a SBI, as vacinas de especial importância para os indivíduos com disfunção esplênica (o que inclui indivíduos com anemia falciforme) são aquelas direcionadas contra os seguintes patógenos: as bactérias *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e os vírus da hepatite A, hepatite B, varicela-zoster, influenza A e B.

Dentre essas imunizações destacam-se as vacinas pneumocócica conjugada 10 valente (VPC10) e polissacarídica 23 valente (VPP23). A primeira é administrada aos 2, 4 e 12 meses de vida e confere imunidade à 10 sorotipos de *S. pneumoniae* (4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), já a segunda é administrada após os 2 anos e confere imunidade à 23 sorotipos do pneumococo (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F e 33F). Todas as imunizações citadas pela SBI fazem parte do calendário vacinal do SUS (ABHH, 2018; ANVISA, 2002; DI-NUZZO; FONSECA, 2004; PEARSON, 1977).

4.5.2 Antibioticoprofilaxia

Isoladas, as vacinas reduzem parcialmente a incidência de bacteremias (BABIKER, 1986). Isso ocorre, pois, a vacina elicit imunidade humoral somente para alguns dos sorotipos patogênicos. Uma das maneiras de superar essa limitação é a combinação das vacinas com a administração de antibióticos de forma profilática durante a infância, que, como já relatado, é o período mais suscetível a complicações graves por infecções (JOHN *et al.*, 1984).

Essa profilaxia é baseada no resultado de um estudo multicêntrico duplo-cego randomizado patrocinado pelo Instituto Nacional de Saúde estadunidense (NIH, do inglês, *National Institute of Health*) realizado na década de 1986 que detectou que a administração regular de penicilina oral duas vezes ao dia em crianças de até 3 anos de idade era capaz de reduzir em 84% o risco de sepse por *S. pneumoniae*, além de ter evitado óbitos durante o período de estudo no grupo tratado enquanto que houve três mortes do grupo controle (GASTON *et al.*, 1986)

Visto isso, a antibioticoprofilaxia se mostra uma medida eficaz para redução da morbimortalidade das infecções em crianças. Assim, é recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (2018a) que a penicilina V oral seja administrada profilaticamente, dos dois meses aos 5 anos de idade.

4.5.3 Hidroxiureia

A hidroxiureia é o principal fármaco antifalcizante disponível comercialmente para tratamento da anemia falciforme. No Brasil, a HU é oferecida como parte do tratamento de doenças falciformes pelo SUS, sendo elegíveis para esse, segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas de Doença Falciforme, os indivíduos diagnosticados com doença falciforme, sintomáticos e maiores de dois anos de idade. O tratamento tem duração indeterminada e deve ser mantido enquanto houver resposta clínica e laboratorial (BRASIL, 2018a).

A HU é um quimioterápico antineoplásico, originalmente direcionado para tratamento de leucemia, que é utilizado para prevenção de complicações agudas da anemia falciforme (THORNBURG *et al.*, 2012). O fármaco induz de forma indireta a síntese de HbF a partir da elevação dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc, do inglês, *cyclic guanosine monophosphate*) nos eritroblastos, o que tem sido associado a um efeito antifalcizante (HOPPE; NEUMAYR, 2019). Além disso, possui ação mielossupressora ao inibir a ribonucleotídeo redutase, o que compromete a replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, *deoxyribonucleic acid*) e reduz, entre outros eventos, a hematopoese (HIDROXIUREIA, 2018).

A primeira descrição de que o fármaco seria útil para o tratamento de hemoglobinopatias foi feita em 1984, por pesquisadores que detectaram a capacidade do fármaco em elevar a expressão de HbF no sangue de símios do velho mundo, da espécie *Macaca fascicularis* (LETVIN *et al.*, 1984). No mesmo ano, esse resultado foi replicado em um estudo clínico com indivíduos afetados pela anemia falciforme, evidência que revelou a necessidade de se estudar, desta vez, a influência do fármaco nas complicações clínicas da anemia falciforme (PLATT; ORKIN; DOVER, 1984).

A eficácia terapêutica da HU foi comprovada por um estudo estadunidense duplo-cego randomizado realizado em 1996 que acompanhou 299 indivíduos com anemia falciforme por dois anos, sendo parte desses tratados com HU e outra parte com placebo. O estudo revelou que o uso da HU foi capaz de reduzir pela metade as crises vasclusivas e crises álgicas no grupo tratado em relação ao grupo controle. Além disso, houve redução nos casos de síndrome torácica aguda, redução do número anual de internações hospitalares e do número de transfusões de sangue, ao

passo que houve poucas reações adversas, sendo a mais expressiva a neutropenia; essa, porém, reversível mediante ajuste de dose (CHARACHE *et al.*, 1996).

A eficiência e segurança do uso do fármaco em crianças foi validada anos após, em 2011, por um estudo duplo-cego randomizado (BABY HUG) realizado em indivíduos de 6-18 meses de idade com anemia falciforme. Os resultados obtidos replicaram grande parte dos efeitos benéficos do uso de HU reportados pelo estudo multicêntrico de 1996 e não foi detectado aumento da incidência de infecções com o uso do fármaco, mesmo em eventos de neutropenia leve ou moderada; não houve reações adversas significativas. Assim, os autores declararam que a administração de HU em crianças assintomáticas ou com alguma manifestação clínica é seguro e recomendável, contudo, alertaram sobre a necessidade de estudos sobre os efeitos mutagênicos mediante o uso crônico do medicamento (ARMSTRONG *et al.*, 2011).

Um dos desafios enfrentados pelo paciente ou cuidador nos primeiros meses de uso é a necessidade de acompanhamento muito frequente (a cada 2 semanas) com hematologista para avaliação laboratorial de mielossupressão e ajuste de dose. Geralmente, o fármaco é bem tolerado e devido redução das crises de dor e internações hospitalares exerce um grande impacto positivo na vida do afetado (BRASIL, 2018a).

Diversos ensaios clínicos têm investigado possíveis alternativas à HU para o tratamento da doença (MANWANI; FRENETTE, 2013). Dentre os achados encontra-se o aminoácido glutamina. Quando administrado, esse potencializa a formação de glutathiona, uma molécula com ação antioxidante (INCA, 2020). A aplicação do composto tem sido associada à redução de mais de 20% da incidência de STA, crise vasclusiva e internação hospitalar em doentes falciformes. Devido a ação mais tênue, a associação de glutamina e HU tem sido considerada como uma forma de potencializar a ação terapêutica dos dois princípios ativos (TELEN, 2020).

4.5.4 Transfusão de sangue

Apesar da grande contribuição da HU para melhora do estado geral de saúde e bem-estar do indivíduo com anemia falciforme, o fármaco não elimina completamente a possibilidade de ocorrência de complicações vasclusivas graves, que colocam a vida do afetado em risco. Nessas situações em que a oxigenação

tecidual é severamente comprometida pode ser necessário a realização de transfusão de sangue para reversão do quadro (MARSELLA; BORGNA-PIGNATTI, 2014).

4.5.4.1 Transfusão terapêutica

As indicações transfusionais para as complicações agudas da anemia falciforme encontram-se resumidas no quadro a seguir:

Quadro 3 – Indicações transfusionais para adultos e crianças com anemia falciforme em eventos clínicos agudos.

TRANSFUSÕES TERAPÊUTICAS	TRANSFUSÕES CONTRAINDICADAS
<p>Aplasia medular</p> <p>AVE isquêmico agudo</p> <p>Colestase intra-hepática aguda</p> <p>Complicações obstétricas durante a gravidez</p> <p>Crise de sequestro esplênico</p> <p>Crise de sequestro hepático</p> <p>Falência de órgãos múltiplos</p> <p>Pré-operatório (em caso de anestesia geral)</p> <p>Síndrome torácica aguda</p>	<p>Crise vasclusiva do tipo álgica não complicada</p> <p>Gestação não complicada</p> <p>Priapismo</p> <p>Úlcera de perna</p>

Fonte: Adaptado de Chou; Fasano, 2016

Em todos esses eventos, o tipo de hemocomponente transfundido é o concentrado de hemácias (CH), que podem ser infundidos por duas modalidades principais: transfusão simples (infusão de hemocomponente do doador sem remoção de sangue do receptor) ou transfusão de troca (infusão de hemocomponente do doador com remoção de alíquotas de sangue do receptor) (HEMORIO, 2014).

A transfusão simples aumenta a viscosidade do sangue e pode ser utilizada caso o hematócrito pós-transfusional não exceda 35%, do contrário há risco de hiperviscosidade, lentificação do fluxo na microcirculação e aumento das falcizações. Por sua vez, a transfusão de troca permite um controle sobre o hematócrito e pode ser indicada aos casos que em que a transfusão simples pode elevar o hematócrito a níveis além do recomendado (HEMORIO, 2014).

Devido a remoção das hemácias do doador, a transfusão de troca permite reduzir de forma abrupta a concentração de HbS (geralmente para 30-50%) sem comprometer a viscosidade do sangue. (BRASIL, 2009; HEMORIO, 2014) O procedimento pode ser feito de forma manual (exsanguineotransfusão parcial) ou automatizada (eritrocitaférese) (HEMORIO, 2014; HEMOTERAPIA 9 DE JULHO, [2015?])

Devido ao estado politransfusional, os indivíduos são mais suscetíveis a aloimunização (produção de anticorpos pelo receptor contra antígenos não-próprios da hemácia do doador). Assim, é recomendado que desde a primeira transfusão seja realizada a fenotipagem eritrocitária (além de ABO e RhD) para os sistemas Rh (C,c,E,e), Kell (K), Duffy (Fya, Fyb), Kidd (Jka, Jkb), MNS (Ss). Essa informação deve ser considerada no processo de seleção de unidades compatíveis para reduzir risco de reação transfusional. Eventualmente, as unidades disponíveis podem não ser totalmente compatíveis. Nesses casos, deve-se selecionar a bolsa contendo o(s) antígeno(s) menos imunogênico(s). (grau de imunogenicidade: RhC > RhE > Rhce > K > Jka > Fya > Jkb > Fyb > S > s) (BRASIL, [2015?]).

Durante todo o procedimento e após a transfusão o indivíduo deve ser acompanhado pois podem ocorrer reações imediatas (dentro de 24h) como reação alérgica, reação anafilática, reação febril não hemolítica, reação hemolítica, hipotermia, contaminação bacteriana, edema pulmonar não cardiogênico, embolismo gasoso, alteração eletrolítica (hipocalemia ou hipocalcemia), sobrecarga volêmica. Nesses casos, caso esteja em andamento, a transfusão deve ser interrompida e feita as intervenções necessárias por um médico hemoterapeuta (BRASIL, [2015?]).

4.5.4.2 Transfusão crônica

Além da transfusão terapêutica, indivíduos com alto risco de desenvolvimento de AVE devem se submeter a um regime de transfusão crônica. Para evitar as lesões neurais irreversíveis, a detecção dos casos de alto risco é feito pela aferição da velocidade de fluxo sanguíneo das artérias (VFSA) do círculo arterial cerebral (polígono de Willis) por Doppler Transcraniano, medida que é diretamente proporcional ao nível de estenose arterial e risco de AVE (CHOU; FASANO, 2016). No Brasil, essa avaliação é feita de forma anual ou com maior frequência nos indivíduos de 2-16 anos, e, em caso de VFSA é >200 cm/s, a transfusão crônica é indicada (BRASIL, 2018a).

Dentre os benefícios alcançados pela transfusão crônica encontram-se a redução da incidência do primeiro AVE em 92%, quando comparado com indivíduos que não recebem o tratamento e, ainda, redução do risco de recorrência de AVE de 90% para 10% sob regime de hipertransfusão (ADAMS *et al.*, 1998; RUSSELL *et al.*, 1984). O tratamento deve ser mantido indefinidamente, devido ao aumento da VFSA e do risco de ocorrência de AVE caso a transfusão crônica seja descontinuada. (ADAMS; BRAMBILLA, 2005).

Um efeito colateral preocupante da transfusão crônica que necessita de monitoramento contínuo e de medidas de mitigação é o acúmulo de ferro. Cada mL de CH transfundido contém 1 mg de ferro, quantidade equivalente a necessidade diária do micronutriente (1-2mg/dia). Assim, uma única unidade transfundida ultrapassa em centenas de vezes a necessidade do organismo e esse ferro se acumula devido a capacidade limitada de excreção restrita a descamação epitelial, secreção intestinal e sangramento menstrual (BRASIL, 2018a; MARSELLA; BORGNA-PIGNATTI, 2014).

O aumento do ferro não ligado a ferritina (proteína endógena que quela até 4.500 átomos de ferro, como hidroxifosfato férrico) faz com que esse elemento promova danos oxidativos nos tecidos, em especial no coração, fígado, pâncreas e glândulas endócrinas (GROTTO, 2010). Visto isso, os pacientes em regime de hipertransfusão fazem uso de quelantes de ferro para manter o balanço negativo do elemento, ou seja, uma quantidade de ferro excretado maior que a quantidade de ferro infundida (BRASIL, 2018b).

No Brasil é indicado a terapia com quelantes no caso de ferritina sérica > 1.000 ng/mL, concentração de ferro em biópsia hepática >3,2mg/g de fígado seco, sobrecarga cardíaca ou hepática de ferro identificada por ressonância magnética. Os quelantes disponíveis no SUS são desferroxamina (administração subcutânea por bomba de infusão), deferiprona e deferasirox (via oral) (BRASIL, 2018b).

A transfusão deve ser vista como uma terapia secundária e adotada quando se esgotam alternativas para resolução do quadro clínico ou quando for necessário evitar uma complicação clínica iminente. Toda indicação deve ser cuidadosa, considerando a avaliação de risco-benefício em cada caso. (BRASIL, [2015?]).

4.6 HISTÓRICO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

O primeiro relato de transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) por via intravenosa foi feito em Portland (EUA) em 1939. Uma jovem de 21 anos com anemia aplásica recebeu, como último recurso à graves episódios hemorrágicos, uma alíquota de medula óssea de seu irmão. Porém, em decorrência de leucopenia e infecção, essa faleceu no dia seguinte ao procedimento, antes que considerações sobre a eficácia da técnica pudessem ser feitas (OSGOOD; RIDDLE; MATHEWS, 1939).

Até então, a escassez de informações sobre o TCTH em modelos animais se traduzia em pouco interesse na elaboração de ensaios clínicos envolvendo o procedimento (ORTEGA, 2004 apud REKSUA, 2015). Isso mudou, entretanto, após o uso de armamentos nucleares durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945). Nesse período ficou claro que doses elevadas de radiação poderiam levar um indivíduo à morte, em partes, devido a lesão das células da medula óssea e falência da produção de sangue. O TCTH passa, então, a ser considerado como uma estratégia interessante para o tratamento de acidentes com radiação (DE LA MORENA; GATTI, 2011; PERRY; LINCH, 1996).

A partir disso, são desenvolvidos diversos experimentos em radiobiologia que serviriam de embasamento para os estudos com humanos. Jacobson (1949 apud LITTLE; STORB, 2002) descobre que a sobrevivência de camundongos expostos a radiação ionizante poderia ser aumentada mediante a proteção do baço por anteparo plumbífero, o que pode ser atribuído à preservação da função hematopoética do órgão. Pouco tempo depois, Lorenz, Congdon e Uphoff (1951) demonstram que a infusão de medula óssea em camundongos isogênicos expostos a dose letal de radiação era capaz de reduzir a mortalidade em 70-100% e postularam que as células transfundidas teriam a capacidade de migrar para os espaços hematopoéticos e restituir a produção de sangue nas regiões afetadas pela radiação. BARNES *et al.* (1956), descobrem que a associação de radiação ionizante e TCTH poderia ser usada no tratamento de leucemia ao identificarem que alguns camundongos leucêmicos tratados com irradiação de corpo total, seguida por infusão de medula óssea, ficavam livres da doença.

Os resultados promissores do TCTH em murinos despertaram o interesse de oncologistas em utilizar a terapia no tratamento de câncer. Thomas *et al.* (1957), realizam nos Estados Unidos o TCTH em 6 pacientes, 5 deles portadores de neoplasia (esses foram tratados previamente com quimioterápico ou irradiação de corpo total numa tentativa de eliminar as células cancerosas). Os transplantes não foram bem-sucedidos, apenas 2 pacientes apresentaram pega transitória da medula transplantada e todos faleceram em decorrência do estado avançado da doença. Apesar de não ter comprovado a eficácia do tratamento, o estudo criou condições para a continuidade da pesquisa de TCTH em humanos ao apresentar métodos assépticos de infusão, ausência de reações imediatas aos transplantes e métodos de dissociação e remoção de lipídeos por centrifugação, evitando embolia gordurosa na administração intravenosa.

Um levantamento realizado por Bortin (1970) com 203 registros de TCTH entre 1939 e 1969 revelou que 75% desses procedimentos foram realizados entre 1959 e 1962. A maioria falhou. Grande parte do insucesso foi atribuído a ausência de testes de compatibilidade entre doadores, ausência de imunossupressão prévia ao transplante, resultando em reação dos linfócitos do hospedeiro contra o enxerto e não recuperação da aplasia induzida pela radiação. Em 200 dos 203 transplantes não foi realizado teste de compatibilidade entre doador e receptor, resultando em apenas 2 casos de sucesso. Todos os 3 pacientes cujo doador foi selecionado pelo teste de cultura mista de leucócitos sobreviveram ao procedimento.

Em decorrência dos poucos benefícios do TCTH em ensaios clínicos, após 1962 houve uma queda no número de procedimentos com humanos e, em contrapartida, aumento na realização de estudos com cães. Durante esses estudos ficou claro que a sobrevida após o procedimento tinha associação com a tolerância imune entre receptor e doador (EPSTEIN; BRYANT; THOMAS, 1967). A imunossupressão com quimioterápicos antineoplásicos antes e após o procedimento foi capaz de otimizar essa tolerância e aumentar a sobrevida em transplantes alogênicos de 10% para 40% (THOMAS *et al.*, 1962). Entretanto, que para uma maior eficácia, seria necessário o uso de métodos de seleção de doadores histocompatíveis (MANNICK *et al.*, 1960; THOMAS *et al.*, 1964).

Nos anos seguintes descobriu-se que a compatibilidade dos transplantes dependia da tolerância mútua de antígenos de doador e receptor (BACH; AMOS, 1967). Esses antígenos foram encontrados em tecidos e leucócitos. Com isso, métodos experimentais de imunofenotipagem foram desenvolvidos utilizando anticorpos antilinfocitários para serem usados como indicadores da compatibilidade de doador e receptor a partir do resultado da tipagem dos antígenos presentes nos leucócitos (EPSTEIN *et al.*, 1968). Mesmo sendo revelado o fenótipo de poucos antígenos do doador e do receptor, o teste rudimentar de compatibilidade resultou em aumento significativo no tempo de sobrevivência do TCTH-alo em cães (STORB *et al.*, 1968). No mesmo ano, Gatti (1968) realiza o primeiro transplante antígeno leucocitário humano (HLA) compatível em uma criança com imunodeficiência (GATTI *et al.*, 1968).

A partir de 1970 o reconhecimento da importância do HLA para a histocompatibilidade fez com que a maioria dos TCTH-alo fosse feito entre irmãos HLA compatíveis (PERRY; LINCH, 1996). Com isso, houve alguns transplantes bem sucedidos em pacientes com leucemia em estágio terminal, o que permitiu a formação de uma base ética para o uso do tratamento em estágios menos avançados da doença. Esses últimos tiveram sobrevivência livre de doença maior do que pacientes terminais (THOMAS, 1999). No final da década, em 1979, é realizado o primeiro TCTH no Brasil, na Universidade Federal do Paraná (PASQUINI, 2004 apud KUHNEN, 2014).

A década de 1980 marcou o aumento de TCTH no mundo e as aplicações no tratamento de doenças não neoplásicas (PERRY; LINCH, 1996). Em 1982 houve o primeiro registro de cura de talassemia major pela técnica (THOMAS *et al.*, 1982). Em 1984, foi relatado a primeira cura de anemia falciforme pelo TCTH (JOHNSON *et al.*, 1984). Durante esse período imunossuppressores como bussulfano e ciclofosfamida substituíram a irradiação para condicionamento. Também, ciclosporina e metotrexato começaram a ser usados para redução dos casos de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (SANTOS *et al.*, 1983; STORB *et al.*, 1986). Em 1986 foi fundada a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO, 2001).

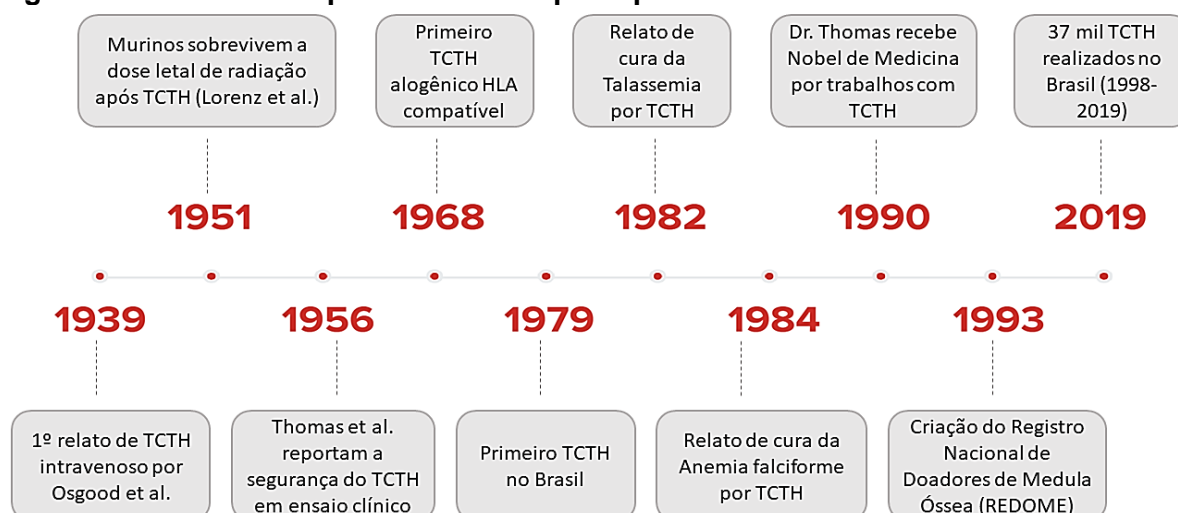
Em 1990 Thomas é agraciado com o prêmio Nobel de medicina pelas contribuições do estudo do TCTH para tratamento de doenças humanas (THE NOBEL PRIZE, 1990). Durante a década ocorre a criação de registros internacionais de

doadores, permitindo ampliação da realização de TCTH não aparentado. O cordão umbilical, reconhecido como fonte de células-tronco hematopoéticas, passa ser armazenado em bancos de criopreservação para TCTH. É também nesta década que têm início os primeiros estudos de terapia gênica com células-tronco hematopoéticas. (PERRY; LINCH, 1996). A sorologia é gradualmente substituída pelas técnicas moleculares para genotipagem de HLA, aumentando a especificidade dos testes de compatibilidade (THOMAS, 2000). No Brasil, o serviço de transplantes passa a ser regulamentado em 1997 (BRASIL, 1997).

É valido destacar que em 1993 houve a criação do Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea (Redome) em São Paulo. Esse contém atualmente informações genéticas de mais de 5 milhões de doadores de medula óssea no Brasil e é o principal serviço de doadores não aparentados para os transplantes alogênicos. É o maior banco de dados de doadores de medula óssea financiado com dinheiro público do mundo e o terceiro maior banco de dados de doadores de medula óssea (atrás dos EUA e da Alemanha) (REDOME, [2018]).

As regulamentações do TCTH entre as décadas de 1990 e 2000, fundação de entidades dedicadas ao TCTH, investimento em plataformas de busca e registro de doadores e receptores contribuíram para expansão do tratamento no Brasil (INCA, 2012; SOUZA, 2017). Segundo dados do Registro Brasileiro de Transplantes entre 1998 e 2019 foram realizados 37.949 TCTH no Brasil. Desses, 37% alogênico e 61% autólogo (ABTO, 2020). Um resumo dos principais fatos históricos do TCTH se encontra na figura 8.

Figura 8 – Linha do tempo contendo os principais fatos históricos do TCTH



4.7 PRINCÍPIOS DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS EM DOENTES FALCIFORMES

O vocábulo transplante refere-se ao ato de “[...] transferir órgão (ou porção deste) de uma parte para outra parte do mesmo indivíduo, ou [...] para outro.” (FERREIRA, 2010, p. 752). O transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (TCTH-alo) é, atualmente, a única terapia curativa para anemia falciforme (KASSIM; SHARMA, 2017). Tal procedimento envolve a eliminação total ou parcial dos precursores hematopoéticos mutados provenientes do receptor, seguida por transferência de células-tronco hematopoéticas (CTH) provenientes de um doador não afetado pela doença para o receptor, garantindo a codificação da HbA e cura (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008b).

O termo transplante alogênico é atribuído ao transplante entre indivíduos geneticamente diferentes, pertencentes a mesma espécie (PRIBERAM, 2020). Esses indivíduos podem ser consanguíneos (transplante aparentado) ou não (transplante não aparentado). Outras duas modalidades de transplante são os transplantes singênico (entre gêmeos monozigóticos) e autogênico (onde doador é o próprio receptor, também dito autólogo) (CASTRO JUNIOR, 2002). Essa última modalidade tem sido utilizada em pesquisas de terapia gênica para AF (RIBEIL *et al.*, 2017)

O TCTH-alo é reconhecido mundialmente como forma de tratamento curativo para a anemia falciforme. Uma das razões para isso, de acordo com Gluckman *et al.* (2017, p. 1553), que avaliaram 1000 desses procedimentos por meio de um estudo observacional retrospectivo de eventos ocorridos entre 1993 e 2013, é a de que o “TCTH-alo entre irmãos HLA idênticos oferece excelente sobrevida nos primeiros 5 anos [pós-transplante] [...]” (tradução nossa)¹.

4.7.1 Critérios de elegibilidade

Para receber o transplante é necessário atender alguns critérios. Segundo um consenso de membros da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (SBTMO), sobre as indicações para o TCTH-alo na anemia falciforme, são elegíveis para o procedimento indivíduos sintomáticos que apresentem uma ou mais

¹ “*Transplantation of grafts from HLA-identical siblings offers excellent 5-year survival [...]*”. (GLUCKMAN *et al.*, 2017, p.1553)

complicações clínicas graves ou que apresentem sinais preditivos de má evolução clínica (quadro 4) (SIMÕES *et al.*, 2017). Apesar da SBTMO não estipular uma faixa etária para o procedimento, a Sociedade Europeia de Transplante de Medula e Sangue, recomenda que, nesses casos sintomáticos, o TCTH-alo seja realizado precocemente (de preferência na infância) caso haja disponibilidade de doador HLA-compatível aparentado (ANGELUCCI *et al.*, 2014). A recomendação é embasada no conhecimento de que o acúmulo de lesões orgânicas ocorridas com o avanço da idade reduz a sobrevida global e sobrevida livre de doença (KRISHNAMURTI *et al.*, 2019).

Quadro 4 – Critérios para o TCTH-alo na anemia falciforme.

CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE PARA O TCTH-ALO PEDIÁTRICO
<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 3 crises vasclusivas graves, refratária a hidroxiureia, dentro de 1 ano • AVE ou afecção neural de duração > 24 horas • Vasculopatia cerebral demonstrada por ressonância magnética ou angiografia e tratável com transfusão crônica • Síndrome torácica aguda • Priapismo recorrente • Hipertensão pulmonar • Recaída após primeiro TCTH • Velocidade do fluxo sanguíneo arterial cerebral > 200 cm/s • ≥ 2 aloanticorpos > 1 aloanticorpo contra antígeno de alta frequência

Fonte: adaptado de Simões *et al.*, 2017. Ao menos um dos critérios acima deve ser atendido.

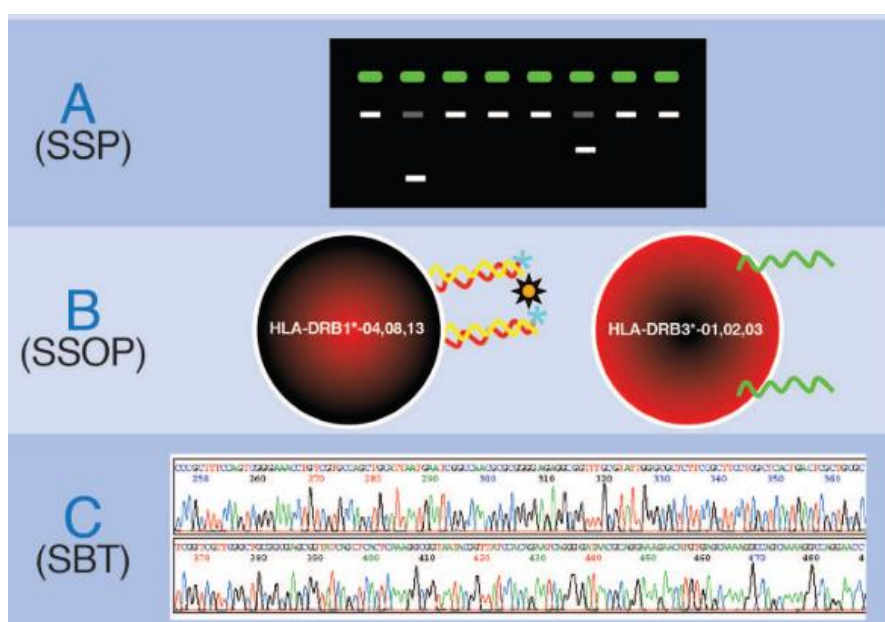
4.7.2 Seleção de doador

Como denotado, o principal critério de seleção de doador para o TCTH é a compatibilidade HLA, pois esse é um dos fatores genéticos que mais influencia no desfecho do procedimento (PEREIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2014). A segregação dos genes HLA segue “[...] regras de herança mendeliana simples [...]” (CASTRO JUNIOR, 2002, p. 10), assim, irmãos tem 25% de probabilidade de serem compatíveis, de modo que esses são os indivíduos preferencialmente considerados para a seleção de doador. Para realização do transplante é necessário que doador e receptor

apresentem compatibilidade mínima 6/6 para os *loci* HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 (HOWARD *et al.*, 2015). A incompatibilidade nessas regiões resulta em queda drástica da sobrevida, há aumento do risco de rejeição, enxertia tardia ou DECH (INCA, 2012; OLIVEIRA, 2014).

A maioria dos laboratórios utiliza ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*), seguidas ou não de sequenciamento do DNA, para realizar a tipagem de HLA. As técnicas empregadas são PCR *sequence specific primer* (PCR SSP), PCR *sequence specific oligonucleotide probes* (PCR SSOP) e *sequence based typing* (SBT), cujos detalhes de cada princípio dessas técnicas podem ser encontrados na descrição da figura 9. (FASANO *et al.*, 2017).

Figura 9 – Representação gráfica dos métodos moleculares utilizados na tipagem HLA.



Fonte: Fasano *et al.*, 2017. A) Na PCR SSP os primers se ligam e amplificam uma sequência específica. A presença de bandas no gel de agarose indica a presença do alvo. O padrão de positivos e negativos permite estabelecer os alelos HLA. B) Já na PCR SSOP sondas (oligonucleotídeos) complementares a sequência de alelos conhecidos são fixadas numa membrana ou micropartícula e entram em contato com *amplicons* de alelos de HLA provindos de uma PCR multiplex. A interação com a sonda pode ser revelada por reação colorimétrica. C) Em SBT ocorre a determinação da sequência nucleotídica dos alelos. Esse último permite identificar discrepâncias de 1 nucleotídeo de alelos HLA entre doador e receptor, mesmo que essas sequências ainda não tenham sido descritas na literatura, sendo considerado o padrão-ouro para a tipagem HLA.

Apesar da busca, nem sempre é possível encontrar um parente compatível. Menos de 30% dos portadores de hemoglobinopatias tem irmão HLA compatível, de modo que apenas uma minoria dos pacientes tem a possibilidade de usufruir do tratamento (KRISHNAMURTI *et al.*, 2003). O TCTH-alo não aparentado, uma

alternativa para os indivíduos que não atendem aos requisitos de compatibilidade entre familiares, ainda não é uma realidade na prática clínica devido a quantidade insuficiente de dados sobre o desfecho dessa abordagem e sua indicação na anemia falciforme é limitada aos ensaios clínicos controlados (ANGELUCCI *et al.*, 2014).

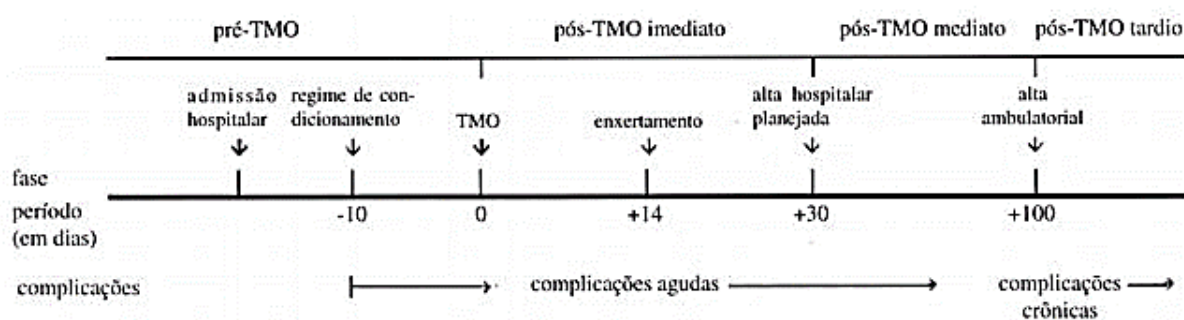
4.7.3 Fonte de células-tronco hematopoéticas

Para os casos em que se encontra um doador dentro das condições estabelecidas, as CTH podem ser colhidas das seguintes fontes: medula óssea por punção aspirativa da crista ilíaca sob anestesia geral do doador; sangue periférico por aférese, após mobilização das CTH por fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF, do inglês, *granulocyte colony-stimulating factor*) e sangue do cordão umbilical (CASTRO JUNIOR, 2002; INCA, 2012). Dentre todas essas fontes, a medula óssea é a utilizada com maior frequência (GLUCKMAN *et al.*, 2017).

4.8 FASES DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

O procedimento do transplante pode ser dividido em pré-transplante (dias que antecedem o transplante), transplante propriamente dito (dia zero), pós-transplante imediato (intervalo entre o transplante e a alta hospitalar), pós-transplante mediato (primeiros 100 dias pós-transplante) e pós-transplante tardio (a partir do 100º dia pós-TCTH), como esquematizado na figura 10 (RIUL; AGUILLAR, 1997).

Figura 10 – Representação esquemática do processo de TCTH.



Fonte: Riul; Aguillar, 1997

4.8.1 Pré-transplante

Na semana anterior ao transplante é necessário que o receptor seja internado e passe por um tratamento de imunossupressão, conhecido como condicionamento (AAC). O objetivo do condicionamento é evitar a rejeição do enxerto (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008b). O condicionamento mais bem estabelecido é o mieloablativo, que envolve a lesão das células-tronco hematopoéticas do receptor por quimioterápicos antineoplásicos, o que leva a uma pancitopenia irreversível e restauração da hematopoese dependente de transplante (HSIEH; FITZHUGH; TISDALE, 2011). A associação mais utilizada para esse procedimento é a de bussulfano, ciclofosfamida e imunoglobulina antitimocitária (ANGELUCCI *et al.*, 2014). Informações farmacológicas sobre os princípios ativos citados estão descritas no quadro seguinte.

Quadro 5 – Informações farmacológicas dos princípios ativos mais utilizados para o condicionamento mieloablativo no TCTH.

	Bussulfano	Ciclofosfamida	Imunoglobulina antitimocitária
Indicação Primária	Condicionamento para TCTH	Quimioterapia antineoplásica	Imunossupressão em transplantes
Natureza	Agente citotóxico alquilante	Agente citotóxico alquilante	Anticorpos policlonais de coelho antitimócitos humanos
Mecanismo de ação	Interfere na fase S e leva a apoptose. Estabelece ligação covalente com nitrogênio número 7 da guanina. Resulta em ligações cruzadas entre bases nitrogenadas da mesma fita ou fitas distintas de DNA, inibindo, assim, a replicação do DNA pela DNA polimerase	Idêntico ao bussulfano	Promove depleção de linfócitos T. No sangue periférico leva a ativação do sistema complemento na superfície dessas células e nos tecidos linfoides promove apoptose após induzir ativação e proliferação excessiva dessa linhagem
Reações adversas	Infecção, cistite, vômito, diarreia, náusea, insuficiência hepática, inibição da oogênese e espermatogênese, suscetibilidade a leucemia aguda	Infecção, distúrbios gastrointestinais, inibição da espermatogênese e oogênese, teratogênese, mutagênese, doença hepática veno-oclusiva	Infeção, neoplasia linfoproliferativa, coagulação intravascular disseminada, reação anafilática, lesão hepatocelular

4.8.2 Transplante propriamente dito

Após o término do período de condicionamento, o transplante propriamente dito é realizado (ORTEGA, 2004 apud CRUZ; SANTOS, 2013). Geralmente, as CTH são colhidas do doador no mesmo dia do procedimento (ou descongeladas no setor de criobiologia, caso as CTH sejam provenientes de cordão umbilical) e são administradas no receptor intravenosamente através de um cateter de Hickman, introduzido previamente, por cirurgia, na veia subclávia, jugular externa ou jugular interna (CASTRO JUNIOR, 2002; ORTEGA, 2004 apud CRUZ; SANTOS, 2013).

4.8.3 Pós-transplante imediato

Realizado o transplante, o paciente passa por um período de pancitopenia, que perdura entre duas e três semanas após o transplante, em razão da mieloablação prévia (PRADO; RAMOS; VALLE, 2018). Durante esse período o paciente é mantido em quarto individual, com pressão positiva e filtração de ar por filtro de ar de alta eficiência (HEPA, *high efficiency particulate air*) para minimizar o risco de infecção por fungos filamentosos. Também são administrados antibióticos de amplo espectro, antifúngicos e antivirais como profilaxia a infecções (BATISTA *et al.*, 2015). O suporte hemoterápico é feito com transfusões de concentrado de hemácias para manter a Hb entre 9 – 11 g/dL e transfusões de concentrado de plaquetas, para manter uma contagem plaquetária $>50.000/\text{mm}^3$, minimizando o risco de hemorragias (KRISHNAMURTI *et al.*, 2019). A enxertia (conhecida como pega da medula), ocorre quando há sinais de recuperação da hematopoese, a saber: “[...] contagem de reticulócitos acima de $50.000/\text{mm}^3$, granulócitos acima de $500/\text{mm}^3$ e de plaquetas acima de $20.000/\text{mm}^3$ [...]” (PRADO; RAMOS; VALLE, 2018, p. 2056).

A alta hospitalar ocorre a partir do momento em que as complicações agudas são superadas e há sinais clínicos e laboratoriais de sucesso da enxertia, geralmente na quarta semana após o procedimento. Apesar da liberação, o paciente passa por acompanhamento ambulatorial frequentemente para avaliação do estado de saúde e detecção de eventuais complicações crônicas (RIUL; AGUILLAR, 1997).

4.8.4 Pós-transplante mediato

As eventuais complicações que ocorrem nos primeiros 100 dias após o transplante são chamadas de complicações precoces. Dentre essas destacam-se as infecções, pneumonite intersticial causada por reativação de citomegalovírus (CMV) ou infecção por CMV do doador (principal causa de morte nesse período), hemorragias devido a plaquetopenia, insuficiência cardíaca decorrente de cardiotoxicidade por ciclofosfamida, falha de enxertia causada por microambiente medular anormal ou infecção por CMV e DECH aguda (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008b). Essa última é a complicação de maior reconhecimento clínico (GHIMIRE *et al.*, 2017).

A DECH aguda é causada por uma resposta lesiva de linfócitos TCD4+ e TCD8+ aloreativos, provenientes do enxerto, contra tecidos de origem epitelial do hospedeiro, especialmente pele, trato gastrointestinal e fígado (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013b). A doença secundária ocorre em 26-32% dos pacientes e a intensidade varia com o grau de histocompatibilidade entre doador e receptor. A pele é o primeiro órgão a ser acometido e as alterações podem ser brandas como eritema ou graves como eritroderma descamativo; as lesões aos enterócitos podem provocar náuseas, vômitos e diarreia sanguinolenta. O comprometimento hepático leva a icterícia e aumento de aminotransferases. Dada a gravidade do acometimento e potencial evolução para o óbito, a profilaxia é essencial e é realizada mediante a administração de inibidores da calcineurina como ciclosporina e inibidores da fase S do ciclo celular como metotrexato durante o primeiro ano pós-TCTH (ARNAOUT *et al.*, 2014).

4.8.5 Pós-transplante tardio

As complicações mais comuns no pós-transplante tardio incluem infertilidade, de modo que se recomenda congelamento prévio de óocitos ou espermatozoides do receptor, redução do crescimento, especialmente se o procedimento ocorrer na fase de estirão, maior suscetibilidade a neoplasias devido redução da atividade antitumoral linfocitária nos períodos de imunossupressão e DECH crônica. Esse último ocorre em cerca de 35% dos casos e o principal fator de risco para desenvolvê-lo é a ocorrência de DECH aguda (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008b). A resposta citotóxica na DECH aguda promove disfunção tímica, redução da seleção negativa dos linfócitos, aumento de linfócitos T e B autorreativos circulantes que levam a produção de autoanticorpos e intolerância ao próprio, característica da DECH crônica. O tratamento é baseado na administração de imunossupressores como prednisona, ciclosporina e antimicrobianos por 2-3 anos após o início dos sintomas (ARNAOUT *et al.*, 2014).

Não é necessário que as CTH do receptor sejam totalmente substituídas pelas CTH do doador para a cura fenotípica da anemia falciforme. Na maioria das vezes ocorre um quimerismo misto com porcentagem relativa de células de doador de 11%-74%, valores suficientes para garantir a produção de HbA em quantidades normais (SHENOY, 2011).

O sucesso do transplante resulta em declínio das hospitalizações, redução das crises de dor e independência transfusional (KING *et al.*, 2019). Assim, apesar das limitações, se considerado a eficácia, impacto na qualidade de vida e longevidade dos afetados pela doença, os benefícios do TCTH-alo HLA aparentado suplantam os riscos inerentes ao procedimento e consolidam sua indicação para os indivíduos com manifestações graves ou com sinais preditivos de má evolução clínica (PIERONI *et al.*, 2007a).

4.9 SEGURANÇA E EFICÁCIA DO TCTH-ALO

A anemia falciforme pode ser curada pelo transplante de células-tronco hematopoéticas (KASSIM; SHARMA, 2017). As evidências científicas que embasam a indicação atual dessa terapia no tratamento da anemia falciforme estão contidas em diversos estudos clínicos, estudos observacionais retrospectivos e prospectivos realizados a partir da década de 1980 que avaliaram os desfechos clínicos em pacientes que receberam o tratamento em questão (SIMÕES *et al.*, 2017).

4.9.1 Eficácia

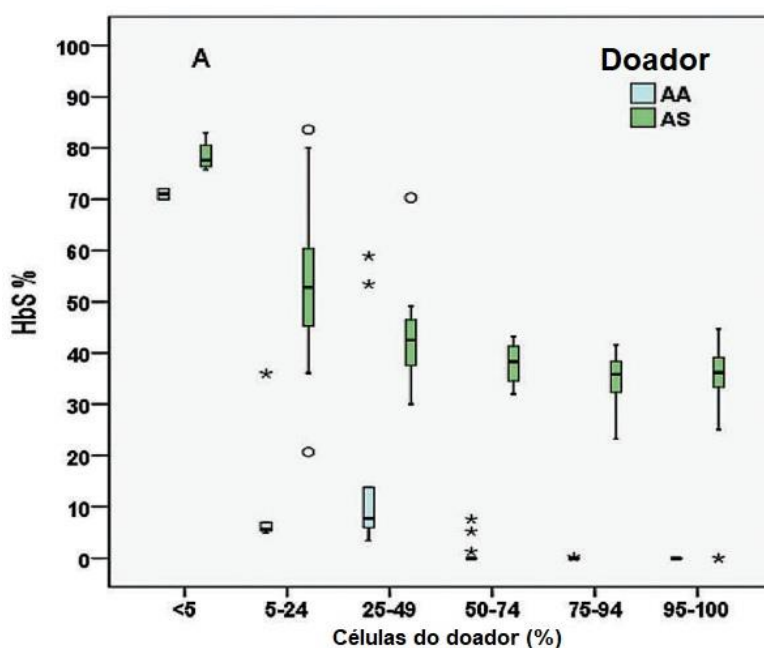
Segundo Bernaudin *et al.* (2020), a probabilidade de cura do TCTH-alo aparentado em crianças e jovens adultos é de, ao menos, 95%. A afirmação provém de considerações sobre os resultados do estudo coorte desses autores, cuja sobrevida livre de eventos em 5 anos em 151 transplantados entre 2005 e 2012 foi de 97,9% (IC 95%: 95,5 - 100%) (as estimativas foram realizadas segundo as probabilidades de Kaplan-Meier e os eventos considerados foram morte, rejeição e falha de enxertia). Tais resultados são compatíveis com a sobrevida livre de eventos em 5 anos reportada pelo estudo de Gluckman *et al.* (2017), que foi de 93% (IC 95%: 92-95%).

Apesar da sobrevida livre de doença ser elevada atualmente, os transplantes realizados antes dos anos 2000 apresentaram menor sobrevida livre de eventos. Segundo Walters *et al.* (2000), a sobrevida livre de eventos (sendo eventos morte, rejeição ou recorrência de doença falciforme) em 6 anos foi de 84% para 50 transplantes realizados entre 1991 e 1999. De acordo com Alonso *et al.* (2019), a melhora dos indicadores de eficácia do transplante após esse período se deve ao oferecimento de um melhor suporte transfusional. Dentre os procedimentos de suporte terapêutico, destaca-se a disseminação do uso da globulina antitimidocitária nos estudos, que contribuiu para redução da rejeição de cerca de 20%, antes dos anos 2000, para 3%, levando ao aumento da sobrevida livre de eventos para 95% (LOCATELLI; PAGLIARA, 2012).

Quanto ao efeito do tratamento sobre o quadro clínico, os indivíduos que desenvolvem quimerismo doador > 5%, em geral, deixam de apresentar complicações características da anemia falciforme (WALTERS *et al.*, 2001). Com o procedimento,

cessam as crises vasclusivas, crises álgicas, síndrome torácica aguda, ocorre regressão/estabilização de doença pulmonar restritiva (WALTERS *et al.*, 2000). Dores crônicas podem persistir por 3-6 meses após o procedimento (SHENOY *et al.*, 2017) Já com um quimerismo doador > 50%, o perfil de HbS do receptor torna-se semelhante ao do doador, ou seja, ~0% para doadores AA e ~40 para doadores AS, como pode ser observado no gráfico abaixo (WALTERS *et al.*, 2001; BERNAUDIN *et al.*, 2020).

Gráfico 1 – Boxplot contendo relação de porcentagem de HbS e categoria de porcentagem de quimerismo doador.



Fonte: Bernaudin *et al.* (2020). O gráfico mostra que a porcentagem de HbS é similar ao doador (AA ou AS) quando o quimerismo doador é > 50%.

Além disso, o TCTH-alo exerce efeito protetor contra lesões encefálicas e recorrência de AVE (DALLAS *et al.*, 2013). Segundo Bernaudin *et al.* (2019), o TCTH-alo está associado a redução da velocidade do fluxo sanguíneo arterial cerebral (VSFA) (média de VSFA de 129.6 cm/s em transplantados contra 170.4 cm/s em transfundidos crônicos, diferença de -40.8 cm/s [IC 95% -62.9cm/s a -18.6cm/s]), redução essa que contribuiria para uma menor incidência de complicações encefálicas.

Em decorrência do efeito neuroprotetor, a redução da incidência de AVE após o TCTH-alo é relatada por diversos estudos. Segundo resultados de um estudo prospectivo multicêntrico de Walters *et al.* (2010), que acompanhou a evolução clínica

de 59 crianças com anemia falciforme que receberam o TCTH-alo, 90% dos indivíduos com histórico de AVE prévio ao transplante (26 de 29) não tiveram recorrência desse acometimento após o transplante (a mediana de acompanhamento foi de 6.5 anos [variação de 3 - 12.4 anos]). Conforme o estudo clínico de Mynarek *et al.* (2013), de forma semelhante, o TCTH foi capaz de prevenir AVE nos 9 indivíduos com anemia falciforme que foram avaliados; 8 deles possuíam alto risco de AVE devido presença de lesões indicativas de vasculopatia cerebral. Por sua vez, no estudo prospectivo de Dallas *et al.* (2013), que acompanhou 14 crianças com anemia falciforme que receberam TCTH-alo por uma mediana de 11 anos (5.4 – 17.4 anos), nenhum dos pacientes com enxertia sustentada apresentou evidência clínica de AVE ou progressão de lesões encefálicas segundo avaliação por Ressonância Magnética, reiterando o efeito protetor do tratamento ante acometimentos no sistema nervoso central (SNC).

Além de apresentarem risco reduzido para recorrência de AVE, indivíduos com quimerismo doador estável se tornam independentes de transfusão. Segundo Walters *et al.* (1996), a descontinuidade das transfusões não levou a episódios de crises vasclusivas, progressão de doença encefálica ou outra manifestação debilitante em 16 transplantados que apresentaram enxertia sustentada.

4.9.2 Segurança

Segundo Pieroni *et al.* (2007), a mortalidade relacionada ao TCTH-alo na anemia falciforme varia de 5% a 10%. A incidência cumulativa de mortalidade relacionada ao TCTH segundo o estudo de Gluckman *et al.* (2017), foi de 7%. Porém, uma publicação recente apresentou uma incidência cumulativa de morte relacionada ao transplante <5%, a saber, 1,4% (IC 95%: 0-3.4%), indicando que o limite inferior da atual faixa de mortalidade pode ser menor que 5% (BERNAUDIN *et al.*, 2020).

De acordo com Gluckman *et al.* (2017), a sobrevida global sofre redução significativa conforme a idade em que o indivíduo realiza o TCTH, mais precisamente, para cada ano adicional, a razão de risco de morte aumenta em 10% (HR 1,10 [IC 95%: 1.06 – 1.14], $p < 0.0001$). A sobrevida global em 5 anos em indivíduos < 16 anos foi de 95% (IC 95%: 93-97%) e de 81% (IC 95%: 74 – 88%) em indivíduos ≥ 16 anos. Assim, o tratamento apresenta boa sobrevida em crianças e adolescentes. Entretanto, devido ao acúmulo de lesões orgânicas, adultos seriam mais afetados pela toxicidade

do condicionamento mieloablativo e poderiam se beneficiar de regimes de condicionamento menos intensos.

As morbidades associadas ao tratamento mais bem avaliadas foram a doença do enxerto contra o hospedeiro e comprometimento da capacidade reprodutiva. A DECH é uma (potencial) doença secundária ao tratamento que contribui para o aumento do risco de morte do TCTH (HULBERT; SHENOY, 2018). A condição é tratada com uso prolongado de glicocorticoides, o que aumenta o risco de complicações infecciosas potencialmente irreversíveis (LUCARELLI *et al.*, 2012). Mesmo com a profilaxia, a incidência de DECH aguda varia entre 15-20% e de DECH crônica varia entre 10-20% e é, portanto, uma reação adversa que pode limitar a indicação da terapia (BOLAÑOS-MEADE; BRODSKY, 2009)

Segundo Shenoy *et al.* (2017), a maioria dos pacientes que recebe condicionamento mieloablativo desenvolve infertilidade. O risco de infertilidade em homens tratados com bussulfano/ciclofosfamida é de 50%. Segundo avaliação da função gonadal em indivíduos > 14 anos realizada no estudo de Walters *et al.* (2010), os níveis de testosterona estavam reduzidos em 76% dos adolescentes do sexo masculino (10 de 13). Já em adolescentes do sexo feminino, 57% apresentaram níveis elevados de gonadotrofina e níveis reduzidos de estradiol, indicativo de falência ovariana. Devido ao risco de infertilidade em ambos os sexos é recomendado a criopreservação do tecido ovariano, testicular/sêmen antes do transplante (BERNAUDIN *et al.*, 2020).

Já Eggleston *et al.* (2007), avaliaram o impacto do transplante no crescimento, uma variável importante a ser considerada já que o procedimento é realizado sobretudo em crianças. Segundo os autores, o TCTH-alo não compromete, em geral, o crescimento de crianças, contudo, o crescimento pode ser reduzido caso o tratamento seja realizado próximo ou durante o período de estirão de crescimento que ocorre na puberdade devido a toxicidade gonadal do bussulfano poder levar a redução da secreção de hormônios sexuais que contribuem para esse processo.

Em suma, a grande maioria das crianças e adolescentes que recebem o TCTH-alo mieloablativo aparentado ficam livre das complicações clínicas da anemia falciforme (KRISHNAMURTI, 2007). Em adultos, entretanto, o procedimento tem sido associado a maior morbidade e mortalidade, de modo que a idade é um importante

fator prognóstico para o desfecho do transplante (GLUCKMAN *et al.*, 2017). Associado ao transplante há alto risco de infertilidade e risco considerável de desenvolvimento de doença secundária como o DECH, complicações que devem ser consideradas na avaliação risco benefício do tratamento (WALTERS, 2015; SHENOY *et al.*, 2017).

4.10 PRINCÍPIOS DA TERAPIA GÊNICA

A terapia gênica consiste na modificação genética de células para aliviar o sofrimento ou curar doentes. É uma modalidade terapêutica em investigação para o tratamento de doenças graves e de difícil resolução por terapias convencionais, principalmente, neoplasias malignas, doenças cardiovasculares, doenças infecciosas (sobretudo, a síndrome da imunodeficiência adquirida [AIDS, do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*]) e doenças hereditárias monogênicas como as hemoglobinopatias. (NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002; ARTIOLI; ROSÁRIO; ANTONIO, 2007).

Inicialmente, de uso restrito a ambientes controlados como laboratórios e centros de pesquisa clínica, a terapia gênica tem sido gradualmente inserida na prática clínica. (GONÇALVES; PAIVA, 2017). Em 2017, houve a primeira aprovação de um produto de terapia gênica nos Estados Unidos da América (EUA), o Kymriah® para tratamento de leucemia linfoblástica aguda, e, desde então, ao menos 9 terapias gênicas também foram aprovadas no país (DALEY, 2020; FDA, 2017). Recentemente, o primeiro produto de terapia gênica (Luxturna®) foi aprovado no Brasil; uma abordagem inédita, agora disponível em território nacional, para tratamento da perda de visão (ANVISA, 2020).

4.10.1 Métodos de transferência gênica

Os agentes terapêuticos utilizados para modificação genética das células são os ácidos nucleicos (principalmente DNA). Como os ácidos nucleicos não se difundem pela bicamada (antes dependem da endocitose para serem capturadas) técnicas de transferência química, física ou biológica de material genético (figura 11) são utilizadas para otimizar a incorporação celular dos agentes terapêuticos (DANI, 2000).

Figura 11 – Principais modalidades de transferência gênica.



Fonte: Adaptado de Bioninja, [2017?].

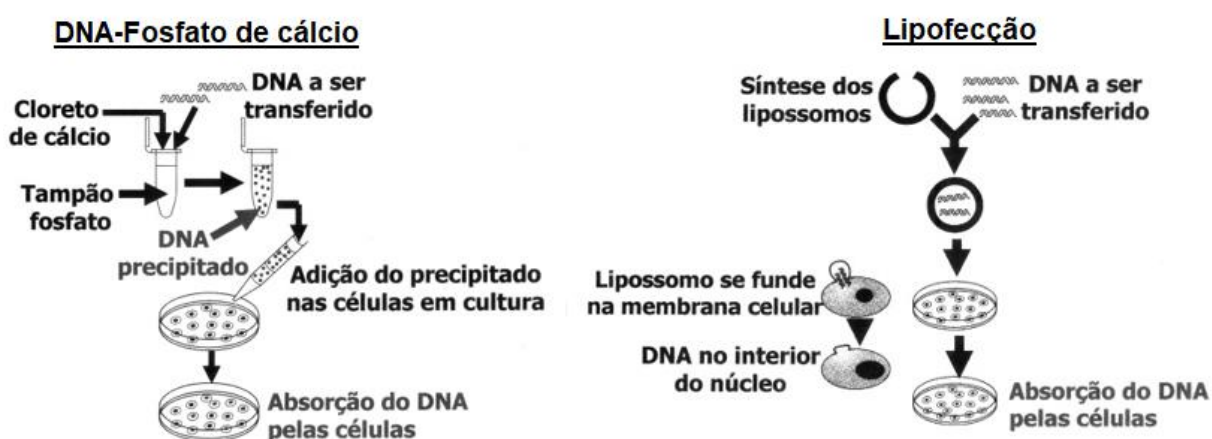
4.10.1.1 Métodos físicos

Nos métodos físicos o DNA entra na célula de forma mecânica. Na eletroporação, pulsos elétricos alternados formam poros na membrana plasmática, facilitando a entrada do DNA. Por sua vez, na microinjeção, uma agulha muito fina é usada para a injetar o DNA diretamente no interior celular. Já na biobalística, microesferas de ouro ou de tungstênio são projetadas sob alta velocidade na direção das células. Apesar da taxa elevada de transfecção para a eletroporação e biobalística, a morte celular associada é alta. Já na microinjeção, o número de células transfectadas é baixo. (DANI, 2000; NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002).

4.10.1.2 Métodos químicos

Nos métodos químicos, compostos catiônicos são associados ao DNA para reduzir a repulsão eletrostática da face externa da membrana plasmática (carregada negativamente) pelo ácido nucleico e facilitar a entrada por endocitose. DNA-fosfato de cálcio (formado pela adição de DNA a uma mistura de cloreto de cálcio e fosfato, em pH adequado) e DNA-lipossomas (vesículas compostas por fosfolipídios catiônicos organizados em bicamada) são os métodos mais utilizados na transferência química, conforme mostra a figura 12 (BATISTA *et al.*, 2007; DORNELLES *et al.*, 2010).

Figura 12 – Métodos químicos empregados na transferência gênica.

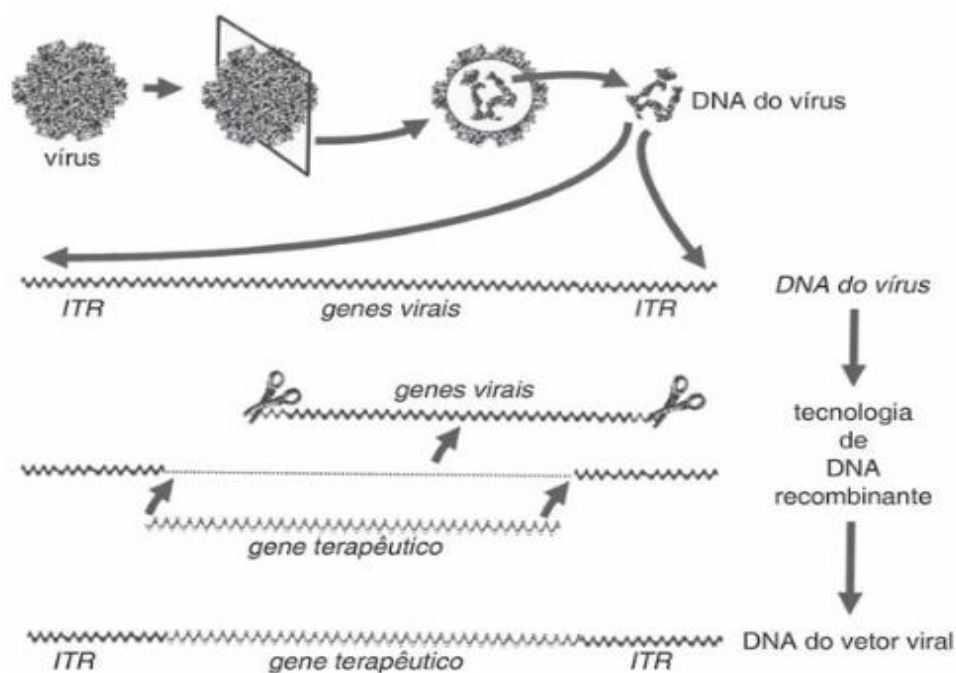


Fonte: Adaptado de Santos, 2011

4.10.1.3 Métodos biológicos

Nesse método, a transferência gênica é realizada por vírus recombinantes (TENDELOO; BROECKHOVEN; BERNEMAN, 2001). É o método mais utilizado em estudos de terapia gênica, e, também, o mais eficiente (AMOR, 2001). Para isso, as sequências replicativas do vírus ou codificantes de proteínas virais são deletadas e as sequências residuais são recombinadas com uma sequência terapêutica de interesse, (figura 13). Isso permite que o vírus transfira o material genético, mas não complete o ciclo infeccioso (TENDELOO; BROECKHOVEN; BERNEMAN, 2001; NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002).

Figura 13 – Processo de construção de vetor viral para terapia gênica.



Fonte: Linden, 2010

Os vetores virais são construídos, principalmente, a partir de vírus provenientes de umas das seguintes famílias: *Adenoviridae* (família dos adenovírus), *Retroviridae* (família dos retrovírus, incluindo a subfamília dos lentivírus), *Parvoviridae* (família dos vírus adenoassociados), *Herpesviridae* (família dos herpesvírus) (AL-DOSARI; GAO, 2009). Cada vetor tem características distintas (quadro 6) e a escolha do mais apropriado depende do tipo celular alvo, tamanho do inserto, duração desejada da expressão do transgene (TENDELOO; BROECKHOVEN; BERNEMAN, 2001).

Quadro 6 – Comparação entre vetores virais utilizados na terapia gênica.

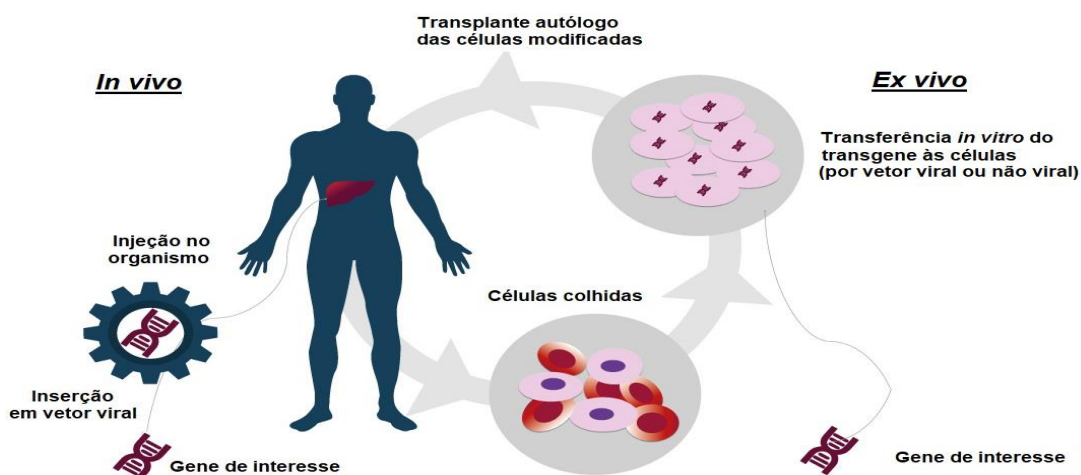
	Retrovírus	Lentivírus	Herpesvírus	Adenovírus	Adeno-associado
Genoma viral	RNA	RNA	RNA	DNA	DNA
Capacidade	~9kB	~10kB	>30kB	~30kB	~4,6kB
Integração no genoma do receptor	Sim	Sim	Sim	Não	Raríssima
Duração da expressão do transgene	Longa	Longa	Transitória	Transitória	Longa (células pós-mitóticas)
Imunidade preexistente no receptor	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Efeitos adversos	Mutagênese insercional	Mutagênese insercional	Resposta inflamatória	Resposta inflamatória	Resposta inflamatória leve

Fonte: Gonçalves; Paiva, 2017

Apesar da eficiência, há riscos associados ao uso de vetores virais. Dependendo da imunidade prévia do receptor pode haver resposta inflamatória acentuada e, ainda, para os vírus que se integram no genoma do hospedeiro há risco de oncogênese, devido a possibilidade de ocorrência de mutagênese insercional. Assim, o ajuste de dose e a escolha de vetores que não tendem a se integrar em sítios relacionados a câncer têm servido de estratégia para aumentar a segurança dos tratamentos (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

4.10.2 Modificação genética *in vivo* e *ex vivo*

A modificação genética pelo agente terapêutico pode ocorrer fora do organismo vivo, que é a modificação *ex vivo*, ou diretamente no organismo, a modificação *in vivo* (figura 14). A primeira é realizada em tecidos acessíveis como sangue e pele. Já a segunda, em alvos de difícil acesso (p.ex. tecido nervoso) (AMOR, 2001)

Figura 14 – Terapia gênica *in vivo* e *ex vivo*.

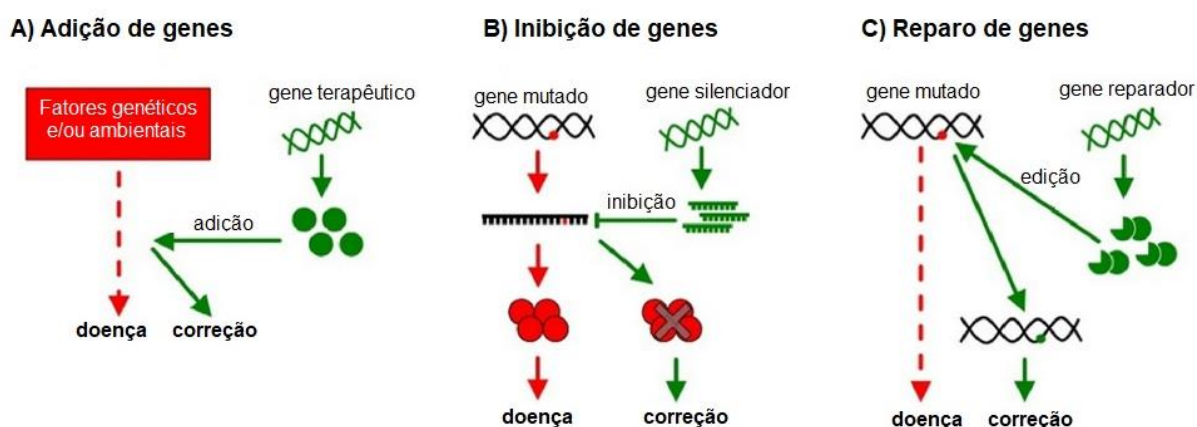
Fonte: Lonza, [2019?]

Em geral, enquanto a transferência de genes por métodos físicos e químicos (exceto lipofecção) se restringem a modificação *ex vivo*, os vetores virais são frequentemente empregados na modificação celular *in vivo* (DANI, 2000).

4.10.3 Mecanismo de ação da terapia gênica

Essencialmente, a terapia gênica permite que as células tenham uma disfunção corrigida ou ganhem uma função. Assim, três tipos de intervenções celulares podem ser realizadas para produção de efeito terapêutico: (1) adição de transgene, (2) inibição da expressão de gene endógeno, (3) reparo de gene endógeno, como esquematizado na figura 15 (TANG; XU, 2020).

Figura 15 – Representação esquemática dos três principais mecanismos de modificação genética utilizados na terapia gênica.



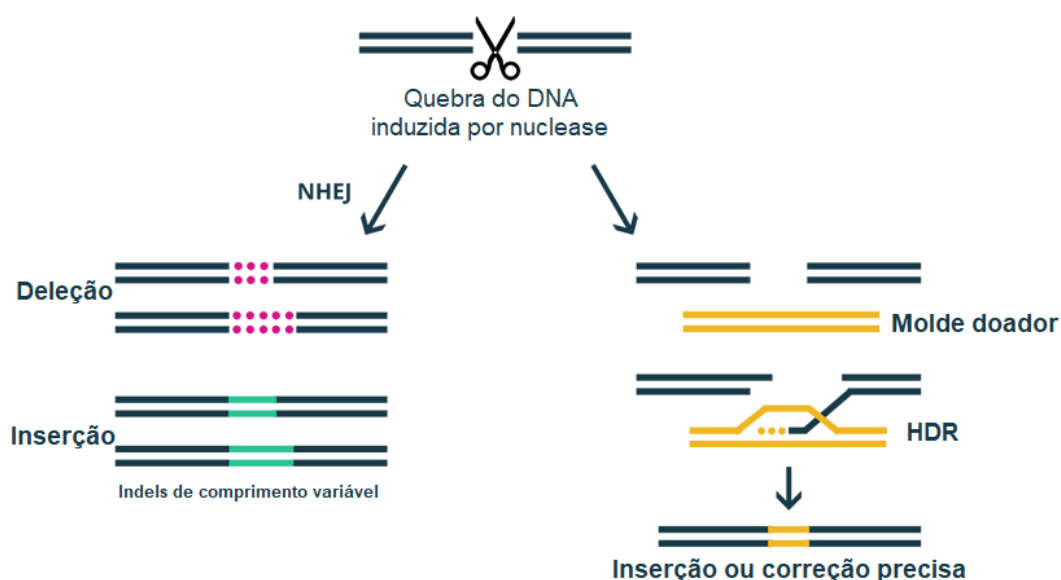
Fonte: Wang; Gao, 2014

Na primeira, um gene exógeno é entregue às células-alvo e restaura a função de um gene defectivo. Na segunda, pequenas moléculas de ácido ribonucleico (RNA, do inglês, *ribonucleic acid*) em forma de grampo de cabelo (shRNA, do inglês, *short hairpin RNA*) podem ser construídos para reduzir a formação de produtos de genes defectivos ao inibir a tradução do RNA mensageiro (mRNA, do inglês, *messenger RNA*) do gene alvo (inibição pós-transcricional). Na última, uma sequência alvo no genoma pode ser corrigida a partir da indução de quebra na dupla fita do DNA seguida por reparação do local segundo um molde de DNA entregue a célula. Esse último processo é conhecido como edição gênica e é uma das abordagens utilizadas, no presente, para modificação permanente do genoma.(TANG; XU, 2020).

4.11 EDITORES GENÔMICOS

Apesar da adição de genes ser a estratégia de modificação genética mais bem estabelecida, os editores de genoma desenvolvidos nas últimas duas décadas têm gerado grande impacto no desenvolvimento de terapias gênicas. Esses são sistemas com capacidade de clivagem sítio-específica que permitem inserir, deletar ou corrigir uma sequência genômica de interesse. Isso é possível pois as quebras na dupla fita do DNA, feitas por nucleases que compõem esses sistemas, estimulam mecanismos endógenos de reparo do DNA, a saber, reparo dirigido por homologia (HDR, do inglês, *homology directed repair*) e união de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês, *nonhomologous end-joining*), ambos esquematizados a baixo (MAEDER; GERSBACH, 2016).

Figura 16 – Representação esquemática de mecanismos de reparo do DNA.



Fonte: PIKPNG, [2019?].

Na união de extremidades não homólogas, as extremidades clivadas são religadas independente de molde. No processo, podem ocorrer inserções ou deleções (indels) de nucleotídeos para compatibilizar as extremidades. A presença dos indels, geralmente inativa o gene alvo. Já no reparo dirigido por homologia, há dependência de um molde de DNA, que pode ser a cromátide irmã, cromossomo homólogo, ou no caso da edição gênica, um DNA contendo a sequência desejada de reparo. Mediante a quebra, a extremidade clivada invade a sequência homóloga de DNA e é estendida a partir das sequências do molde, permitindo posterior união por complementariedade de bases das extremidades clivadas. A expressão transitória desses sistemas resulta

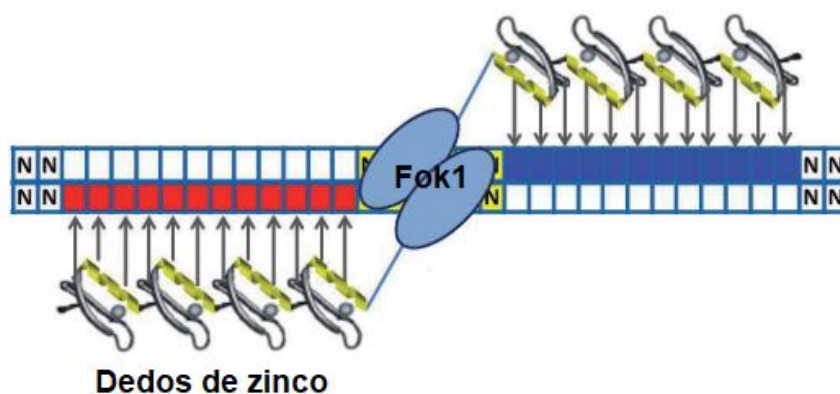
em modificação permanente do genoma. (BRANDSMA; GENT, 2012; MAEDER; GERSBACH, 2016; YAN *et al.*, 2020).

Dentre as ferramentas de edição genômica destacam-se três: ZFN, TALEN e CRISPR-Cas9. (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013) A composição e mecanismo de ação de cada uma dessas serão discutidos a seguir.

4.11.1 Nucleases dedos de zinco

As nucleases dedos de zinco (ZFN, do inglês, *zinc-finger nucleases*) são proteínas quiméricas compostas por dois domínios, sendo um deles o de ligação ao DNA e o outro, de clivagem da dupla fita (CARROLL, 2011). A quebra da dupla fita é realizada pelo domínio catalítico da endonuclease Fok1 (BITINAITE *et al.*, 1998). Sozinho, esse domínio não é capaz de clivar o DNA de forma específica, assim, associado ao sítio ativo da Fok1 encontra-se uma série de dedos de zinco programáveis, capazes de reconhecer uma sequência alvo (figura 17). Esses últimos são domínios proteicos de cerca de 30 aminoácidos comumente encontrados em fatores de transcrição que são estabilizados por um átomo de zinco e cuja conformação assemelha-se a um dedo. Cada dedo de zinco é capaz de reconhecer 3 pares de bases, de modo que 6 dedos de zinco são necessários para garantir especificidade mínima de reconhecimento de uma região genômica. Devido ao fato da Fok1 exercer ação catalítica apenas na forma de dímero, duas nucleases dedos de zinco precisam ser desenvolvidas para que, os dedos de zinco associados a sequências vizinhas, permitam a interação entre dois monômeros contendo o sítio ativo da enzima. (CARROLL, 2011; VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016).

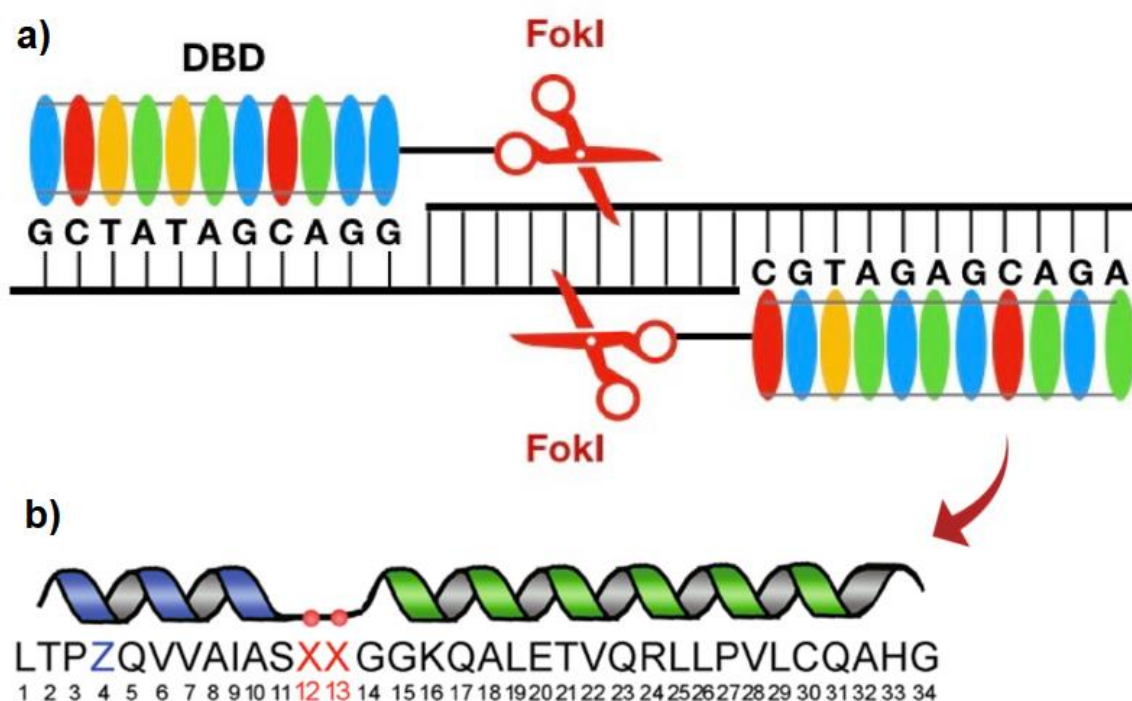
Figura 17 – Representação esquemática do mecanismo de ação de nucleases dedo de zinco.



4.11.2 TALEN

As nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (TALEN, do inglês, *transcription activator-like effector nucleases*) são endonucleases quiméricas artificiais compostas por um domínio de ligação ao DNA e um domínio catalítico da enzima FokI (figura 18a). Cada repetição de 34 resíduos de aminoácidos do domínio de ligação ao DNA interage com um único nucleotídeo. A especificidade da interação é determinada por uma combinação de dois aminoácidos nas posições 12 e 13 de cada repetição, região chamada de repetição variável di-residual (RVD do inglês, *repeat variable diresidue*) (figura 18b). A combinação de várias repetições contendo RVDs distintos permite direcionar a nuclease a qualquer sequência de nucleotídeos do DNA. Para a introdução de uma quebra na dupla fita do DNA é necessário a formação de um dímero de FokI, assim, é necessário a construção de duas TALENs, cujos domínios de ligação ao DNA se associam a sequências opostas entre si (DENG *et al.*, 2014; NEMUDRYI *et al.*, 2014).

Figura 18 – Representação esquemática da estrutura das TALENs.



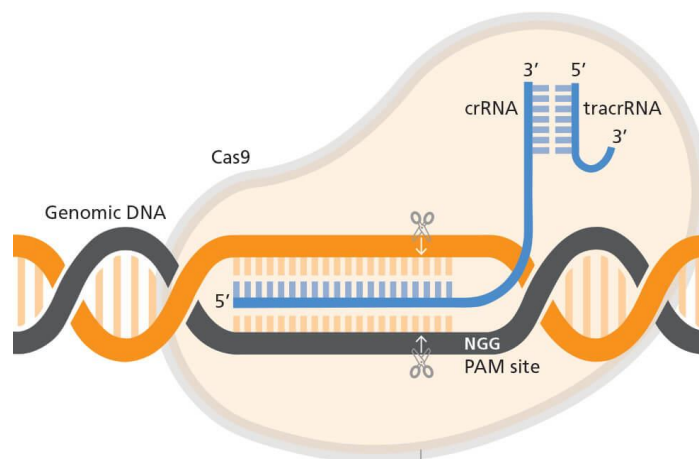
Fonte: Adaptado de Deng *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2014. a) As sequências repetitivas de aminoácidos do domínio de ligação ao DNA (DBD) encontram-se representadas pelas elipses pareadas a bases nitrogenadas, enquanto as tesouras representam a endonuclease FokI. b) Representação da estrutura secundária e primária de uma sequência repetitiva. Destacado em vermelho encontram-se as posições dos resíduos responsáveis pelo reconhecimento dos nucleotídeos.

4.11.3 CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 é uma ferramenta de edição genética adaptada de um sistema de defesa bacteriano contra bacteriófagos e plasmídeos. A técnica permite induzir quebra na dupla fita de DNA de forma sítio-específica por meio da ação catalítica da endonuclease Cas9, a partir do reconhecimento da interação RNA-DNA pela enzima (CASTRIGNANO, 2017).

Descobertas inicialmente em *Escherichia coli*, CRISPR são repetições nucleotídicas curtas em palíndromo (CRISPR, do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) encontradas no genoma de alguns procaríotos. Essas são intercaladas por sequências de 20 pares de base de DNA invasor (espaçadores) inseridas no DNA cromossomal durante uma infecção primária (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2015). Em infecções secundárias, o *locus* CRISPR é transcrito em mRNA, e, em seguida, processado em RNAs menores, constituídos de sequências de espaçadores e sequências repetitivas (CRISPR RNA ou crRNA) que permitem a formação de um duplex com o RNA CRISPR transativador (*tracrRNA*, do inglês, *trans-activating CRISPR RNA*) que é transcrito *upstream* ao *locus CRISPR* e permite a estabilização da estrutura do guia de RNA (figura 19). Esses, unidos, associam-se e ativam a nuclease, para então, a direcionarem ao sítio alvo, permitindo a clivagem do DNA exógeno e inibição da progressão da infecção, processo ilustrado abaixo (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Figura 19 – Representação esquemática do mecanismo de ação do complexo CRISPR-Cas9.



Fonte: (STEMCELL, 2020) A clivagem da dupla fita de DNA pelo complexo CRISPR-Cas9 envolve a interação de DNA alvo, duplex de RNA (crRNA + tracrRNA) e a nuclease Cas-9. Formado o híbrido DNA-RNA, dois sítios ativos (HNH e *RuvC-like*, representados por tesouras) hidrolisam a ligação fosfodiéster de cada uma das fitas do DNA a 3 pares de bases *upstream* a sequência NGG encontrada no DNA genômico. PAM (motivo adjacente ao protoespaçador) refere-se a sequência nucleotídica NGG, localizada no DNA, que sinaliza para a abertura da dupla fita pela Cas-9.

Para a realização de experimentos de edição genética, os componentes do sistema foram modificados de forma que uma molécula única de RNA programável, que une características de crRNA e tracrRNA, chamado de guia único de RNA (sgRNA, do inglês, *single guide RNA*) fosse necessária para guiar a nuclease. Assim, devido à facilidade com que o complexo pode ser desenvolvido, quando comparado ao TALEN e ZFN, esta é considerada, atualmente, a principal ferramenta de edição genética, cujo potencial está sendo explorado para tratamento de diversas doenças genéticas, como as hemoglobinopatias (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

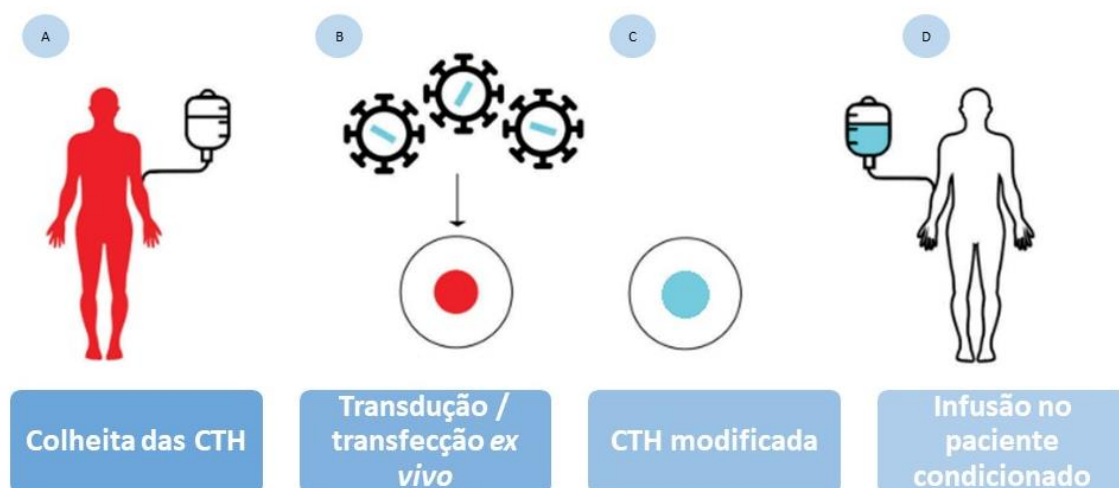
Devido ao impacto sem precedentes da aplicação dessa tecnologia, sobretudo na agricultura e na medicina, as pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna foram laureadas com o Prêmio Nobel de Química de 2020, por desenvolverem esse complexo artificial de fácil programação para edição genética. A inovação tem permitido o melhoramento genético de plantas para resistir a pragas, como também, tem tornado viável o desenvolvimento de estratégias potencialmente curativas para doenças genéticas hereditárias (como a anemia falciforme) e adquiridas (como alguns tipos de neoplasias) em diversos centros de pesquisa do mundo (THE NOBEL PRIZE, 2020).

4.12 TERAPIA GÊNICA PARA ANEMIA FALCIFORME

Como dito, a terapia gênica consiste na modificação genética de células para aliviar o sofrimento ou curar doentes (NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002). Na anemia falciforme, o objetivo desse tratamento é aumentar a síntese de hemoglobinas com propriedades antifalcizantes no eritrócito e, assim, evitar as complicações clínicas decorrentes da presença da HbS (HOBAN; ORKIN; BAUER, 2016a).

Para que isso seja possível, é necessário a realização de um transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (figura 20). Nesse, as CTH são colhidas, principalmente, da medula óssea e, eventualmente, do sangue periférico do paciente (o uso de cordão umbilical é incomum) (HSIEH; TISDALE, 2018). Em seguida, as células são mantidas *ex vivo* em meio de cultura e são modificadas por vetor viral ou não viral. Posteriormente, essas são reinfundidas no paciente condicionado previamente por regime mieloablativo (esse último favorece, na medula óssea, a expansão das CTH modificadas em detrimento das CTH nativas). (ROMERO; DEWITT; WALTERS, 2018).

Figura 20 – Visão geral das etapas necessárias para a terapia gênica para anemia falciforme.



Fonte: Adaptado de Romero; Dewitt; Walters, 2018. A entrega da construção para as CTH pode ser realizada por meio de vetor viral (transdução) ou não viral (transfecção).

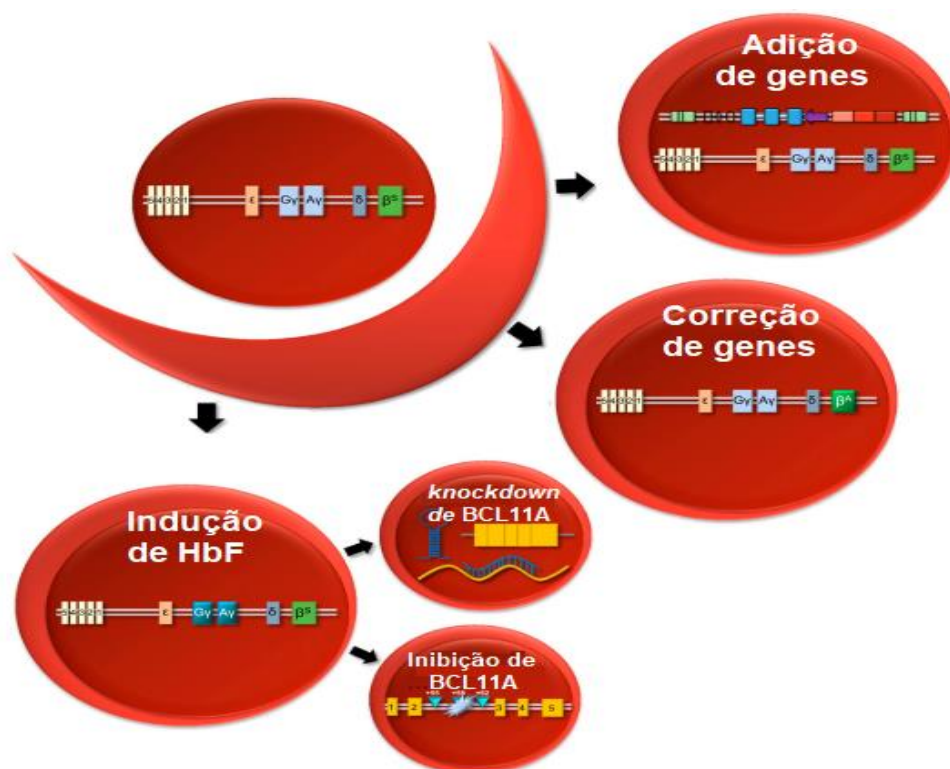
Vale ressaltar que, após o indivíduo receber o tratamento, todas as células da linhagem linfóide e mieloide que derivem das CTH transfectadas/transduzidas também se tornam modificadas geneticamente. Entretanto, a produção de hemoglobina antifalcizante sempre é restrita aos eritrócitos. Isso acontece em razão

dos genes alvos da terapia (endógenos ou exógenos) estarem sob controle transcricional eritroide-específico, ou seja, a transcrição dos genes terapêuticos só é ativada na presença de fatores de transcrição que estão presentes nos eritrócitos. Isso garante que o fenótipo de linhagens não eritroides não seja alterado pelo tratamento (BUNN, 1997; DUNBAR *et al.*, 2018).

4.12.1 Estratégias de terapia gênica

Em relação aos métodos que permitem corrigir o fenótipo falciforme, diversas estratégias de modificação da informação genética das CTH têm sido desenvolvidas ao longo dos últimos 40 anos. O potencial terapêutico de muitas dessas está sendo investigado em ensaios clínicos. Em suma, essas estratégias podem ser classificadas em três abordagens principais: adição, correção e indução de genes, todas representadas na figura abaixo (HOBAN; ORKIN; BAUER, 2016a).

Figura 21 – Representação esquemática das principais estratégias de terapia gênica para anemia falciforme.



Fonte: Hoban; Orkin; Bauer, 2016. Adição de genes: transgene codificador de globina antifalcizante (β -nativa/recombinante ou γ) é transferido à CTH por lentivírus. Correção de genes: Alelo β^S é reparado por editor genômico, permitindo produção de β -globina nativa. Indução de HbF: Repressor de HbF (BCL11A) é inibido, permitindo alta produção de HbF, um carreador funcional de oxigênio e que inibe a polimerização de HbS.

4.12.1.1 Adição de genes

A adição de genes foi a primeira estratégia utilizada em estudos de terapia genica envolvendo a anemia falciforme e é a que se encontra em estágio mais avançado de estudo clínico (LEONARD; TISDALE; ABRAHAM, 2020). Os estudos iniciais na década de 1980 utilizaram como vetor os retrovírus devido à alta taxa de transdução e de integração do inserto no genoma do hospedeiro. O transgene principal, até então, era a beta-globina humana nativa. Entretanto, a incapacidade de adicionar sequencias reguladoras (*enhancers*) grandes no inserto foi um fator que limitou o uso do vetor devido à baixa expressão dos transgenes (BANK; MARKOWITZ; LERNER, 1989).

Nos períodos posteriores, principalmente após os anos 2000, tornou-se comum o uso de construções lentivirais devido a possibilidade de uso de insertos grandes e a capacidade do vetor em transduzir células em G0, estado em que a maioria das CTH se encontram. Também difundiu-se o uso de transgenes contendo hemoglobinas beta com mutações antifalcizantes únicas ou múltiplas tais como T87Q (substituição de treonina por glutamina na posição 87), E22A (substituição de glutamato por alanina na posição 22), G16D (substituição de glicina por aspartato na posição 16), mutações essas baseadas nos resíduos encontrados na estrutura da gama e delta globina que conferem a essas globinas grande propriedades antifalcizantes (TAKEKOSHI *et al.*, 1995; ROMERO; DEWITT; WALTERS, 2018).

A mutação T87Q, devido a cadeia de maior comprimento da glutamina em relação a treonina, impede o contato lateral da Val Beta-6 com sítios hidrofóbicos Phe85 Beta-6 e Leu88 Beta-6 de tetrâmeros adjacentes (inibe o contato lateral dos polímeros de HbS). Já a mutação E22A, devido a apolaridade da alanina em relação ao glutamato (carga negativa), impede a interação estável beta-globínica com a carga positiva do grupo imidazol da Hys alfa-20 de tetrâmeros próximos (inibe o contato polimérico axial) (MCCUNE *et al.*, 1994). Por sua vez a mutação G16D aumenta a afinidade da beta-globina pela alfa globina, favorecendo a montagem do tetrâmero de Hb contendo a mutação antifalcizante (LEVASSEUR *et al.*, 2003; ROMERO; DEWITT; WALTERS, 2018).

Além da beta-globina, a γ -globina também já foi utilizada como transgene (figura 22). O intuito da entrega dessa globina a CTH é o de mimetizar os efeitos da

alta expressão de HbF que está associada negativamente a eventos vasclusivos e outros sintomas característicos da doença, um evento que ocorre naturalmente em indivíduos falciformes que apresentam HPFH e que apresentam complicações de menor gravidade (PESTINA *et al.*, 2009; LEONARD; TISDALE; ABRAHAM, 2020).

4.12.1.2 Correção de genes

As estratégias para corrigir a mutação pontual c.20A>T no gene HBB se beneficiam do mecanismo endógeno de reparo do DNA dirigido por homologia. Em estudos *in vitro*, nucleases como Fok1 (sistemas TALEN, ZFN) e Cas9 (sistemas CRISPR/Cas9) têm sido utilizadas para induzir quebras sítio-específicas no interior do exon 1 do gene HBB em CTH CD34+ provindas de indivíduos com AF. A partir de então, devido ao mecanismo de HDR, a maquinaria de reparo celular é capaz de utilizar a cromátide irmã como molde para induzir o reparo da fita clivada. Para que a correção ocorra, entretanto, além dos sistemas de edição genômica é fornecida à CTH uma sequência nativa do gene HBB para ser utilizado como molde. Ocorrendo o reparo é possível, a partir da diferenciação e maturação celular, a síntese da beta-globina nativa e de HbA (HOBAN *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2019).

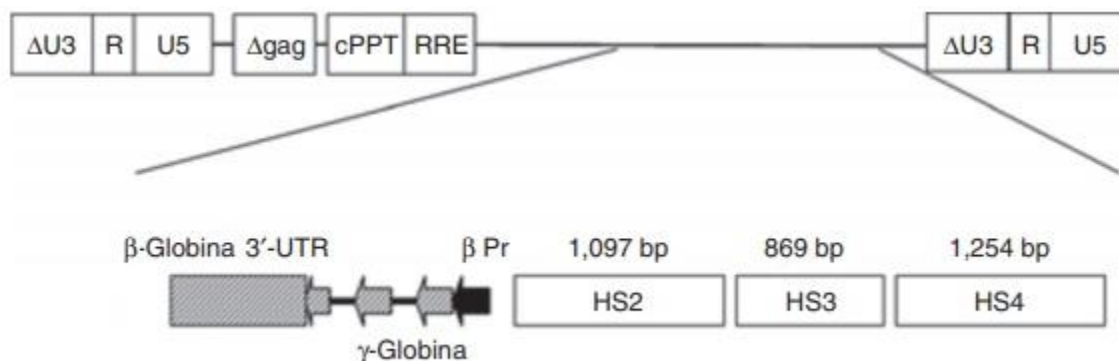
4.12.1.3 Indução de genes

As abordagens de indução de genes visam elevar a síntese de HbF no eritrócito. Um alvo terapêutico de grande interesse na terapia gênica para AF é o gene de linfoma/leucemia de células-B 11 A (BCL11A, do inglês, *B-cell lymphoma/leukemia 11A*) um fator de transcrição que atua como repressor do gene da gama globina (ACTON, 2011). A indução de indels em sítios do enhancer de BCL11A (p.ex. +58 DHS) pelo mecanismo de união de extremidades não homólogas após uso de ZFN, TALEN e CRISPR-Cas9 é uma das abordagens que permite reduzir a expressão do repressor, aumentar a expressão de γ -globina e HbF nas CTH modificadas (BAUER *et al.*, 2013; CANVER *et al.*, 2015; VIERSTRA *et al.*, 2015)

Além dos editores genômicos, uma alternativa utilizada para indução de HbF é o uso de RNA de interferência (RNAi) para realizar a inibição pós-transcricional do BCL11A. Por meio do uso de uma construção lentiviral contendo shRNA direcionado ao transcrito do repressor, foi possível a realização do *knockdown* de BCL11A em

CTH obtidas de doadores humanos saudáveis, resultado numa expressão de HbF > 50% nas CTH transduzidas (GUDA *et al.*, 2015).

Figura 22 – Representação esquemática de construção lentiviral contendo como inserto o gene da γ -globina humana.

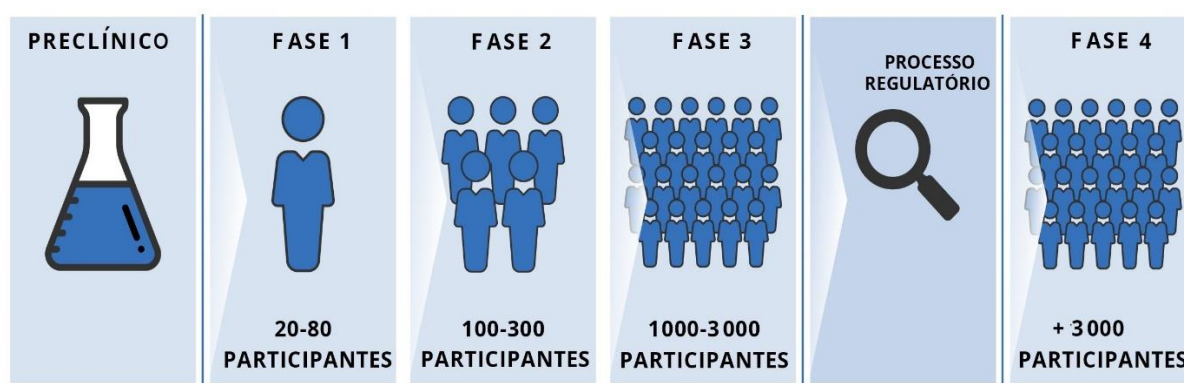


Fonte: Adaptado de Pestina, 2009. Nos insertos é comum a presença de sítios hipersensíveis a DNase I da região reguladora do *locus* da beta-globina humana representados por HS2, HS3 e HS4, um promotor beta-globínico seguido da região codificante contendo o gene globínico (nesse caso, o gene γ). Nessa construção também foi adicionado *enhancers* locais do gene da beta-globina (β -globina 3'-UTR) para potencializar a expressão do transgene. Acima, representação dos elementos do vetor lentiviral do tipo SIN (*self-inactivating*); contendo repetições terminais longas (U3, R U5), destaque para deleções nos promotores e *enhancer* do vetor (U3) para minimizar ativação de genes adjacentes, elemento responsivo rev (RRE), polipurina central (cPPT).

4.13 AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DA TERAPIA GÊNICA PARA ANEMIA FALCIFORME

A aplicação de terapias experimentais em seres humanos deve ser realizada por meio de ensaios clínicos (figura 23). Porém, para minimizar o risco de reações adversas nos participantes da pesquisa é necessário que a segurança e eficácia da intervenção sob investigação sejam previamente estabelecidas em modelos experimentais, por meio de ensaios pré-clínicos. Esses ensaios podem ser realizados em células, tecidos ou órgãos isolados (*in vitro*), ou diretamente em organismos vivos (*in vivo*) (GALVÃO, 2014; CLINICALINFO, 2020).

Figura 23 – Fases dos ensaios clínicos.



Fonte: BIOTECHINVESTMENTS (2020). Os ensaios clínicos são estudos em voluntários humanos. A fase pré-clínica, geralmente, é realizada em modelo animal e dá indícios da eficácia e toxicidade do tratamento. A fase I é realizado em poucos voluntários (saudáveis ou doentes sem opção terapêutica). o objetivo é estabelecer a segurança inicial. A fase II é realizada com número maior de indivíduos. Avalia-se a segurança e eficácia. A fase III é realizada com milhares de participantes para confirmação da segurança e eficácia numa população com maior variabilidade genética. A partir desse a terapia pode ser submetida a agencias regulatórias para uso comercial. A fase IV envolve a farmacovigilância pós-comercialização para considerações sobre reações adversas não detectadas nas fases anteriores.

Os principais modelos utilizados nos estudos de terapia gênica para anemia falciforme são as CTH (CD34+) colhidas da medula óssea de pacientes com anemia falciforme ou camundongos transgênicos que expressam HbS e que apresentam complicações similares à doença humana (p. ex. camundongos Berkeley). Enquanto as culturas celulares são, geralmente, utilizadas para avaliar a influência da intervenção no grau de falcização dos eritrócitos e proliferação celular, os modelos animais são úteis para identificar o impacto sistêmico da terapia, principalmente, por meio de avaliação da histológica dos órgãos comumente afetados pela isquemia (PÁSZTY *et al.*, 1997)

4.13.1 Adição de genes

Como já relatado, as estratégias que visam a cura da anemia falciforme por adição de genes globínicos são diversas. Muitas dessas abordagens apresentaram resultados encorajadores na fase pré-clínica, de modo que, serviram de embasamento para a investigação do potencial terapêutico em seres humanos (DEMIRCI; UCHIDA; TISDALE, 2018).

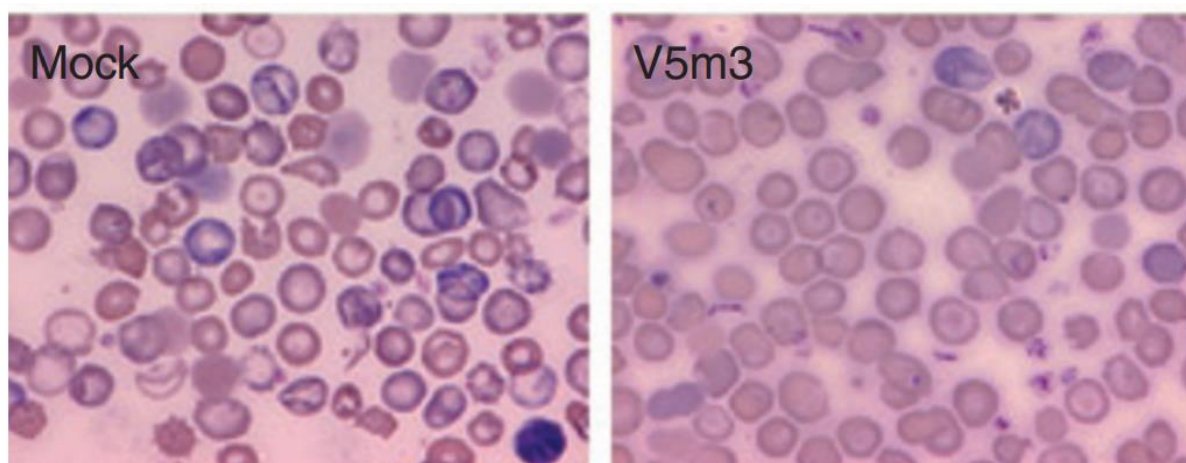
Na década de 1990, McCune *et al.* (1994) apresentaram os primeiros indícios de que uma hemoglobina recombinante teria a capacidade de inibir a eritrocitose de modo similar à HbF. Segundo o estudo desses autores, a adição de HbAS2 (Hb contendo beta-globina com mutação T87Q e E22A) à solução de HbS em uma razão 1:4 foi capaz de atrasar a formação de polímeros de HbS em ambiente hipóxico (5% de pO₂) na mesma intensidade que a HbF. Com isso, segundo os autores, o resultado seria sugestivo de que uma construção lentiviral que pudesse levar a expressão de HbAS2 à 25% da Hb total teria potencial terapêutico *in vivo*.

Na década seguinte, estudos delineados para avaliar o potencial terapêutico *in vivo* de construções com hemoglobinas antifalcizantes, como os de Levasseur *et al.* (2003), foram desenvolvidos. Segundo esses, uma dose única de CTH autólogas transduzidas por vetor lentiviral contendo sequência codificadora para HbAS3 (Hb com mutações T87Q, E22A e G16D na cadeia beta-globínica) foi capaz corrigir o fenótipo falciforme em camundongos modelo da doença (KO-TG-B6). O transplante autólogo foi capaz de aumentar a contagem total de eritrócitos e hemoglobina total, reduzir reticulocitose e inibir a eritropoese extramedular (hepática). Houve aumento expressivo da capacidade de concentrar urina (indicador de melhora da função renal), além de redução de 3x de esplenomegalia e ausência de detecção de infarto esplênico. A expressão de HbAS3 variou de 20-25% e os resultados foram replicados em recipientes secundários avaliados 7 meses após o transplante, indicando expressão persistente do transgene.

Resultados similares de correção do fenótipo falciforme em camundongos Berkeley foram demonstrados pelo estudo de Pestina *et al.* (2009). Nesse ensaio, a eficácia terapêutica da expressão do gene da gama-globina (HBG, do inglês *hemoglobin subunit gama*) pelo vetor lentiviral V5m3 foi avaliada. Nos camundongos adultos (5 meses), cujas CTH foram modificadas pelo tratamento, a produção média

de HbF foi de 48% do total de Hb (nessa fase de vida, a [HbF] é baixa camundongos não tratados), indicando potente expressão do transgene. Nos camundongos tratados também houve aumento da contagem de eritrócitos e Hb total. Drepanócitos foram raros ou ausentes no esfregaço de sangue periférico (figura 24). Além disso, enquanto as alterações pulmonares foram mínimas, os parênquimas renal e esplênico estavam preservados, sem lesões aparentes, o que reforça a capacidade de preservação de danos orgânicos secundários sob produção > 30% de hemoglobina antifalcizante. Não menos importante, casos de leucemias não foram detectados nos camundongos tratados.

Figura 24 – Fotomicrografias de esfregaço de sangue de camundongos Berkeley evidenciando o impacto do tratamento com vetor V5m3 no grau de poiquilocitose.



Fonte: Pestina *et al.* (2009). No esfregaço do camundongo tratado (V5m3), os drepanócitos estão ausentes. Já no esfregaço do camundongo controle (Mock), as poiquilocitoses são abundantes.

Apesar das evidências de cura do fenótipo falciforme em modelos *in vivo*, a avaliação da segurança carecia de investigações mais robustas, especialmente quanto ao potencial oncogênico dos lentivírus. Devido à característica de se integrar ao genoma, a construção pode ativar a expressão de genes adjacentes ao sítio de integração, e, sendo esse um proto-oncogene, a transformação maligna da célula pode ser iniciada. Assim, os ensaios pré-clínicos desenvolvidos a partir de 2010 incluíram a avaliação do potencial genotóxico dos vetores para esclarecer o risco oncogênico da terapia com esses vetores (HOBAN; ORKIN; BAUER, 2016b).

Segundo Urbinati *et al.* (2015), CTH transduzidas por dois vetores lentivirais distintos carregando sequências da globina β^{AS3} (beta-globina com mutações T87Q E22A e G16D) e da gama globina, respectivamente, não apresentaram alterações no

perfil de proliferação ou diferenciação celular em comparação com CTH não transduzidas (controle negativo).

Já no estudo de Urbinati *et al.* (2017), apesar de 3 camundongos (de um total de 57) terem desenvolvido neoplasia após o tratamento com lentivírus codificando para a globina β^{AS3} , o evento foi considerado como uma reação adversa da irradiação mieloablativa. Nesses eventos, as células neoplásicas não continham a sequência do provírus. Também, o mesmo estudo detectou que o provírus se insere com menor frequência em sítios próximos de genes relacionados ao câncer, quando comparado a retrovírus reconhecidamente oncogênicos.

Por sua vez, Poletti *et al.* (2018), reforçaram a ideia de baixo potencial oncogênico do uso dos lentivírus na terapia para anemia falciforme. Em ensaio *in vitro* de immortalização celular, onde a taxa de proliferação de 100 células por microplaca de 96 poços é comparada após a transdução de CTH com vetores de interesse, não houve diferença significativa na taxa de proliferação de CTH tratada com vetor GLOBE-AS3 (lentivírus carregando codificando para a globina β^{AS3}) em relação às CTH não transduzidas (controle negativo). Já a taxa de proliferação das CTH tratadas com vetor de interesse em relação ao controle positivo (retrovírus gama) foi de 10 vezes menor.

4.13.2 Correção da mutação falciforme

A capacidade de reparar mutações genômicas para restaurar a função de um gene endógeno e, com isso, curar doenças monogênicas é almejada desde o princípio da terapia gênica (LINDEN, 2010). Por muito tempo isso não foi possível em decorrência de limitações técnicas (BANK; MARKOWITZ; LERNER, 1989). No presente, os editores genômicos programáveis têm permitido o desenvolvimento de estratégias de correção sítio-específica do material genético, cujo potencial terapêutico começa a ser investigado para o tratamento de hemoglobinopatias (HOBAN; ORKIN; BAUER, 2016).

Atualmente, os sistemas CRISPR-Cas9, ZFN e TALEN têm sido empregados em ensaios *in vitro* para avaliação da capacidade de correção da mutação c.20A>T no gene HBB (figura 25), principalmente, em culturas de CTH ou de células-tronco pluripotente induzida (IPS, do inglês, *induced pluripotent stem cells*), provenientes de pacientes com anemia falciforme (HUANG *et al.*, 2015; WEN *et al.*, 2017).

Figura 25 – Representação esquemática da correção de HBB por HDR após ação de nucleases.



Fonte: Adaptado de Romero; Dewitt; Walters (2018). As nucleases inserem quebras na dupla fita do gene HBB contendo a mutação falciforme (AF). Um molde doador com a sequência selvagem de HBB é entregue às CTH. Por meio do HDR, a sequência do gene endógeno é corrigida, o que permite produção de beta-globinas funcionais e de HbA.

Conforme esses ensaios, as nucleases foram capazes de induzir, em geral, correção monoalélica da mutação falciforme (SUN; ZHAO, 2014; ZOU *et al.*, 2011). As estratégias utilizando o sistema CRISPR-Cas9 foram as que obtiveram os maiores índices de correção monoalélica em relação a colônias tratadas com outros editores. Em um dos estudos, 20% das colônias de CTH tiveram a mutação corrigida após a associação de eletroporação de mRNA da Cas9 e transdução por lentivírus defeituoso em integrase codificando o sgRNA e molde do gene HBB nativo. Por meio da mesma abordagem, uma concentração máxima de 12.3% de HbA (em relação ao total de Hb) foi detectada por HPLC em colônias eritroides diferenciadas de CTH, anteriormente homozigotas para a mutação falciforme e, portanto, incapazes de produzir esse tipo de hemoglobina (HOBAN *et al.*, 2016). Por sua vez, as taxas de correção por meio de sistemas ZFN e TALEN foram menores (10% e 4%, respectivamente) (SEBASTIANO *et al.*, 2011; SUN; ZHAO, 2014).

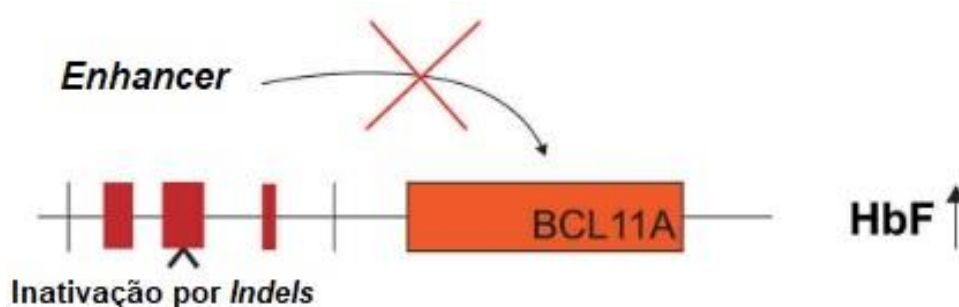
A clivagem específica do alvo é um requisito para que o tratamento possa ser considerado seguro. Devido, geralmente, ocorrer uma seleção prévia dos complexos mais promissores, além do emprego de ferramentas computacionais para programação dos guias de nucleases, a clivagem ou mutagênese fora do alvo em genes de alta homologia ou com sequências muito similares ao HBB não foi detectada (SEBASTIANO *et al.*, 2011). Em um dos estudos, o sequenciamento completo do genoma de colônias IPS não revelou modificação de nenhum dos 1469 sítios com alta homologia ao HBB após o tratamento com CRISPR-Cas9 (LI *et al.*, 2016).

Como já relatado, o uso de editores genômicos têm permitido a correção de, ao menos, um dos alelos contendo a mutação falciforme. Contudo, a produção de HbA alcançada por esses tratamentos ainda é baixa, de modo que essas intervenções precisam ser otimizadas para que efeitos terapêuticos *in vivo* possam ser efetivamente alcançados. (DEMIRCI; UCHIDA; TISDALE, 2018; HOBAN *et al.*, 2016).

4.13.3 Indução do gene HBG

As estratégias de indução do gene HBG têm como objetivo aumentar a transcrição endógena desse gene, e, com isso, elevar a produção de HbF a níveis similares ao da fase intrauterina (CHAMBERS *et al.*, 2020). A maioria dos estudos pré-clínicos envolvendo essa abordagem, tem aplicado editores genômicos e RNAs interferentes em culturas de CTH para inibir a ação de BCL11A (o principal repressor de HBG), como ilustrado na figura 26, e avaliar o impacto da intervenção na transcrição endógena de HBG e na produção de HbF (ROMERO; DEWITT; WALTERS, 2018).

Figura 26 – Representação gráfica de aumento de HbF por meio da introdução de inserções ou deleções (indels) em motivos de enhancer de BCL11A.



Fonte: Adaptado de Romero; Dewitt; Walters (2018). A introdução de *Indels* no *enhancer* de BCL11A promove *knockdown* do repressor e desinibe a transcrição de HBG, o que eleva os níveis de HbF.

Em um estudo de Li *et al.* (2018), a transcrição de HBG pôde ser aumentada em até 30 vezes após a deleção do domínio de ligação de BCL11A no promotor de HBG. Os autores transduziram CTH de camundongos transgênicos para o *locus* beta-globínico humano (beta-YAC) com adenovírus codificando sgRNA e CRISPR-Cas9 e foram capazes de deletar o motivo TGACCA em 50% das células tratadas após ação da nuclease e reparo por NHEJ. A ausência dessa sequência impede a ligação de BCL11A ao promotor de HBG, e, assim, sua ação repressora é inibida. Segundo os autores, o aumento de até 30% da relação gama-globina/beta-globina foi alcançado

pelo tratamento, o que poderia levar a produção de HbF em níveis suficientes para efeito terapêutico. Apesar disso, não foi avaliado o impacto da modificação em órgãos ou sistemas.

Já no estudo Brendel *et al.* (2020), o impacto da edição genética sobre o índice de falcização celular foi avaliado. Células CD34+ colhidas de pacientes com anemia falciforme foram transfectadas *ex vivo* por lentivírus autoinativante codificando RNAi contra BCL11A. Segundo avaliação por HPLC de eritrócitos diferenciados das CTH modificadas, a inibição pós-transcricional de BCL11A pelo RNA interferente aumentou em 48% a média de síntese de HbF (31% de HbF em cultura controle e 79% em cultura tratada). Além disso, o índice de eritrofalcização foi reduzido em 42% após o tratamento (foi encontrado 90% de drepanócitos em cultura controle e 48% em cultura tratada), indicando grande inibição da formação de polímeros de HbS pelo tratamento. Também, não houve aumento significativo da taxa de proliferação celular nas CTH modificadas em relação à cultura controle, segundo resultados de ensaio de imortalização celular.

Por sua vez, no estudo de Chang *et al.* (2017), o motivo GATAA foi deletado do enhancer de BCL11A, localizado no cromossomo 2. Um par de ZFN delineado para permitir a introdução de indels, por meio de NHEJ, na região alvo. Como resultado do *knockdown* de BCL11A, houve aumento da síntese de gama-globina à níveis potencialmente terapêuticos. A análise dos eritrócitos diferenciados das CTH não evidenciou comprometimento da capacidade de diferenciação ou maturação da linhagem após o tratamento

Assim, os níveis de suprarregulação de HBG e de síntese de HbF alcançados pelas estratégias de indução de HBG em cultura de células formam a base teórica para investigação do potencial terapêutico *in vivo* (CHANG *et al.*, 2017). Em decorrência dos resultados promissores, o impacto dessa abordagem sobre a funcionalidade de múltiplos órgãos e sobre os marcadores sanguíneos em doentes falciformes começa a ser caracterizado em ensaios clínicos (CLINICALTRIALS.GOV, 2020).

4.14 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DA TERAPIA GÊNICA PARA ANEMIA FALCIFORME EM ENSAIOS CLÍNICOS

No presente, o tratamento da anemia falciforme encontra-se sob investigação clínica. Até julho de 2020, no mundo, 11 ensaios clínicos haviam sido registrados na base de dados ClinicalTrials.gov, da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (quadro 7). Dentre esses, devido ao vasto embasamento com modelos animais, a terapia de adição de genes globínicos tem sido a abordagem de maior frequência em ensaios clínicos, seguida pela estratégia de indução do gene da gama-globina (HBG). Entretanto, não houve registros de ensaios envolvendo abordagens de correção da mutação falciforme (CLINICALTRIALSGOV, 2020).

Quadro 7 – Terapias gênicas para anemia falciforme sob investigação clínica (julho de 2020).

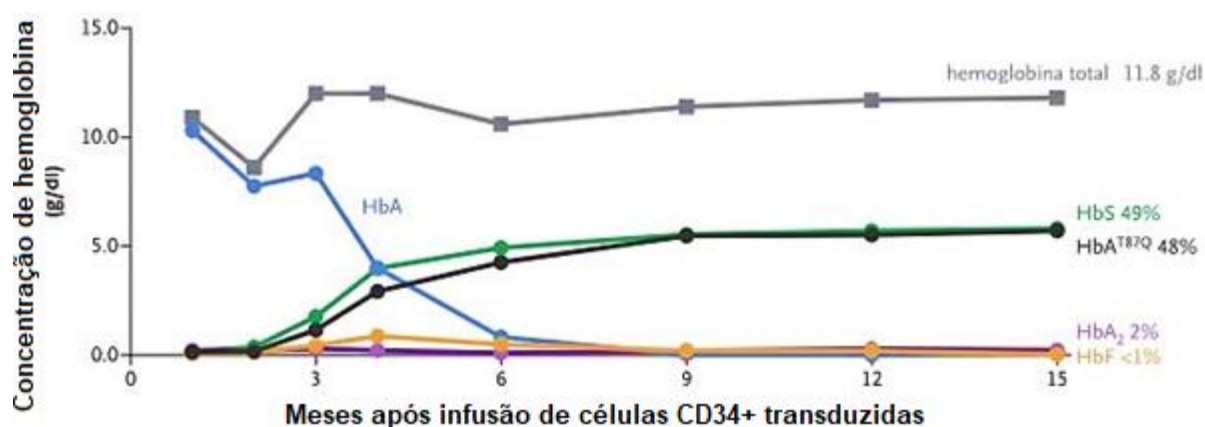
	Número	Fase	Intervenção	Produto	Situação	Financiador
Indução de HBG	NCT04443907	I / II	Inibição de BCL11A por CRISPR-Cas9	OTQ293 e HIX 763	Ainda não recrutando	Novartis Pharmaceuticals
	NCT03745287	I / II	Inibição de BCL11A por CRISPR-Cas9	CTX001	Recrutando	Vertex Pharmaceuticals
	NCT03282656	I	Inibição pós transcricional de BCL11A	shRNA	Recrutando	David Williams (Hospital infantil de Boston)
Adição de genes globínicos	NCT04293185	III	Lentivírus codificador de globina β T87Q	LentiGlobin BB305	Recrutando	BlueBirdBio
	NCT02151526	I / II	Lentivírus codificador de globina β T87Q	LentiGlobin BB305	Finalizado (com resultados)	BlueBirdBio
	NCT02140554	I / II	Lentivírus codificador de globina β T87Q	LentiGlobin BB305	Ativo (não recrutando)	BlueBirdBio
	NCT02633943	OB	Lentivírus codificador de globina β T87Q	LentiGlobin BB305 [?]	Recrutando (sob convite)	BlueBirdBio
	NCT02186418	I / II	Lentivírus codificador de γ -globina	ARU-1801	Recrutando	Aruvant Sciences
	NCT02247843	I / II	Lentivírus codificador de globina β T87Q/E22A/G16D	β AS3	Recrutando	Donald B. Kohn, M.D. (Universidade da Califórnia)
	NCT03964792	I / II	Lentivírus codificador de globina β T87Q/E22A/G16D	GLOBE1	Ainda não recrutando	Público (Hospital de Paris)
	NCT04091737	I	Lentivírus codificador de globina γ G16D / shRNA	CSL200	Recrutando	CSL Behring

Fonte: adaptado de CLINICALTRIALSGOV, 2020. [?] = produto provável. OB = Observacional.

Os resultados preliminares de dois desses ensaios clínicos demonstram que a aplicação dos produtos investigacionais é capaz de reverter as complicações da doença, a partir do aumento da expressão de globinas com propriedades antifalcizantes (DEMIRCI; UCHIDA; TISDALE, 2018).

A remissão clínica da anemia falciforme em um participante de pesquisa (ensaio NCT02151526) de 13 anos de idade, tratado com terapia de adição de genes, foi relatada em uma publicação do periódico *The New England Journal of Medicine* em 2017. Nos 15 meses pós TCTH-auto, o participante, até então com sintomas graves da doença, não apresentou complicações típicas da anemia falciforme e não foi internado. As medicações e as transfusões foram descontinuadas. Houve normalização dos marcadores hemolíticos ² e recuperação da eritropoese normal, indicada pela redução substancial dos reticulócitos ³ e ausência de eritroblastos no sangue periférico. As CTH foram colhidas da medula óssea e transduzidas *ex vivo* por vetor lentiviral codificando a globina β^{T87Q} . Enquanto a [HbA] recombinante aproximou-se dos 50%, a [HbS] alcançou níveis similares aos dos heterozigotos para a mutação falciforme, ou seja, HbS ~ 50% (gráfico 2). Isso demonstra que a expressão do transgene pela linhagem eritrocítica foi bem-sucedida (RIBEIL *et al.*, 2017).

Gráfico 2 – Concentrações hemoglobínicas absoluta e relativas, segundo quantificação e qualificação das globinas por HPLC, após o transplante autólogo de CTH geneticamente modificadas por LentiGlobin BB305.



Fonte: Ribeil *et al.*, 2017. A detecção de HbA (ausente de forma espontânea na AF) é decorrente das transfusões de sangue prévias ao transplante e seguem em declínio após a última transfusão no 88º dia pós-TCTH. A partir do 3º mês pós-TCTH, ocorre um aumento expressivo de HbA^{T87Q} (recombinante) e de HbS, cujas concentrações se estabilizam em 48% e 49%, respectivamente, após o 9º mês. Esse resultado indica sucesso na expressão do transgene na linhagem eritroide após a terapia gênica. HbA₂ e HbF permanecem em baixas concentrações após o transplante.

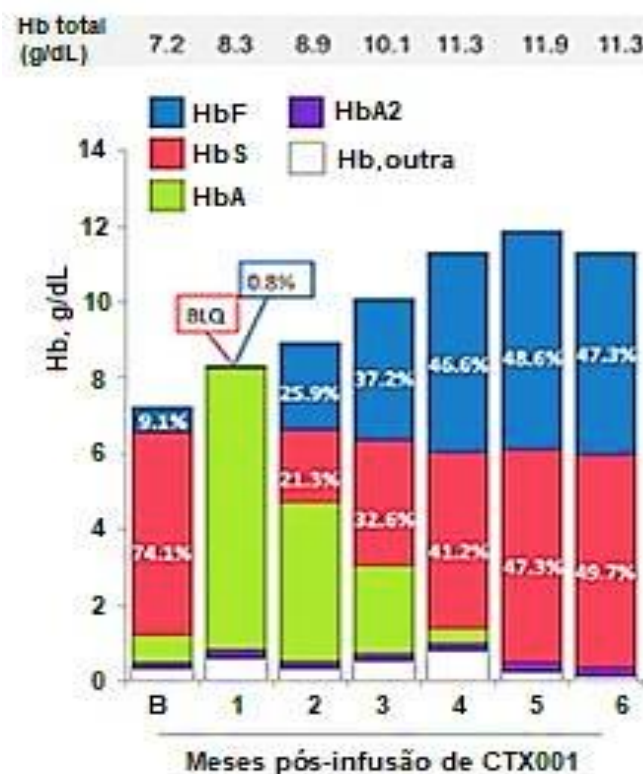
Também, resultados preliminares encorajadores sobre o uso de editores genômicos para o tratamento de hemoglobinopatias foram apresentados no 25º Congresso da Associação Europeia de Hematologia. Os dois primeiros participantes

² Bilirrubina total de 12 $\mu\text{mol/L}$ (intervalo de referência: 0-17 $\mu\text{mol/L}$); LDH de 212 U/L (intervalo de referência: 125-243 U/L).

³ Contagem de reticulócitos de 230.000 mm^3 (pré-TCTH) para 141.000 mm^3 (15 meses pós-TCTH). Intervalo de referência: 20.000-80.000 mm^3 .

do estudo NCT03745287 receberam o TCTH-auto baseado na inibição de BCL11A por CRISPR-Cas9 e apresentaram remissão da doença nos primeiros 6 meses de avaliação. Enquanto um dos participantes apresentava anemia falciforme grave, o outro era afetado por talassemia beta intermediária (β^0/β^+). No caso do participante com AF, houve aumento gradual da concentração de HbF após a intervenção e não houve desenvolvimento de crise vasclusiva pós-TCTH. A concentração relativa basal de HbF passou de 9,2% (valor antecedente ao tratamento) para 47,3% no 6º mês após o transplante (gráfico 3). Houve aumento substancial da Hb total (de 7,2 g/dL antes da intervenção para 11,3 g/dL após o procedimento). O sgRNA foi delineado para que a Cas9 pudesse promover a deleção do *enhancer* de BCL11A e, assim, inibir a transcrição do repressor de gama-globina. A elevação de HbF observada após a terapia gênica sugere eficácia na ação do editor. Os autores destacam que o estudo seria a primeira evidência científica de eficácia do sistema CRISPR-Cas9 para tratamento de doenças genéticas humanas (CORBACIOGLU *et al.*, 2020).

Gráfico 3 – Hb total e frações de Hb de participante do estudo NCT03745287 com anemia falciforme após modificação das CTH por CTX001.



Fonte: Corbacioglu *et al.*, 2020. BLQ = Abaixo do limite de quantificação. As barras em azul e a caixa com contorno azul representam a [HbF], em relação a Hb total ao longo do tempo. O aumento da extensão das barras azuis ao longo do tempo demonstra elevação gradual da fração de HbF cuja concentração é superior a 45% no sexto mês pós-TCTH autólogo. As barras em rosa e a caixa com contorno rosa representam os níveis de HbS em relação a Hb total.

Nos dois ensaios, as reações adversas observadas não foram associadas a infusão do produto investigacional, mas sim, à toxicidade inerente do condicionamento mieloablativo, tais como pancitopenia, sepse, aumento transitório de enzimas hepáticas. Contudo, todos esses efeitos adversos foram solucionados por meio de tratamentos convencionais (CORBACIOGLU *et al.*, 2020; RIBEIL *et al.*, 2017).

Assim, os resultados iniciais da aplicação de terapia gênica por adição de genes e indução de HbF em humanos sugerem que essa modalidade terapêutica é capaz de curar a anemia falciforme de forma segura (DEMIRCI; UCHIDA; TISDALE, 2018). Porém, a reprodutibilidade da eficácia terapêutica e segurança observadas até o presente só poderá ser conhecida a partir da realização de ensaios clínicos com um número maior de participantes (JAYAVARADHAN; MALIK, 2018).

4.15 VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA TERAPIA GÊNICA EM RELAÇÃO AO TCTH-ALO

Devido ao potencial curativo, a terapia gênica pode ser considerada como um tratamento mais conveniente que o TCTH-alo por algumas razões (quadro 8). Primeiramente, o número de pacientes que poderiam ter acesso à cura seria maior. O procedimento torna dispensável a busca por doadores histocompatíveis por se tratar de uma modalidade de transplante autólogo (DEMIRCI; UCHIDA; TISDALE, 2018). Assim, doentes com estado de saúde estável ou suficiente para serem submetidos ao transplante podem ser candidatos ao procedimento, mesmo que não possuam parente HLA compatível (o que ocorre mais de 70% dos casos, motivo pelo qual o TCTH-alo é realizado em uma minoria dos doentes) (KRISHNAMURTI *et al.*, 2003).

Quadro 8 – Vantagens da terapia gênica em relação ao TCTH-alo.

VANTAGENS DA TERAPIA GÊNICA PARA ANEMIA FALCIFORME	
Proporção de beneficiados	Maior número de doentes elegíveis à terapia curativa, em razão da busca por doadores compatíveis não ser necessária (transplante autólogo).
Doenças secundárias ao TCTH	Sem risco de desenvolvimento de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), devido à tolerância imune das células reinfundidas para com os antígenos do receptor.
Risco de Rejeição	Risco de rejeição mínimo ou ausente ao enxerto, em razão das CTH modificadas serem reconhecidas como próprias pelo sistema imune do receptor.
Farmacoterapia pós-TCTH	Imunossupressão profilática à DECH dispensável no pós-transplante, o que reduz o risco de infecções nesse período.

Outras três vantagens da terapia gênica sobre o TCTH-alo decorrem de um mesmo fenômeno imune. Em decorrência da autotolerância, a doença do enxerto contra o hospedeiro, que é uma doença secundária ao transplante alogênico e, também, potencialmente fatal, não ocorre nas abordagens de terapia gênica para anemia falciforme pois os linfócitos derivados das CTH reinfundidas toleram os antígenos do receptor, que são próprios, o que, por si só, aumenta a sobrevivência global ao transplante (BRENDEL *et al.*, 2020). Ademais, devido à ausência de DECH, não é necessário o uso de imunossupressores no pós-transplante, reduzindo o risco de

infecções (NOWOGRODZKI, 2018). Além disso, em teoria, o risco de rejeição do receptor às CTH modificadas é mínimo ou ausente devido sua constituição ser reconhecida como própria pelo sistema imune (ROMERO; DEWITT; WALTERS, 2018).

Apesar dos benefícios significativos, essa modalidade terapêutica também apresenta limitações (quadro 9). No presente, a terapia gênica está disponível apenas em ensaios clínicos (VERYWELLHEALTH, 2020). Também, a capacidade do tratamento em induzir um estado assintomático permanente e sem reações adversas a longo prazo ainda é desconhecido (RIBEIL *et al.*, 2017). Dentre essas reações, a mais preocupante é o desenvolvimento de neoplasias. Como visto, apesar desse evento não ter sido detectado ensaios pré-clínicos devido aos esforços em reduzir a genotoxicidade do tratamento, o risco está presente tanto nas estratégias que fazem uso de lentivírus, devido a mutagênese insercional, quanto no uso de editores genômicos, devido a clivagem em sítios indesejados (efeito *off target*) (WALTERS, 2005; LI *et al.*, 2016).

Quadro 9 - Limitações da terapia gênica em relação ao TCTH-alo

LIMITAÇÕES DA TERAPIA GÊNICA PARA ANEMIA FALCIFORME	
Disponibilidade	Restrita a participantes de ensaios clínicos.
Eficácia e segurança	A longo prazo, ainda são desconhecidas.
Toxicidade	A mieloablação por quimioterápicos antineoplásico é necessária para favorecer expansão das CTH modificadas. Com isso, o tratamento continua proibitivo para pacientes com danos em múltiplos órgãos.
Estimativa de custo inicial	Muito alto. Superior a US\$ 500.000.

Por fim, como ocorre com a maioria de procedimentos médicos avançados e inovadores, o custo inicial do tratamento seria alto e, num primeiro momento, limitado a doentes com elevado poder aquisitivo ou financiamento governamental. Com base em outras terapias gênicas aprovadas, o custo seria superior a US\$500.000, o que é, no mínimo duas vezes e meio o custo de um TCTH-alo realizado sistema de saúde estadunidense que custa cerca de US\$200.000 (NOWOGRODZKI, 2018).

5 CONCLUSÃO

A cura para a anemia falciforme é altamente desejável em indivíduos que apresentam manifestações graves da doença, devido aos impactos negativos dessa condição sobre a qualidade de vida, desempenho acadêmico e profissional. Apesar da terapia curativa atual apresentar excelentes indicadores de cura e sobrevida pós-transplante, apenas uma minoria é elegível ao procedimento. Isso cria uma grande demanda pelo desenvolvimento de terapias alternativas que eliminem a necessidade de uso de células-tronco hematopoéticas alogênicas. Assim, a terapia gênica é uma dessas alternativas, cujo potencial terapêutico se encontra sob investigação clínica.

Evidências apresentadas em ensaios intervencionais envolvendo seres humanos indicam que terapias baseadas na modificação genética de células-tronco hematopoéticas, as terapias gênicas, são capazes de curar a anemia falciforme. Essas novas abordagens, devido serem realizadas por meio de transplante autólogo, permitem que a maioria dos afetados pela anemia falciforme, antes impossibilitada de ser submetida ao TCTH-alo, em decorrência da dificuldade de obtenção de doadores aparentados histocompatíveis, se torne elegível à tratamentos curativos.

Além de permitir que mais indivíduos sejam elegíveis à cura, a terapia gênica também possui outros benefícios quando comparada ao TCTH-alo, como dispensabilidade do uso de imunossupressores pós-transplante autólogo, ausência de desenvolvimento de doença secundária ao transplante (doença do enxerto contra o hospedeiro) e risco mínimo ou ausente de rejeição às células-tronco modificadas, em decorrência da tolerância aos antígenos próprios. Em conjunto, acredita-se que esses fatores resultarão em uma taxa de sobrevida ainda maior que a apresentada pelo TCTH-alo.

A aplicação de terapias gênicas para anemia falciforme em seres humanos é restrita a centros de pesquisa clínica. A reprodutibilidade dos resultados reportados em ensaios clínicos recentes precisa ser investigada em um número maior de participantes. Também, tanto a segurança quanto a eficácia terapêutica a longo prazo precisam ser caracterizadas por ensaios clínicos futuros.

Sendo assim, os resultados dessa modalidade terapêutica podem ser considerados como promissores. O número crescente de aprovações de terapias gênicas no mundo e o grande interesse comercial no desenvolvimento de terapias avançadas indicam que a terapia gênica para anemia falciforme se tornará, nas próximas décadas, uma alternativa curativa ao TCTH-alo a ser considerada em tomadas de decisões da prática clínica.

REFERÊNCIAS

- ABHH. **Anemia falciforme**: diferenças de eficácia e eventos adversos nas vacinas antipneumocócica pneumo 23, pneumo 7 e pneumo 10-valente. 1. ed. [s.l.]: Associação Médica Brasileira, 2018. *E-book*. Disponível em: http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/43702/8810131_312361.pdf. Acesso em: 14 maio 2020.
- ABRASTA. **Retirar ou não o baço?** [S.l.], 2017. Disponível em: <https://www.abrasta.org.br/retirar-ou-nao-o-baco/>. Acesso em: 13 maio 2020.
- ABTO. **Histórico da ABTO**. Cerqueira César, 2001. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=460&c=902&s=0&friendly=historico-da-abto>. Acesso em: 23 mar. 2020.
- ABTO. **Registro Brasileiro de Transplantes**: Estatística de Transplantes. Cerqueira César, 2020. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=457&c=900&s=0>. Acesso em: 23 maio 2020.
- ACTON, Q. A. **Hemoglobin subunits**: advances in research and application. 1. ed. Atlanta: Scholarly Editions, 2011. *E-book*. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=YcJik4WfNkMC&pg=PT5&dq=Hemoglobin+Subunits:+Advances+in+Research+and+Application&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwjF2pCBrd_qAhUBK7kGHfJEA9gQ6AEwAHoECAAQAg#v=onepage&q=Hemoglobin%20Subunits%3A%20Advances%20in%20Research%20and%20Application&f=false. Acesso em: 21 jul. 2020.
- ADAMS, R. J. *et al.* Stroke prevention trial in sickle cell anemia. **Controlled Clinical Trials**, New York, v. 19, n. 1, p. 110–129, Feb. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9492971/>. Acesso em: 13 abr. 2020.
- ADAMS, R. J.; BRAMBILLA, D. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, Georgia, v. 353, n. 26, p. 2769–2778, Dec. 2005. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa050460>. Acesso em: 13 abr. 2020.
- AL-DOSARI, M. S.; GAO, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, United States of America, v. 11, n. 4, p. 671–681, Dec. 2009. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1208%2Fs12248-009-9143-y>. Acesso em: 30 ago. 2020.
- ALONSO, L. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients with β -thalassemia and sickle cell disease: an experience of the spanish working group for bone marrow transplantation in children (GETMON). **Medicina Clínica**, Spain, v. 152, n. 4, p. 135–140, Feb. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.12.010>. Acesso em: 14 jun. 2020.
- AMOR, D. Gene therapy: principles and potential applications. **Australian Family Physician**, Australia, v. 30, n. 10, p. 953–958, Oct. 2001. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/11647636_Gene_therapy_Principles_and_potential_applications. Acesso em: 29 ago. 2020.

ANGELUCCI, E. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. **Haematologica**, [s.l.], v. 99, n. 5, p. 811–820, May. 2014. Disponível em: <http://www.haematologica.org/content/99/5/811.full.pdf+html>. Acesso em: 1 jun. 2020.

ANVISA. **Aprovado primeiro produto de terapia avançada no Brasil**. Brasil, 2020. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/aprovado-primeiro-produto-de-terapia-avancada-no-brasil-219201/pop_up?inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dpop_up%26p_p_mode%3Dview%26p_r_p_564233524_tag%3Dterapia%2Bg%25C3%25AAnica. Acesso em: 29 ago. 2020.

ANVISA. **Doença falciforme**: manual do agente de saúde. 1. ed. [S.l.]: ANVISA, [2005?]. *E-book*. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anvisa/agente.pdf> Acesso em: 13 maio 2020.

ANVISA. **Manual diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2002. *E-book*. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anvisa/diagnostico.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2020.

ARNAOUT, K. *et al.* Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Cancer Investigation**, Washington, v. 32, n. 7, p. 349–362, Jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/07357907.2014.919301>. Acesso em: 6 jun. 2020.

ARTIOLI, G. G.; ROSÁRIO, D. C. H.; ANTONIO, H. L. J. Terapia gênica, doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 13, n. 5, p. 349–354, out. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbme/v13n5/13.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2020.

AZEVEDO, M. R. A. de. **Hematologia básica**: fisiopatologia e diagnóstico laboratorial. 6. ed. Rio de Janeiro: Thieme Revinter, 2019.

BABIKER, M. A. Prophylaxis of pneumococcal infection in sickle-cell disease by the combined use of vaccination and penicillin. **Annals of Tropical Paediatrics**, Saudi Arabia, v. 6, n. 3, p. 179–181, Mar. 1986. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2430506>. Acesso em: 24 abr. 2020.

BACH, F. H.; AMOS, D. B. Hu-1: Major histocompatibility locus in man. **Science**, United States of America, v. 156, n. 3781, p. 1506–1508, Jun. 1967. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4887739/>. Acesso em: 21 maio 2020.

BAIN, B. J. **Haemoglobinopathy Diagnosis**. 2. ed. Massachusetts. Blackwell, 2006. *E-book* Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=bl_SDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=haemoglobinopathy+diagnosis&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwiHqLTX_rboAhWeGbkGHepJDcYQ6AEIKDAA#v=onepage&q=haemoglobinopathy%20diagnosis&f=false. Acesso em: 25 mai. 2020.

BAMFORD-PERKINS, J. **Clinical manifestations and complications of sickle cell disease**. [S.l.], [2010-2020]. Disponível em:

<https://br.pinterest.com/pin/131659989078339997/>. Acesso em: 13 maio 2020

BANK, A.; MARKOWITZ, D.; LERNER, N. Gene transfer: a potential approach to gene therapy for sickle cell disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 565, n. 1, p. 37–43, Jul. 1989. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb24147.x>. Acesso em: 21 jul. 2020.

BARNES, D. W. H. *et al.* Treatment of Murine Leukaemia with X Rays and Homologous Bone Marrow. **British Medical Journal**, Harwell, v. 2, n. 4993, p. 626-627, Sept. 1956. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2035298/>. Acesso em: 19 maio 2020.

BATISTA, C. M. *et al.* Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Pernambuco, v. 43, n. 2, p. 167–179, jun. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n2/02.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2020.

BATISTA, V. *et al.* **Manejo de infecções em transplante de células tronco-hematopoiéticas**: Consenso da SBTMO. 1. ed. Brasil: SBTMO, 2015. E-book. Disponível em: https://sbtmo.com.br/userfiles/aulas/arquivo_20171030163043.pdf. Acesso em: 05 jun. 2020.

BAUER, D. E. *et al.* An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. **Science**, New York, v. 342, n. 6155, p. 253–257, Oct. 2013. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1126%2Fscience.1242088>. Acesso em: 21 jul. 2020.

BERNAUDIN, F. *et al.* Association of matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation with transcranial doppler velocities in children with sickle cell anemia. **Journal of the American Medical Association**, France, v. 321, n. 3, p. 266–276, Jan. 2019. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2721177>. Acesso em: 30 maio 2020.

BERNAUDIN, F. *et al.* Long-term event-free survival, chimerism and fertility outcomes in 234 patients with sickle-cell anemia younger than 30 years after myeloablative conditioning and matched-sibling transplantation in france. **Haematologica**, France, v. 105, n. 1, p. 91–101, Jan. 2020. Disponível em: <http://www.haematologica.org/content/105/1/91.full.pdf+html>. Acesso em: 14 jun. 2020.

BERTHOLO, Luciane Cristina; MOREIRA, Haroldo Wilson. Focalização isoelétrica na identificação das hemoglobinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, online, v. 42, n. 3, p. 163–168, jun. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n3/a04v42n3.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2020.

BIONINJA. **Gene Delivery Systems**. [S.l.], [2017?]. Disponível em: <https://ib.bioninja.com.au/options/untitled/b2-biotechnology-in-agricul/gene-delivery-systems.html>. Acesso em: 30 ago. 2020.

BIO-RAD. **Variant Sickle cell program**: 270-0500. 1. ed. Lagoa Santa: BIO-RAD, 2005. E-book. Disponível em: <http://www.bio->

rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/pt/270-0500_08-2005.pdf. Acesso em: 20 mar. 2020.

BIOTECHINVESTMENTS. **Clinical Trials**. [S.l.], 2020. Disponível em: <https://biotech-investments.com/clinical-trials/>. Acesso em: 1 oct. 2020.

BITINAITE, J. *et al.* Foki dimerization is required for DNA cleavage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States of America, v. 95, n. 18, p. 10570–10575, Sept. 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27935/>. Acesso em: 20 ago. 2020.

BOLAÑOS-MEADE, J.; BRODSKY, R. A. Blood and marrow transplantation for sickle cell disease: overcoming barriers to success. **Current Opinion in Oncology**, Baltimore, v. 21, n. 2, p. 158–161, Sept. 2009. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1097%2FCCO.0b013e328324ba04>. Acesso em: 1 jul. 2020.

BORTIN, M. M. A Compendium of reported human bone marrow transplants. **Transplantation**, Wisconsin, v. 9, n. 8, p. 571–589, Jun. 1970. Disponível em: https://journals.lww.com/transplantjournal/citation/1970/06000/a_compendium_of_reported_human_bone_marrow.6.aspx. Acesso em: 18 maio 2020.

BRAGA, J. A. P. *et al.* Guidelines on neonatal screening and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Project guidelines: Associação Médica Brasileira - 2016. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**, Brazil, v. 38, n. 2, p. 147–157, Apr. 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842016000200147&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 20 abr. 2020.

BRAGA, J. A. P.; APARECIDA, J.; BRAGA, P. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 233–238, Jul. 2007. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300009. Acesso em: 25 abr. 2020.

BRANDSMA, I.; GENT, D. C. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. **Genome Integrity**, The Netherlands, v. 3, n. 9, p. 1–10, 27 Nov. 2012. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1186%2F2041-9414-3-9>. Acesso em: 31 ago. 2020.

BRASIL. **Doença falciforme: diretrizes básicas da linha de cuidado**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015a. *E-book*. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_diretrizes_basicas_li nha_cuidado.pdf. Acesso em: 27 abr. 2020.

BRASIL. **Doença falciforme: orientação sobre o uso de sulfato ferroso em crianças**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015b. *E-book*. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_orientacao_uso_sulf ato_ferroso_crianças.pdf. Acesso em: 27 abr. 2020.

BRASIL. **Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997**. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento e dá outras providências. Brasília: Presidência da República, 1997. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9434.htm. Acesso em: 23 maio 2020.

BRASIL. **Manual de educação em saúde**: linha de cuidado em Doença Falciforme. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. *E-book*. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_educacao_saude_v2.pdf. Acesso em: 1 mar. 2020.

BRASIL. **Portaria conjunta nº 05, de 19 de fevereiro de 2018**. Aprovação do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença Falciforme. Brasília, 2018a. Disponível em: <http://portalmis.saude.gov.br/protocolos-e-diretrizes>. Acesso em: 31 mar. 2020.

BRASIL. **Portaria conjunta nº 7, de 23 de fevereiro de 2018**. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da sobrecarga de ferro. Brasília, 2018b. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2018/poc0007_01_03_2018.html. Acesso em: 19 abr. 2020.

BRASIL. **Portaria nº822, de 06 de junho de 2001**. Instituição, no âmbito do Sistema Único de Saúde, do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Gabinete do Ministro, 2001. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822_06_06_2001.html. Acesso em: 16 mar. 2020.

BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença Falciforme**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. *E-book*. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_PCDT_DoencaFalciforme.pdf. Acesso em: 13 de maio de 2013

BRASIL. Secretaria de Estado de Saúde. **Protocolo transfusional - indicação de hemocomponentes**. Brasília: Secretaria de Estado de Saúde, [2015?]. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/wp-conteudo/uploads/2018/04/HEMATOLOGIA-3-Ptransfusional_-_Indicacao_de_Hemocomponentes_Word.pdf. Acesso em: 14 maio 2020.

BRENDEL, C. *et al.* Preclinical evaluation of a novel lentiviral vector driving lineage-specific BCL11A knockdown for sickle cell gene therapy. **Molecular Therapy**, United States of America, v. 17, p. 589–600, Jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.03.015>. Acesso em: 6 set. 2020.

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 337, n. 11, p. 762–769, Sept. 1997. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199709113371107>. Acesso em: 2 abr. 2020.

CAMPBELL, M.; HENTHORN, J. S.; DAVIES, S. C. Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. **Clinical Chemistry**, London v. 45, n. 7, p. 969–975, Apr. 1999. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.483.84&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 26 abr. 2020

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 204–206, set. 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300002. Acesso em: 28 abr. 2020.

CANVER, M. C. *et al.* BCL11A enhancer dissection by cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. **Nature**, United States of America, v. 527, n. 7577, p. 192–197, Sept. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature15521>. Acesso em: 21 jul. 2020.

CARROLL, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. **Genetics**, Utah, v. 188, n. 4, p. 773–782, Aug. 2011. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1534%2Fgenetics.111.131433>. Acesso em: 23 jul. 2020.

CASTRIGNANO, S. B. Enzimas em biologia molecular. III. Tecnologia CRISPR-Cas9. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 27, p. 1–3, 2017. Disponível em: www.genscript.com/http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_27/27u_art-3.pdf-Cas9-technology-. Acesso em: 18 ago. 2020.

CASTRO JUNIOR, C. G. de. **Análise clínica e epidemiológica do transplante de medula óssea no serviço de oncologia pediátrica do hospital de clínicas de Porto Alegre**. 2012. Dissertação (mestre em pediatria) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002.

CHAMBERS, C. B. *et al.* The mRNA-binding protein IGF2BP1 restores fetal hemoglobin in cultured erythroid cells from patients with β -hemoglobin disorders. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 17, p. 429–440, 2020. Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501\(20\)30022-X](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501(20)30022-X). Acesso em: 29 set. 2020.

CHANG, K. H. *et al.* Long-term engraftment and fetal globin induction upon BCL11A gene editing in bone-marrow-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 4, p. 137–148, Jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28344999/>. Acesso em: 15 set. 2020.

CHARACHE, S. *et al.* Hydroxyurea and sickle cell anemia: clinical utility of a myelosuppressive “switching” agent. **Medicine**, Baltimore, v. 75, n. 6, p. 300–26, Nov. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982148>. Acesso em: 9 abr. 2020.

CHOU, S. T.; FASANO, R. M. Management of patients with sickle cell disease using transfusion therapy: guidelines and complications. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, Georgia, v. 30, n. 3, p. 591–608, Jun. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27112998/>. Acesso em: 3 abr. 2020.

CLINICALINFO. **Clinical Trial**. [s.l.], 2020. Disponível em: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/clinical-trial>. Acesso em: 1 out. 2020.

CLINICALTRIALS.GOV. **Gene therapy AND Sickle cell disease**. United States of America, 2020. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?pg=1&load=cart&id=NCT03282656+OR+NCT03964792+OR+NCT04293185+OR+NCT02247843+OR+NCT02186418+OR+NCT02633943+OR+NCT04091737+OR+NCT02140554+OR+NCT02151526+OR+NCT04443907+OR+NCT03745287>. Acesso em: 27 set. 2020.

CORBACIOGLU, S. *et al.* **Initial safety and efficacy results with a single dose of autologous crispr-cas9 modified CD34+ hematopoietic stem and progenitor**

cells in transfusion-dependent β -thalassemia and sickle cell disease. [S./], 2020. Disponível em:

https://library.ehaweb.org/eha/2020/eha25th/295100/selim.corbacioglu.initial.safety.and.efficacy.results.with.a.single.dose.of.html?f=menu%3D6%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D2%2Amedia%3D3%2Ace_id%3D1766%2Aot_id%3D23239%2Amarker%3D756%2Afeatured%3D16775. Acesso em: 27 set. 2020.

COSTA, F. F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K. Y. Anemia falciforme. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. 1. ed. São Paulo: Ateneu, 2013. p. 205-223. Disponível em:

<https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=1682842>. Acesso em 04. out. 2020.

CRUZ, K. R. P. da; SANTOS, A. C. F. dos. Assistência de enfermagem ao paciente submetido a transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). **Revista UNINGÁ**, Maringá, v. 37, n. 32, p. 135–146, Jul. 2013. Disponível em:

https://www.mastereditora.com.br/periodico/20131122_175358.pdf. Acesso em: 5 jun. 2020.

DALEY, J. **Gene Therapy Arrives**. United States of America, 2020. Disponível em:

<https://www.scientificamerican.com/article/gene-therapy-arrives/>. Acesso em: 29 ago. 2020.

DALLAS, M. H. *et al.* Long-term outcome and evaluation of organ function in pediatric patients undergoing haploidentical and matched related hematopoietic cell transplantation for sickle cell disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, United States of America, v. 19, n. 5, p. 820–830, May 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.02.010>. Acesso em: 15 jun. 2020.

DANI, S. U. Terapia gênica: vetores para terapia gênica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, [s./], p. 28–33, jan. 2000. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/287215848_Terapia_genica_Vetores_para_terapia_genica. Acesso em: 2 ago. 2020.

DE LA MORENA, M. T.; GATTI, R. A. A history of bone marrow transplantation.

Immunology and Allergy Clinics of North America, United States of America, v. 30, n. 1, p. 1–15, Feb. 2011. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889856109000848?via%3Dihub>. Acesso em: 18 maio 2020.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio.

Química Nova na Escola, [s./], v. 1, n. 7, p. 21–25, mai. 1998. Disponível em:

<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2020.

DEMIRCI, S.; UCHIDA, N.; TISDALE, J. F. Gene therapy for sickle cell disease: an update. **Cytotherapy**, Bethesda, v. 20, n. 7, p. 899–910, Jul. 2018. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324918304869>. Acesso em: 26 jul. 2020.

DENG, D. *et al.* Revisiting the TALE repeat. **Protein and cell**, [s./], v. 5, n. 4, p. 297–306, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13238-014-0035-2>. Acesso em: 17 ago. 2020.

DI NUZZO, D. V. P.; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 80, n. 5, p. 347–354, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jped/v80n5/v80n5a04.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2020.

DIGGS, L. W.; BRUEGGE, C. F. Vascular Occlusive Mechanisms in Sickle Cell Disease. **Journal of the National Medical Association**, Tennessee, v. 46, n. 1, p. 46–49, 1954. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13118358>. Acesso em: 4 fev. 2020.

DORNELLES, E. B. *et al.* Transfecção de DNA de boHV-5 com fosfato de cálcio em diferentes tipos de cultivos celulares. **Acta Scientiae Veterinariae**, Rio Grande do Sul, v. 38, n. 1, p. 31–35, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.16481>. Acesso em: 29 ago. 2020.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, [s.l.], v. 346, n. 6213, p. 1258096-1 - 1258096–9, Nov. 2014. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1258096>. Acesso em: 19 ago. 2020.

DUNBAR, C. E. *et al.* Gene Therapy Comes of Age. **Science**, [s.l.], v. 359, n. 6372, p. 1–10, Jan. 2018. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/359/6372/eaan4672>. Acesso em: 23 ago. 2020.

EGGLESTON, B. *et al.* Effect of myeloablative bone marrow transplantation on growth in children with sickle cell anaemia: results of the multicenter study of haematopoietic cell transplantation for sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, California, v. 136, n. 4, p. 673–676, Feb. 2007. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2006.06486.x>. Acesso em: 14 jun. 2020.

EPSTEIN, R. B. *et al.* Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. **Transplantation**, Washington, v. 6, n. 1, p. 45–58, Jan. 1968. Disponível em: https://journals.lww.com/transplantjournal/Abstract/1968/01000/CYTOTOXIC_TYPING_ANTISERA_FOR_MARROW_GRAFTING_IN.5.aspx. Acesso em: 21 maio 2020.

EPSTEIN, R. B.; BRYANT, J.; THOMAS, E. D. Cytogenetic demonstration of permanent tolerance in adult outbred dogs. **Transplantation**, Washington, v. 5, n. 2, p. 267–272, Mar. 1967. Disponível em: https://journals.lww.com/transplantjournal/Abstract/1967/03000/Cytogenetic_Demonstration_of_Permanent_Tolerance.15.aspx. Acesso em: 20 maio 2020.

FASANO, R. M. *et al.* Genotyping applications for transplantation and transfusion management: the emory experience. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, United States of America, v. 141, n. 3, p. 329–340, Mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0277-SA>. Acesso em: 3 jun. 2020.

FDA. **FDA approval brings first gene therapy to the United States**. United States of America, 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approval-brings-first-gene-therapy-united-states>. Acesso em: 29 ago. 2020.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São

Paulo, v. 32, n. 3, p. 203–208, jun. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000300006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 26 abr. 2020.

FERREIRA, A. B. de H. **Mini Aurélio**: o dicionário da língua portuguesa. 8. ed. Curitiba: Positivo, 2010.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, United States of America, v. 31, n. 7, p. 397–405, Jul. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167779913000875>. Acesso em: 23 jul. 2020.

GALVÃO, C. (org.). **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. [S.l.]: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. E-book. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=S-mgCwAAQBAJ&pg=PA263&lpg=PA263&dq=In+vivo+ocorre+ou+tem+lugar+dentro+de+um+organismo&source=bl&ots=XRrHR52IL9&sig=ACfU3U1Jhcl8i8dLTBe9zs_wJ Mj-STx77Q&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwi43cLovbTmAhXUBtQKHVV1DtEQ6AEwCnoECAoQAQ#v=onepage&q=In vivo ocorre ou tem lugar dentro de um organismo&f=false. Acesso em: 1 out. 2020.

GASTON, M. H. *et al.* Prophylaxis with Oral Penicillin in Children with Sickle Cell Anemia. **New England Journal of Medicine**, Bethesda, v. 314, n. 25, p. 1593–1599, Jun. 1986. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3086721>. Acesso em: 16 mar. 2020.

GATTI, R. A. *et al.* Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. **Lancet**, United States of America, v. 2, n. 7583, p. 1366–1369, Dec. 1968. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(68\)92673-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(68)92673-1/fulltext). Acesso em: 22 maio 2020.

GAUTHIER, E. *et al.* Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation of Lutheran/Basal Cell Adhesion Molecule Glycoprotein Regulates Cell Adhesion to Laminin A5. **Journal of Biological Chemistry**, Paris, v. 280, n. 34, p. 30055–30062, Aug. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15975931>. Acesso em: 11 maio 2020.

GHIMIRE, S. *et al.* Pathophysiology of GvHD and other HSCT-related major complications. **Frontiers in Immunology**, Germany, v. 8, n. 79, p. 1–11, Mar. 2017. Disponível em: <https://www.readcube.com/articles/10.3389/fimmu.2017.00079>. Acesso em: 6 jun. 2020.

GLUCKMAN, E. *et al.* Sickle Cell Disease: An International Survey of Results of HLA-Identical Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Blood**, Paris, v. 129, n. 11, p. 1548–1556, Mar. 2017. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood-2016-10-745711>. Acesso em: 1 jun. 2020.

GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. de M. A. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. **Einstein**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 369–375, jul. 2017. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1679-45082017000300369&script=sci_arttext&lng=pt. Acesso em: 28 ago. 2020.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e Metabolismo Do Ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Campinas, v. 32, suppl. 2, p. 8–17, jun. 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000800003&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 19 abr. 2020.

GUDA, S. *et al.* MiRNA-embedded shRNAs for lineage-specific BCL11A knockdown and hemoglobin F induction. **Molecular Therapy**, Boston, v. 23, n. 9, p. 1465–1474, Sept. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mt.2015.113>. Acesso em: 21 jul. 2020.

HAYAKAWA, E. H.; MATSUOKA, H. Detailed Methodology for High Resolution Scanning Electron Microscopy (SEM) of Murine Malaria Parasitized-Erythrocytes. **Parasitology International**, Tochigi, v. 65, n. 5, p. 539–544, Oct. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576916300265?via%3Dihub>. Acesso em: 15 fev. 2020.

HELENA, M.; FERRAZ, C.; MURAO, M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 218–222, set. 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300005&lang=pt. Acesso em: 18 mar. 2020.

HEMORIO. **Protocolos de tratamento: Hematologia e Hemoterapia**. 2.ed. Rio de Janeiro: HEMORIO, 2014. *E-book*. Disponível em: <http://www.hemorio.rj.gov.br/protocolo.pdf>. Acesso em: 14 maio 2020.

HEMOTERAPIA 9 DE JULHO. **Aférese terapêutica**. Cerqueira César, [2015?]. Disponível em: http://www.hemoterapia9dejulho.com.br/servicos_afereze.asp. Acesso em: 19 abr. 2020.

HERRICK, J. B. Classics of Biology and Medicine: Peculiar Elongated and Sickle-Shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. **Yale journal of biology and medicine**, Connecticut, v. 74, n. 3, p. 179–84, May. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588723/>. Acesso em: 9 maio 2020.

HIDROXIUREIA: Cápsula dura – 500 mg. Responsável Técnico Telma Elaine Spina. Hortolândia, SP: Indústria Brasileira; 2018. Bula de remédio.

HINES, P. C. *et al.* Novel Epinephrine and Cyclic AMP-Mediated Activation of BCAM/Lu-Dependent Sickle (SS) RBC Adhesion. **Blood**, Chapel Hill, v. 101, n. 8, p. 3281–3287, Apr. 2003. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood-2001-12-0289>. Acesso em: 11 maio 2020.

HOBAN, M. D. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated correction of the sickle mutation in human CD34+ cells. **Molecular Therapy**, California, v. 24, n. 9, p. 1561–1569, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1038%2Fmt.2016.148>. Acesso em: 15 out. 2019.

HOBAN, M. D.; ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. **Blood**, Boston, v. 127, n. 7,

p. 839–848, Feb. 2016. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/127/7/839/1354060/839.pdf>. Acesso em: 9 jul. 2020.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. Dactilite em criança com anemia falciforme [fotografia], 2008a.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. **Fundamentos em hematologia**. 2. ed. São Paulo: Artmed, 2008b.

HOPPE, C.; NEUMAYR, L. Sickle cell disease: monitoring, current treatment, and therapeutics under development. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, Okakland, v. 33, n. 3, p. 355–371, Jun. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31030807>. Acesso em: 2 abr. 2020.

HOWARD, C. A. *et al.* Recommendations for donor human leukocyte antigen assessment and matching for allogeneic stem cell transplantation: consensus opinion of the blood and marrow transplant clinical trials network (BMT CTN). **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Minneapolis, v. 21, n. 1, p. 4–7, Jan. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4272893/>. Acesso em: 3 jun. 2020.

HSIEH, M. M.; FITZHUGH, C. D.; TISDALE, J. F. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: the time is now. **Blood**, Bethesda, v. 118, n. 5, p. 1197–1207, Aug. 2011. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood-2011-01-332510>. Acesso em: 25 maio 2020.

HSIEH, M. M.; TISDALE, J. F. Hematopoietic stem cell mobilization with plerixafor in sickle cell disease. **Haematologica**, Bethesda, v. 103, n. 5, p. 749–750, Apr. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5927977/>. Acesso em: 16 jul. 2020.

HUANG, X. *et al.* Production of gene-corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation. **Stem Cells**, United States of America, v. 33, n. 5, p. 1470–1479, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25702619/>. Acesso em: 18 set. 2020.

HUISMAN, T. H. J. Separation of hemoglobins and hemoglobin chains by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam v. 418, n. 3626, p. 277–304, nov. 1987. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378434787800129>. Acesso em: 24 mai. 2020.

HULBERT, M. L.; SHENOY, S. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: progress and challenges. **Pediatric Blood and Cancer**, Missouri, v. 65, n. 9, p. 1–10, Sept. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29797658/>. Acesso em: 1 jul. 2020.

INCA. **Tópicos em transplante de células-tronco hematopoéticas**. 1. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012. *E-book*. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//topicos-transplantes-medula.pdf>. Acesso em: 22 maio 2020.

JAYAVARADHAN, R.; MALIK, P. Genetic therapies for sickle cell disease. **Pediatric**

Clinics of North America, [s.l.], v. 65, n. 3, p. 465–480, 1 Jun. 2018. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/29803277>. Acesso em: 26 jul. 2020.

JENKINS, Margaret A.; RATNAIKE, Sujiva. Capillary isoelectric focusing of haemoglobin variants in the clinical laboratory. **Clinica Chimica Acta**, Australia, v. 289, n. 1-2, p. 121–132, Nov. 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898199001679>. Acesso em: 22 mar. 2020.

JOHN, A. B. *et al.* Prevention of Pneumococcal Infection in Children with Homozygous Sickle Cell Disease. **British Medical Journal**, Jamaica, v. 288, n. 6430, p. 1567–1570, May. 1984. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1441216/>. Acesso em: 24 abr. 2020.

JOHNSON, F. L. *et al.* Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. **New England Journal of Medicine**, Memphis, v. 311, n. 12, p. 780–783, Sept. 1984. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198409203111207>. Acesso em: 22 maio 2020.

KASSIM, A. A.; SHARMA, D. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: the changing landscape. **Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy**, Tennessee, v. 10, n. 4, p. 259–266, Dec. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658387617300444?via%3Dihub>. Acesso em: 25 maio 2020.

KATO, G. J. *et al.* Sickle Cell Disease. **Nature Reviews Disease Primers**, Pittsburg, v. 4, n. 18010, p. 1–22, Mar. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201810>. Acesso em: 13 maio 2020.

KRISHNAMURTI, L. *et al.* Availability of unrelated donors for hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies. **Bone Marrow Transplantation**, Pennsylvania, v. 31, n. 7, p. 547–550, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703887>. Acesso em: 4 jun. 2020.

KRISHNAMURTI, L. *et al.* Bone marrow transplantation for adolescents and young adults with sickle cell disease: results of a prospective multicenter pilot study. **American Journal of Hematology**, Atlanta, v. 94, n. 4, p. 446–454, Apr. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ajh.25401>. Acesso em: 30 maio 2020.

KRISHNAMURTI, L. Hematopoietic cell transplantation for sickle cell disease: state of the art. **Expert Opinion on Biological Therapy**, Pittsburgh, v. 7, n. 2, p. 161–172, Feb. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17250455/>. Acesso em: 5 jul. 2020.

KUHNEN, A. E. **A unidade de transplantes de medula óssea em Santa Catarina: a contribuição das enfermeiras (1997-2009)**. 2014. Dissertação (Mestre em Enfermagem) - Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Anemia falciforme – Esfregaço de sangue periférico [fotografia]. 2013a.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013b.

LANZKRON, S.; CARROLL, C. P.; HAYWOOD, C. Mortality Rates and Age at Death from Sickle Cell Disease: U.S., 1979-2005. **Public Health Reports**, Baltimore, v. 128, n. 2, p. 110–116, Mar. 2013. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/003335491312800206>. Acesso em: 13 mar. 2020.

LEONARD, A.; TISDALE, J.; ABRAHAM, A. Curative options for sickle cell disease: haploidentical stem cell transplantation or gene therapy? **British Journal of Haematology**, Washington, v. 189, n. 3, p. 408–423, May. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.16437>. Acesso em: 6 jul. 2020.

LETVIN, N. L. *et al.* Augmentation of fetal-hemoglobin production in anemic monkeys by hidroxyurea. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 310, n. 14, p. 869–873, Apr. 1984. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198404053101401>. Acesso em: 24 abr. 2020

LEVASSEUR, D. N. *et al.* Correction of a mouse model of sickle cell disease: lentiviral/ antisickling β -globin gene transduction of unmobilized, purified hematopoietic stem cells. **Blood**, Birmingham, v. 102, n. 13, p. 4312–4319, Dec. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1251>. Acesso em: 21 jul. 2020.

LI, C. *et al.* Novel HDAd/EBV reprogramming vector and highly efficient ad/crispr-cas sickle cell disease gene correction. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 30422, p. 1–10, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27460639/>. Acesso em: 6 set. 2020.

LI, C. *et al.* Reactivation of γ -globin in adult B-YAC mice after ex vivo and in vivo hematopoietic stem cell genome editing. **Blood**, [s.l.] v. 131, n. 26, p. 2915–2928, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29789357/>. Acesso em: 29 set. 2020.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 31–69, 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300004. Acesso em: 18 set. 2020.

LITTLE, M. T.; STORB, R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 231–238, Mar. 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc748>. Acesso em: 19 maio 2020.

LOCATELLI, F.; PAGLIARA, D. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. **Pediatric Blood & Cancer**, Italy, v. 59, n. 2, p. 372–376, Aug. 2012. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.24177>. Acesso em: 5 jul. 2020.

LONZA. **Cell and Gene Therapy**. [S.l.], [2019?]. Disponível em: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/cell-and-gene-therapy. Acesso em: 1 set. 2020.

LORENZ, E.; CONGDON, C.; UPHOFF, D. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. **Radiology**, Chicago, v. 58, n. 6, p. 863–877, Jun. 1951. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14941986>. Acesso em: 18 maio 2020.

LUCARELLI, G. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia and sickle cell anemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Italy, v. 2, n. 5, p. 1–12, May. 2012. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a011825>. Acesso em: 5 jul. 2020.

MAEDER, M. L.; GERSBACH, C. A. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. **Molecular Therapy**, United States of America, v. 24, n. 3, p. 430–446, Feb. 2016. Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/pdf/S1525-0016\(16\)30961-3.pdf](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/pdf/S1525-0016(16)30961-3.pdf). Acesso em: 31 ago. 2020

MANNICK, J. A. *et al.* Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. **Blood**, New York, v. 15, n. 2, p. 255–266, Feb. 1960. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/15/2/255/37248/Autografts-of-Bone-Marrow-in-Dogs-After-Lethal>. Acesso em: 20 maio 2020.

MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-Occlusion in Sickle Cell Disease: Pathophysiology and Novel Targeted Therapies. **Blood**, New York, v. 122, n. 24, p. 3892–3898, Dec. 2013. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/122/24/3892/1370308/3892.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2020.

MARSELLA, M.; BORGNA-PIGNATTI, C. Transfusional iron overload and iron chelation therapy in thalassemia major and sickle cell disease. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s.l.], v. 28, n. 4, p. 703–727, Aug. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25064709/>. Acesso em: abr. 2020.

MASON, K. *et al.* Newborn screening for sickle cell disease: jamaican experience. **West Indian Medical Journal**, Jamaica v. 65, n. 1, p. 18–26, Nov. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26901597>. Acesso em: 20 mar. 2020.

MCCUNE, S. L. *et al.* Recombinant human hemoglobins designed for gene therapy of sickle cell disease. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, United States of America. v. 91, n. 21, p. 9852–9856, Oct. 1994. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1073%2Fpnas.91.21.9852>. Acesso em: 21 jul. 2020.

METOTREXATO: comprimido - 25 mg. Marcia da Costa Pereira. Buenos Aires: Asofarma S.A.I.Y.C.; 2019. Bula de remédio.

MORRIS, C. R. *et al.* Dysregulated Arginine Metabolism, Hemolysis-Associated Pulmonary Hypertension, and Mortality in Sickle Cell Disease. **Journal of the American Medical Association**, Oakland, v. 294, n. 1, p. 81–90, Jul. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15998894>. Acesso em: 11 maio 2020.

MORRIS, C. R. Mechanisms of Vasculopathy in Sickle Cell Disease and Thalassemia. **American Society of Hematology**, Oakland v. 2008, n. 1, p. 177–185, Jan. 2008. Disponível em: <https://ashpublications.org/hematology/article-lookup/doi/10.1182/asheducation-2008.1.177>. Acesso em: 2 maio 2020.

MYNAREK, M. *et al.* Normalized transcranial doppler velocities, stroke prevention and improved pulmonary function after stem cell transplantation in children with sickle cell anemia. **Klinische Padiatrie**, Germany, v. 225, n. 3, p. 127–132, Apr. 2013. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0033-1333754>. Acesso em: 14 jun. 2020.

NARDI, N. B.; TEIXEIRA, L. A. K.; SILVA, E. F. Á. da. Terapia gênica. **Ciência & Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 109–116, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232002000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 16 jul. 2020.

NEIDLINGER, N. A. *et al.* Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase a2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction. **Journal of Biological Chemistry**, Oakland, v. 281, n. 2, p. 775–781, Jan. 2006. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/281/2/775.long>. Acesso em: 11 maio 2020.

NEMUDRYI, A. A. *et al.* TALEN and CRISPR/cas genome editing systems: tools of discovery. **Acta Naturae**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 20–40, 2014. Disponível em: <http://actanaturae.ru/2075-8251/article/view/10529>. Acesso em: 17 ago. 2020.

NOWOGRODZKI, A. **Medicine is in the blood**. [S.l.], 2018. Disponível em: <https://media.nature.com/original/magazine-assets/d41586-018-07646-w/d41586-018-07646-w.pdf>. Acesso em: 6 set. 2020.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

OHENE-FREMPONG, K. *et al.* Cerebrovascular Accidents in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors. **Blood**, Philadelphia, v. 91, n. 1, p. 288–294, Jan. 1998. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/91/1/288/260307/Cerebrovascular-Accidents-in-Sickle-Cell-Disease>. Acesso em: 6 mar. 2020.

OLIVEIRA, B. de A. *et al.* Vetores virais para uso em terapia gênica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Pará, v. 9, n. 2, p. 57–66, Jun. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232018000200008>. Acesso em: 29 ago. 2020.

OLIVEIRA, R. A. F. de. **Antígenos leucocitários humanos (HLA) na avaliação imunológica para a seleção de receptor-doador para transplantes**, 2014. Tese (Doutor em Bioinformática) - Pós-Graduação em Bioinformática, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2014

OSGOOD, E. E.; RIDDLE, M. C.; MATHEWS, T. J. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report case reporte. **Annals of Internal Medicine**, Oregon, v. 13, n. 2, p. 357–367, Aug. 1939. Disponível em: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/0003-4819-13-2-357>. Acesso em: 17 maio. 2020.

PARK, S. H. *et al.* Highly efficient editing of the β -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 15, p. 7955–7972, Sept. 2019. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkz475>. Acesso em: 21 jul. 2020.

PÁSZTY, C. *et al.* Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. **Science**, [s.l.] v. 278, n. 5339, p. 876–878, Oct. 1997. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/278/5339/876>. Acesso em: 19 jul. 2020.

PEARSON, H. A. Sickle Cell Anemia and Severe Infections Due to Encapsulated Bacteria. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 136, p. S25–S30, Aug. 1977. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/330779>. Acesso em: 24 abr. 2020.

PEREIRA, N. F. *et al.* Seleção de Doador de Medula Óssea Ou Sangue Periférico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, Suppl. 1, p. 3–5, Maio. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000022>. Acesso em: 3 jun. 2020.

PERRY, A. R.; LINCH, D. C. The history of bone-marrow transplantation. **Blood Reviews**, London, v. 10, n. 4, p. 215–219, Dec. 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268960X96900041>. Acesso em: 18 maio 2020.

PESTINA, T. I. *et al.* Correction of murine sickle cell disease using γ -globin lentiviral vectors to mediate high-level expression of fetal hemoglobin. **Molecular Therapy**, Tennessee, v. 17, n. 2, p. 245–252, Feb. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mt.2008.259>. Acesso em: 21 jul. 2020.

PIERONI, F. *et al.* Transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) em doenças falciformes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 326–330, Jul. 2007. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300026&lang=pt. Acesso em: 25 maio. 2020.

PIKPNG. **Recombination Strategies**. [S.l.], [2019?]. Disponível em: <https://www.pikpng.com/transpng/bxToRx/>. Acesso em: 31 ago. 2020.

PIMENTEL, F. S. **Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à da hemoglobina S no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG)**. 2010. Dissertação. (Mestrado em Medicina na especialidade em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: https://www.nupad.medicina.ufmg.br/wp-content/uploads/2016/12/Dissertacao_FernandaPimentel.pdf. Acesso em: 26 abr. 2020.

PLATT, O. S. *et al.* Mortality in Sickle Cell Disease: Life Expectancy and Risk Factors for Early Death. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 330, n. 23, p. 1639–1644, Jun. 1994. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199406093302303>. Acesso em: 13 mar. 2020.

PLATT, O. S.; ORKIN, S. H.; DOVER, G. Hydroxyurea enhanced fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **Journal of Clinical Investigation**, Washington, v. 74, n. 2, p. 652–656, Aug. 1984. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6205021/>. Acesso em: 14 maio 2020.

POLETTI, V. *et al.* Pre-clinical development of a lentiviral vector expressing the anti-sickling β AS3 globin for gene therapy for sickle cell disease. **Molecular Therapy**, [s.l.] v. 11, p. 167–179, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.10.014>. Acesso em: 01 out. 2020.

PRADO, F. C. do; RAMOS, J. de A.; VALLE, J. R. do. **Atualização Terapêutica: Diagnóstico e Tratamento**. 26. ed. Brasil: Artes Médicas, 2018. E-book. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=HWU9DwAAQBAJ&pg=PA2056&lpg=PA2056&dq=2+a+3+semanas+TCTH&source=bl&ots=tZjEBi-ZDN&sig=ACfU3U2iNsr5EcBZEx0qaDCD6N0JqQhvhg&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwiG76u1p-vpAhUiHrkGHbu8C7AQ6AEwAHoECAkQAQ#v=onepage&q=2 a 3 semanas TCTH&f=false>. Acesso em: 05 jun. 2020

RAPAPORT, S. I. **Hematologia: Introdução**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1989.

REDOME. **Conheça o REDOME**: Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea. Rio de Janeiro, [2018]. Disponível em: <http://redome.inca.gov.br/o-redome/conheca-o-redome/>. Acesso em: 23 maio 2020.

REGIONAL COMMITTEE FOR AFRICA, 60., 2010, Malabo. **Sickle-cell disease: a strategy for the who african region**. Malabo: World Health Organization, 2010. Disponível em: https://www.afro.who.int/sites/default/files/2017-06/afr_rc60_8.pdf. Acesso em: 28 abr. 2020.

REKSUA, V. M. **Diretrizes para cuidados paliativos prestados a pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas**. Dissertação (Mestre em Enfermagem) - Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Curitiba, 2015.

RIBEIL, J. A. *et al.* Gene therapy in a patient with sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, United States of America, v. 376, n. 9, p. 848–855, Mar. 2017. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1609677>. Acesso em: 26 out. 2019.

RIGHETTI, Pier Giorgio. **Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Application**. 1. ed. Italy: Elsevier, 2000. *E-book*. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=Nvs2kxOINWIC&printsec=frontcover&dq=isoelectric+focusing&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjK6peL4a7oAhUtLLkGHUXEA6YQ6AEIKDAA#v=onepage&q=isoelectric+focusing&f=false>. Acesso em: 22 mar. 2020.

RIUL, S.; AGUILLAR, M Contribuição à organização de serviços de transplante de medula óssea e a atuação do enfermeiro. **Revista Latinoamericana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 1, p. 49–58, Jan. 1997. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rlae/v5n1/v5n1a06.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2020.

ROMERO, Z.; DEWITT, M.; WALTERS, M. C. Promise of gene therapy to treat sickle cell disease. **Expert Opinion on Biological Therapy**, California, v. 18, n. 11, p. 1123–1136, Nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1536119>. Acesso em: 5 dez. 2019.

ROTHER, R. P. *et al.* The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin: A Novel Mechanism of Human Disease. **Journal of the American Medical Association**, Bethesda, v. 293, n. 13, p. 1653–1662, Apr. 2005. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/200611>. Acesso em: 11 maio 2020.

RUSSELL, M. O. *et al.* Effect of transfusion therapy on arteriographic abnormalities and on recurrence of stroke in sickle cell disease. **Blood**, Philadelphia, v. 63, n. 1, p. 162–169, Jan. 1984. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6689947/>. Acesso em: 19 abr. 2020.

SANTA CASA DE MISERICÓRDIA. **Anemia falciforme: um problema de saúde pública**. São Paulo, 2018. Disponível em: <https://santacasasp.org.br/portal/site/pub/12482/anemia-falciforme--um-problema-de-saude-publica>. Acesso em: 28 abr. 2020.

SANTOS, D. **Clonagem gênica**. [S.l.], 2011. Disponível em: <https://djalmasantos.wordpress.com/2011/02/26/clonagem-genica-2/>. Acesso em: 30 ago. 2020.

SANTOS, G. W. *et al.* Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. **New England Journal of Medicine**, Baltimore, v. 309, n. 22, p. 1347–1353, Dec. 1983. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198312013092202>. Acesso em: 23 maio 2020.

SEBASTIANO, V. *et al.* In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. **Stem Cells**, United States of America, v. 29, n. 11, p. 1717–1726, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21898685/>. Acesso em: 26 jul. 2020.

SHENOY, S. *et al.* Current results and future research priorities in late effects after hematopoietic stem cell transplantation for children with sickle cell disease and thalassemia: a consensus statement from the second pediatric blood and marrow transplant consortium international conference on late effects after pediatric hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Missouri, v. 23, n. 4, p. 552–561, Apr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.01.009>. Acesso em: 14 jun. 2020.

SHENOY, S. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: current practice and emerging trends. **American Society of Hematology**, Missouri, v. 2011, n. 1, p. 273–279, Dec. 2011. Disponível em: <https://ashpublications.org/hematology/article-lookup/doi/10.1182/asheducation-2011.1.273>. Acesso em: 25 maio 2020.

SILVA, A. M.; NETO, L. M. R.; SANTOS, P. C. J. DE L. **Hematologia: Métodos e Interpretação**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2017.

SIMÕES, B. P. *et al.* Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, supl. 1, p. 46–53, maio. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000700009. Acesso em: 28 abr. 2020.

SINGER, K. The Pathogenesis of Sick Cell Anemia: A Review. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 21, n. 9, p. 858–865, Sept. 1951. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1093/ajcp/21.9.858>. Acesso em: 4 fev. 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES. **Calendário de vacinação: pacientes especiais**. 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Imunizações, 2019. E-book. Disponível em: <https://sbim.org.br/images/calendarios/calend-sbim-pacientes-especiais.pdf>. Acesso em: 14 maio 2020.

SOUZA, G. de P. e S. C. M. de. **Caracterização epidemiológica e estudo de fármacos utilizado em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea em um hospital público de Curitiba – Paraná**. 2017. Dissertação (Mestre em Saúde Coletiva) - Programa de Pós Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

STEMCELL. **Genome editing with direct Cas9 RNP delivery design considerations**. [S.l.], 2020 Disponível em: <https://www.stemcell.com/design-considerations-for-the-arcitect-crispr-cas9-genome-editing-system.html>. Acesso em: 18 ago. 2020.

STORB, R. *et al.* Marrow grafts by combined marrow and leukocyte infusions in unrelated dogs selected by histocompatibility typing. **Transplantation**, Washington, v. 6, n. 4, p. 587–593, Jul. 1968. Disponível em: https://journals.lww.com/transplantjournal/Abstract/1968/07000/MARROW_GRAFTS_BY_COMBINED_MARROW_AND_LEUKOCYTE.11.aspx. Acesso em: 21 maio 2020.

STORB, R. *et al.* Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. **New England Journal of Medicine**, Seattle, v. 314, n. 12, p. 729–735, Mar. 1986. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198603203141201>. Acesso em: 23 maio 2020.

STROUSE, J. Sick Cell Disease. **Handbook of Clinical Neurology**, Durham, v. 138, n. 3, p. 311–324, Sept. 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029732000185>. Acesso em: 1 mar. 2020.

SUN, N.; ZHAO, H. Seamless correction of the sickle cell disease mutation of the HBB gene in human induced pluripotent stem cells using TALENs. **Biotechnology and Bioengineering**, Illinois, v. 111, n. 5, p. 1048–1053, May 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23928856/>. Acesso em: 18 set. 2020.

TAKEKOSHI, K. J. *et al.* Retroviral transfer of a human (8-globin/6-globin hybrid gene linked to f8 locus control region hypersensitive site 2 aimed at the gene therapy of sickle cell disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Boston, v. 92, n. 1, p. 3014–3018, Mar. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.3014>. Acesso em: 21 jul. 2020.. Acesso em: 21 jul. 2020.

TANG, R.; XU, Z. Gene therapy: a double-edged sword with great powers. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s.l.], p. 1–9, Jul. 2020. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-020-03834-3>. Acesso em: 30 ago. 2020.

TELEN, M. J. Curative vs targeted therapy for SCD: does it make more sense to address the root cause than target downstream events? **Blood Advances**, v. 4, n. 14, p. 3457–3465, Jul. 2020. Disponível em: <https://ashpublications.org/bloodadvances/article-pdf/4/14/3457/1750266/advancesadv2020001469c.pdf>. Acesso em: 3 set. 2020.

TELEN, M. J. Mechanisms behind Adhesive Erythrocytes in Sickle-Cell Disease. **ISBT Science Series**, Durham, v. 7, n. 1, p. 197–201, Jul. 2012. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-2824.2012.01547.x>. Acesso em: 2 maio 2020.

TELEN, M. J. Role of Adhesion Molecules and Vascular Endothelium in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease. **American Society of Hematology**, Washington, v. 2007, n. 1, p. 84–90, Jan. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024614>. Acesso em: 2 maio 2020.

TENDELOO, V. Van; BROECKHOVEN, C. Van; BERNEMAN, Z. Gene therapy: principles and applications to hematopoietic cells. **Leukemia**, Belgium, v. 15, n. 4, p. 523–544, May 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402085>. Acesso em: 30 ago. 2020.

THE NOBEL PRIZE. **Press release: the Nobel prize in Chemistry 2020**.

Stockholm, 2020. Disponível em:

<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>. Acesso em: 14 out. 2020.

THE NOBEL PRIZE. **The Nobel prize in Physiology or Medicine 1990**. Stockholm, 1990 Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1990/summary/>. Acesso em: 22 maio 2020.

THOMAS, E. D. A history of haemopoietic cell transplantation. **British Journal of Haematology**, Seattle, v. 105, n. 2, p. 330–339, May. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10233401/>. Acesso em: 22 maio 2020.

THOMAS, E. D. Bone marrow transplantation: a historical review. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 1, p. 209–218, Jul. 2000. Disponível em: http://revista.fmrp.usp.br/2000/vol33n3/bone_marrow_transplantation.pdf. Acesso em: 18 maio 2020.

THOMAS, E. D. *et al.* Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **The New England Journal of Medicine**, New York, v. 257, n. 11, p. 491–496, Sept. 1957. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM195709122571102>. Acesso em: 16 maio 2020.

THOMAS, E. D. *et al.* Marrow transplantation for thalassaemia. **The Lancet**, [s.l.], v. 320, n. 8292, p. 227–229, Jul. 1982. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(82\)90319-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(82)90319-1/fulltext). Acesso em: 22 maio 2020.

THOMAS, E. D. *et al.* Marrow transplants in lethally irradiated dogs given methotrexate. **Blood**, New York, v. 19, n. 2, p. 217–228, Feb. 1962. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/19/2/217/37448>. Acesso em: 20 maio 2020.

THOMAS, E. D. *et al.* Significance of blood groups in homotransplantation of marrow in the dog. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 120, n. 1, p. 362–366, Dec. 1964. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1964.tb34735.x>. Acesso em: 20 maio 2020.

THORNBURG, C. D. *et al.* Impact of hydroxyurea on clinical events in the BABY HUG trial. **Blood**, United States of America, v. 120, n. 22, p. 4304–4310, Nov. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507142/>. Acesso em: 9 abr. 2020.

UNITED STATES OF AMERICA. National Institutes of Health. **The management of sickle cell disease**. 4. ed. Bethesda: NIH, 2002. *E-book*. Disponível em: https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/sc_mngt.pdf. Acesso em: 16 mar. 2020.

URBINATI, F. *et al.* Potentially therapeutic levels of anti-sickling globin gene expression following lentivirus-mediated gene transfer in sickle cell disease bone marrow CD34+ cells. **Experimental Hematology** [s.l.], v. 43, n. 5, p. 346–351, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2015.01.009>. Acesso em: 1 out. 2020.

URBINATI, F. *et al.* Preclinical studies for a phase 1 clinical trial of autologous hematopoietic stem cell gene therapy for sickle cell disease. **Cytotherapy**, [s.l.] v. 19, n. 9, p. 1096–1112, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.06.002>. Acesso em: 1 out. 2020.

VASCONCELOS, M. J. V. de; FIGUEIREDO, J. E. F. **Edição de genoma com nuclease “zinc finger”**. 1. ed. Minas Gerais: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. *E-book*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1059977/edicao-de-genoma-com-nuclease-zinc-finger>. Acesso em: 1 set. 2020.

VASCONCELOS, M. J. V. de; FIGUEIREDO, J. E. F. **Tecnologia CRISPR-Cas para edição genômica**. 1. ed. Minas Gerais: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. *E-book*. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/149707/1/doc-197.pdf>. Acesso em: 1 set. 2020.

VERYWELLHEALTH. **Benefits and risks of gene therapy for sickle cell**. [S.l.], 2020. Disponível em: <https://www.verywellhealth.com/gene-therapy-for-sickle-cell-disease-4588187>. Acesso em: 3 set. 2020.

VIERSTRA, J. *et al.* Functional footprinting of regulatory DNA. **Nature Methods**, Washington, v. 12, n. 10, p. 927–930, Sept. 2015. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1038%2Fnmeth.3554>. Acesso em: 21 jul. 2020.

WALTERS, M. C. *et al.* Bone marrow transplantation for sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, Seattle, v. 335, n. 6, p. 369–376, Aug. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejm199608083350601>. Acesso em: 15 jun. 2020.

WALTERS, M. C. *et al.* Impact of bone marrow transplantation for symptomatic sickle cell disease: an interim report. **Blood**, North Carolina, v. 95, n. 6, p. 1918–1924, Mar. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.V95.6.1918>. Acesso em: 14 jun. 2020.

WALTERS, M. C. *et al.* Pulmonary, gonadal, and central nervous system status after bone marrow transplantation for sickle cell disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, California, v. 16, n. 2, p. 263–272, Feb. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.10.005>. Acesso em: 14 jun. 2020.

WALTERS, M. C. *et al.* Stable mixed hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation for sickle cell anemia. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, California, v. 7, n. 12, p. 665–673, Dec. 2001. Disponível em: [https://www.bbmt.org/article/S1083-8791\(01\)50026-9/fulltext](https://www.bbmt.org/article/S1083-8791(01)50026-9/fulltext). Acesso em: 14 jun. 2020.

WALTERS, M. C. Stem cell therapy for sickle cell disease: Transplantation and Gene Therapy. **Hematology**, Oakland, p. 66–73, Jan. 2005. Disponível em: <https://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2005/1/66/645025/066.pdf>. Acesso em: 6 jul. 2020.

WALTERS, M. C. Update of hematopoietic cell transplantation for sickle cell disease. Current opinion in hematology, **Oakland**, v. 22, n. 3, p. 227–233, May. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25767957/>. Acesso em: 5 jul. 2020.

WANG, D.; GAO, G. State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications. **Discovery Medicine**, United States of America, v. 18, n. 98, p. 151–161, Sept. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25227756/>. Acesso em: 1 set. 2020.

WEN, J. *et al.* Cellular function reinstatement of offspring red blood cells cloned from the sickle cell disease patient blood post crispr genome editing. **Journal of Hematology and Oncology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0489-9>. Acesso em: 18 set. 2020.

WORLD HEALTH ASSEMBLY, 59., 2006, Geneva. **Sickle cell anaemia**: Report by the Secretariat. Geneva: World Health Organization, 2006. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/20890>. Acesso em: 23 mar. 2020.

WRIGHT, D. A. *et al.* TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 462, n. 1, p. 15–24, Aug. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057889/>. Acesso em: 17 ago. 2020.

YAN, M.-Y. *et al.* A CRISPR-assisted nonhomologous end-joining strategy for efficient genome editing in Mycobacterium tuberculosis. **American Society for Microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1–14, Jan. 2020. Disponível em: <https://mbio.asm.org/content/mbio/11/1/e02364-19.full.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2020.

ZENNADI, R. *et al.* Epinephrine Acts through Erythroid Signaling Pathways to Activate Sickle Cell Adhesion to Endothelium via LW-Av β 3 Interactions. **Blood**, Durham, v. 104, n. 12, p. 3774–3781, Dec. 2004. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/104/12/3774/89076/Epinephrine-acts-through-erythroid-signaling>. Acesso em: 11 maio 2020.

ZOU, J. *et al.* Site-specific gene correction of a point mutation in human IPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. **Blood**, Baltimore, v. 118, n. 17, p. 4599–4608, Oct. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21881051>. Acesso em: 11 maio 2020.