



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

STÉPHANE CAROLINE SILVA PESTANA MARTINS

**CRISPR COMO FERRAMENTA TERAPÊUTICA NA
TALASSEMIA BETA:
UMA REVISÃO INTEGRATIVA**

Recife
2024

STÉPHANE CAROLINE SILVA PESTANA MARTINS

**CRISPR COMO FERRAMENTA TERAPÊUTICA NA
TALASSEMIA BETA:
UMA REVISÃO INTEGRATIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Gabriela da Silva Arcanjo.

Coorientador: Marcos André Cavalcanti
Bezerra.

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Martins, Stéphanie Caroline Silva Pestana.

CRISPR COMO FERRAMENTA TERAPÊUTICA NA TALASSEMIA
BETA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA / Stéphanie Caroline Silva Pestana
Martins. - Recife, 2024.

50 p. : il., tab.

Orientador(a): Gabriela da Silva Arcanjo

Coorientador(a): Marcos André Cavalcanti Bezerra

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Terapia Gênica.. 2. Regulação da Expressão Gênica.. 3.
Hemoglobinopatias.. 4. Hemoglobina Fetal.. 5. Hemoterapia.. I. Arcanjo,
Gabriela da Silva. (Orientação). II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti.
(Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

STÉPHANE CAROLINE SILVA PESTANA MARTINS

**CRISPR COMO FERRAMENTA TERAPÊUTICA NA
TALASSEMIA BETA:
UMA REVISÃO INTEGRATIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Mestre Gabriela da Silva Arcanjo.
UFPE/ Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial - Labcen

Mestre Layza Fernanda Gomes Bezerra.
UFPE/ Laboratório de Lipídios - CCS

Doutor Pedro Luiz França Neto.
UFPE/ Departamento de Genética - CCS

Dedico este trabalho a minha mãe
Lúcia Maria da Cruz e Silva (*in
memoriam*), "o que a memória ama,
fica eterno. Te amo com a memória,
imperecível."

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder a força, a saúde e a sabedoria para trilhar o caminho da realização deste trabalho, guiando-me em cada etapa e desafio.

Expresso minha profunda gratidão à minha orientadora, Msc. Gabriela da Silva Arcanjo, pela orientação, paciência e dedicação durante o desenvolvimento deste projeto. Sua experiência e incentivo constante foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Agradeço também ao meu professor e coorientador Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra e a todos os professores, colegas e colaboradores que, de alguma forma, contribuíram com seus conhecimentos e apoio ao longo dessa jornada acadêmica.

Gostaria de estender meus sinceros agradecimentos ao Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial (NHCL) da UFPE, pela infraestrutura, recursos e suporte oferecidos durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço especialmente à minha mãe, Lúcia Maria da Cruz e Silva, por todo o amor, apoio e ensinamentos que me guiaram até aqui. Sou eternamente grata por ser sua filha, eu não poderia ter uma mãe melhor.

Em seguida, agradeço à Família Melquíades, de coração, por tudo que fizeram por mim.

Um agradecimento especial ao meu marido, Ugo Henrique Rocha Martins, que é o meu maior apoiador e está ao meu lado a cada desafio. Por último, mas não menos importante, agradeço à Família Martins: meu sogro/"pai" Ugo Leonardo Martins, minha sogra/"mãe" Rosineide Rocha Martins e meu cunhado/"irmão" Gabriel Ângelo Rocha Martins, que me apoiaram imensamente na parte mais difícil dessa caminhada. Obrigada por não me deixarem desistir, eu amo vocês.

A todos, meu muito obrigada!

“O momento mais assustador é sempre logo antes de você começar. Depois disso, as coisas só podem melhorar. Você pode, você deve e se você for corajoso o suficiente para começar, o fará.”
Stephen King

MARTINS, Stéphane Caroline Silva Pestana. **CRISPR como ferramenta terapêutica na talassemia beta**: uma revisão integrativa. Ano de Realização. Número total de folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

As β -talassemias são anemias hereditárias autossômicas recessivas heterogêneas, caracterizadas pela síntese reduzida ou ausente da cadeia β -globina, uma consequência de mutações nos genes β -globina. A forma mais grave da doença é a β -talassemia maior (BTM) na qual os pacientes são dependentes de transfusão. A terapia médica inclui transfusões sanguíneas e quelação de ferro, sendo que ambas podem causar toxicidade, bem como outras consequências clínicas. O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (CTH) é uma cura eficaz para a β -talassemia, embora nem todos os pacientes tenham doadores ideais e o procedimento esteja associado a complicações imunológicas graves. Tais problemas podem ser contornados por terapias experimentais como a edição genética de células hematopoiéticas autólogas. Os métodos atuais de modificação genética, como edição de genoma e edição de bases, visam restaurar a produção de β -globina ou reativar a produção de γ -globina fetal, que forma a hemoglobina fetal (HbF, $\alpha_2\gamma_2$). O complexo CRISPR/Cas9 pode realizar alterações direcionadas e precisas no DNA de células vivas; e tem sido promissor para atuar como terapia gênica em indivíduos portadores de hemoglobinopatias, modificando as células e causando o aumento da produção de HbF. O objetivo deste trabalho foi descrever os conhecimentos atuais sobre a participação do CRISPR/Cas9 como uma possibilidade de terapia gênica, por meio da comparação de estudos experimentais focados na talassemia beta. O presente trabalho trata-se de uma revisão integrativa, onde foi realizada uma pesquisa bibliográfica a partir de livros e artigos científicos em inglês e português, os quais estão indexados nas principais bases de dados. Foram selecionados artigos que discutem sobre o uso do CRISPR/Cas9 como terapia gênica para a talassemia beta, por meio de estudos experimentais com o objetivo de estímulo da produção de HbF, visando a independência e/ou a diminuição da frequência transfusional dos pacientes beta talassêmicos. Após a pesquisa e análise dos artigos, foram selecionados 5 artigos que fizeram experimentos em camundongos e 2 artigos de ensaios clínicos em humanos. Os resultados dos autores mostram que a edição gênica usando CRISPR/Cas9 pode ser usada tanto para silenciar o repressor da gama globina, o BCL11A, quanto para editar células tronco hematopoiéticas (CTH) para a reinfusão. Foi observado a partir das análises dos dados que a edição gênica é eficaz na reativação da hemoglobina fetal (HbF). Os estudos clínicos em humanos mostram que a maior parte dos pacientes alcançaram a independência transfusional. Portanto, mesmo que o acompanhamento a longo prazo seja essencial, o CRISPR-Cas9 pode alterar radicalmente o tratamento dessa condição genética.

Palavras-chave: Terapia Gênica. Regulação da Expressão Gênica. Hemoglobinopatias. Hemoglobina fetal. Hemoterapia.

MARTINS, Stéphanie Caroline Silva Pestana. **CRISPR as a therapeutic tool in beta thalassemia**: an integrative review. 2024. Número total de folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

β -Thalassemias are heterogeneous autosomal recessive inherited anemias characterized by reduced or absent synthesis of the β -globin chain, a consequence of mutations in the β -globin genes. The most severe form of the disease is β -thalassemia major (BTM), in which patients are transfusion dependent. Medical therapy includes blood transfusions and iron chelation, both of which can cause toxicity as well as other clinical consequences. Allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation is an effective cure for β -thalassemia, although not all patients have ideal donors and the procedure is associated with serious immunological complications. Such problems can be circumvented by experimental therapies such as gene editing of autologous hematopoietic cells. Current genetic modification methods, such as genome editing and base editing, aim to restore β -globin production or reactivate the production of fetal γ -globin, which forms fetal hemoglobin (HbF, $\alpha\gamma$). The CRISPR/Cas9 complex can make targeted and precise changes in the DNA of living cells; and has shown promise as a gene therapy in individuals with hemoglobinopathies, modifying the cells and causing increased production of HbF. The objective of this work was to describe the current knowledge on the participation of CRISPR/Cas9 as a possibility of gene therapy, by comparing experimental studies focused on beta thalassemia. This work is an integrative review, where a bibliographic search was carried out from books and scientific articles in English and Portuguese, which are indexed in the main databases. Articles discussing the use of CRISPR/Cas9 as gene therapy for beta thalassemia were selected through experimental studies aimed at stimulating HbF production, aiming at independence and/or reducing the frequency of transfusions in beta thalassemic patients. After the research and analysis of the articles, 5 articles that performed experiments in mice and 2 articles of clinical trials in humans were selected. The authors' results show that gene editing using CRISPR/Cas9 can be used both to silence the gamma globin repressor, BCL11A, and to edit hematopoietic stem cells (HSC) for reinfusion. It was observed from the data analysis that gene editing is effective in reactivating fetal hemoglobin (HbF). Clinical studies in humans show that most patients achieved transfusion independence. Therefore, even though long-term follow-up is essential, CRISPR-Cas9 can radically change the treatment of this genetic condition.

Key words: Gene Therapy. Regulation of Gene Expression. Hemoglobinopathies. Fetal Hemoglobin. Hemotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da hemoglobina normal.	14
Figura 2 – Representação esquemática da mudança no padrão de expressão dos genes do agrupamento da β -globina.	16
Figura 3 – Mecanismo putativo de ação do luspatercept.	24
Figura 4 – Mecanismo de ação do CRISPR-Cas9.	26
Figura 5 – Mecanismo de ação do CRISPR-Cas9 para aumento da HbF.	28
Figura 6 – Mecanismo de ação do gene BCL11A sem interferência do CRISPR.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da beta talassemia de acordo com os genótipos.	19
Tabela 2 – Resultados do uso do CRISPR/Cas9 em camundongos.	33
Tabela 3 – Resultados dos ensaios com o CRISPR/Cas9 em humanos.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BTI	Beta Talassemia Intermediária
BTM	Beta Talassemia Maior
CTH	Células Tronco Hematopoiéticas
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina Adulta
HbF	Hemoglobina Fetal
HPFH	Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal
LCR	Locus Control Region
PAM	Motivo Adjacente do Protoespaçador
SCD	Doença Falciforme
TT	Talassemia transfusional

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1	HEMOGLOBINA	14
1.1.1	Estrutura da Hemoglobina	14
1.1.2	Genes da Hemoglobina	15
1.1.3	Expressão dos Genes da Hemoglobina	15
1.2	HEMOGLOBINOPATIAS	17
1.2.1	Conceito de Hemoglobinopatias	17
1.2.2	Hemoglobinopatias Qualitativas	17
1.2.3	Hemoglobinopatias Quantitativas	18
1.3	BETA TALASSEMIA	18
1.3.1	Tipos de Beta Talassemia	18
1.3.1.1	Beta talassemia menor	19
1.3.1.2	Beta talassemia intermediária	19
1.3.1.3	Beta talassemia maior	20
1.3.1.4	Diagnóstico da beta talassemia	20
1.3.2	Fisiopatologia da Beta Talassemia	21
1.3.3	Tratamento Atual da Beta Talassemia	21
1.4	TERAPIAS EMERGENTES	23
1.4.1	Novos Medicamentos para Beta Talassemia	23
1.4.1.1	Luspatercept	23
1.4.2	Terapia Gênica para Beta Talassemia	25
1.4.2.1	CRISPR/Cas9	25
1.4.2.1.1	<i>Objetivos da edição gênica com o CRISPR/Cas9</i>	27
1.4.2.1.2	<i>Abordagens mais utilizadas</i>	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo Geral	30
2.2	Objetivos Específicos	30
3	METODOLOGIA	31
3.1	Seleção de Artigos	31
3.1.1	Descritores e booleanos	31

3.2	Período de Desenvolvimento do Trabalho	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40

INTRODUÇÃO

As β -talassemias são anemias hereditárias autossômicas recessivas heterogêneas, caracterizadas pela síntese reduzida ou ausente da cadeia β -globina, uma consequência de mutações nos genes β -globina, posicionados no cromossomo 11. As cadeias de globina desemparelhadas não são estáveis, precipitam-se nas células, o que leva à destruição imatura de precursores de eritrócitos e à redução da vida útil dos eritrócitos maduros no sangue. Inclui três formas principais: β -talassemia maior, também conhecida como “anemia de Cooley” e “anemia mediterrânea”; β -talassemia intermediária; e talassemia menor, chamada de “portador de β -talassemia”, “traço de β -talassemia” ou “ β -talassemia heterozigótica” (Adly et al., 2015; Ali et al., 2021; Origa, 2017).

As características mais relevantes de indivíduos com BTM não tratados ou mal transfundidos são retardo de crescimento, palidez, icterícia, pigmentação marrom da pele, musculatura deficiente, genu valgo, hepatoesplenomegalia, úlceras nas pernas, desenvolvimento de massas provenientes de hematopoiese extramedular e alterações esqueléticas que resultam da expansão da medula óssea. Essas alterações esqueléticas incluem deformidades dos ossos longos das pernas, alterações craniofaciais típicas e osteoporose. Indivíduos que não foram submetidos a transfusões regulares geralmente morrem de insuficiência cardíaca de alto débito (Origa, 2017).

A fim de que a sobrevida de pacientes portadores de talassemia beta seja garantida, são necessárias transfusões sanguíneas regulares, com a finalidade de manter os níveis de hemoglobina adequados (Serpeloni et al., 2022). Isso predispõe os pacientes a uma série de complicações, como infecções transmitidas por transfusão, reações febris à transfusão, reações hemolíticas tardias à transfusão, bem como outras consequências clínicas como anemia, doença óssea, eritropoiese extramedular e sobrecarga de ferro, causando danos aos órgãos-alvo, como coração, fígado, baço, pâncreas, hipófise, cérebro e medula óssea, e retardo de crescimento. O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas tem sido a única opção curativa para hemoglobinopatias há décadas. No entanto, o risco de complicações agudas e crônicas e a falta de doadores disponíveis limitaram seu uso (Christakopoulos et al., 2023; Ferraresi et al., 2023; Garg et al., 2023).

Tais problemas podem ser contornados por terapias experimentais nas quais células-tronco hematopoiéticas autólogas são isoladas, geneticamente alteradas *ex vivo* e reintroduzidas no paciente após a administração de condicionamento mielotóxico da medula óssea para facilitar o enxerto de células modificadas. Os métodos atuais de modificação genética, como edição de genoma e edição de bases, visam restaurar a produção de β -globina durante a eritropoiese ou reativar a produção de γ -globina fetal, que liga-se à α -globina para formar a hemoglobina fetal (Christakopoulos et al., 2023).

O complexo CRISPR, sigla em inglês para repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter-espaçadas, é conhecido, inicialmente, por promover a imunidade adaptativa contra ácidos nucleicos exógenos nas bactérias. É constituído por sequências altamente variáveis que captam material genético de plasmídeos invasores e de bacteriófagos, desenvolvendo uma imunidade herdada que passará a ser codificada em DNA no decorrer do tempo (Serpeloni et al., 2022).

Equiparado aos mecanismos convencionais de edição genética, que aplicam vírus como fonte do material genético a ser inserido no genoma, o CRISPR/Cas9 pode realizar alterações direcionadas e precisas no DNA de células vivas; e tem sido promissor para atuar como terapia gênica em indivíduos portadores de hemoglobinopatias, modificando as células e causando o aumento da produção de hemoglobina fetal (Randhawa; Sengar, 2021; Serpeloni et al., 2022).

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 HEMOGLOBINA

1.1.1 Estrutura da Hemoglobina

A oxigenação dos tecidos ao longo da vida depende da atividade da hemoglobina (Hb), uma das hemoproteínas que liga o oxigênio nos pulmões e assegura sua distribuição por todo o corpo. A hemoglobina é uma molécula globular formada por quatro cadeias de globinas que constituem dois pares: um par de cadeias α e um par de cadeias β . Todas as cadeias de globina têm estrutura similar (figura 1). São formadas por uma sequência de 141 aminoácidos (cadeia α) ou 146 aminoácidos (cadeia β). A ordem desses aminoácidos na cadeia é determinada pelo código genético no DNA, no gene da globina correspondente. A cadeia de globina exibe uma conformação helicoidal, que transforma a sequência linear em uma espiral que, mudando de direção e enovelando-se, dá à molécula uma forma globular. Essa conformação cria uma cavidade denominada bolsa do heme, onde fica a molécula de heme com o átomo de ferro no seu centro. O heme é uma molécula planar formada pela condensação de quatro núcleos pirrólicos, contendo em seu centro um átomo de ferro na forma de Ferroso. Cada cadeia de globina tem uma bolsa onde se fixa o heme (Zago, M. A; Falcão, R. P.; Pasquini, R., 2013).

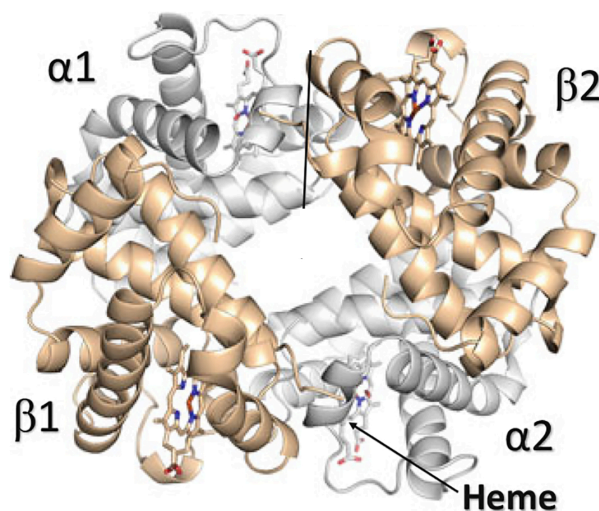


Figura 1: Estrutura da hemoglobina normal. Presença das duas cadeias alfa, duas cadeias beta, grupo prostético heme e do ferro. Adaptado de (AHMED; GHATGE; SAFO, 2020).

Além disso, a estrutura da hemoglobina, observada na figura 1, é essencial para sua função. Mutações nos genes que são responsáveis pela síntese das cadeias de globínicas podem resultar em alterações estruturais ou em uma síntese reduzida, como na anemia falciforme e nas talassemias, nas quais a função normal da hemoglobina é comprometida (Torres, 2016).

1.1.2 Genes da Hemoglobina

Os genes da hemoglobina são fundamentais para a síntese das diferentes cadeias globínicas que compõem esta proteína vital para o transporte de oxigênio no organismo. Estes genes estão organizados em dois agrupamentos de moléculas principais: o *cluster* alfa, localizado no cromossomo 16, e o cluster beta, localizado no cromossomo 11. O cluster alfa contém os genes *HBA1* e *HBA2*, que codificam as cadeias alfa da hemoglobina, e o gene *HBZ*, responsável pela síntese da globina zeta durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (Filser et al., 2022).

Já o *cluster* beta inclui os genes *HBB*, *HBD*, *HBG1*, *HBG2* e *HBE*, que codificam, respectivamente, as cadeias beta. Esses genes apresentam uma expressão temporalmente regulada, com o gene *HBE* sendo expresso durante a vida embrionária, os genes *HBG1* e *HBG2* durante a fase fetal, e os genes *HBB* e *HBD* predominantemente na fase adulta, formando a hemoglobina adulta composta por duas cadeias alfa e duas cadeias beta. A regulação da expressão desses genes é complexa, envolvendo elementos cis-regulatórios, como o *locus control region*, que controla a expressão ordenada dos genes globínicos no cluster beta. (Pavani et al., 2021)

1.1.3 Expressão dos Genes da Hemoglobina

A expressão dos genes da hemoglobina é um processo altamente regulado e orquestrado ao longo do desenvolvimento humano, garantindo a produção das cadeias globínicas necessárias para formar a hemoglobina, desde a vida embrionária até a fase adulta. A regulação da expressão desses genes ocorre em fases específicas do desenvolvimento, com a ativação e desativação sequencial dos genes localizados nos clusters alfa e beta, localizados nos cromossomos 16 e 11, respectivamente. (Fontana et al., 2023)

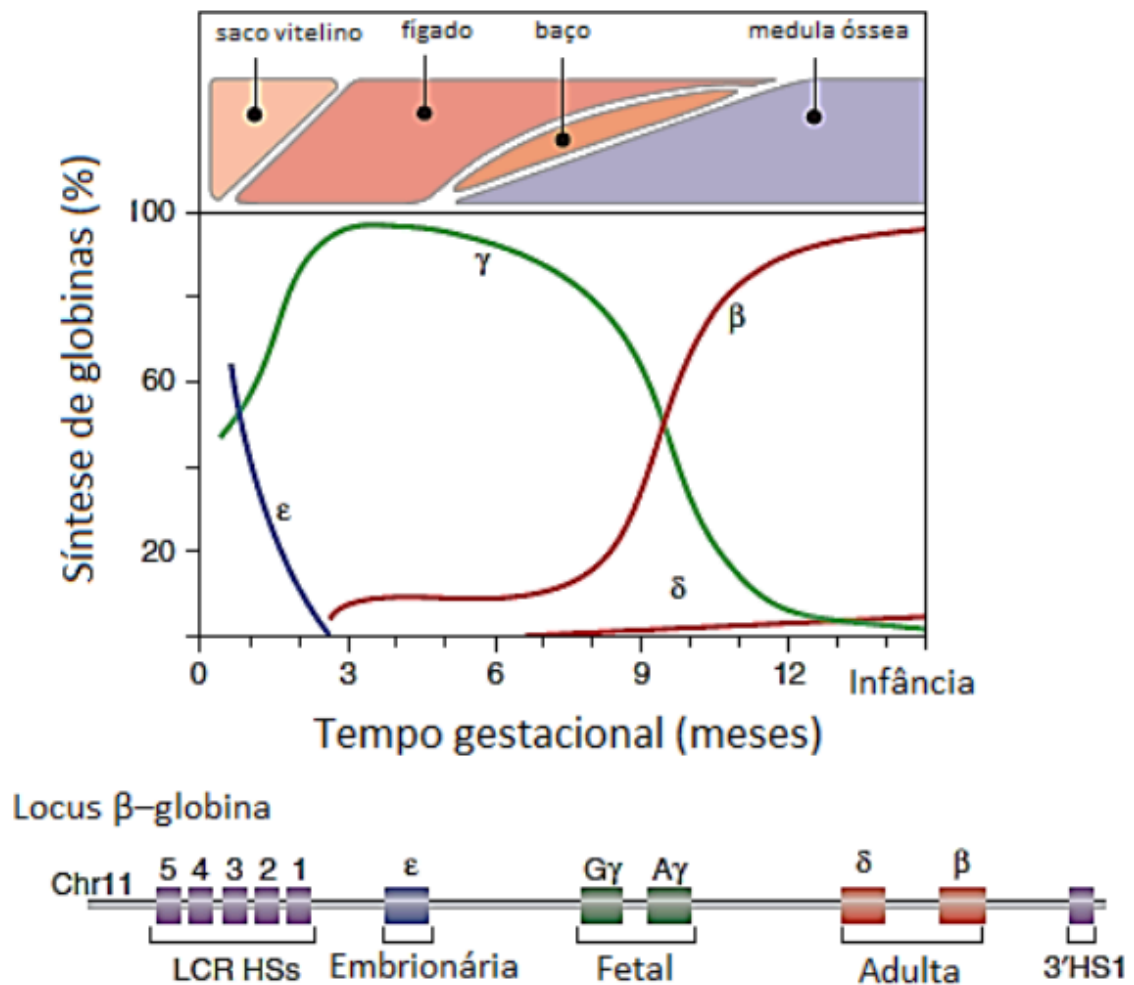


Figura 2: Representação esquemática da mudança no padrão de expressão dos genes do agrupamento da β -globina. O gráfico mostra a porcentagem da síntese de cada gene do agrupamento, em relação ao local onde é produzido e o período de gestação (Sankaran; Orkin, 2012).

Durante a fase embrionária, os genes *HBZ1* e *HBE* expressam a Hb Gower I, II e a Hb Portland, nas 6 semanas seguintes os genes *HBZ1* e *HBE* são reprimidos e a HbF é expressa, como visto na figura 2. Perto do nascimento, há uma repressão acentuada da expressão do gene γ em favor da expressão do gene β -globina, resultando em uma diminuição no nível de HbF para menos de 0,5% e uma síntese crescente de HbA até aproximadamente 97–98%, que é concluída aproximadamente 6 meses após o nascimento. Ao mesmo tempo, a *HBD* é expressa e a HbA 2 é sintetizada (2%–3%), o que tem um valor diagnóstico na detecção de portadores de talassemia β para os quais os níveis de HbA 2 são elevados (4%–8%). (Harteveld et al., 2022).

1.2 HEMOGLOBINOPATIAS

1.2.1 Conceito de Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias constituem as doenças monogênicas recessivas mais frequentes a nível mundial. Resultam de alterações nos genes que regulam a síntese direta das cadeias de globina da hemoglobina. Dividem-se em dois grandes grupos, quantitativas, quando se verifica uma alteração quantitativa na síntese de um tipo de cadeias globínicas (talassemia e persistência hereditária de hemoglobina fetal) e qualitativas ou estruturais, quando existe uma modificação estrutural de um tipo de cadeias globínicas (caso da anemia falciforme ou drepanocitose (Oliveira, 2022)).

1.2.2 Hemoglobinopatias Qualitativas

As hemoglobinopatias qualitativas, também conhecidas como Hb variantes, derivadas de alterações nos genes das cadeias globínicas da hemoglobina, levando à produção de moléculas de hemoglobina com estrutura alterada, como a anemia falciforme, que é caracterizada por uma anormalidade na estrutura da hemoglobina, em particular, a substituição de adenina no sexto códon do gene β (GAG-GTG), codificando assim valina em vez de ácido glutâmico na sexta posição da cadeia β , modificando as propriedades da hemoglobina e afetando sua função biológica e a estabilidade da molécula. (K.C.; Basnet; Gyawali, 2017; Santos, D. F. C., 2021).

Em relação à anemia falciforme (HbSS), as mutações são homozigotas com a produção de HbS. Outros problemas classificados na doença falciforme (SCD), incluindo HbSE, HbSC e HbS β -talassemia, são expressões heterozigotas. Independentemente de uma variante de α -globina ou β -globina, a gravidade da doença varia de insignificante a grave ou com risco de vida (Viprakasit; Ekwattanakit, 2018).

A maioria das hemoglobinas variantes é devida a substituições de aminoácidos que alteram a carga iônica líquida, alterando assim as mobilidades eletroforéticas. As variantes foram inicialmente designadas em ordem alfabética - Hb A para adulto normal, F para fetal e S para falciforme; as variantes seguintes foram nomeadas em ordem de descoberta - hemoglobinas C, D, E e G foram as próximas

variantes detectadas. Mais de 50 variantes com a mobilidade de Hb S (+2 cargas líquidas por tetrâmero) foram descritas. Essas são referidas genericamente como hemoglobinas D se a substituição for na cadeia β -globina e Hb G se na cadeia α (Harold schumacher; William rock; Sanford stass, 2019).

1.2.3 Hemoglobinopatias Quantitativas

As hemoglobinopatias quantitativas, também conhecidas como talassemias alfa e beta, são doenças hereditárias geralmente causadas por uma mutação genética ou uma deleção de certos fragmentos de genes-chave (K.C.; Basnet; Gyawali, 2017).

A talassemia alfa é uma hemoglobinopatia hereditária recessiva, causada principalmente por grandes deleções do gene da alfa-globina. Sua gravidade é proporcional à quantidades de genes afetados, sendo clinicamente classificada como: Portador Silencioso quando há perda de um único gene; Traço de Talassemia Alfa quando há perda de dois genes; Doença da Hb H quando há perda de três genes e Síndrome da Hidropisia Fetal por Hb de Bart com o envolvimento dos quatro genes alfa (Malerba, 2024).

A talassemia beta é uma doença que faz parte de um conjunto de doenças hematológicas hereditárias, que resulta em anemia de graus variáveis, ocasionados pelo ritmo anômalo de produção das cadeias polipeptídicas que compõem a hemoglobina. Os principais tipos de talassemia beta são: menor, onde a pessoa possui apenas um gene afetado e, normalmente, é assintomática; intermediária, quando o indivíduo possui ambos os genes afetados e anemia de grau leve a moderado; e a maior é o tipo mais grave e mais característico, quando o doente apresenta anemia severa e se torna dependente de transfusões sanguíneas (Cruz; Antunes, 2018; Freire et al., 2019)

1.3 BETA TALASSEMIA

1.3.1 Tipos de Beta Talassemia

Na talassemia β , a síntese insuficiente de β -globina resulta em α globina livre excessiva, eritropoiese ineficaz e anemia grave. As três classificações da

beta-talassemia são definidas por seus achados clínicos, laboratoriais e impacto das alterações genéticas na produção de cadeias β -globina (Tabela 1). Suas opções de tratamento são limitadas e normalmente dependem da gravidade da doença. Isso pode variar de nenhum tratamento a transfusões regulares e suplementação de ferro ou quelação, dependendo do quadro clínico (Vinjamur et al., 2018).

Tabela 1: Classificação da beta talassemia de acordo com os genótipos.

Genótipos possíveis da beta talassemias		
β/β	Pessoa não talassêmica	
β^0/β^0	Homozigotos	β Talassemia Maior (transfusional)
β^0/β^+	Duplo heterozigotos	Talassemia intermediária (transfusional)
β^0/β e β^+/β	Heterozigotos	Talassemia menor ou “traço talassêmico”

Fonte: A autora, 2024.

1.3.1.1 Beta talassemia menor

A beta-talassemia menor, também chamada de portadora ou traço, é o estado heterozigoto que geralmente é assintomático com anemia leve. É tipicamente descoberta incidentalmente no hemograma completo de rotina. Os pacientes podem ter sintomas leves de anemia sem achados significativos no exame físico. Homozigosidade ou heterozigosidade composta para mutações de beta-talassemia causam um espectro mais grave de anemias chamadas beta-talassemia intermediária e beta-talassemia maior. Essas duas são distinguidas clinicamente pela dependência de transfusão. A beta-talassemia maior requer transfusões de rotina, e a intermediária não (Needs; Gonzalez-mosquera; Lynch, 2024; Origa, 2017).

1.3.1.2 Beta talassemia intermediária

A beta-talassemia intermediária abrange uma ampla gama de apresentações clínicas, embora, por definição, não seja grave o suficiente para exigir transfusões regulares. A intermediária pode se apresentar em crianças de até dois anos de idade

com atraso no crescimento e desenvolvimento. Formas mais leves de beta-talassemia intermediária podem se apresentar primeiro em adultos como fadiga e palidez. A beta-talassemia intermediária pode ter graus variáveis de achados de exame físico sugestivos de hiperplasia eritroide e hematopoiese extramedular, conforme descrito para a beta-talassemia maior; no entanto, essa hematopoiese reativa é suficiente para compensar a anemia sem exigir transfusão (Needs; Gonzalez-Mosquera; Lynch, 2024).

1.3.1.3 Beta talassemia maior

Pacientes com beta-talassemia maior, se o diagnóstico não foi determinado pré-natalmente, apresentam-se entre 6 e 24 meses de idade quando a produção de hemoglobina transita de HbF para HbA. Anemia grave ocorre e se apresenta como problemas de alimentação, irritabilidade, retardo de crescimento, palidez, diarreia, irritabilidade, crises recorrentes de febre e aumento abdominal por hepatoesplenomegalia. Bebês não tratados ou subtratados, especialmente em áreas com poucos recursos, sofrem de retardo de crescimento, icterícia, pigmentação marrom da pele, musculatura deficiente, genu valgo, hepatoesplenomegalia, úlceras nas pernas, desenvolvimento de massas de locais hematopoiéticos extramedulares e deformidades esqueléticas por expansão da medula óssea. Saliência frontal, hipertrofia maxilar e deformidades de ossos longos são achados esqueléticos comuns (Origa, 2017).

1.3.1.4 Diagnóstico da beta talassemia

Os achados laboratoriais sugestivos de talassemia incluem anemia microcítica hipocrômica. Pode haver anisopoikilocitose significativa (variação de tamanho e forma) em casos de beta-talassemia maior em esfregaço periférico. A exclusão de deficiência de ferro e eletroforese de hemoglobina ou cromatografia líquida de alta eficiência são frequentemente necessárias para o diagnóstico (Needs; Gonzalez-Mosquera; Lynch, 2024).

1.3.2 Fisiopatologia da Beta Talassemia

Os três fatores fisiopatológicos importantes nas β -talassemias são: anemia crônica/hipóxia, eritropoiese ineficaz e sobrecarga de ferro. A gravidade da doença depende principalmente de deficiências moleculares. O desequilíbrio das quantidades de cadeias beta faz com que o excesso de cadeias α instáveis precipite dentro dos progenitores eritroides, levando ao declínio da membrana celular e à lise celular. Isso desencadeia uma alteração no ambiente microambiente da medula óssea devido a um desequilíbrio de citocinas que faz com que os progenitores eritroides proliferem, mas com maturação inadequada, o que é chamado de eritropoiese ineficaz. Esse desequilíbrio de citocinas, juntamente com a hiperplasia da medula óssea, causa eritropoiese extramedular e, subsequentemente, as deformações ósseas associadas. Devido à anemia/hipóxia crônica, retroelementos da eritropoiese infecciosa são mantidos e perpetuados ao longo do tempo (ASADOV et al., 2018; CAPPELLINI et al., 2014a).

A síntese reduzida ou ausente de cadeias de β -globina, mas as cadeias não afetadas, como as cadeias de α -globina, continuam a ser sintetizadas em níveis relativamente normais. Como resultado, a formação de HbA ($\alpha_2\beta_2$) não funciona corretamente. O excesso de cadeias α livres precipita no citoplasma dos precursores eritroides. Os agregados moleculares são tóxicos e altamente insolúveis e formam inclusões em precursores eritroides nucleados na medula óssea. Esses corpos de inclusão causam destruição acelerada de glóbulos vermelhos por apoptose e hemólise intramedular, levando à eritropoiese ineficaz (Kautz et al., 2014; Sanchez-Villalobos et al., 2022)

A complexidade da fisiopatologia da beta talassemia envolve, portanto, uma série de interações entre a eritropoiese ineficaz, a hemólise crônica, e as complicações decorrentes da sobrecarga de ferro, todas as quais contribuem para o quadro clínico debilitante observado nos pacientes. O entendimento detalhado desses mecanismos é essencial para o desenvolvimento de terapias direcionadas que possam mitigar os efeitos devastadores da doença.

1.3.3 Tratamento Atual da Beta Talassemia

O tratamento atual da beta talassemia é voltado principalmente para o manejo

das manifestações clínicas da doença, com o objetivo de aliviar os sintomas, prevenir complicações e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. No caso da hidroxiureia, seu principal mecanismo de ação justifica sua atividade citotóxica, pois bloqueia a ribonucleosídeo difosfato redutase, uma importante enzima envolvida na síntese de DNA. Portanto, não permite que as células ultrapassem a fase S do ciclo celular. É também um indutor de HbF ao interferir em vários fatores de transcrição (reprime BCL11A e GATA1, estimula GATA2), mas também ao modular alguns processos epigenéticos. No entanto, 89% dos participantes que receberam o medicamento apresentaram aumentos na HbF durante o tratamento, e 79% apresentaram reduções nos níveis séricos de sTfR (receptor de transferrina solúvel), o que está associado a melhorias na hematopoiese (Longo et al., 2021; Yasara; Premawardhena; Mettananda, 2021).

A base do tratamento para os casos mais graves, como a beta talassemia maior, consiste em um regime de transfusões sanguíneas regulares ao longo da vida e terapia de quelação para reduzir a sobrecarga de ferro. Sendo assim, pacientes com talassemia transfusional, consequentemente sofrem com a sobrecarga secundária de ferro da terapia de transfusão regular, que pode levar a danos e falência de órgãos, especialmente no coração, fígado e glândulas endócrinas (Taher; Saliba, 2017).

Em pacientes tratados de forma subótima, comumente experimentamos um início precoce de distúrbios endócrinos na infância, adolescência ou início da idade adulta (falha de crescimento, hipogonadismo) com um risco crescente à medida que os pacientes envelhecem, em vista da exposição cumulativa, bem como do risco aumentado subjacente visto na população em envelhecimento em geral (por exemplo, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo, diabetes, osteoporose). Insuficiência cardíaca e arritmias podem ser detectadas no início da idade adulta, novamente com um risco crescente à medida que os pacientes envelhecem naturalmente, enquanto vê-se mais comumente arritmias em adultos mais velhos. Os primeiros sinais de enzimas hepáticas que aumentam secundariamente à sobrecarga de ferro podem ser detectados em qualquer idade, enquanto doenças hepáticas evidentes, como fibrose, cirrose ou carcinoma hepatocelular, são mais dependentes do tempo e são vistas mais comumente em adultos mais velhos. Embora os quelantes de ferro disponíveis tenham servido bem aos pacientes e tenham um grande corpo de evidências de eficácia na quelação de ferro de órgãos-alvo, ainda é observado um

número considerável de pacientes com alta concentração de ferro no fígado e no coração globalmente (Aydinok et al., 2015; Cappellini et al., 2014; Taher et al., 2017).

O transplante de células tronco hematopoiéticas de indivíduos saudáveis doadores também tem sido uma opção de tratamento, porém não é feito com muita frequência devido a alguns fatores como seu alto custo, nem todos os pacientes possuem doadores ideais e o procedimento estar associado a complicações imunológicas sérias, incluindo doença do enxerto versus hospedeiro e rejeição do enxerto. Pesquisas recentes avaliam a possibilidade de utilização de estratégias de terapia gênica e edição de genoma para portadores desta doença (Bou-Fakhredin; Dan et al., 2023; Kuo; Taher, 2023).

O tratamento inadequado e a própria condição patológica da TM estão intimamente relacionados com a maior mortalidade da população que possui essa enfermidade, destacando-se com maior frequência algumas comorbidades, dentre elas, doenças cardíacas, quadros de infecções, doenças hepáticas, câncer, tromboembolismo e anemia grave (Forni et al., 2023).

1.4 TERAPIAS EMERGENTES

O manejo das talassemias e outras desordens de hemoglobina tem evoluído significativamente, com avanços no tratamento. Considerando todos os encargos reais, não há outra opção senão buscar novas terapias disponíveis, acessíveis e econômicas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes de beta talassemia. Abordagens emergentes de terapia genética, como a edição de genes com a tecnologia CRISPR-Cas9, têm mostrado resultados promissores para corrigir defeitos genéticos em células-tronco hematopoiéticas e podem ser uma opção futura para pacientes com talassemia (Anurogo et al., 2021).

1.4.1 Novos Medicamentos para Beta Talassemia

1.4.1.1 Luspatercept

Uma terapia promissora recentemente aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*), em 2019 e EMA (*European Medicines Agency*), em 2020, para o tratamento da β -talassemia é o luspatercept (ACE-536). Ele atua inibindo a via de

sinalização Smad2/3 (figura 3), que promove a atenuação da eritropoiese ineficaz. Ele também mostra uma melhora dos parâmetros do equilíbrio de ferro. Atualmente, ele é aprovado apenas para o tratamento de TT, mas há esperança de que também possa ser usado para talassemia não transfusional, de acordo com ensaios clínicos em andamento. No entanto, uma desvantagem importante do uso do luspatercept hoje é o custo muito alto do medicamento, pois estima-se que o valor anual total que um paciente poderia pagar pelo luspatercept chegue a US\$ 170.000 (Bou-Fakhredin; Kuo; Taher, 2023; Longo et al., 2021; Taher et al., 2021, 2022).

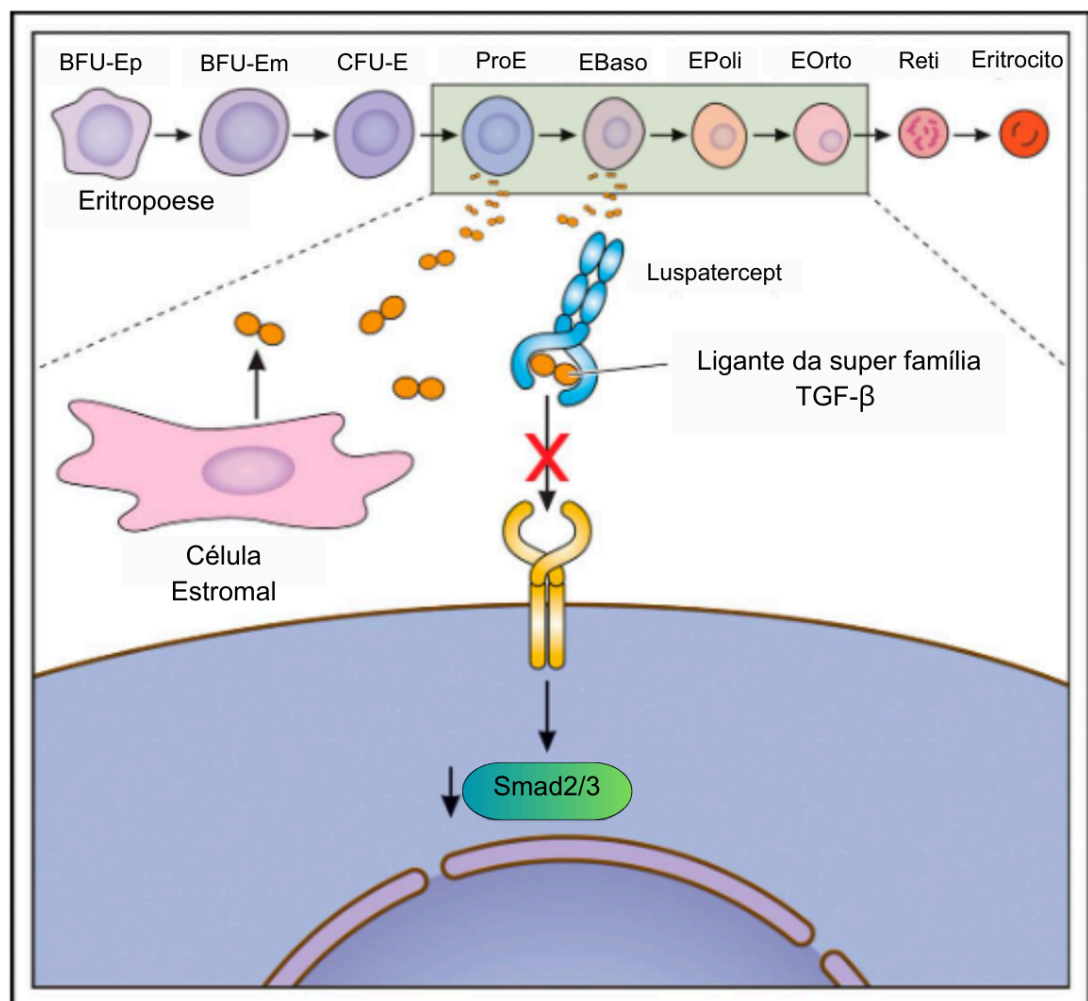


Figura 3: Mecanismo putativo de ação do luspatercept. Uma armadilha de ligante da superfamília TGF- β , para melhorar a eritropoiese ineficaz (Kubasch; Fenaux; Platzbecker, 2021).

1.4.2 Terapia Gênica para Beta Talassemia

Uma das prioridades dos pesquisadores no tratamento da β -talassemia é aumentar a produção da cadeia γ , que se liga às cadeias α , levando à produção de

níveis de HbF. Isso resulta na redução da precipitação de cadeias α livres e na mitigação da sobrecarga de ferro e do estresse oxidativo celular. Dessa forma, combate tanto a síndrome hemolítica quanto a diseritropoiese. A edição genética surgiu como uma solução para aumentar os níveis de γ -globina, por meio da manipulação do genoma das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas dos pacientes. Nesse sentido, o sistema *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/*CRISPR associated protein 9* (Cas9) é continuamente testado (Dan et al., 2023; Fibach; Dana, 2019; Magrin; Miccio; Cavazzana, 2019).

Atualmente, também tem sido estudado o uso de vetores lentivirais para a infusão de células-tronco hematopoiéticas autólogas modificadas, expressando o gene β -globina nos progenitores eritroides do paciente, sendo uma abordagem promissora para curar completamente a β -talassemia. No entanto, a terapia genética lentiviral resulta na integração aleatória do gene funcional no genoma, levando a mutações indesejadas (Wattanapanitch et al., 2018).

A terapia gênica para beta talassemia é uma abordagem inovadora que visa corrigir a causa subjacente da doença ao modificar geneticamente as células do paciente. Essa terapia oferece a possibilidade de uma cura definitiva, ao invés de apenas tratar os sintomas, e tem se mostrado promissora em vários estudos clínicos e experimentos.

1.4.2.1 CRISPR/Cas9

A tecnologia CRISPR/Cas9 (repetições palindrômicas curtas regularmente interespçadas em cluster) revolucionou a terapia gênica ao permitir a edição precisa do DNA. O sistema CRISPR-Cas funciona como um mecanismo de defesa do sistema imunológico adaptativo procarioto contra invasores do genoma, como plasmídeos e vírus. Os *loci* CRISPR no DNA consistem em sequências de bases curtas e repetitivas cercadas por espaçadores, que contêm cópias da sequência genética do invasor. Assim, o CRISPR foi descrito como a memória do sistema imunológico bacteriano. Entre as diferentes classificações e tipos de sistema CRISPR-Cas, o Cas9, que pertence ao sistema CRISPR-Cas tipo II, recebeu o maior interesse no campo da edição do genoma, pois depende apenas de uma única proteína para fazer DSB. Três componentes essenciais foram identificados para clivar o alvo do DNA: proteína Cas9, RNA CRISPR (cr-RNA) e crRNA transativador

(tracr-RNA). A ação do CRISPR-Cas9 envolve três etapas (figura 4): aquisição, expressão e interferência (Hryhorowicz et al., 2017; Jiang; Doudna, 2017; Lone et al., 2018).

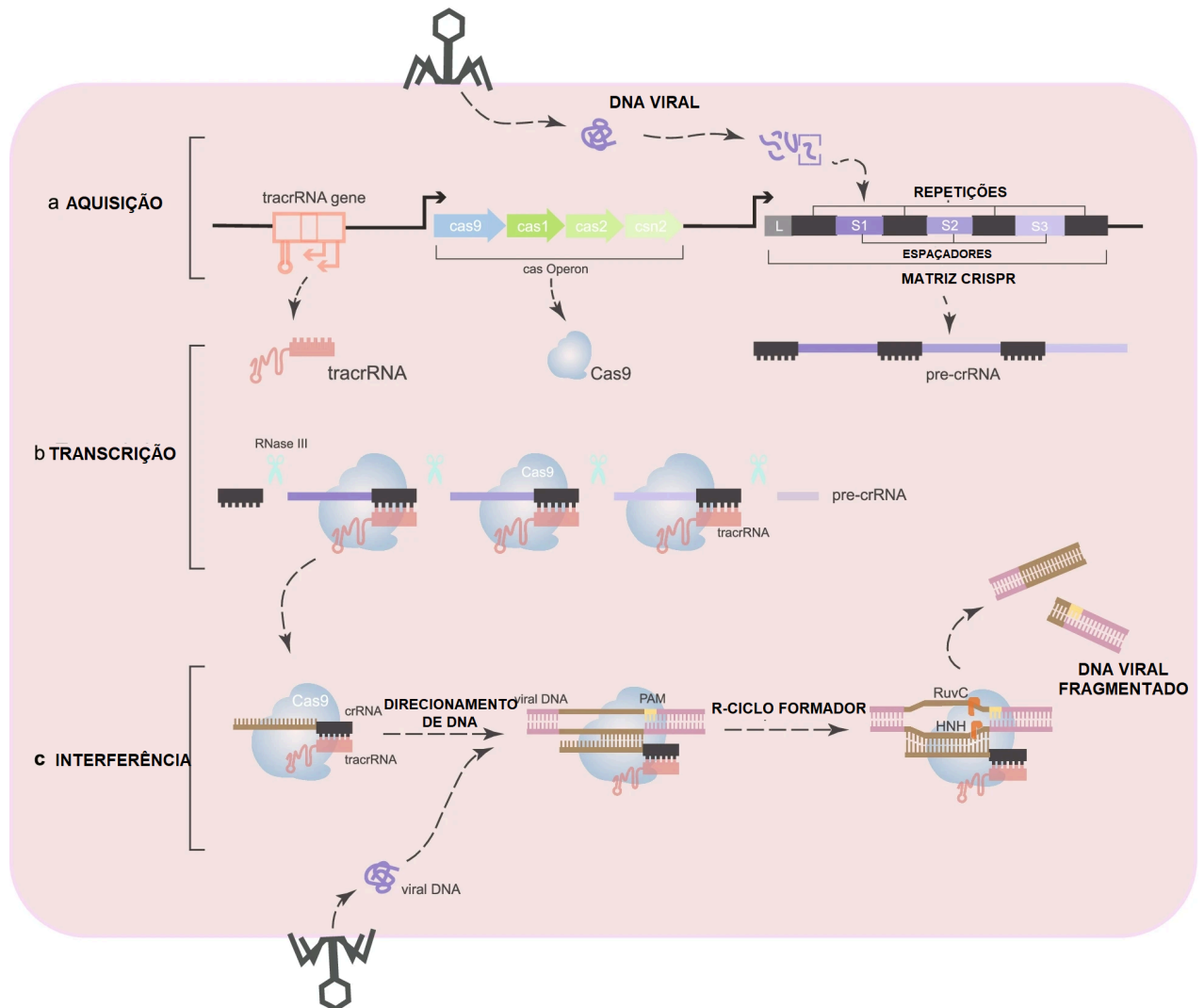


Figura 4: Mecanismo do sistema CRISPR/Cas9 tipo II. a Durante a aquisição, após ser infectado pelo fago, a sequência de DNA do invasor é integrada ao locus CRISPR hospedeiro como um espaçador e separada por sequências repetitivas. b Durante o estágio de transcrição, o pré-crRNA é transcrito e, em seguida, o pré-crRNA é clivado para produzir crRNA maduro. Cada crRNA é composto de uma sequência repetitiva e uma sequência espaçadora contra o invasor. c Na fase de interferência, a proteína Cas cliva diretamente o ácido nucleico exógeno em um sítio complementar à sequência do espaçador do crRNA. Adaptado de (WANG et al., 2022).

Na fase de aquisição, o ácido nucleico do invasor é clivado em pequenos fragmentos e incorporado em novos espaçadores em loci CRISPR. Isso permite que o procarioto se adapte e utilize esses espaçadores em ataques subsequentes. Na fase de expressão seguinte, a transcrição é iniciada pela RNA polimerase para gerar

um RNA específico do locus espaçador, denominado pré-CRISPR RNA (pré-crRNA). A próxima etapa é induzir a maturação do pré-crRNA por bases de RNA não codificadoras chamadas crRNA transativador (tracr-RNA). Então, o complexo tracr-RNA:cr-RNA é integrado à proteína Cas9, atuando como um guia para a proteína Cas9 executar seu processo de quebra de DNA alvo no local complementar à sequência de crRNA na fase de interferência. O motivo adjacente do protoespaçador (PAM) é um par de bases de 2 a 5 do genoma estranho que é necessário para direcionar a proteína Cas9 para atingir e clivar o DNA invasor (Gupta et al., 2019; Jiang; Doudna, 2017; Wang et al., 2022).

Em contraste com técnicas de nuclease, o sistema CRISPR-Cas9 depende de uma única sequência de RNA como um guia para identificar uma sequência genômica específica para executar engenharia genética (Konstantakos et al., 2022).

1.4.2.1.1 Objetivos da edição gênica com o CRISPR/Cas9

O propósito da terapia genética para o tratamento da beta-talassemia é obter a introdução estável de genes de globina funcional nas CTHs do próprio paciente, restaurando sua capacidade das próprias, a fim de corrigir a eritropoiese ineficaz e a anemia hemolítica, evitando assim a necessidade de transfusão, como também sem expor os pacientes aos riscos do transplante de HSCs de um doador sub-ótimo compatível. Para isso, é essencial expressar cadeias de globina semelhantes a β , reduzindo a abundância da α -globina (Karponi; Zogas, 2019; Mansilla-Soto et al., 2016; Thompson et al., 2018).

A edição gênica oferece uma perspectiva inovadora para o tratamento e, possivelmente, a cura da beta talassemia. Contudo, a realização desses objetivos requer avanços contínuos na tecnologia e um entendimento aprofundado dos mecanismos genéticos envolvidos.

1.4.2.1.2 Abordagens mais utilizadas

A hemoglobina fetal pode compensar a hemoglobina adulta defeituosa por meio de vários mecanismos. Foi descoberto que a hemoglobina γ pode aliviar a gravidade da talassemia maior ao melhorar e substituir a HbA deficiente (Bauer; orkin, 2015; Constantinou et al., 2019; Demirci et al., 2020; Jensen; Axelgaard; Bak,

2019). A condição benigna persistência hereditária da hemoglobina fetal é conhecida por melhorar os sintomas de β -hemoglobinopatias co-hereditárias, como anemia falciforme e β -talassemia. A condição é algumas vezes associada a mutações pontuais nos promotores da globina fetal que interrompem a ligação do repressor BCL11A, que foi extensivamente estudado (Topfer et al., 2022).

Para regular o BCL11A através do mecanismo do CRISPR-cas9 (figura 5), tem-se, entre outros meios, o silenciamento do seu acentuador eritróide, interrompendo assim a sua influência na γ -globina. Uma outra forma é a modificação do sítio de ligação do BCL11A nos promotores dos genes *HBG1* e *HBG2*, o que impede a sua interação e permite que a γ -globina continue sendo produzida (Paschoudi; Yannaki; Psatha, 2023).

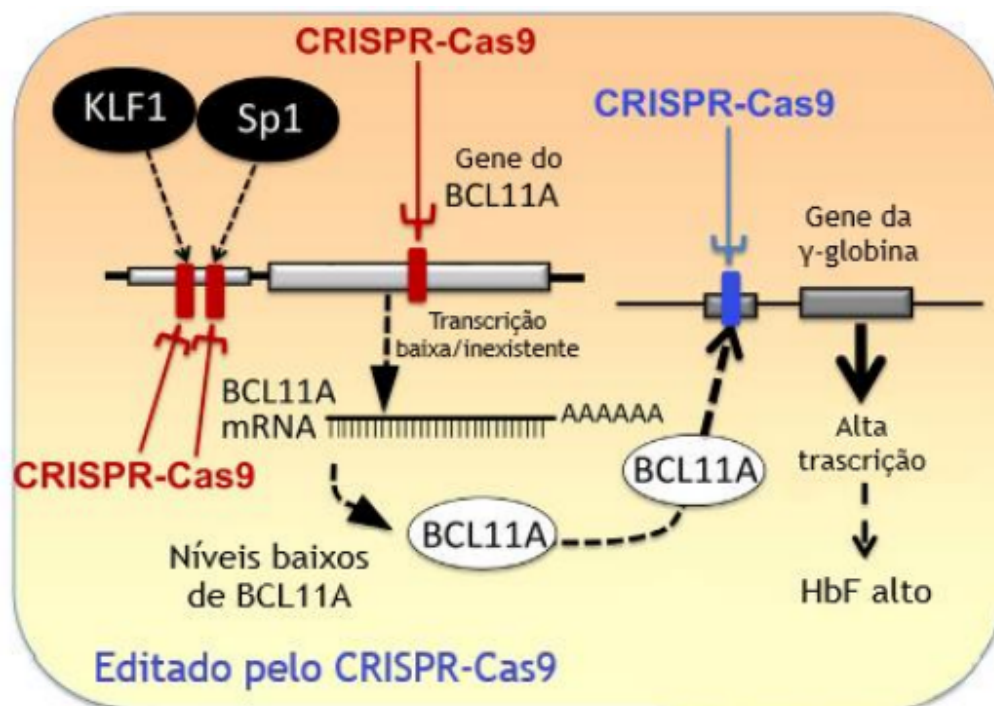


Figura 5: Mecanismo de ação do CRISPR-Cas9 para aumento da HbF. O CRISPR/Cas9 atua através do silenciamento do gene BCL11A, impedindo que este se ligue aos promotores dos genes do HGB1 e HGB2, ou ambos. KLF1 = Fator 1 do tipo Krueppel, fator de transcrição necessário para a maturação adequada das células eritróides. Sp1 = Proteína de Especificidade 1, também fator de transcrição. HDAC = Histonas Desacetilases, enzimas importantes na repressão da expressão gênica. Adaptado de Finotti; Gambari, 2023.

Sem interferência do CRISPR/Cas9 (figura 6), o gene *BCL11A* codifica uma proteína que é predominantemente expressa no cérebro e tecido hematopoiético e funciona principalmente como um repressor transcricional essencial no

desenvolvimento do cérebro, no sistema hematopoiético, bem como na transição da hemoglobina fetal para a adulta. BCL11A se liga a sequências específicas de DNA no agrupamento de genes HBB, se ligando aos promotores dos genes *HBG2* e *HBG1* e interagindo com o LCR para que as globinas produzidas sejam as que compõem as hemoglobinas do adulto e não mais a gama globina, que faz parte da HbF (Yin et al. 2019; Steinberg, 2015).

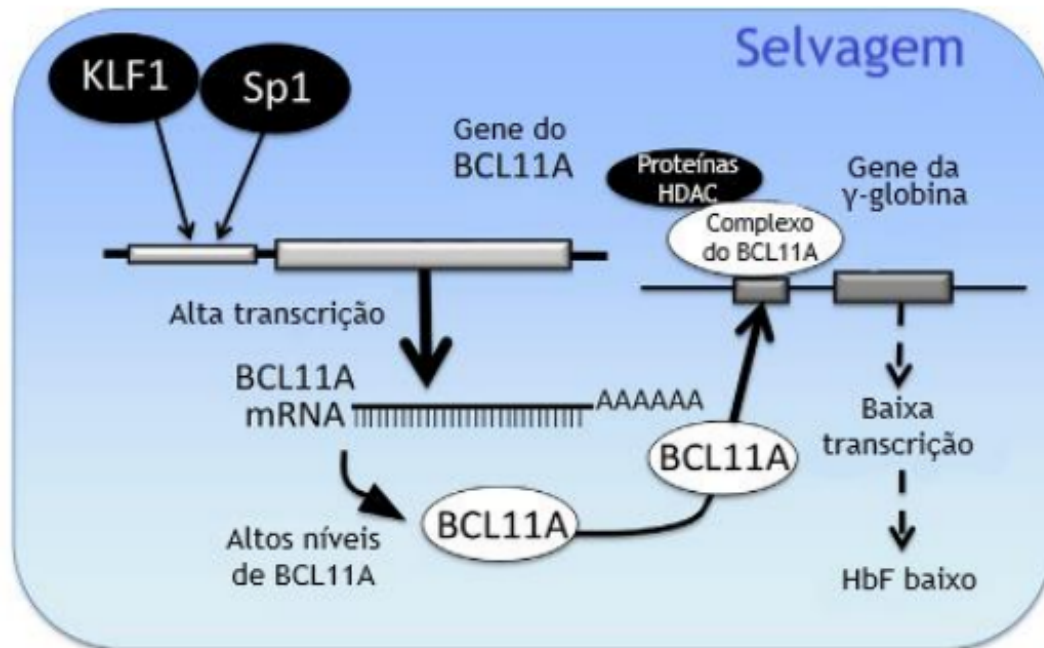


Figura 6: Mecanismo de ação do gene BCL11A sem interferência do CRISPR. Adaptado de Finotti; Gambari, 2023).

Mais recentemente, descobriu-se que o ZBTB7A é um importante repressor dos genes da γ -globina humana. A introdução de variantes de ocorrência natural pode ser considerada uma estratégia de terapia genética mais atraente do que a incorporação de novo material genético, especialmente em casos como esse, em que o mecanismo molecular preciso — a interrupção da ligação de BCL11A — é conhecido (Martyn et al., 2018).

A pesquisa genética demonstrou que a troca da hemoglobina fetal para hemoglobina adulta depende do silenciamento da hemoglobina γ por diferentes repressores transcricionais, mais notavelmente BCL11A e LRF, que funcionam independentemente um do outro. Com base nisso, a eliminação dos repressores BCL11A e LRF pelo CRISPR-Cas9 foi proposta como uma estratégia viável para melhorar os resultados das hemoglobinopatias (Martyn et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever os conhecimentos atuais sobre a participação do CRISPR/Cas9 como uma possibilidade de terapia gênica na talassemia beta, por meio da análise de estudos experimentais e ensaios clínicos.

2.1 Objetivos Específicos

- Descrever o mecanismo de edição gênica do CRISPR/Cas9 na talassemia beta;
- Descrever as consequências clínicas da produção de HbF nos indivíduos beta talassêmicos;
- Descrever os ensaios clínicos e laboratoriais com foco no uso do CRISPR-Cas9 para o aumento da HbF através da modulação do BCL11A que foram realizados ou estão em andamento até a finalização deste trabalho;
- Descrever e comparar pesquisas realizadas envolvendo o uso da tecnologia de CRISPR/Cas9 para tratamento da talassemia beta.

3 METODOLOGIA

A metodologia deste Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) é baseada em uma revisão bibliográfica integrativa, analisando publicações científicas sobre o mecanismo de atuação do CRISPR/Cas9 na edição genética e nas consequências clínicas da produção de hemoglobina fetal (HbF), bem como a frequência transfusional em pacientes com beta-talassemia.

3.1 SELEÇÃO DE ARTIGOS

Para atingir esses objetivos, foi realizada uma pesquisa bibliográfica abrangente em bases de dados renomadas como CAPES, PubMed, SciELO e ScienceDirect. A busca foi refinada utilizando descritores específicos e operadores booleanos para garantir a inclusão de artigos relevantes. Os descritores foram combinados para abranger tópicos como terapias genéticas, CRISPR/Cas9, beta-talassemia e hemoglobina fetal, com o objetivo de reunir um conjunto de dados atuais e relevantes publicados em português, inglês e espanhol, nos últimos 10 anos (2014 – 2024). Após a coleta dos artigos selecionados, foi realizada uma leitura crítica e uma análise detalhada de artigos que tratassem da beta talassemia usando a ferramenta CRISPR/Cas9 em modelo animal e ensaios clínicos em humanos, sendo estes já concluídos ou em fase de acompanhamento, com o objetivo de garantir a integridade acadêmica e o rigor na citação das fontes, proporcionando uma revisão abrangente e crítica dos avanços na terapia genética e suas implicações para pacientes com beta-talassemia.

3.1.1 Descritores e Booleanos

Foi utilizado como ferramenta de pesquisa o site DeCS (descritores em ciências da saúde) e o refinamento da pesquisa com o auxílio dos booleanos “AND” e “OR” para a inserção de artigos, a partir dos seguintes descritores: ((genetic therapy) OR (gene therapy)) OR (somatic gene therapy)) AND (crispr-associated protein 9)) OR (cas9 endonuclease)) OR (cas9 enzyme)) OR (cas9 protein)) AND (beta-thalassemia)) OR (erythroblastic anemia)) OR (Cooley's anemia)) OR (Mediterranean anemia)) OR (hemoglobin F disease)) OR (thalassemia major)) OR

(thalassemia minor)) AND (hemoglobin f)) OR (fetal hemoglobin)) OR (fetal hemoglobin)) AND (blood transfusion)) OR (hemotherapy).

3.2 PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O desenvolvimento do trabalho ocorreu entre os meses de maio e setembro de 2024, e as atividades foram realizadas principalmente no Núcleo de Hematologia e Clínica e Laboratorial da UFPE (NHCL), localizado no Laboratório Central da UFPE (Labcen).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após análise dos artigos, foram selecionados 7 estudos que avaliaram o uso do CRISPR/Cas9 como terapia gênica na talassemia beta. Na tabela 2 e tabela 3 estão descritos os autores e os resultados obtidos em cada estudo.

Tabela 2: Resultados do uso do CRISPR/Cas9 em camundongos.

CRISPR/Cas9 em Camundongos					
Estudo	Técnica de Edição Genética	Nível de HbF (%)	Redução da Anemia (%)	Necessidade de Transfusões (Redução ao longo do tempo)	Efeitos Fora do Alvo
(Antoniou et al., 2022)	Edição cis-regulatória da γ -globina	65%	80%	Reduzida em 70% após 6 meses de tratamento	Não significativo
(ANToniani et al., 2018)	Edição do locus β -globina	68%	80%	Reduzida em 85% após 4 meses	Não observado
(Canver et al., 2015)	Mutagênese saturada do BCL11A	55%	70%	Reduzida em 70% após 5 meses	Não observado
(Zeng et al., 2023)	Silenciamento de BCL11A via CRISPR-Cas9	70%	85%	Eliminada após 6 meses	Não significativo
(Abdulfatah Alayoubi., 2023)	Edição direta do BCL11A via CRISPR-Cas9	60%	75%	Reduzida em 90% após 3 meses	Não observado

Fonte: A autora (2024).

Tabela 3: Resultados dos ensaios com o CRISPR/Cas9 em humanos (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, [2024]).

CRISPR/Cas9 em Humanos					
Objetivo	Técnica de Edição Genética	Patrocinador	Status do ensaio	Nº Participantes	Resultados
Indução de HbF	BCL11A via NHEJ (Interrupção pelo Cas9)	Terapêutica CRISPR; Vertex Pharmaceuticals	NCT03655678 Fase I, II, III	45	42 de 44 pacientes interromperam as transfusões de hemácias; 2 pacientes tiveram reduções de 75% e 89% nas transfusões de hemácias
	BCL11A via NHEJ (Interrupção pelo Cas9)	Laboratórios Bioray Xangai China	NCT04211480 Fase I, II	12	2 crianças com TDT alcançaram independência transfusional com níveis normais de hemoglobina após f>18 meses de acompanhamento

Fonte: A autora, 2024.

O CRISPR/Cas9 oferece uma abordagem revolucionária para o tratamento da beta talassemia, visando corrigir diretamente as mutações genéticas responsáveis pela doença. A técnica permite a edição precisa do genoma das células-tronco hematopoiéticas autólogas, potencialmente restaurando a produção normal de beta-globina ou reativando a produção de hemoglobina fetal, que pode compensar a deficiência de beta-globina. Essa abordagem tem a vantagem de evitar as complicações associadas às transfusões sanguíneas e à sobrecarga de ferro, oferecendo uma possível cura duradoura sem a necessidade de um doador externo (Randhawa; Sengar, 2021)

Embora o CRISPR/Cas9 ofereça promissora vantagem sobre os tratamentos convencionais, ele também enfrenta desafios significativos, como a eficiência da edição genética, a segurança em relação aos efeitos fora do alvo, e questões éticas e regulamentares. Comparado com a terapia convencional, que já está bem estabelecida e amplamente utilizada, o CRISPR/Cas9 ainda está em fase

experimental e requer mais estudos para otimizar sua aplicação clínica e garantir sua eficácia e segurança a longo prazo (Liu et al., 2021).

Apesar desses desafios, os resultados em estudos com camundongos utilizando a edição genética do gene BCL11A têm demonstrado grande potencial. A hemoglobina fetal, que normalmente é suprimida após o nascimento, pode ser reativada pela edição de BCL11A. Isso é de extrema importância, pois a HbF tem a capacidade de substituir a hemoglobina adulta defeituosa, cuja ausência é a principal causa da anemia severa em pacientes com beta talassemia. A reativação da HbF, portanto, é uma solução terapêutica potencialmente curativa, capaz de melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes.

No estudo de (Antoniou et al., 2022) (tabela 2), a edição de elementos regulatórios no gene BCL11A foi utilizada para modular a expressão de HbF em camundongos com beta talassemia. A técnica demonstrou ser eficaz na reativação da HbF, o que levou à redução dos sintomas clínicos e à necessidade de transfusões sanguíneas. O estudo mostrou que essa abordagem foi capaz de melhorar significativamente os parâmetros hematológicos dos camundongos.

A edição do locus da β -globina por meio da tecnologia CRISPR-Cas9 também levou a uma reativação eficiente da HbF. Em (Antoniani et al., 2018) (tabela 2), camundongos tratados com essa abordagem apresentaram não apenas uma melhoria nos níveis de hemoglobina, mas também uma redução significativa das complicações relacionadas à sobrecarga de ferro, que afeta órgãos como o fígado e o baço. Além disso, a necessidade de transfusões foi drasticamente reduzida. Essa abordagem oferece uma alternativa terapêutica menos invasiva em comparação com métodos tradicionais, como o transplante de medula óssea.

Em Canver et al., 2015, (tabela 2) a mutagênese saturada, a técnica usada para editar o acentuador de BCL11A, também demonstrou resultados promissores em outro estudo. Ao identificar as regiões do gene que poderiam ser alvo da modulação genética, os cientistas conseguiram reativar a HbF em níveis suficientes para quase eliminar a necessidade de transfusões nos camundongos. Essa abordagem se mostrou eficaz ao elevar os níveis de HbF e reduzir em 70% os sintomas da beta talassemia, indicando que a edição do aprimorador de BCL11A pode ser uma solução promissora para o tratamento da doença (Canver et al., 2015).

Já no estudo de Zeng et al., 2023 (tabela 2), os pesquisadores utilizaram

CRISPR-Cas9 para silenciar o gene BCL11A em camundongos com beta talassemia. O uso da modulação de BCL11A via CRISPR-Cas9 em outro experimento resultou em níveis elevados de HbF, que compensou a deficiência da globina beta, aliviando os sintomas da doença e uma redução de 85% na anemia dos camundongos, o que quase eliminou a necessidade de transfusões. Esse experimento demonstrou uma eficácia considerável, com os camundongos mostrando uma melhora significativa nos níveis de hemoglobina e uma redução substancial na necessidade de transfusões regulares. Esses resultados destacam o potencial de modulação de BCL11A como uma estratégia eficaz e segura para o tratamento da beta talassemia.

Ainda, no experimento de Alayoubi et al., 2024 (tabela 2), o uso da edição direta do BCL11A via CRISPR-Cas9 resultou em níveis elevados de HbF e uma redução de 75% na anemia dos camundongos, o que quase eliminou completamente a necessidade de transfusões. A edição genética foi bem tolerada e os efeitos fora do alvo foram mínimos, destacando a segurança da técnica.

Esses resultados reforçam a ideia de que a edição do gene BCL11A por meio do CRISPR-Cas9 é uma abordagem altamente eficaz para o tratamento da beta talassemia. A reativação da HbF em níveis clinicamente relevantes alivia os sintomas da doença e oferece uma alternativa terapêutica menos invasiva em comparação aos métodos convencionais.

Os ensaios clínicos NCT03655678 e NCT04211480 (tabela 3) exploram o uso de CRISPR-Cas9 como uma abordagem terapêutica para doenças hereditárias, como a beta talassemia e a anemia falciforme, utilizando a tecnologia de edição genética para corrigir mutações específicas responsáveis por essas condições. Essas terapias inovadoras têm como objetivo fornecer soluções curativas para doenças que, até então, dependiam de tratamentos paliativos, como transfusões regulares e transplantes de medula óssea.

O ensaio NCT03655678 (tabela 3) foi conduzido com o objetivo de tratar a beta talassemia, especificamente em pacientes que necessitam de transfusões regulares. Ele utilizou o CRISPR-Cas9 para fabricar um complexo terapêutico, o CTX001, que contém células CD34+ adquiridas do paciente por aférese, modificadas geneticamente, através de CRISPR/Cas9, para reativar a produção de HbF. A HbF pode substituir a produção deficiente de beta-globina, mitigando a gravidade da anemia e diminuindo a necessidade de transfusões. De acordo com

(Frangoul et al., 2021), os resultados preliminares demonstram que, após a edição das células e a reinfusão nos pacientes, houve uma redução significativa na necessidade de transfusões em alguns indivíduos. Os níveis de HbF aumentaram, sugerindo uma reativação bem-sucedida dessa hemoglobina. Além disso, os resultados até agora não indicam efeitos colaterais graves relacionados à edição genética. Estudos subsequentes destacam a eficácia da técnica, mas sublinham que o acompanhamento de longo prazo é necessário para avaliar a segurança e a durabilidade dos resultados (Frangoul et al., 2021b).

O ensaio NCT04211480 (tabela 3), abordado no estudo "CRISPR–Cas9-mediated gene editing of the BCL11A enhancer for pediatric β^0/β^0 transfusion-dependent β -thalassemia" (FU et al., 2022), foca no uso do CRISPR-Cas9 para tratar a beta talassemia dependente de transfusões. O alvo específico da edição genética neste estudo foi o gene BCL11A, um repressor da produção de HbF. Através da edição do aprimorador de BCL11A em células-tronco hematopoiéticas autólogas, o objetivo foi aumentar a produção de HbF, compensando a deficiência de beta-globina nos pacientes com beta talassemia severa.

Os resultados preliminares do ensaio mostraram que essa abordagem foi eficaz em aumentar os níveis de HbF em pacientes pediátricos com talassemia transfusional, levando a uma redução na necessidade de transfusões regulares. Em alguns pacientes, os níveis de HbF foram suficientes para manter a oxigenação adequada sem transfusões por longos períodos após a terapia. Este estudo destaca o potencial do CRISPR-Cas9 não apenas para minimizar as complicações associadas à terapia transfusional, como sobrecarga de ferro, mas também para proporcionar uma alternativa curativa em casos de beta talassemia grave. Em termos de segurança, o estudo destacou que os efeitos adversos foram relativamente baixos, com poucos pacientes apresentando complicações significativas, e nenhum evento adverso grave relacionado à edição genética foi observado. No entanto, o estudo reforça a necessidade de monitoramento de longo prazo para garantir a segurança da técnica, especialmente considerando os possíveis efeitos fora do alvo que podem surgir com o uso do CRISPR-Cas9 (Fu et al., 2022).

Essa estratégia inovadora mostra resultados promissores em comparação com os tratamentos convencionais de beta talassemia, como as transfusões

regulares e o transplante de células-tronco. O CRISPR-Cas9 oferece uma potencial solução curativa sem a necessidade de transplantes de células-tronco de doadores, que são limitados pela compatibilidade e pelo risco de complicações, como a doença do enxerto contra o hospedeiro (Bak; Dever; Porteus, 2018). Além disso, a utilização da edição genética em células autólogas diminui os riscos de rejeição, tornando o tratamento potencialmente mais seguro e acessível a uma população mais ampla.

Ambos os ensaios são vistos como marcos importantes no uso clínico de CRISPR-Cas9 para doenças monogênicas como a beta talassemia e a anemia falciforme. Embora os resultados sejam promissores, com uma potencial mudança no paradigma de tratamento dessas doenças, mais dados são necessários para entender plenamente as implicações da edição genética, principalmente no que diz respeito a efeitos fora do alvo e à segurança a longo prazo (Liu et al., 2021).

Esses ensaios representam um avanço significativo na medicina regenerativa, especialmente no tratamento de doenças que, até então, contavam com terapias de suporte e tratamentos curativos invasivos, como o transplante de medula óssea. A reativação da hemoglobina fetal oferece uma abordagem inovadora que pode transformar a maneira como essas condições são tratadas, oferecendo uma alternativa mais eficaz e menos invasiva (Christakopoulos et al., 2023).

5 CONCLUSÃO

A análise dos artigos evidenciou que o foco no gene BCL11A pela edição genética via CRISPR/Cas9, tem demonstrado grande potencial no tratamento da beta-talassemia. Nos estudos com camundongos, a reativação da hemoglobina fetal resultou em uma redução significativa dos sintomas da beta talassemia, com uma intensa diminuição na necessidade de transfusões. Já os ensaios clínicos também mostraram aumento nos níveis de HbF em pacientes humanos, sugerindo um impacto clínico positivo, especialmente tendo como alvo da edição o gene BCL11A.

O acompanhamento de longo prazo é essencial para avaliar a viabilidade da técnica que possa vir a ser usada, porém, é inegável o potencial transformador do CRISPR-Cas9 na beta talassemia, podendo alterar radicalmente o tratamento dessa condição genética.

REFERÊNCIAS

ADLY, A. A. M. et al. Vascular dysfunction in patients with young β -thalassemia: relation to cardiovascular complications and subclinical atherosclerosis. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 21, n. 8, p. 733–744, nov. 2015.

AHMED, Mostafa H.; GHATGE, Mohini S.; SAFO, Martin K. Hemoglobin: structure, function and allostery. **Vertebrate and invertebrate respiratory proteins, lipoproteins and other body fluid proteins**, p. 345-382, 2020.

ALAYOUBI, A. M. et al. CRISPR-Cas9 system: a novel and promising era of gene therapy for beta-hemoglobinopathies, hematological malignancy, and hemophilia. **Annals of Hematology**, v. 103, n. 6, p. 1805–1817, 1 jun. 2024.

ALI, S. et al. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 9, n. 12, p. e1788, dez. 2021.

ANTONIANI, C. et al. Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus. **Blood**, v. 131, n. 17, p. 1960–1973, 26 abr. 2018.

ANTONIOU, P. et al. Base-editing-mediated dissection of a γ -globin cis-regulatory element for the therapeutic reactivation of fetal hemoglobin expression. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 6618, 4 nov. 2022.

ANUROGO, D. et al. Cell and Gene Therapy for Anemia: Hematopoietic Stem Cells and Gene Editing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6275, 10 jun. 2021.

ASADOV, C. et al. β -Thalassemia intermedia: a comprehensive overview and novel approaches. **International Journal of Hematology**, v. 108, n. 1, p. 5–21, jul. 2018.

AYDINOK, Y. et al. Prevalence and distribution of iron overload in patients with transfusion-dependent anemias differs across geographic regions: results from the CORDELIA study. **European Journal of Haematology**, v. 95, n. 3, p. 244–253, set. 2015.

BAK, R. O.; DEVER, D. P.; PORTEUS, M. H. CRISPR/Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells. **Nature Protocols**, v. 13, n. 2, p. 358–376, fev. 2018.

BAUER, D. E.; ORKIN, S. H. Hemoglobin switching's surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 33, p. 62–70, ago. 2015.

BOU-FAKHREDIN, R.; KUO, K. H. M.; TAHER, A. T. Emerging Therapies in β -Thalassemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 37, n. 2, p. 449–462, abr. 2023.

CANVER, M. C. et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 192–197, nov. 2015.

CAPPELLINI, M. D. et al. (EDS.). **Guidelines for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia (TDT)**. 3rd. ed. Nicosia (CY): Thalassaemia International Federation, 2014.

CHRISTAKOPOULOS, G. E. et al. GENE THERAPY AND GENE EDITING FOR β THALASSEMIA. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 37, n. 2, p. 433–447, abr. 2023.

CONSTANTINO, C. et al. The multi-faceted functioning portrait of LRF/ZBTB7A. **Human Genomics**, v. 13, p. 66, 10 dez. 2019.

CRUZ, T.; ANTUNES, L. Fisiopatogenia e métodos diagnósticos das anemias hemolíticas: uma revisão integrativa. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, v. 6, p. 49, 11 set. 2018.

DAN, M.-O. et al. Innovative and Needs-led research on β -thalassemia treatment methods. **Frontiers in Hematology**, v. 1, 4 jan. 2023.

DEMIRCI, S. et al. BCL11A enhancer-edited hematopoietic stem cells persist in rhesus monkeys without toxicity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 12, p. 6677–6687, 1 dez. 2020.

OLIVEIRA, A. **Hemoglobinopatias e seu diagnóstico laboratorial**, 25 nov. 2022.

FERRARESI, M. et al. Therapeutic perspective for children and young adults living with thalassemia and sickle cell disease. **European Journal of Pediatrics**, v. 182, n. 6, p. 2509–2519, 2023.

FIBACH, E.; DANA, M. Oxidative Stress in β -Thalassemia. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 23, n. 2, p. 245–261, abr. 2019.

FILSER, M. et al. Importance of Sequencing HBA1, HBA2 and HBB Genes to Confirm the Diagnosis of High Oxygen Affinity Hemoglobin. **Genes**, v. 13, n. 1, p. 132, 12 jan. 2022.

FINOTTI, A.; GAMBARI, R. Combined Approaches For Increasing Fetal Hemoglobin (Hbf) And De Novo Production Of Adult Hemoglobin (Hba) In Erythroid Cells From BThalassemia Patients: Treatment With Hbf Inducers And CRISPR-Cas9 Based Genome Editing. **Frontiers**, v. 5, p.1-13, 17 jul 2023.

FONTANA, L. et al. Epigenetic Regulation of β -Globin Genes and the Potential to Treat Hemoglobinopathies through Epigenome Editing. **Genes**, v. 14, n. 3, p. 577, 25 fev. 2023.

FORNI, G. L. et al. Overall and complication-free survival in a large cohort of patients with β -thalassemia major followed over 50 years. **American Journal of Hematology**, v. 98, n. 3, p. 381–387, mar. 2023.

FRANGOUL, H. et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 3, p. 252–260, 20 jan. 2021.

FREIRE, Í. A. et al. β -Thalassemia major: um relato de caso. **Revista de Medicina da UFC**, v. 59, n. 2, p. 66–70, 19 jun. 2019.

FU, B. et al. CRISPR–Cas9-mediated gene editing of the BCL11A enhancer for pediatric β^0/β^0 transfusion-dependent β -thalassemia. **Nature Medicine**, v. 28, n. 8, p. 1573–1580, ago. 2022.

GARG, A. et al. Safety and Efficacy of Thalidomide and Hydroxyurea Combination in Beta Thalassemia Patients. **Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion**, v. 39, n. 1, p. 85–89, jan. 2023.

GUPTA, D. et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. **Life Sciences**, v. 232, p. 116636, 1 set. 2019.

SCHUMACHER, Harold; ROCK, William; STASS, Sanford (Ed.). **Handbook of hematologic pathology**. CRC Press, 2019.

HARTEVELD, C. L. et al. The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 44, n. Suppl 1, p. 28–36, set. 2022.

HRYHOROWICZ, M. et al. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 3, p. 233–240, jun. 2017.

JENSEN, T. I.; AXELGAARD, E.; BAK, R. O. Therapeutic gene editing in haematological disorders with CRISPR/Cas9. **British Journal of Haematology**, v. 185, n. 5, p. 821–835, jun. 2019.

JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. **Annual**

Review of Biophysics, v. 46, p. 505–529, 22 maio 2017.

KARPONI, G.; ZOGAS, N. Gene Therapy For Beta-Thalassemia: Updated Perspectives. **The Application of Clinical Genetics**, v. 12, p. 167–180, 23 set. 2019.

KAUTZ, L. et al. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. **Nature Genetics**, v. 46, n. 7, p. 678–684, jul. 2014.

K.C., SHIVA R.; BASNET, S.; GYAWALI, P. Prevalence of Hemoglobinopathies and Hemoglobin Variants. v. 19, 1 set. 2017.

KONSTANTAKOS, V. et al. CRISPR-Cas9 gRNA efficiency prediction: an overview of predictive tools and the role of deep learning. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 7, p. 3616–3637, 22 abr. 2022.

KUBASCH, A. S.; FENAUX, P.; PLATZBECKER, U. Development of luspatercept to treat ineffective erythropoiesis. **Blood Advances**, v. 5, n. 5, p. 1565–1575, 9 mar. 2021.

LIU, W. et al. Applications and challenges of CRISPR-Cas gene-editing to disease treatment in clinics. **Precision Clinical Medicine**, v. 4, n. 3, p. 179–191, 16 set. 2021.

LONE, B. A. et al. CRISPR/Cas9 System: A Bacterial Tailor for Genomic Engineering. **Genetics Research International**, v. 2018, 2018.

LONGO, F. et al. Ineffective Erythropoiesis in β -Thalassaemia: Key Steps and Therapeutic Options by Drugs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 7229, 5 jul. 2021.

MAGRIN, E.; MICCIO, A.; CAVAZZANA, M. Lentiviral and genome-editing strategies for the treatment of β -hemoglobinopathies. **Blood**, v. 134, n. 15, p. 1203–1213, 10 out. 2019.

MALERBA, D. P. Estresse oxidativo e gravidade da anemia falciforme em associação com alfa talassemia e uso de hidroxicarbamida. 4 mar. 2024.

MANSILLA-SOTO, J. et al. Cell and Gene Therapy for the Beta-Thalassemias: Advances and Prospects. **Human Gene Therapy**, v. 27, n. 4, p. 295–304, abr. 2016.

MARTYN, G. E. et al. Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of BCL11A or ZBTB7A binding. **Nature Genetics**, v. 50, n. 4, p. 498–503, abr. 2018.

NEEDS, T.; GONZALEZ-MOSQUERA, L. F.; LYNCH, D. T. Beta Thalassemia. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

ORIGA, R. β -Thalassemia. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 6, p. 609–619, 1 jun. 2017.

PASCHOUDI, K.; YANNAKI, E.; PSATHA, N. Precision Editing as a Therapeutic Approach for β -Hemoglobinopathies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9527, 31 maio 2023.

PAVANI, G. et al. Correction of β -thalassemia by CRISPR/Cas9 editing of the α -globin locus in human hematopoietic stem cells. **Blood Advances**, v. 5, n. 5, p. 1137–1153, 26 fev. 2021.

RANDHAWA, S.; SENGAR, S. Chapter One - The evolution and history of gene editing technologies. Em: GHOSH, D. (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. Advances in CRISPR/Cas and Related Technologies. [s.l.] Academic Press, 2021. v. 178p. 1–62.

SANCHEZ-VILLALOBOS, M. et al. New Insights Into Pathophysiology of β -Thalassemia. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 880752, 2022.

SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H. The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. **Cold**

Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 3, n. 1, p. a011643–a011643, 3 dez. 2012.

SANTOS, Daniela Filipa Claudino. **Caracterização molecular de Hemoglobinopatias na população portuguesa—um sub-estudo do projeto INSEF**. 2021. Tese de Doutorado.

SERPELONI, B. B. et al. O sistema CRISPR/Cas9 e o potencial para a talassemia beta. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 23, n. 1, p. 2–5, 2022.

TAHER, A. T. et al. New film-coated tablet formulation of deferasirox is well tolerated in patients with thalassemia or lower-risk MDS: Results of the randomized, phase II ECLIPSE study. **American Journal of Hematology**, v. 92, n. 5, p. 420–428, maio 2017.

TAHER, A. T. et al. Improving outcomes and quality of life for patients with transfusion-dependent β -thalassemia: recommendations for best clinical practice and the use of novel treatment strategies. **Expert Review of Hematology**, v. 14, n. 10, p. 897–909, out. 2021.

TAHER, A. T. et al. Luspatercept for the treatment of anaemia in non-transfusion-dependent β -thalassaemia (BEYOND): a phase 2, randomised, double-blind, multicentre, placebo-controlled trial. **The Lancet. Haematology**, v. 9, n. 10, p. e733–e744, out. 2022.

TAHER, A. T.; SALIBA, A. N. Iron overload in thalassemia: different organs at different rates. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2017, n. 1, p. 265–271, 8 dez. 2017.

THOMPSON, A. A. et al. Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 16, p. 1479–1493, 19 abr. 2018.

TOPFER, S. K. et al. Disrupting the adult globin promoter alleviates promoter competition and reactivates fetal globin gene expression. **Blood**, v. 139, n. 14, p. 2107–2118, 7 abr. 2022.

TORRES, G. A. Hemoglobinopatias: manifestações clínica e diagnósticos. 2016.

VIPRAKASIT, V.; EKWATTANAKIT, S. Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 32, n. 2, p. 193–211, abr. 2018.

WANG, S.-W. et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, p. 57, 21 fev. 2022.

WATTANAPANITCH, M. et al. One-step genetic correction of hemoglobin E/beta-thalassemia patient-derived iPSCs by the CRISPR/Cas9 system. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 46, 26 fev. 2018.

YASARA, N.; PREMAWARDHENA, A.; METTANANDA, S. A comprehensive review of hydroxyurea for β -haemoglobinopathies: the role revisited during COVID-19 pandemic. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 16, p. 114, 1 mar. 2021.

ZAGO, M. A; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R.. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.

ZENG, S. et al. CRISPR/Cas-based gene editing in therapeutic strategies for beta-thalassemia. **Human Genetics**, v. 142, n. 12, p. 1677–1703, 1 dez. 2023.