



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

AMANDA BEZERRA DE SÁ ARAÚJO

**CRISPR-CAS9 COMO FERRAMENTA TERAPÊUTICA NA  
ANEMIA FALCIFORME: ABORDAGENS MODULATÓRIAS  
DO BCL11A PARA ELEVAÇÃO DA HEMOGLOBINA FETAL**

Recife  
2024

AMANDA BEZERRA DE SÁ ARAÚJO

**CRISPR-CAS9 COMO FERRAMENTA TERAPÊUTICA NA  
ANEMIA FALCIFORME: ABORDAGENS MODULATÓRIAS  
DO BCL11A PARA ELEVAÇÃO DA HEMOGLOBINA FETAL**

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: Msc. Gabriela da Silva Arcanjo  
Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Recife  
2024

AMANDA BEZERRA DE SÁ ARAÚJO

**CRISPR-CAS9 COMO FERRAMENTA TERAPÊUTICA NA ANEMIA  
FALCIFORME: ABORDAGENS MODULATÓRIAS DO BCL11A PARA  
ELEVAÇÃO DA HEMOGLOBINA FETAL**

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 UFPE

---

Mestre Amanda Moreira Gonçalves de Aguiar  
Laboratório Central do Centro de Biociências - UFPE

---

Doutor Juan Luiz Coelho  
UFPE/ Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

Dedico este trabalho à minha vó, dona Inalda Maria Bezerra de Sá. Obrigada por tudo, vovó.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Msc. Gabriela Arcanjo, que me guia desde o início da minha jornada acadêmica. Sem você, nada disso seria possível. Obrigada pelos ensinamentos, pelos materiais, pela disponibilidade, paciência e atenção.

Ao meu professor e co-orientador Dr. Marcos André, que também está comigo desde o início, por me apresentar a hematologia e me guiar através dela. Tudo o que conquistei ao longo da minha jornada universitária se deve em grande parte à sua dedicação em me tornar uma profissional melhor. Sem o senhor, eu não estaria onde estou.

Aos meus colegas da graduação e do Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial do LabCen, que trilharam essa jornada comigo, mesmo nos momentos mais difíceis. Em especial, meus grandes amigos: Carlos Eduardo, por ter sido o melhor parceiro de monitoria que eu poderia pedir, Vitor Pontes, por sempre me apoiar e Carlos Augusto Brandão, por ser você.

Agradeço também à minha família por todo o suporte. Principalmente à minha mãe, Fabíola Bezerra, por tudo o que fez e faz por mim. Você esteve comigo nos meus piores e melhores momentos e se hoje tenho a oportunidade de escrever e apresentar esse trabalho, grande parte se deve a você. Obrigada por nunca desistir de mim e sempre me apoiar.

“ Se eu puder evitar que um coração se parta,  
eu não terei vivido em vão; se eu puder evitar a  
agonia duma vida, ou acalantar uma dor, ou  
assistir um desfalecido melro a voltar a seu  
ninho, eu não terei vivido em vão. ”

Emily Dickinson

ARAÚJO, Amanda Bezerra de Sá. **CRISPR-Cas9 como ferramenta terapêutica na Anemia Falciforme: Abordagens modulatórias do BCL11A para elevação da hemoglobina fetal.** 2024. 52 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## RESUMO

A Anemia Falciforme (AF) é a forma clássica da doença falciforme, que possui como principal característica a presença da Hemoglobina S (HbS). Quando se encontra em baixa pressão de O<sub>2</sub>, ela polimeriza e forma longas fibrilas, originando as hemácias falcizadas, que apresentam moléculas de adesão anormais, aumentando assim sua aderência. A adesão celular aumentada, junto com outros fatores, resulta em graves complicações clínicas. Como forma de tratamento, alguns dos principais esforços dos pesquisadores estão sendo voltados para a indução da hemoglobina fetal (HbF), fundamental na melhora do quadro clínico do paciente por competir com a HbS, interferindo na sua polimerização. Para tanto, muitos estudam a possibilidade do uso do CRISPR-Cas9 (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associadas à proteína 9) como tratamento para AF, visto que essa ferramenta é capaz de editar o genoma das células do paciente, sendo uma dessas formas a modulação do gene *BCL11A* (*Linfoma de células B/leucemia 11A*), cuja função é inibir a produção de gama globina. Essa cadeia globínica compõe a estrutura da HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Este trabalho teve como objetivo explorar o uso do CRISPR-cas9 na modulação do *BCL11A* para a indução da HbF como possível tratamento para pacientes com AF. Para tanto, foi feita uma revisão integrativa de dados obtidos em artigos experimentais com foco no mecanismo estudado. Ao comparar diferentes alvos da ferramenta, concluiu-se que tanto a modificação do sítio de ligação dos promotores dos genes quanto o silenciamento do *BCL11A* são os alvos mais promissores e seguros. Ambos obtiveram elevados níveis de HbF, sendo o silenciamento do *BCL11A* o responsável por trazer benefícios comprovados por ensaios clínicos para os pacientes falciformes, como a eliminação das crises vaso-occlusivas e da necessidade de transfusão. A partir disso, foi possível concluir que o uso do CRISPR-Cas9 na modulação do *BCL11A* é bastante eficiente no aumento da HbF, o que traz benefícios para o paciente, sendo assim de suma importância a realização de mais estudos e ensaios clínicos com foco nessa ferramenta para assim popularizar o seu uso e garantir a sua segurança a longo prazo.

**Palavras-chave:** Doença Falciforme. Tratamento. CRISPR. Modulação Genética. HbF.

ARAÚJO, Amanda Bezerra de Sá. **CRISPR-Cas9 as a Therapeutic Tool in Sickle Cell Anemia: Modulatory Approaches of BCL11A for Fetal Hemoglobin Elevation.** 2024. 52 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## ABSTRACT

Sickle Cell Anemia (SCA) is the classic form of sickle cell disease, characterized by the presence of Hemoglobin S (HbS) as its main feature. When exposed to low oxygen pressure, it polymerizes and forms long fibrils, resulting in sickled red blood cells with abnormal adhesion molecules, thereby increasing their adherence. Increased cellular adhesion, along with other factors, leads to severe clinical complications. As a treatment approach, researchers are focusing their efforts on inducing fetal hemoglobin (HbF), crucial for improving the patient's clinical condition by competing with HbS and interfering with its polymerization. Therefore, many are exploring the possibility of using CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated with Cas9 protein) as a treatment for SCA, as this tool can edit the patient's cell genome, with one such approach being the modulation of the *BCL11A* gene (B-cell lymphoma/leukemia 11A), which functions to inhibit gamma globin production. This globin chain is part of the HbF structure ( $\alpha_2\gamma_2$ ). This study aimed to explore the use of CRISPR-Cas9 in modulating *BCL11A* to induce HbF as a potential treatment for SCA patients. An integrative review of data obtained from experimental articles focusing on the studied mechanism was conducted. By comparing different targets of the tool, it was concluded that both modifying the gene promoters' binding site and silencing *BCL11A* are the most promising and safe targets. Both approaches resulted in elevated levels of HbF, with silencing *BCL11A* being responsible for proven benefits in sickle cell patients, such as the elimination of vaso-occlusive crises and the need for transfusions, as demonstrated by clinical trials. From this, it was possible to conclude that using CRISPR-Cas9 to modulate *BCL11A* is highly efficient in increasing HbF, which brings benefits to the patient. Therefore, conducting more studies and clinical trials focusing on this tool is crucial to popularize its use and ensure its long-term safety.

**Key words:** Sickle Cell Disease. Treatment. CRISPR. Genetic Modulation. HbF.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Loci das globinas humanas	14
<b>Figura 2</b> – Fisiopatologia da AF	16
<b>Figura 3</b> – Edição do genoma induzida por nucleases projetadas	23
<b>Figura 4</b> – Mecanismo do CRISPR-Cas9 para aumento da HbF	26
<b>Figura 5</b> – Sequências-alvo para cada sgRNA	31
<b>Figura 6</b> – Análise das HSPCs CD34+	32
<b>Figura 7</b> – As mutações associadas à HPFH elevam expressão de $\gamma$ -globina	34
<b>Figura 8</b> – Clusters associados à HPFH	35
<b>Figura 9</b> – Eficiência da edição do genoma em linhagens celulares eritróides	36
<b>Figura 10</b> – Reativação da gama globina após edição gênica	37
<b>Figura 11</b> – O silenciamento de BCL11A leva à indução de HbF em células K562	37
<b>Figura 12</b> – HbF na edição de um único gene	39
<b>Figura 13</b> – Resultados da edição múltipla	40
<b>Figura 14</b> – HbF após edição	41
<b>Figura 15</b> – Hbs, Células F e eventos transfusionais dos pacientes	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Manifestações clínicas da AF	18
<b>Tabela 2</b> – Terapias farmacológicas atualmente aprovadas para a AF	22
<b>Tabela 3</b> – Artigos utilizados nos resultados	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAVS1	Sítio De Ancoragem Do Vírus Adeno-Associado 1
AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente Vascular Cerebral
<i>BCL11A</i>	do inglês, <i>B-cell lymphoma/leukemia 11A</i>
<i>BCL6</i>	do inglês, <i>B-cell lymphoma 6</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAR	Contagem Absoluta de Reticulócitos
<i>Cas9</i>	do inglês, <i>CRISPR-associated protein 9</i>
CRISPR-Cas9	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associadas à proteína 9
CVO	Crises Vaso-Oclusivas
DAPK1	do inglês, <i>Death-associated Protein Kinase 1</i>
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Dupla quebra de fita no DNA
DTC	Doppler Transcraniano
DUSP2	do inglês, <i>Dual-Specificity Phosphatase 2</i>
EMSAs	Ensaio de Mobilidade Eletroforética de Mudança
EPO	Eritropoetina
ERK/MAPK	Proteína Quinase Ativada Por Mitógeno/Fosfatase Ativada Por Mitógeno
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FLT3	do inglês, <i>FMS-Like Tyrosine Kinase 3</i>
GM-CSF	Fator Estimulador De Colônias De Granulócitos-Macrófagos
gRNA	RNA guia
GVHD	Doença do enxerto-versus-hospedeiro ( <i>Graft Versus Host Disease</i> )
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina do Adulto
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina Falciforme ( <i>Sickle</i> )
HDAC	Histonas Desacetilases
HDR	Reparo Dirigido por Homologia ( <i>Homology-Directed Repair</i> )

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
HSPC	Células Progenitoras de Células-tronco Hematopoiéticas ( <i>Hematopoietic Stem And Progenitor Cells</i> )
HU	Hidroxiuréia
ICAM-1	Molécula De Adesão Intercelular 1
ICS	Infartos Cerebrais Silenciosos
IL7-R	Receptor de interleucina-7
INDELS	Inserções e Deleções
KLF1	Fator 1 do tipo Krueppel
LCR	do inglês, <i>Locus Control Region</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
LRF	do inglês, <i>Leukemia/Lymphoma-Related Factor</i>
mRNA	DNA mensageiro
NHEJ	Junção Não Homóloga ( <i>Non-Homologous End Joining</i> )
NO	Óxido Nítrico
PCR	Proteína C Reativa
HPFH	Persistência Hereditária de HbF ( <i>Hereditary Persistence Of Fetal Hemoglobin</i> )
PIR	Priapismo Isquêmico Recorrente
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RP-HPLC	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Por Fase Reversa
sgRNAs	RNA de guias únicos
Sp1	Proteína de Especificidade 1
STA	Síndrome Torácica Aguda
VHS	Volume de Hemossedimentação
VOD-SOS	Doença Venoso-Oclusiva Hepática Com Síndrome De Obstrução Sinusoidal
WBC	do inglês, <i>White Blood Cells</i>
ZF	do inglês, <i>Zinc Finger</i>

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
1.1	SÍNTESE DE HEMOGLOBINA.....	14
1.2	ANEMIA FALCIFORME.....	15
1.2.1	Fisiopatologia.....	15
1.2.2	Manifestações Clínicas.....	17
1.2.3	Tratamento.....	20
1.3	CRISPR-Cas9.....	24
1.3.1	BCL11A.....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.2	Objetivos Específicos.....	27
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## INTRODUÇÃO

A Anemia Falciforme (AF) é a doença monogênica mais comum no mundo. Ela é caracterizada pela presença da Hemoglobina S (HbS), formada a partir de uma substituição de glutamato por valina na posição 6 da cadeia proteica da globina beta, que origina a cadeia variante  $\beta^S$ . Essa cadeia origina um tetrâmero assimétrico, que se polimeriza em baixa pressão parcial de  $O_2$ , formando longas fibrilas, o que deixa as hemácias rígidas e modifica sua forma, tornando-as falcizadas. A mutação em heterozigose determina o portador ou traço falcêmico (geralmente assintomático) e a mutação em homozigose determina a forma clássica da AF (FERREIRA; GOUVÊA, 2018). As hemácias falcizadas apresentam anormalidades nas moléculas de adesão, o que resulta em anemia hemolítica e vaso-occlusão, que por sua vez causam manifestações clínicas como crise vaso-occlusiva, dor, infarto pulmonar, priapismo, maior suscetibilidade à infecção e acidente vascular cerebral (RUMANEY et al., 2014). Tudo isso contribui para uma expectativa de vida reduzida em até 30 anos para pacientes acometidos pela AF, ainda que tratados com os melhores medicamentos disponíveis (PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

Para reduzir os sintomas da doença, opções como transfusão sanguínea e terapia com hidroxiuréia (HU) têm sido utilizadas. A transfusão, no entanto, não corrige o fenótipo e pode resultar em sobrecarga de ferro. O uso da HU, por outro lado, proporciona benefício clínico através da indução da hemoglobina fetal (HbF) (DEMIRCI; UCHIDA; TISDALE, 2018). A HbF é composta por duas cadeias alfa e duas cadeias gama ( $\alpha_2, \gamma_2$ ) e é expressa durante o período fetal, porém depois do nascimento é substituída pelas hemoglobinas do adulto (HbA,  $\alpha_2, \beta_2$ ; HbA<sub>2</sub>,  $\alpha_2, \delta_2$ ) (LETTRE; BAUER, 2016). Por não ter cadeias beta na sua composição, ela não forma polímero com a HbS, o que diminui a polimerização da HbS e, conseqüentemente, a formação de hemácias falcizadas, reduzindo ou até mesmo cessando as crises vaso-occlusivas (CVO) e outras complicações da doença (WHITE; HART; KOHN, 2023). Além disso, ela também é associada a diminuição de úlceras nas pernas, aumento na saturação de oxigênio e maior longevidade (STEINBERG, 2020). Apesar disso, a resposta da HU muda de pessoa para pessoa, além de existir a preocupação do uso a longo prazo. (DEMIRCI; UCHIDA; TISDALE, 2018). O transplante de células tronco hematopoiéticas (CTH) para a AF é curativo na maioria dos indivíduos que recebem esse tratamento, porém estima-se que apenas 18% dos pacientes terão um irmão compatível. Além disso, há o risco de infertilidade, doença do enxerto contra o

hospedeiro (GVHD) e morte (WALTERS et al., 2016).

Como alternativa, tendo em mente que níveis elevados de HbF estão associados a uma diminuição das complicações clínicas em pacientes com doença falciforme, estudos apontam o uso de ferramentas de edição gênica para o seu aumento. Entre elas, destacam-se as Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) associadas ao *Cas9* (*CRISPR-associated protein 9*), chamada de CRISPR-Cas9, capaz de editar diretamente o genoma das células do paciente para aumentar a produção de HbF (PAIKARI; SHEERAN, 2018).

Algumas das abordagens mais estudadas para a elevação da HbF através da CRISPR-cas9 envolvem o gene *BCL11A* (Linfoma de células B/leucemia 11A). O *BCL11A* é responsável pela ligação com os promotores dos genes de gama globina (*HBG1* e *HBG2*), o que impede a interação deles com o *LCR* (*Locus Control Region*) causando a repressão da sua expressão. Sendo assim, o silenciamento do *BCL11A* está associado a uma menor sintomatologia em pacientes com AF, visto que a  $\gamma$ -globina compõe a HbF (WHITE; HART; KOHN, 2023). Para regular o *BCL11A* através do mecanismo do CRISPR-cas9, tem-se, entre outros meios, o silenciamento do seu acentuador eritróide, interrompendo assim a sua influência na  $\gamma$ -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  $\gamma$ -globina continue sendo produzida (PASCHOUDI; YANNAKI; PSATHA, 2023). Sendo assim, torna-se importante a investigação do uso desses mecanismos em pacientes com AF visando avaliar os resultados experimentais, a segurança e o possível uso prático deles, visando uma melhor qualidade de vida e maior sobrevivência dos indivíduos afetados.

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 SÍNTESE DE HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb), expressa abundantemente nas células vermelhas do sangue, é uma proteína tetramérica composta por duas cadeias  $\alpha$ -símiles ( $\alpha$  ou  $\zeta$ ) e duas cadeias  $\beta$ -símiles ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ou  $\epsilon$ ) (ZAGO, 2013), cujo loci estão localizados nos cromossomos humanos 16 e 11, respectivamente (Figura 1). Esses, por sua vez, consistem em um conjunto de genes que são ativados e silenciados sequencialmente ao longo do desenvolvimento. A Hb é responsável por transportar oxigênio dos pulmões para os diversos tecidos do corpo. Vários genes codificam diferentes tipos de proteínas de globina, e suas várias combinações tetraméricas geram múltiplos tipos de Hb, que são normalmente expressos em diferentes estágios da vida - embrionário, fetal e adulto. Sua expressão é regulada para atender às mudanças nas necessidades de oxigênio durante a ontogenia, um fenômeno conhecido como troca de hemoglobinas (WIENERT et al., 2018).

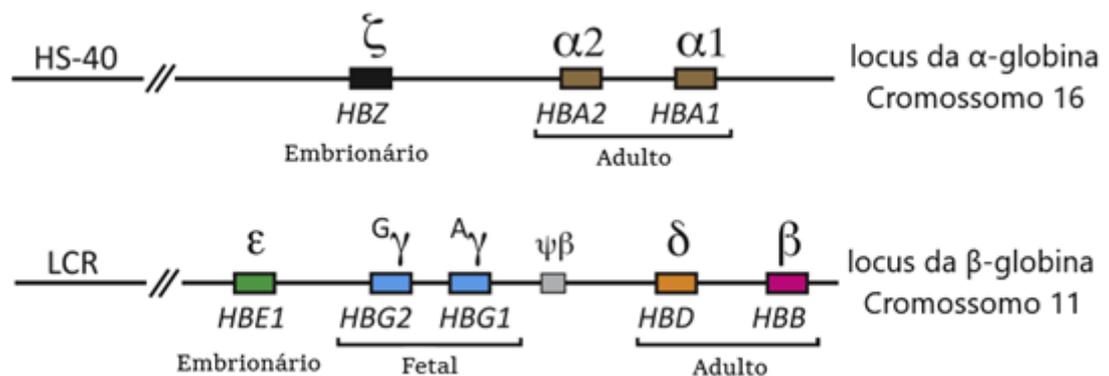


Figura 1: Loci das globinas humanas. Ambos os loci são regulados por elementos amplificadores fortes montante dos genes da globina, HS-40, e a região de controle do locus (LCR). Um pseudogene ( $\Psi\beta$ ) está localizado entre os genes da globina fetal e adulta no locus da globina beta. Adaptado de Wienert et al., (2018).

O local para a síntese primária de hemoglobina é o saco vitelino embrionário, e a primeira transição de hemoglobina (de primitiva para fetal) ocorre no fígado do feto após 5 semanas de gestação, quando há uma troca de hemoglobina embrionária (HbE,  $\zeta_2\epsilon_2$ ) para hemoglobina fetal (HbF,  $\alpha_2\gamma_2$ ). No final do terceiro trimestre, há uma transição gradual de hemoglobina fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ), para hemoglobina

adulta (HARIHARAN; NADKARNI, 2021). Enquanto a HbF é uma combinação de duas proteínas  $\alpha$ -globinas (codificadas pelos genes duplicados *HBA1* e *HBA2*) e duas proteínas  $\gamma$ -globinas (codificadas por *HBG1* e *HBG2*), A HbA, a forma mais abundante (>90%) de Hb adulta, é composta por duas subunidades  $\alpha$ -globina e duas subunidades  $\beta$ -globina (codificadas pelo gene *HBB*) (KATO et al., 2018).

## 1.2 ANEMIA FALCIFORME

A Doença Falciforme (DF) ocorre a partir de uma única mudança na base no códon 6 do gene da globina  $\beta$  (A>T), o que gera uma troca de aminoácidos, onde o ácido glutâmico é substituído pela valina, produzindo a HbS ( $\alpha_2\beta^S_2$ ). As causas genéticas da DF incluem homozigose para a mutação (HbSS, comumente referida como AF) e heterozigose composta pela HbS e mutações que levam a outras variantes estruturais da  $\beta$ -globina (como HbC, causando HbSC) (CISNEROS; THEIN, 2020). De acordo com a análise sistemática do Global Burden of Disease (GBD), 3,2 milhões de pessoas convivem com a DF, 43 milhões possuem o traço falciforme (ou seja, são portadores da mutação) e 176.000 pessoas morrem anualmente de complicações relacionadas à DF (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Em pacientes de ascendência africana, a AF é a causa mais comum da DF (65–70%). Nela, a concentração intracelular de HbS é quase 100%, fazendo dela a forma mais grave e mais bem descrita na literatura (CISNEROS; THEIN, 2020).

### 1.2.1 Fisiopatologia

A substituição do ácido glutâmico por valina na posição  $\beta_6$  ocorre na região externa da molécula, sem provocar alterações significativas na sua conformação global. No entanto, em condições de desoxigenação, a HbS torna-se relativamente insolúvel e agrega-se em longos polímeros dentro da hemácia, fazendo com que ela adquira a forma clássica de foice (ZAGO, 2013). Essa polimerização é diretamente proporcional à concentração intraeritrocitária de HbS (elevado à potência 34) e inversamente proporcional à concentração de Hb fetal (HbF, ( $\alpha_2, \gamma_2$ )), que substitui HbS e interfere na polimerização da HbS (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Episódios repetidos de polimerização da HbS e falcização das hemácias em condições de baixa  $pO_2$  e desfalcização em condições de alta  $pO_2$  podem levar a

alterações graves na estrutura e função da membrana e à compartimentalização anormal de cálcio, o que desidrata o eritrócito. Esses eventos resultam na formação de uma célula irreversivelmente falcizada (KATO et al., 2018), rígida e com maior aderência ao endotélio vascular (ZAGO, 2013).

Em decorrência de sua acentuada rigidez, essas células têm vida-média reduzida para 16 dias (104 dias a menos do que deveria) (WILLIAMS; THEIN, 2018), contribuindo significativamente para a anemia hemolítica dos pacientes. No entanto, os sintomas causados pela anemia em si não são os principais agravantes do quadro clínico da AF, mas sim a ocorrência de lesões orgânicas causadas pela inflamação e obstrução vascular e das chamadas “crises de falcização”. (ZAGO, 2013).

Por apresentarem anormalidades nas características reológicas e na expressão de moléculas de adesão, as hemácias falcizadas podem bloquear pequenos vasos sanguíneos, causando vaso-oclusão. A polimerização da HbS, vaso-oclusão e a anemia hemolítica precipitam uma cascata de eventos patológicos, que por sua vez levam a uma ampla gama de complicações. Esses processos incluem deficiência funcional de óxido nítrico (NO), inflamação, estresse oxidativo e ativação plaquetária (PIEL; STEINBERG; REES, 2017), explicados em parte pela liberação contínua de hemoglobina livre (advinda da hemólise) que esgota a biodisponibilidade de NO (Figura 2) (WILLIAMS; THEIN, 2018). Isso, por sua vez, causa um aumento no estresse oxidativo e contribui para a vaso oclusão, visto que o NO é um importante vasodilatador e regulador da função plaquetária (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

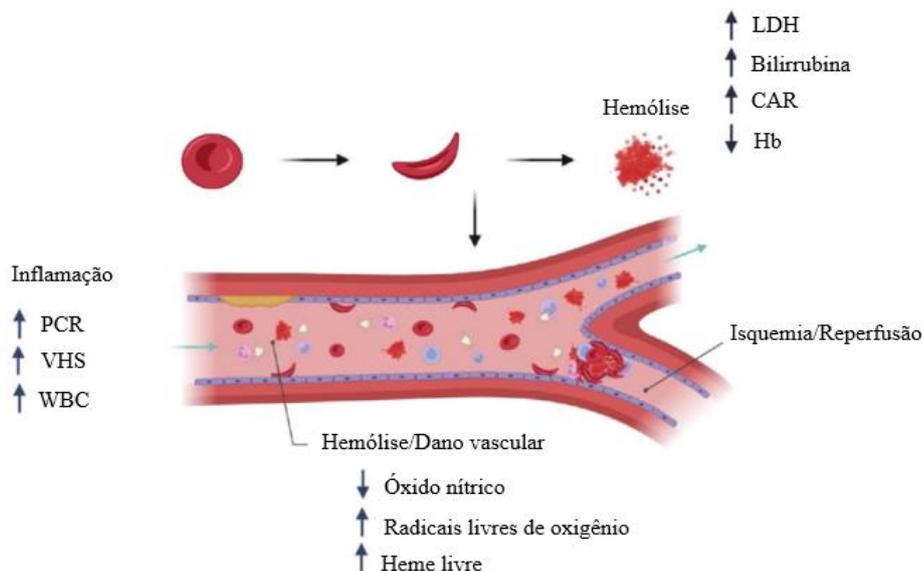


Figura 2: Fisiopatologia da AF. A HbS polimeriza em condições de hipóxia, formando a

hemácia falcizada; os efeitos subsequentes afetam outras células sanguíneas, causam inflamação, danificam o sistema vascular e resultam em complicações clínicas graves. LDH = Lactato Desidrogenase; CAR = Contagem Absoluta de Reticulócitos; Hb = Hemoglobina; PCR = Proteína C Reativa; VHS = Volume de Hemossedimentação; WBC = do inglês, *White Blood Cells* (Células Brancas do Sangue). Adaptado de Saah et al. (2022).

O esgotamento de NO também contribui para a ativação do endotélio que, uma vez ativado, produz e libera uma série de moléculas inflamatórias potentes, incluindo IL-1, IL-8, IL-6, IL-1, GM-CSF, inibidor do ativador do plasminogênio (PAI)-1, MCP-1 e RANTES, que contribuem para o ambiente inflamatório na AF. Além disso, ele também expressa moléculas de adesão, como VCAM-1, ICAM-1, E-selectina e P-selectina, que são importantes para a fixação e adesão de células vermelhas, leucócitos e plaquetas (CONRAN; BELCHER, 2018).

### 1.2.2 Manifestações Clínicas

A AF é caracterizada por uma ampla gama de sintomas, que podem variar de indivíduo para indivíduo em gravidade e apresentação (ELENDU et al., 2023). As manifestações se dividem em agudas e crônicas (Tabela 1). A vaso-oclusão, um dos pontos centrais da fisiopatologia da AF, pode causar as complicações agudas, o que inclui danos isquêmicos aos tecidos, que por sua vez resultam em dor intensa (crise vaso-oclusiva (CVO) ou falência de órgãos. Já as complicações crônicas se dividem em dois grupos principais: aquelas relacionadas à vasculopatia de grandes vasos (doença cerebrovascular, hipertensão pulmonar, priapismo e retinopatia) e aquelas causadas por danos progressivos isquêmicos em órgãos (hipoesplenismo, insuficiência renal, doença óssea e danos no fígado) (PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

A dor aguda, severa e intermitente, que tem como um dos principais causadores a vaso-oclusão, é a complicação mais comum da AF e representa mais de 70% das visitas a serviços de cuidados agudos para pessoas com a doença. A crônica, por sua vez, é diária, aumenta com a idade e pode ser causada pela sensibilização do sistema nervoso central, periférico ou ambos. É frequentemente difusa, com características de dor neuropática (BRANDOW; LIEM, 2022).

Tabela 1: Manifestações clínicas da AF. Adaptado de Ware et al. (2017).

<b>Manifestações</b>	
<b>Agudas</b>	
Dor	Dactilite; dor no esterno/costelas; dor nos ossos longos; priapismo.
Infecção	Bacteremia/septicemia; meningite; osteomielite; pneumonia; malária.
Anemia	Sequestro esplênico; crise aplástica transitória; reação transfusional; necrose papilar
Dano aos órgãos	Derrame cerebral; síndrome torácica aguda; infarto esplênico; necrose papilar.
<b>Crônicas</b>	
Rins	Hiperstenúria; hiperfiltração glomerular; glomeruloesclerose; albuminúria; doença renal em estágio terminal.
Coração/Pulmões	Doença pulmonar restritiva; velocidade elevada do jato tricúspide; hipertensão pulmonar; miocardiopatia restritiva.
Cérebro	Acidente vascular cerebral isquêmico; acidente vascular cerebral hemorrágico; infarto silencioso; declínio neurológico.
Ossos/Pele	Necrose avascular; úlceras nas pernas.

Outra manifestação clínica ocasionada pela vaso-oclusão é a chamada Síndrome Torácica Aguda (STA). A STA é a principal causa de mortalidade (25% das mortes) e a segunda razão mais comum para hospitalização após CVO em indivíduos com AF. Ela está associada a hospitalizações prolongadas, aumento do risco de insuficiência respiratória e à possibilidade de desenvolvimento de doença pulmonar crônica após episódios recorrentes (BHASIN; SARODE, 2023). A STA é uma complicação aguda caracterizada por febre e/ou sintomas respiratórios, acompanhada por um novo infiltrado pulmonar em uma radiografia de tórax (DESAI; ATAGA, 2013). Entretanto, a ocorrência, bem como os sintomas e a progressão do quadro diferem significativamente com a idade. Em crianças com menos de 10 anos de idade, a incidência de STA é mais alta, sendo frequentemente desencadeada por infecções

pulmonares. Como resultado, elas costumam apresentar febre, tosse e chiado. Crianças mais velhas e adultos apresentam com maior frequência dispneia e dor no peito, seguindo geralmente um curso mais grave (JAIN; BAKSHI; KRISHNAMURTI, 2017).

O priapismo é uma condição patológica incomum caracterizada por uma ereção peniana prolongada na ausência de excitação ou desejo sexual. Esta condição patológica, especificamente a variante isquêmica, frequentemente está associada a complicações devastadoras como necrose, fibrose dos tecidos eréteis e disfunção erétil (ANELE et al., 2015). A sua variante isquêmica (priapismo veno-oclusivo), também pode ser observada em pacientes com AF. O priapismo está associado a um fluxo sanguíneo cavernoso diminuído ou ausente, rigidez corporal e dor. Além disso, pacientes falciformes têm um risco elevado de Priapismo Isquêmico Recorrente (PIR), também chamado de priapismo intermitente. Os mecanismos precisos envolvidos no desenvolvimento do priapismo associado à AF são mal definidos, mas estudos mostraram o papel de componentes como a síntese do óxido nítrico endotelial, adenosina, estresse oxidativo, heme oxigenase e testosterona na fisiopatologia do priapismo (ARDUINI; TROVÓ DE MARQUI, 2018).

Pacientes com AF estão em risco de desenvolver diversas complicações neurocognitivas. O comprometimento cognitivo aumenta com a idade em crianças com AF, mesmo na presença de exames de imagem cerebral normais. Testes neuropsicológicos em adultos com AF neurologicamente assintomáticos demonstraram função cognitiva diminuída em comparação com controles Hb AA, agravando-se com o avanço da idade. Isso ocorre por conta da cascata de eventos patológicos, incluindo inflamação, hipercoagulabilidade, disfunção endotelial e vaso-oclusão, desencadeadas pela hemólise e a leucocitose nos pacientes falciformes (AMLIE-LEFOND et al., 2018).

O acidente vascular cerebral (AVC) em vasos sanguíneos de grande porte em pacientes com AF é o resultado de danos vasculares progressivos que causam estenose. A estenose em vasos sanguíneos de grande porte é visível em angiografia cerebral e pode ser inferida por velocidades elevadas de Doppler transcraniano (DTC). Hemoglobina <9 g/dL está associada a um risco elevado de AVC. Em crianças pequenas, níveis diminuídos de hemoglobina em meio a uma doença febril aguda, ou aplasia transitória da medula óssea, como observado em infecções por parvo vírus B19, carrega um risco aumentado de AVC (SAAH et al., 2022).

Sem tratamento, de 7% a 12% das pessoas com AF terão um AVC evidente até os 20 anos e 24% até os 45 anos (AMLIE-LEFOND et al., 2018). Nelas, também ocorrem os chamados infartos cerebrais silenciosos (ICS), que são lesões isquêmicas no cérebro sem evidência clínica de déficits neurológicos. Até um quarto das crianças com AF com menos de 6 anos de idade apresentam ICS, que também pode ser detectado em mais de um terço dos adolescentes com menos de 18 anos (HIRTZ; KIRKHAM, 2019).

A AF apresenta lesão de múltiplos órgãos, sendo o baço um dos primeiros e principais órgãos acometidos (LAKHANI et al., 2022). O baço age diretamente na corrente sanguínea, tendo como principais funções filtrar o sangue, especialmente as hemácias, e contribuir para a defesa imunológica, especialmente contra infecções transmitidas pelo sangue. As propriedades comprometidas das hemácias falcizadas levam a danos no baço no início do curso da doença. Esses, por sua vez, resultam na perda precoce de função esplênica em crianças com AF e aumentam o risco vitalício de infecções por bactérias encapsuladas (HOSS; BROUSSE, 2019). A esplenomegalia é encontrada durante a primeira década de vida, mas mais tarde o baço pode sofrer atrofia progressiva devido a eventos vaso-oclusivos repetidos, levando, em última instância, à auto esplenectomia (LAKHANI et al., 2022). As complicações relacionadas ao baço são responsáveis por uma significativa morbidade e mortalidade em crianças com AF. O sequestro esplênico agudo de hemácias é uma complicação potencialmente fatal nos primeiros meses de vida (HOSS; BROUSSE, 2019).

### 1.2.3 Tratamento

Para aliviar a morbidade, as opções de tratamento atuais incluem transfusões regulares de sangue e o uso de medicamentos que previnem as CVOs ou que reduzem a falcização das hemácias (ZARGHAMIAN; KLERMUND; CATHOMEN, 2023). Dado o papel que a concentração de HbS desempenha no desenvolvimento de eventos vaso-oclusivos e vasculopatia na AF, as transfusões têm o potencial de melhorar a vida dos pacientes. Isso acontece através da elevação da concentração de HbA e redução da concentração de HbS por meio da diluição pelas hemácias do doador. Além disso, ela também suprime a produção endógena de eritropoietina (EPO) e, conseqüentemente, reduz a formação de novas hemácias contendo HbS (AZAR; WONG, 2017). Transfusões pontuais são utilizadas para preparação pré-

operatória ou tratamento de complicações agudas. Já a transfusão periódica na terapia crônica é empregada quando o objetivo é manter um nível mais baixo de HbS, como na prevenção primária ou secundária de AVCs. Um objetivo padrão é manter os níveis de HbS  $\leq 30\%$  ou elevar a hemoglobina para 10-12 g/dL, dependendo da indicação para transfusão. Evita-se, geralmente, elevar a hemoglobina para níveis superiores a 10-12 g/dL para limitar o risco de hiperviscosidade (LINDER; CHOU, 2021). Apesar de suas consideráveis vantagens, no entanto, a transfusão não corrige o fenótipo de forma permanente e pode resultar em sobrecarga de ferro no paciente (DEMIRCI; UCHIDA; TISDALE, 2018).

Entre os medicamentos aprovados e utilizados para tratar a AF (Tabela 2), tem-se a hidroxiuréia (HU), que continua a ser crucial como terapia modificadora de doença na AF desde a publicação do seu ensaio clínico pioneiro em 1995. A HU induz a produção de HbF por meio do estresse eritropoiético, reduz a inflamação, aumenta o NO e diminui a adesão celular. A FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso da HU em 1998 para adultos e em 2017 para uso em crianças com 2 anos ou mais, com o objetivo de reduzir a frequência de eventos dolorosos e a necessidade de transfusões de sangue (BRANDOW; LIEM, 2022).

HbS/HPFH (HbS com Persistência Hereditária de HbF) é uma condição presente em pacientes falciformes que não possuem complicações da doença por naturalmente manterem um nível elevado de HbF. Entretanto, enquanto a HbF é uniformemente distribuída em todas as hemácias de indivíduos com HbS/HPFH, o aumento de HbF induzido pela HU não é uniformemente distribuído entre as hemácias, o que reduz a sua eficácia (TISDALE; THEIN; EATON, 2020). Além disso, os efeitos benéficos da HU não se manifestam imediatamente e podem levar vários meses, sendo necessário monitorar seu uso cuidadosamente, o que nem sempre acontece, e a segurança de longo prazo da hidroxiuréia em pacientes com AF é incerta (KASSIM; DEBAUM, 2014).

Tabela 2: Terapias farmacológicas atualmente aprovadas para a AF.

Medicação (ano de aprovação do FDA)	Faixa etária aprovada	Mecanismo de ação	Efeitos fisiológicos	Efeitos clínicos
Hidroxiuréia (1998 em adultos e 2017 em crianças)	> 9 meses	Inibidor da ribonucleosídeo difosfato redutase	Aumenta a produção de HbF e diminui a polimerização intracelular de HbS	Reduz crises de dor, diminui episódios de síndrome torácica aguda, reduz transfusões de sangue e diminui a mortalidade.
L-Glutamina (2017)	> 5 anos	Aumenta o NADPH	Aumenta o potencial redutor das hemácias	Reduz crises de dor, diminui hospitalizações e diminui episódios de STA.
Crizanlizumabe (2019)	> 16 anos	Anticorpo monoclonal contra P-selectina	Diminui a adesão de hemácias e leucócitos	Diminui as crises de dor
Voxelotor (2019)	> 12 anos	Aumenta a afinidade da Hb pelo oxigênio	Atrasa a produção de deoxihemoglobina e reduz a polimerização da HbS	Aumenta a Hb basal em mais de 1 g/dL, reduz marcadores de hemólise, como os níveis de bilirrubina indireta e a contagem percentual de reticulócitos.

Adaptado de White; Hart; Kohn (2023).

No entanto, cada um desses tratamentos possui limitações específicas que impedem o controle total das complicações da AF. Diversas inovações levaram a opções de tratamento curativo na AF, como o transplante de células-tronco alogênicas. Inicialmente, ele era realizado apenas com a doação de irmãos compatíveis, porém com avanços contínuos nos perfis de segurança, hoje pode ser feito com doadores haploidênticos e não relacionados. Entretanto, a maioria dos pacientes não consegue encontrar uma fonte de doador adequada para o transplante (POLLOCK; NEGRE; RIBEIL, 2023) além do alto risco de Doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD, do inglês *Graft Versus Host Disease*), o que limita a opção de

transplante de medula óssea para pacientes com doença falciforme (ZARGHAMIAN; KLERMUND; CATHOMEN, 2023).

A terapia genética, por outro lado, oferece um meio de tratamento definitivo com as células-tronco do próprio paciente e sem o risco de GVHD. Um dos principais focos dos estudos atuais é a indução da elevação da HbF, dado o seu potente efeito anti-falcêmico, através do aumento da expressão endógena do gene da  $\gamma$ -globina. Esse, por sua vez, ocorre a partir da manipulação dos fatores normais e das vias responsáveis pela inibição da HbF no adulto. Para tanto, tem-se, entre outros mecanismos, a edição gênica (ORKIN; BAUER, 2018), que permite a modificação específica do local no genoma humano para corrigir ou compensar mutações que são a causa de distúrbios genéticos. Essa modificação genômica geralmente ocorre a partir de quebras de fita dupla no DNA (DSBs) que são introduzidas por nucleases projetadas programáveis (ZARGHAMIAN; KLERMUND; CATHOMEN, 2023). Em seguida, ocorre o recrutamento do mecanismo de reparo do DNA por meio de junção não homóloga (NHEJ) ou reparo dirigido por homologia (HDR), utilizando sequências homólogas encontradas em cromátides irmãs, cromossomos homólogos ou sequências de DNA doador extracromossômico fornecidas para fins de correção no local da DSB (Figura 3). Um exemplo dessa tecnologia é o CRISPR-Cas9 (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas/associadas ao CRISPR) (DEMIRCI et al., 2019).

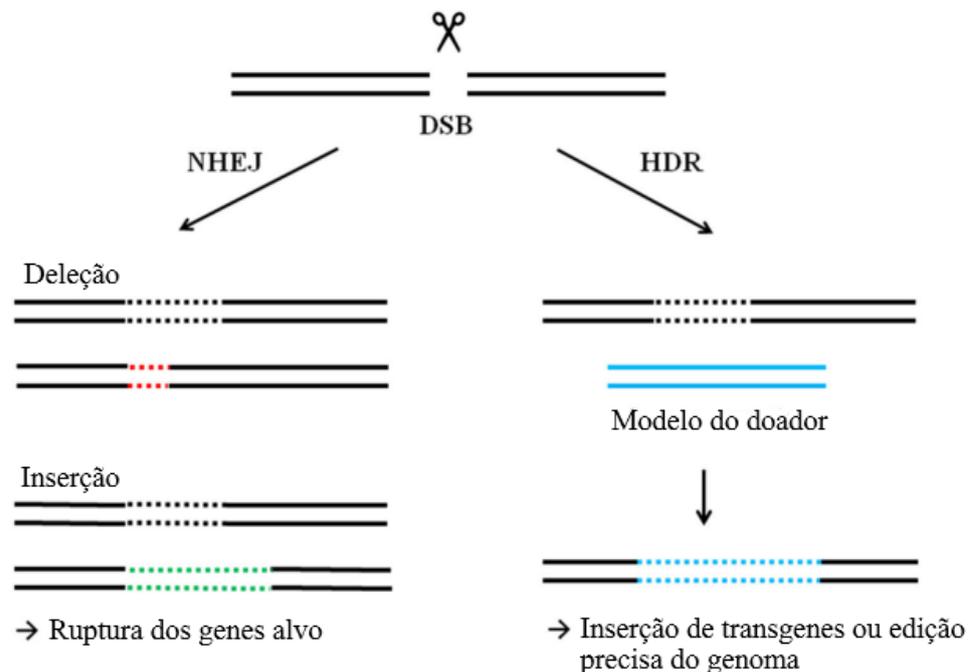


Figura 3: Edição do genoma induzida por nucleases projetadas. Uma quebra de dupla fita (DSB) na sequência-alvo pode ser reparada por meio das vias de junção não homóloga (NHEJ) ou reparo dirigido por homologia (HDR). Adaptado de Hryhorowicz et al. (2017).

### 1.3 CRISPR-CAS9

O CRISPR/Cas é adaptado de um sistema natural de edição de genoma utilizado por bactérias em sua defesa imunológica. Este sistema pode clivar o DNA de fagos ou plasmídeos para possibilitar inserções ou deleções direcionadas em locais específicos do DNA (POLLOCK; NEGRE, RIBEIL, 2023). Nas bactérias, os sistemas CRISPR-Cas de imunidade adaptativa são classificados em três tipos de acordo com as diferenças entre a sequência e a estrutura das proteínas Cas. Enquanto os tipos I e III são bastante complexos e não são aplicados na engenharia genômica, o tipo II passou a ser amplamente utilizado em muitos campos de pesquisa por sua simplicidade, visto que, para interferir com elementos genéticos invasores, ele requer apenas uma única proteína multifuncional Cas9 (HRYHOROWICZ et al., 2017).

O CRISPR-Cas9 foi apresentado por pesquisadores como uma tecnologia de edição genômica em 2012. Nessa abordagem, um RNA guia (gRNA) reconhece a região de DNA-alvo de interesse e direciona a proteína efetora Cas para realizar a edição. Uma vez introduzido nas células-alvo, as DSBs direcionadas pelo CRISPR-Cas9 resultam na ativação dos mecanismos de reparo do DNA. Essa maquinaria pode levar a inserções/deleções (INDELS), que resulta na perda de função para um

determinado gene, ou pode reparar a quebra de DNA usando fitas homólogas se o HDR for ativado. Dessa forma, a tecnologia CRISPR-Cas9 pode, por exemplo, induzir a expressão de HbF editando áreas cromossômicas que controlam sua expressão, dada a importante função protetiva que essa hemoglobina desempenha em pacientes falciformes (DEMIRCI et al., 2019). Para atingir esse objetivo, várias abordagens têm sido amplamente estudadas, entre elas, aquelas voltadas para a modificação da relação entre o *BCL11A* (Linfoma de células B/leucemia 11A) e os promotores dos genes de gama globina (*HBG1* e *HBG2*) (MA et al., 2023).

### 1.3.1 BCL11A

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 (YIN et al. 2019). *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. Por conta dessa relação, variantes do *BCL11A*, presentes em cerca de 20% dos pacientes com AF, estão associadas ao aumento de HbF (STEINBERG, 2015).

Ao observar essa associação, pesquisadores estudaram formas de modular o *BCL11A* para que haja um aumento na produção de HbF em pacientes falciformes, dado o seu fator de proteção para os pacientes. Considerando que a ausência completa de expressão de *BCL11A* poderia ter efeitos prejudiciais na viabilidade das células e no desenvolvimento do organismo, a descoberta do potencial acentuador eritróide do *BCL11A* ofereceu novas oportunidades para a inativação tecido-específica dele. A partir disso, duas abordagens interessantes contam com o sistema CRISPR-Cas9, sendo elas a ruptura do local de ligação do *BCL11A* no locus *HBG1/HBG2* e o silenciamento do acentuador eritróide específico do *BCL11A* (Figura 4), havendo pesquisas com foco em um deles ou em ambos (PASCHOUDI; YANNAKI; PSATHA, 2023).

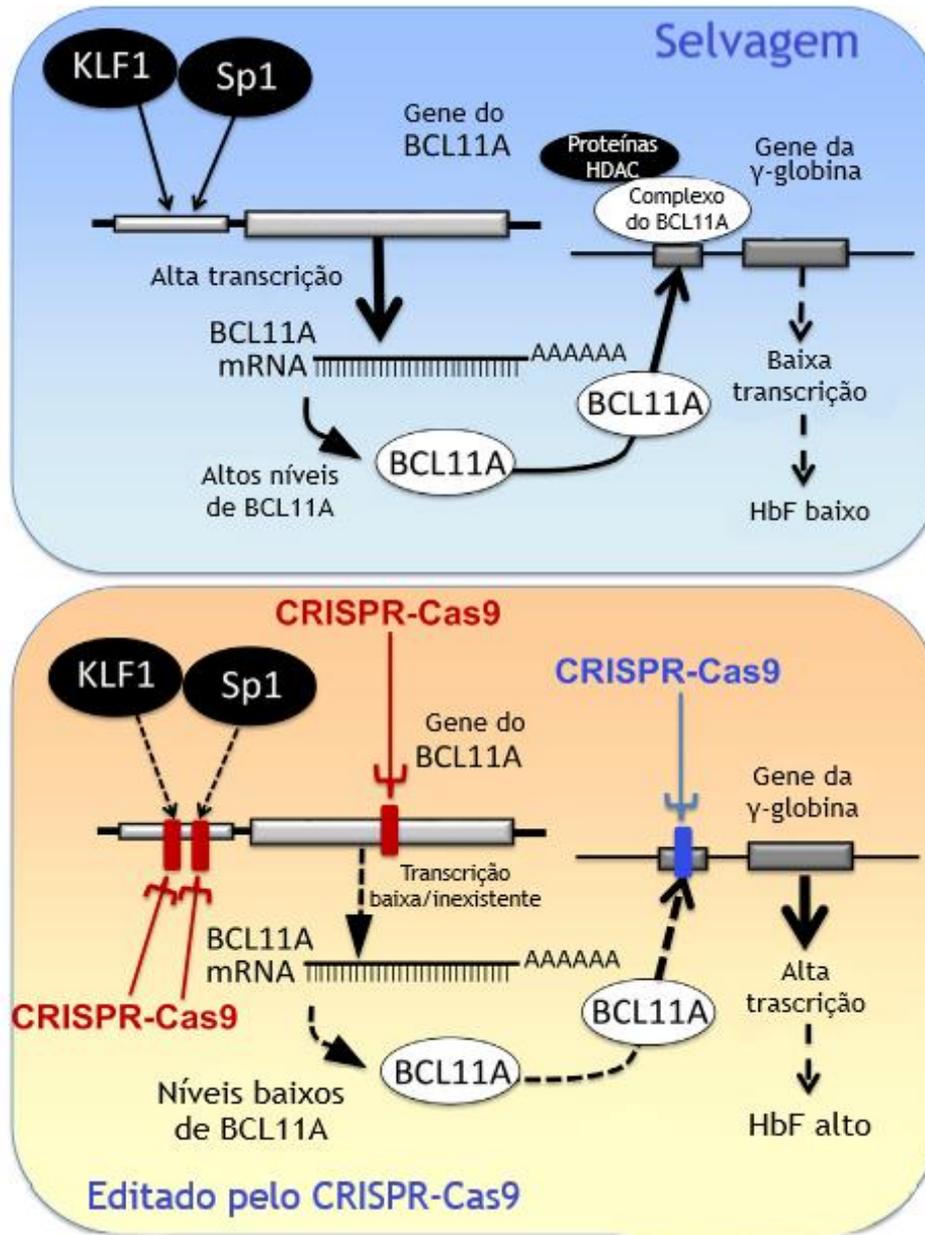


Figura 4: Mecanismo do CRISPR-Cas9 para aumento da HbF. Adaptado de Finotti; Gambari (2023). Na parte superior da figura está sendo ilustrada a via natural de repressão realizada pelo *BCL11A*. A parte inferior, por sua vez, demonstra o efeito do CRISPR-Cas9 na via, podendo silenciar o *BCL11A*, impedir que ele consiga se ligar aos promotores dos genes do *HGB1* e *HGB2*, ou ambos. KLF1 = Fator 1 do tipo Krueppel, que é um fator de transcrição necessário para a maturação adequada das células eritróides. Sp1 = Proteína de Especificidade 1, também é um fator de transcrição. HDAC = Histonas Desacetilases, são enzimas importantes na repressão da expressão gênica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever o potencial terapêutico do uso de CRISPR-cas9 na modulação do *BCL11A* para o aumento da hemoglobina fetal em pacientes com Anemia Falciforme.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o mecanismo de ação do CRISPR-Cas9 na modulação do *BCL11A*;
- Avaliar o possível impacto terapêutico do aumento de HbF gerado pela modulação do *BCL11A* na AF através de artigos experimentais selecionados;
- 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;
- Comparar os dados científicos publicados a respeito da modulação realizada pelo CRISPR-Cas9 com outras terapias para Anemia Falciforme.

### 3 METODOLOGIA

Este trabalho se trata de uma Revisão Integrativa de Literatura. Para tanto, foi feita uma busca em diferentes bancos de dados de literatura científica com o objetivo de obter dados acerca do tema proposto nesta monografia. As plataformas utilizadas para este fim foram: PubMed, Scopus e Periódicos CAPES. Foram utilizados os descritores “Anemia Falciforme”, “Doença Falciforme”, “CRISPR-Cas9”, “BCL11A”, “Hemoglobina Fetal” com os seus termos correspondentes em inglês e o auxílio dos booleanos “AND” e “NOT” para artigos de inclusão e exclusão, respectivamente. Foram incluídos os trabalhos a partir de 2013, em inglês e português.

Artigos experimentais que tiveram como foco utilizar a ferramenta do CRISPR-Cas9 para outros fins que não o aumento da Hemoglobina Fetal como possível terapia para Anemia Falciforme, foram excluídos. Aqueles selecionados foram então utilizados para relatar e discutir no trabalho o potencial terapêutico do aumento da HbF pela modulação do *BCL11A* na AF.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após leitura dos artigos, foram selecionados 6 trabalhos experimentais realizados utilizando modelo celular, animal e em humanos, cujo objetivo era a modulação do *BCL11A* através da ferramenta CRISPR-Cas9 para o aumento da HbF em pacientes com AF (Tabela 3).

Tabela 3: Artigos utilizados nos resultados.

Autor(es)	Título	Modelo	Descrição
(LAMSFUS-CALLE et al., 2020)	Comparative Targeting Analysis Of KLF1, BCL11A, and HBG1/2 in CD34+ HSPCs by CRISPR/Cas9 For The Induction Of Fetal Hemoglobin	HSPCs CD34+	Estudo realizado em células tronco hematopoiéticas para comparar as diferentes abordagens do CRISPR-Cas9 no aumento da HbF.
(MARTYN et al., 2018)	Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of BCL11A or ZBTB7A binding	Células HUDEP-2	Replicaram mutações naturais que modificam o sítio de ligação do BCL11A e do LRF (ZBTB7A) para avaliar se elas influenciam na quantidade de HbF.
(WEBER et al., 2020)	Editing a $\gamma$ -globin Repressor Binding Site Restores Fetal Hemoglobin Synthesis And Corrects The Sickle Cell Disease Phenotype	Células HUDEP-2 e HSPCs CD34+	O estudo modificou o sítio de ligação do LRF e do BCL11A nos promotores dos genes de <i>HBG1</i> e <i>HBG2</i> utilizando o CRISPR-Cas9.
(KHOSRAVI et al., 2019)	Targeted deletion of BCL11A gene by CRISPR-Cas9 system for fetal hemoglobin reactivation: A promising approach for gene therapy of beta thalassemia disease	Células KU-812, KG-1 e K562	Avaliou o aumento de HbF através do silenciamento do <i>BCL11A</i> pelo CRISPR-Cas9 em linhagens celulares diferentes
(HAN et al., 2022)	CRISPR/Cas9-based Multiplex Genome Editing	Células HUDEP-2 e	O estudo utilizou duas estratégias: modificar o

	Of <i>BCL11A</i> And <i>HBG</i> Efficiently Induces Fetal Hemoglobin Expression	HSPC	sítio de ligação do <i>BCL11A</i> nos promotores dos genes de <i>HBG1/HBG2</i> e modificar as regiões acentuadoras do <i>BCL11A</i> para reduzir a sua produção.
(FRANGOUL et al., 2021)	CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and $\beta$ -Thalassemia	HSPCs e Pacientes	Estudo realizado sobre o silenciamento do <i>BCL11A</i> para aumentar a HbF em pacientes com beta talassemia e doença falciforme

Fonte: Autora, 2024

Um estudo, publicado em 2020, fez uma análise comparativa entre as diferentes estratégias de edição gênica oferecida pelo CRISPR-Cas9 para verificar qual delas seria a mais eficiente e mais segura no aumento da HbF (LAMSFUS-CALLE et al., 2020). Para tanto, foram selecionados os seguintes alvos do CRISPR-Cas9: os genes *BCL11A* e *KLF1*, e os promotores dos genes *HBG1/2*. Para realizar a pesquisa, foram utilizadas Células Progenitoras de Células-tronco Hematopoiéticas (HSPC) CD34+ geneticamente modificadas, onde cada *locus* foi alvo de dois sgRNAs (RNA guia único) diferentes (Figura 5). Os dois sgRNAs utilizados no local de ligação do *BCL11A* nos promotores dos genes *HBG1/2* foram criados mimetizando a deleção natural de 13 pares de bases (13pb) descrita anteriormente em indivíduos com Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH).

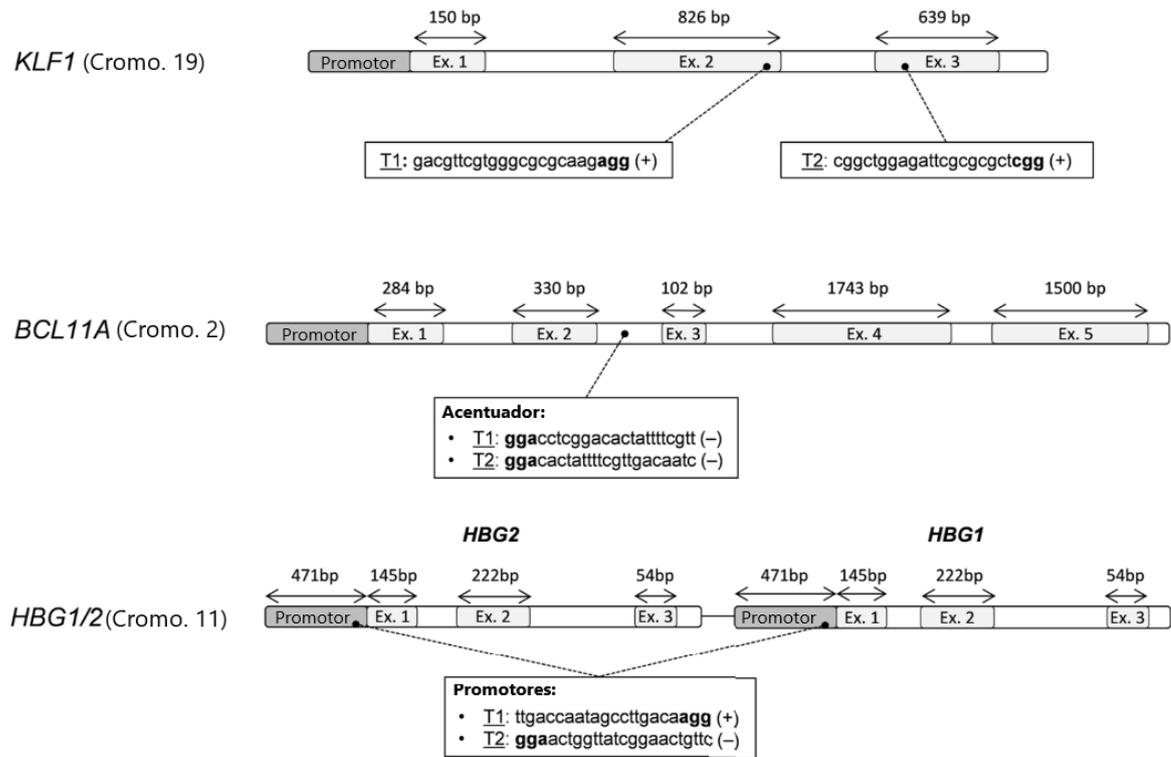


Figura 5: Sequências-alvo para cada sgRNA. *KLF1*: os alvos 1 (T1) e 2 (T2) estão localizados no segundo e terceiro éxons, respectivamente; *BCL11A*: ambos os alvos estão situados na região do enhancer do segundo íntron; *HBG1/2*: ambos os sgRNAs têm como alvo os promotores de *HBG1* e *HBG2*. Cromo = cromossomo. Adaptado de Lamsfus-Calle et al. (2020).

A avaliação da expressão de HbF nas HSPCs CD34+ geneticamente modificadas, revelou que todas as amostras editadas induziram níveis mais elevados de HbF quando comparadas com os controles (Figura 6A), onde o *BCL11A* T2 e *HBG1/2* T2 alcançaram os níveis mais altos de HbF, até 39,5% e 41,9%, respectivamente (Figura 6B). Após análise por citometria de fluxo, foram encontrados números elevados de HSPCs CD34+ HbF+ para todos os genes-alvo testados (intervalo de 50,8% a 91,7%), onde o efeito maior foi observado para *HBG1/2* T2 (Figura 6C). Além disso, a diferenciação in vitro das células HSPCs CD34+ que não foram editadas produziu quantidades semelhantes de HbF quando comparadas aos controles humanos, o que contribui para a credibilidade dos resultados.

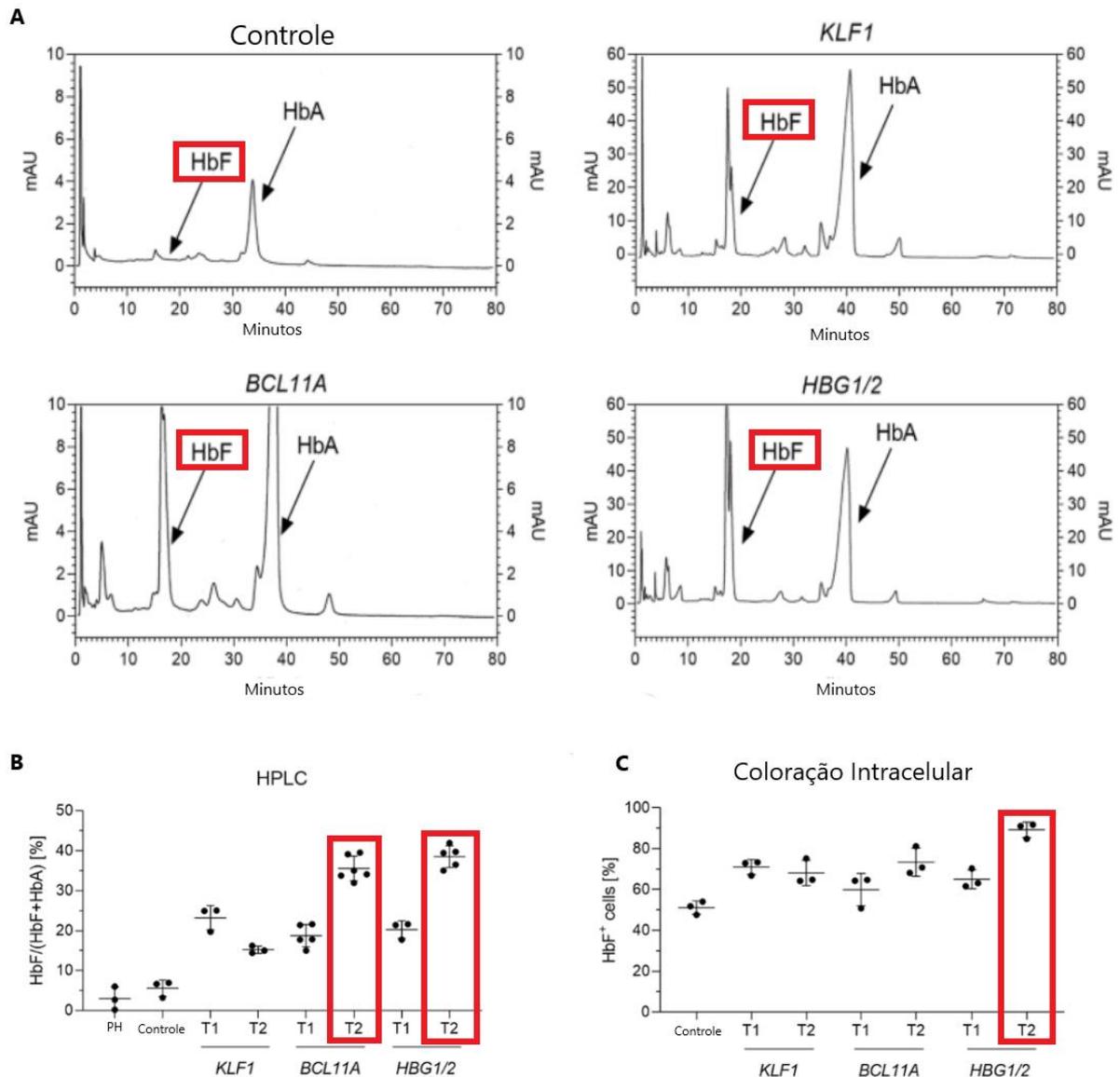


Figura 6: Análise das HSPCs CD34+. A) Histogramas de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) dos controles, *KLF1*, *BCL11A* e amostras de *HBG1/2*. Os resultados mostram que todos obtiveram um aumento de HbF quando comparados com o controle. B) Porcentagem de HbF para o padrão humano (PH), controle e os diferentes tratamentos de edição genética por HPLC no dia 21, mostrando um aumento discretamente maior no *HBG1/2*. C) Coloração intracelular de HbF em HSPCs CD34+ diferenciados no dia 21, mostrando o *HBG1/2* como o responsável pelo maior número de Células F. Adaptado de Lamsfus-Calle et al. (2020).

Com relação ao perfil de segurança das abordagens, devido ao papel essencial do *BCL11A* na troca de globina, regulação de proto-oncogenes (*MDM2* e *TEP1*) e genes envolvidos no desenvolvimento de células imunes (*IL7-R* e *FLT3*), foram realizadas análises de sequenciamento de RNA (RNA-seq) para amostras

geneticamente modificadas do gene *BCL11A* T2. Como resultado, houve uma expressão normal dos genes acima mencionados e quando comparado com as outras estratégias pesquisadas no trabalho, teve a menor variação da expressão gênica. Essa baixa variação era esperada, uma vez que o alvo do estudo foi a sequência acentuadora localizada no segundo *íntron* do gene *BCL11A*, e, portanto, sua expressão diminuiu, mas não ao ponto de afetar a hematopoese. Além disso, também não foram detectadas edições não específicas para *BCL11A* T2, o que mostra um alto nível de perfil de segurança.

Ainda visando a segurança das abordagens, um screening detalhado para encontrar oncogenes ou genes supressores de tumores desregulados nas HSPCs CD34+ geneticamente modificadas foi realizado a partir do RNA-seq. Os resultados mostraram a presença de vários genes alterados envolvidos no ciclo celular (E2F2, E2F7), sinalização ERK/MAPK e p53 (DUSP2, PPP2R5B, TRIM29), apoptose (DAPK1) e vias imunológicas (BCL6) para amostras tratadas com *KLF1* e *HBG1/2*. Por outro lado, nenhum oncogene ou gene supressor de tumor foi encontrado nas amostras de *BCL11A*, o que faz dele o mais seguro entre os pesquisados.

Sendo assim, embora a abordagem *HBG1/2* T2 tenha sido responsável pelo maior nível de HbF dentre as abordagens, a nível de segurança, a análise de RNA-seq mostrou que a abordagem *HBG1/2* foi inferior ao *BCL11A*. Entretanto, visto que ambos têm um perfil de segurança melhor do que a *KLF1*, esse estudo mostrou que os mecanismos voltados para a modulação do *BCL11A* é o melhor caminho a se seguir.

Um outro estudo que fez a mimetização da deleção de 13pb foi executado por Martyn et al. (2018) e teve como objetivo investigar o efeito das diversas mutações de ponto (e a deleção de 13pb) associadas ao fenótipo HPFH. Nele, após realizar uma triagem para repressores candidatos do gene  $\gamma$ -globina, foram selecionados o *BCL11A* e o *LRF* (do inglês, *Leukemia/Lymphoma-Related Factor*). Isso porque a região Zinc Finger C-terminal (ZF) do *BCL11A* demonstrou forte ligação ao local a -115 pb em relação ao promotor do gene da  $\gamma$ -globina, assim como a região ZF do *LRF* ligou-se ao local a -200 pb dele.

Além disso, todas as mutações pontuais no promotor do gene de  $\gamma$ -globina testadas associadas à HPFH e a deleção de 13pb interromperam a ligação com o *BCL11A* e o *LRF*. Sendo c.-117G>A, c.-114C>T, c.-114C>A e c.-114C>G e a deleção 13pb associadas ao *BCL11A* e c.-195C>G, c.-196C>T, c.-197C>T, c.-201C>T, c.-

202C>T e c.-202C>G associadas ao *LRF*.

Foi investigado então o efeito dessas mutações em uma linhagem celular eritróide humana, as células HUDEP-2. Para tanto, os pesquisadores fizeram um grupo de células HUDEP-2 sem edição (consideradas aqui como “selvagens”) e usaram o CRISPR-Cas9 para introduzir mutações homozigotas associadas à HPFH, incluindo c.-117G>A, c.-114C>A,  $\Delta$ 13pb e c.-195C>G em outros grupos. Como resultado, os níveis de mRNA (RNA mensageiro) de  $\gamma$ -globina e HbF estavam elevados em populações clonais com as mutações c.-117G>A, c.-114C>A,  $\Delta$ 13pb e c.-195C>G em comparação com as células HUDEP-2( $\Delta$ G $\gamma$ ) selvagens (Figura 7).

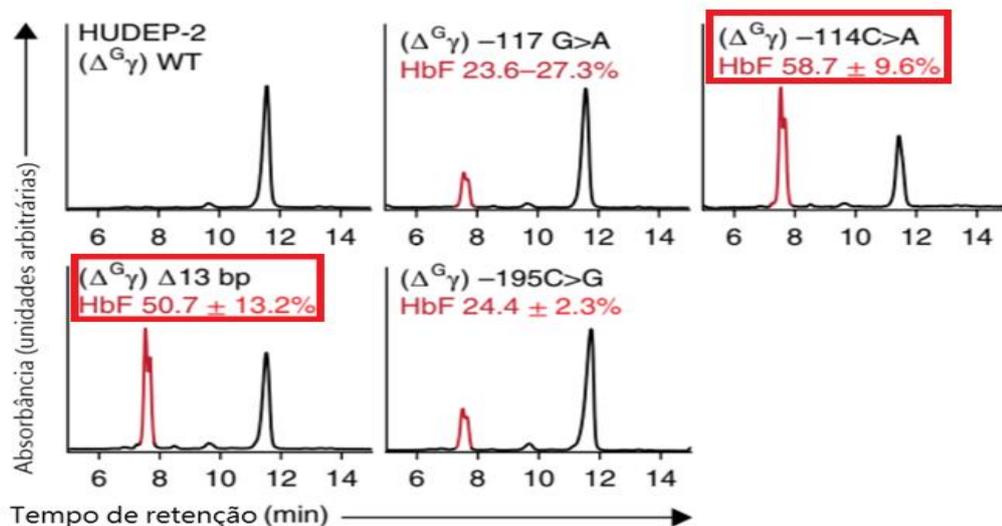


Figura 7: As mutações associadas à HPFH elevam expressão de  $\gamma$ -globina. Os níveis de proteína de hemoglobina fetal determinados por HPLC para células HUDEP-2( $\Delta$ G $\gamma$ ) selvagens, -117G>A (n=2), -114C>A,  $\Delta$ 13pb e -195C>G (n=3) (um clone representativo e a faixa são mostrados para as células -117G>A, e um clone mediano  $\pm$  s.e.m. é mostrado para -114C>A,  $\Delta$ 13 pb e -195C>G). é possível verificar um aumento maior naqueles relacionados ao *BCL11A* (deleção de 13 pb e mutação -114C>A). Adaptado de Martyn et al. (2018).

Esses resultados refletem o fenótipo observado em humanos com HPFH (Persistência Hereditária de HbF, do inglês *Hereditary Persistence Of Fetal Hemoglobin*), confirmando que as mutações associadas à HPFH são responsáveis pelo aumento dos níveis de HbF. Sendo assim, uma possível terapia cujo alvo seja a mimetização de tais mutações poderia ser eficaz na melhoria dos sintomas dos pacientes falciformes, em especial aquelas associadas ao *BCL11A*, visto que os

maiores valores de HbF encontrados na pesquisa podem ser observados na deleção de 13pb (HbF  $50.7 \pm 13.2\%$ ) e na mutação pontual -114C>A (HbF  $58.7 \pm 9.6\%$ ), ambos relacionados ao *BCL11A* (Figura 8).

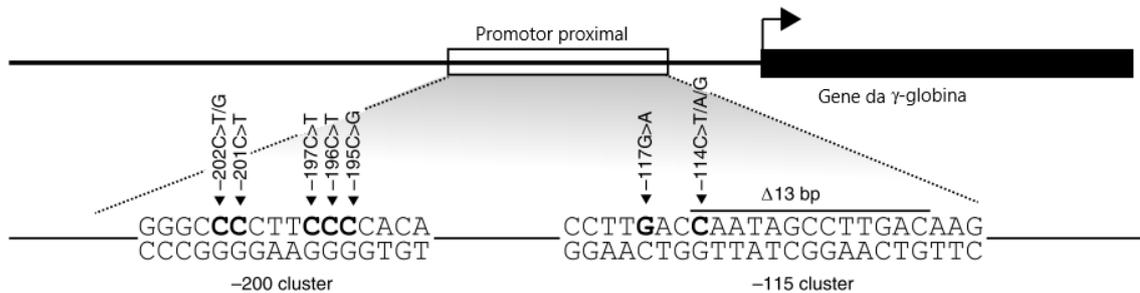


Figura 8: Clusters associados à HPFH. Os agrupamentos (*clusters*) a -115 e -200 pares de bases das mutações associadas à HPFH no promotor do gene da gama globina. Adaptado de Martyn et al. (2018).

Weber et al. (2020) também investigaram as mutações da HPFH relacionadas ao *BCL11A* e o *LRF* com o uso do CRISPR-Cas9. Para tanto, eles criaram gRNAs com foco no sítio de ligação -200 (-197, -196 e -195) e na região -158 (-158, -152 e -151) do *LRF*. Em paralelo, usaram um gRNA cujo alvo era a região -115, reportada como responsável por induzir a reativação de HbF ao gerar uma deleção de 13pb de no sítio de ligação do *BCL11A*, deleção essa mimetizada também pela pesquisa de Lamsfus-Calle et al. (2020) e Martyn et al. (2018). Além disso, também foi usado um gRNA direcionado para o locus *AAVS1* não relacionado, como forma de controle.

Para avaliar a reativação da HbF e a correção do fenótipo celular da AF após a edição dos sítios de ligação nos promotores do *HBG1/2*, os pesquisadores editaram os sítios de ligação dos seus repressores em HSPCs CD34+ obtidas de pacientes com AF. Depois, diferenciaram as HSPCs em hemácias e avaliaram os níveis de  $\gamma$ -globina, obtendo níveis elevados de mRNAs de  $\gamma$ -globina (Figura 9).

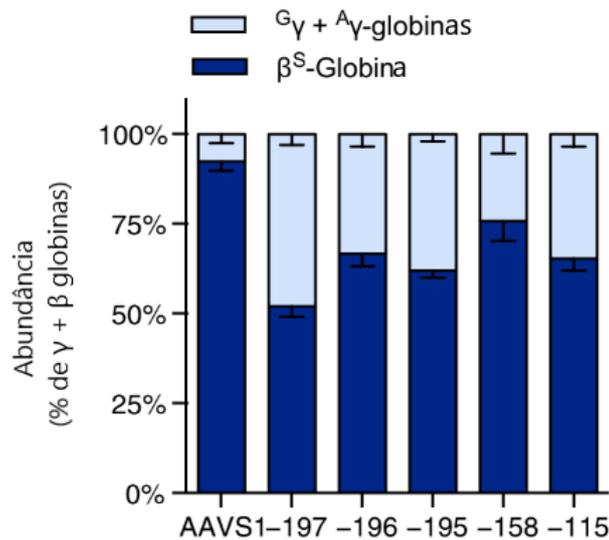


Figura 9: Reativação da gama globina após edição gênica. Níveis de transcritos de ( $G_{\gamma} + A_{\gamma}$ )- e  $\beta^S$ -globina detectados por RT-qPCR em hemácias. Os valores são expressos como porcentagem de mRNAs de ( $\gamma + \beta^S$ )-globina após normalização para  $\alpha$ -globina. Adaptado de Weber et al. (2020).

A edição da região -115 resultou em redução da repressão do *HBG1/2* e uma proporção de  $80 \pm 2\%$  de células que expressam HbF (Células F). A análise de RP-HPLC (Cromatografia de Fase Reversa) mostrou um aumento significativo na expressão das cadeias de  $\gamma$ -globina e uma redução recíproca nos níveis de  $\beta^S$ -globina nas hemácias derivados dos HSPCs editados com -200 e -115, sem evidência de desequilíbrio na síntese de cadeias de globina  $\alpha$ /não- $\alpha$  (Figura 10A). Em células editadas com -197, o aumento nas cadeias de  $\gamma$ -globina e a redução nos níveis de  $\beta^S$ -globina resultaram em uma inversão na razão de globina  $\beta/\gamma$ . Níveis comparáveis de  $A_{\gamma}$ - e  $G_{\gamma}$ -globina foram detectados na maioria das amostras analisadas. No entanto, em células editadas com -115, a HbF foi principalmente composta por  $A_{\gamma}$ -globina.

Por fim, apesar de nesse estudo a modificação do sítio de ligação do *LRF* ter mostrado um aumento de HbF um pouco maior ao ser comparado com o *BCL11A*, ainda é possível ver que ele possui um resultado bastante promissor (Figura 10B). Além disso, esse estudo não traçou um perfil de segurança para os genes estudados. Sendo assim, não é possível determinar se a abordagem do *LRF* é mais segura que a do *BCL11A*, lembrando que no estudo realizado por Lamsfus-Calle et al. (2020) a interrupção da ligação dos promotores de gama globina com o *BCL11A* foi uma abordagem mais segura do que a do *KLF1*.

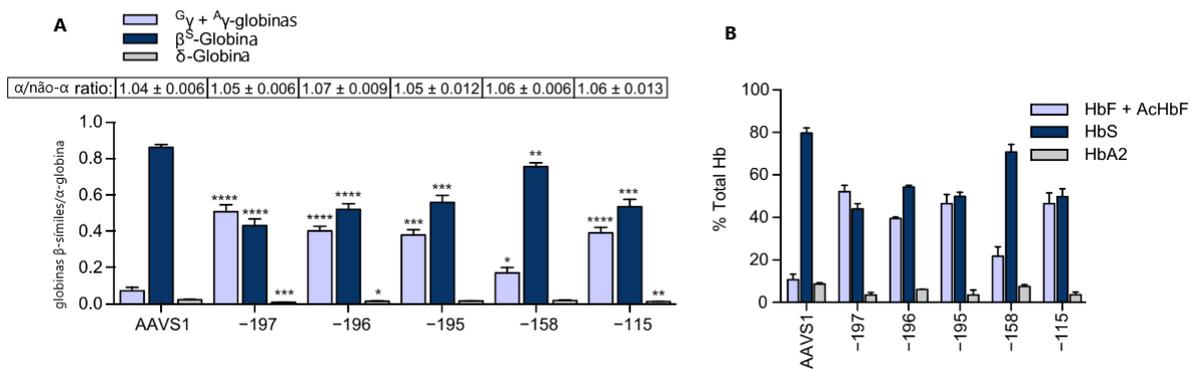


Figura 10: Globinas e Hemoglobinas totais após edição. A) Quantificação das cadeias de  $\gamma$ -,  $\beta^S$ - e  $\delta$ -globina pelo RP-HPLC. A expressão de globina  $\beta$ -símiles foi normalizada para  $\alpha$ -globina. A proporção de cadeias  $\alpha$  para cadeias não- $\alpha$  foi semelhante entre as amostras controle e editadas de HBG1/2. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. B) Quantificação de HbF total (HbF + AcHbF), HbS e HbA2 por CE-HPLC. A porcentagem de cada tipo de Hb está aqui representada sobre os tetrâmeros totais de Hb. Adaptado de Weber et al. (2020).

Khosravi et al. (2019) optaram pelo outro método de modulação abordado nessa revisão, o silenciamento do *BCL11A*. Eles usaram CRISPR-Cas9 para deletar uma região genômica de 200pb, incluindo o motivo de ligação do *GATAA* dentro do acentuador eritróide do *BCL11A* nas linhagens celulares KU-812, KG-1 e K562. Ser apenas no acentuador eritróide do *BCL11A* é importante por conta dos diversos papéis desempenhados por ele em outras linhagens, como visto anteriormente nesse trabalho.

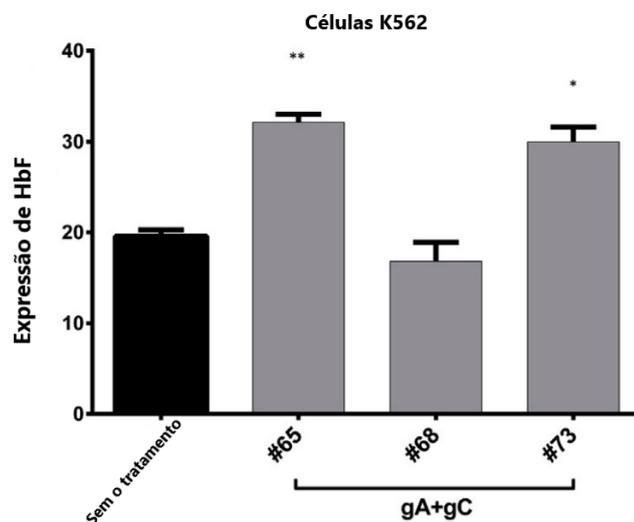


Figura 11: O silenciamento de *BCL11A* leva à indução de HbF em células *K562*. A análise de Western blot foi realizada para determinar os níveis de expressão de HbF nos clones *K562* editados para *BCL11A*, clones #65, #68 e #73, tratados por sgRNAs A e C. Os dados representam a média  $\pm$

desvio padrão da análise densitométrica dos imunoblotos. g = gRNA. Adaptado de Khosravi et al. (2019).

Nesse estudo, apesar da deleção não ter tido bons resultados nas células KU-812 e KG-1, ela levou a uma forte indução da expressão de HbF nas células *K562* (Figura 11), o que direciona estudos futuros para que sejam realizados com ela.

Han et al. (2022) realizaram a edição individual dos genes, mas também a edição de genes múltiplos através do CRISPR/Cas9 para editar o acentuador eritróide do *BCL11A* e o seu sítio de ligação nos promotores do gene da  $\gamma$ -globina em células HUDEP-2 e células CD34+ humanas adultas. Para a abordagem de edição individual, foram desenvolvidos vetores lentivirais que continham sgRNAs visando os promotores do gene  $\gamma$ -globina (sgP1 e sgP2), o acentuador eritróide do *BCL11A* (sgE1 e sgE2), e um vetor lentiviral de controle (sgNEG).

Com o objetivo de avaliar a expressão de *BCL11A*, *HBB* e *HBG* (tanto *HBG1* quanto *HBG2*) nas células HUDEP-2, foi utilizada a técnica de RT-qPCR no 7º dia da diferenciação. Nos grupos focados na região do acentuador eritróide do *BCL11A* (sgE1 e sgE2), foi observada uma diminuição significativa em relação ao grupo selvagem (67% e 63%, respectivamente). Nos quatro grupos, a expressão de *HBG* aumentou em 29,6 vezes (sgP1) e 18,7 vezes (sgP2) nos grupos direcionados aos promotores do gene de  $\gamma$ -globina e 4,5 vezes (sgE1) e 2,8 vezes (sgE2) nos grupos relacionados às regiões do acentuador de *BCL11A*, quando comparados com o grupo selvagem.

A expressão de HbF nas células HUDEP-2 foi detectada por citometria de fluxo após diferenciação por 7 dias. A proporção de células HbF+ (células F) aumentou substancialmente nos quatro grupos de edição, alcançando 29,6% (sgP1), 20,9% (sgP2), 10,8% (sgE1) e 6,6% (sgE2), respectivamente (Figura 12). Em contraste, a proporção de células F nos grupos selvagem e de controle negativo sgNEG foi apenas de 1,32% e 1,34%, respectivamente. Tais resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Lamsfus-Calle et al. (2020), onde foi visto que a edição realizada nos promotores de *HBG* resulta em uma maior elevação de HbF quando comparada com aquela alcançada pela edição focada no *BCL11A*.

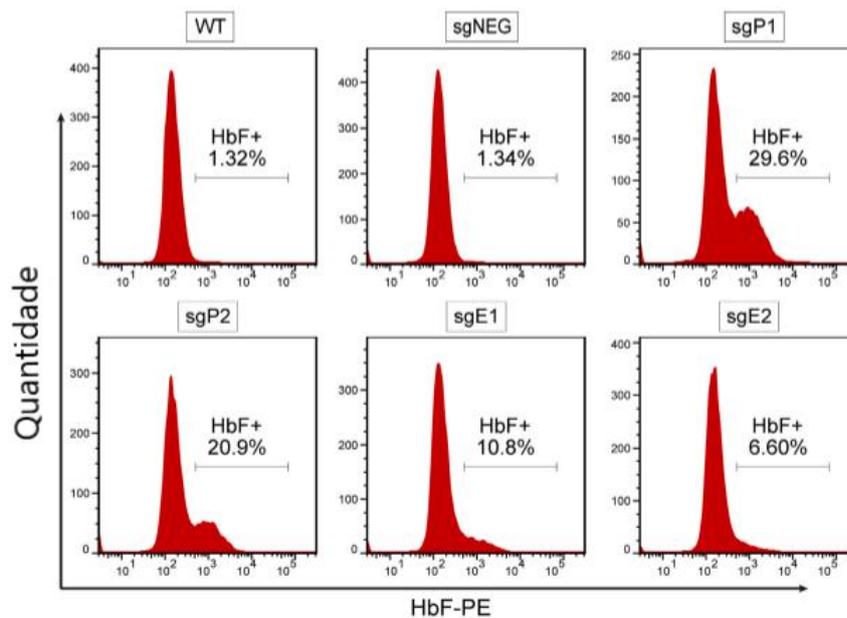


Figura 12: HbF na edição de um único gene. Análise por citometria de fluxo da proporção de células F em células HUDEP-2 selvagens e editadas por gene único no dia 7 de diferenciação. Adaptado de Han et. al. (2022).

No entanto, apesar dos resultados positivos, os pesquisadores afirmam não ser o suficiente, visto que, segundo um estudo mencionado por eles e escrito por Steinberg et al. (2014), é necessário um mínimo de cerca de 30% de HbF para de fato reduzir os sintomas da AF. Sendo assim, os pesquisadores desse estudo passaram então para a edição múltipla. Para tanto, o RT-qPCR foi utilizado para avaliar a expressão de *BCL11A*, *HBB* e *HBG* nos grupos selvagem e três grupos de edição (sgP1, sgE1 e sgP1+E1).

Os níveis de expressão de mRNA de *BCL11A* nos três grupos de edição foram significativamente reduzidos, em 41,5% no sgE1 e 44,9% no sgP1+sgE1, em comparação com o grupo selvagem. Da mesma forma, os níveis de expressão de *HBB* nos grupos sgP1, sgE1 e sgP1+sgE1 foram reduzidos em 23,1%, 16,6% e 35,0%, respectivamente. Em contraste, os níveis de expressão de mRNA de *HBG* aumentaram significativamente nos três grupos de edição, em 28,4 vezes (sgP1), 11,0 vezes (sgE1) e 53,2 vezes (sgP1+sgE1), respectivamente. Sendo assim, a expressão de *HBG* no grupo sgP1+sgE1 foi significativamente maior do que nos grupos sgP1 e sgE1 ( $P < 0,001$ ) (Figura 13A).

A citometria de fluxo foi usada para avaliar as mudanças nas células F em cada grupo após sete dias de diferenciação. As células F representaram 4,5% do total de células no grupo selvagem, mas aumentaram significativamente nos três grupos de

edição: 24,8% no grupo sgP1, 15,5% no grupo sgE1 e 35,3% no grupo sgP1+sgE1, respectivamente. A proporção de células F no grupo sgP1+sgE1 foi significativamente maior do que nos grupos sgP1 e sgE1 ( $P < 0,01$ ) (Figura 13B), o que indica que uma terapia gênica com o uso das duas abordagens ao invés de apenas uma pode ser mais eficiente na melhora dos sintomas de pacientes com AF.

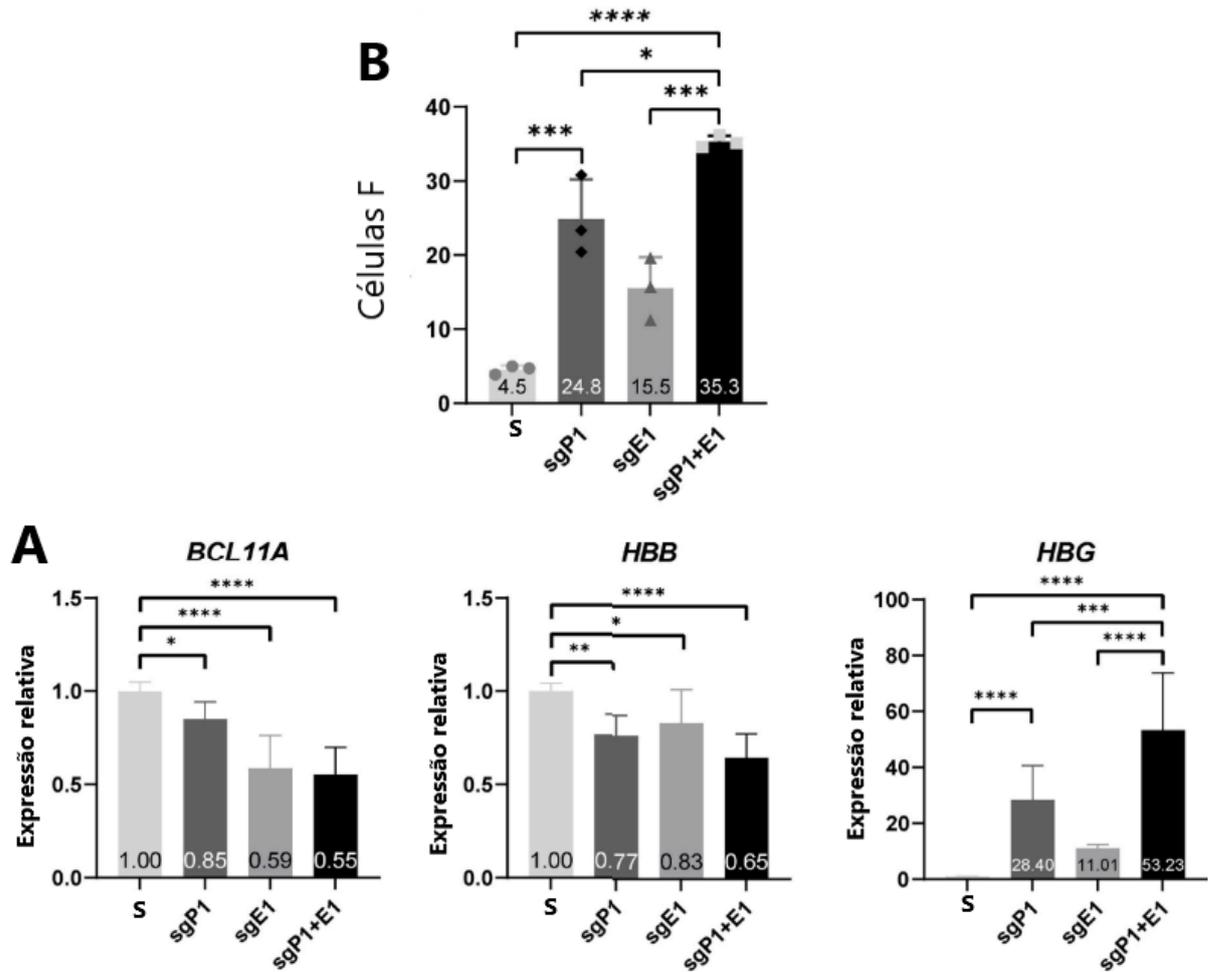


Figura 13: Resultados da edição múltipla. A) Alterações na expressão de mRNA das células HUDEP-2 submetidas à edição de genes único e multiplexo. B) Análise por citometria de fluxo da proporção de células F das células HUDEP-2 no dia 7 de diferenciação e submetidas à edição de genes único e múltiplos. Os dados são médias  $\pm$  DP. O valor de P foi determinado pelo teste t de Student bicaudal ( $n = 3$ , \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ ). S = selvagem. Adaptado de Han et al. (2022).

Entretanto, até a finalização dessa revisão integrativa, só existem ensaios clínicos, em andamento ou finalizados, com a estratégia de silenciar o *BCL11A*. Sendo ainda inexistentes aqueles que façam a edição do sítio dos promotores dos genes *HBG1/2* ou ambos. Um desses estudos experimentais foi realizado por Frangoul et al.

(2021), que avaliou dois pacientes, um com  $\beta$ -Talassemia Dependente de Transfusão (TDT) e o outro com DF. Ambos foram infundidos com CTX001 (HSPCs CD34+ autólogos editados geneticamente com CRISPR-Cas9 para reativar a produção de hemoglobina fetal) e inscritos nos ensaios CLIMB THAL-111 (para o paciente com TDT) e CLIMB SCD-121 (para o paciente com DF).

As CD34+ HSPCs foram coletadas dos pacientes após um mínimo de 8 semanas de transfusões de concentrado de hemácias visando um nível de hemoglobina falciforme abaixo de 30% (no paciente com DF). O CTX001 foi fabricado a partir dessas células CD34+ por edição com CRISPR-Cas9 com o uso de uma molécula de sgRNA. Foi utilizado sequenciamento de DNA para avaliar a porcentagem de edição alélica no local alvo.

A frequência de edição gênica associada ao CTX001 foi avaliada através de HSPCs CD34+ obtidas de 10 doadores saudáveis. Como resultado, foram encontradas altas frequências de edição alélica (média [ $\pm$ SD],  $80\pm 6\%$ ). Em HSPCs CD34+ editadas que foram isoladas e editadas em escala clínica e diferenciadas em direção à linhagem eritróide, os níveis de HbF aumentaram para uma média de  $29,0\pm 10,8\%$ , em comparação com  $10,5\pm 5,2\%$  nas células controle não editadas (Figura 14). Além disso, não houve evidências de edições não relacionadas nos possíveis sítios avaliados por sequenciamento.

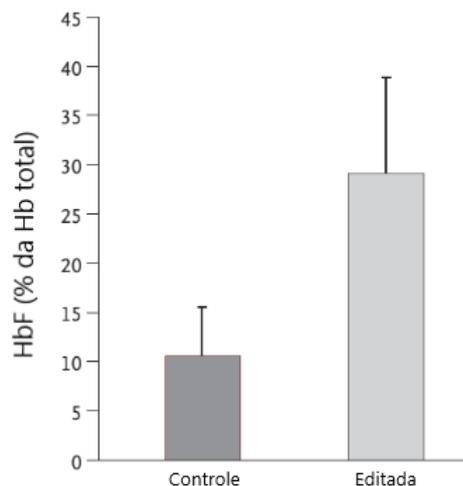


Figura 14: HbF após edição. Dados pré-clínicos referentes à HbF como porcentagem da hemoglobina total após edição e diferenciação das células eritróides. Os dados são de amostras obtidas de 10 doadores saudáveis. As barras de erro indicam o desvio padrão. Adaptado de Frangoul et al. (2021)

A paciente com DF ( $\beta^S/\beta^S$  e uma deleção única de  $\alpha$ -globina), nos dois anos anteriores à sua inscrição, havia apresentado, em média, sete episódios vaso-oclusivos graves por ano. Ela também teve 3,5 hospitalizações relacionadas à DF e cinco transfusões de hemácias por ano, em média, durante um período de 2 anos. Seu histórico médico incluía dor crônica, colelitíase, níveis aumentados de desidrogenase láctica e níveis diminuídos de haptoglobina. No momento do relatório feito pelo estudo, ela havia sido acompanhada por 16,6 meses após a infusão de CTX001, o que incluiu uma visita de estudo de 15 meses.

A infusão de CTX001, teve frequências de edição alélica de 82,6% e 78,7%, respectivamente. Após a administração de CTX001 e ao longo do tempo, altos níveis de alelos editados em células CD34+ da medula óssea e células nucleadas do sangue periférico foram mantidos. Seu nível de hemoglobina basal era de 7,2 g por decilitro, que aumentou para 10,1 g por decilitro no mês 3 e 12 g por decilitro no mês 15 sem transfusão. Inicialmente, o nível de HbF era de 9,1% e o nível de HbS era de 74,1%. No mês 3, o nível de HbF subiu para 37,2% e o nível de HbS foi de 32,6%. No mês 15, o nível de HbF aumentou para 43,2% e a HbS aumentou para 52,3% (Figura 15D). A expressão de células F foi de 99,9% no mês 5 e foi mantida em quase 100% até o mês 15, que foi a data de realização do último relatório até a finalização do estudo (Figura 15E).

A paciente teve 114 eventos adversos durante os 16,6 meses após a infusão de CTX001, sendo 3 classificados como graves: sepse na presença de neutropenia, colelitíase e dor abdominal, sendo todos resolvidos com tratamento.

Ela não teve episódios vaso-oclusivos durante os 16,6 meses após a infusão de CTX001, e a última transfusão de hemácias foi 19 dias após a infusão (Figura 15F). Índices de hemólise, incluindo níveis de haptoglobina, desidrogenase láctica, aspartato aminotransferase e bilirrubina total, normalizaram durante o período de acompanhamento após a infusão.

A paciente com TDT (genótipo  $\beta^0/\beta^+$ ) também obteve bons resultados, com níveis de HbF aumentando rapidamente de 0,3 g por decilitro no início para 13,1 g por decilitro no mês 18 (Figura 15A). A expressão de células F aumentou de 10,1% no início para 99,7% no mês 6 e foi mantida até o mês 18 (Figura 15B). A paciente recebeu sua última transfusão de concentrado de hemácias 30 dias após a infusão de CTX001 (Figura 15C) e seu nível de hemoglobina se normalizou para 12,1 g por decilitro no mês 4, permanecendo normal até o mês 18, data do último relatório do

estudo.

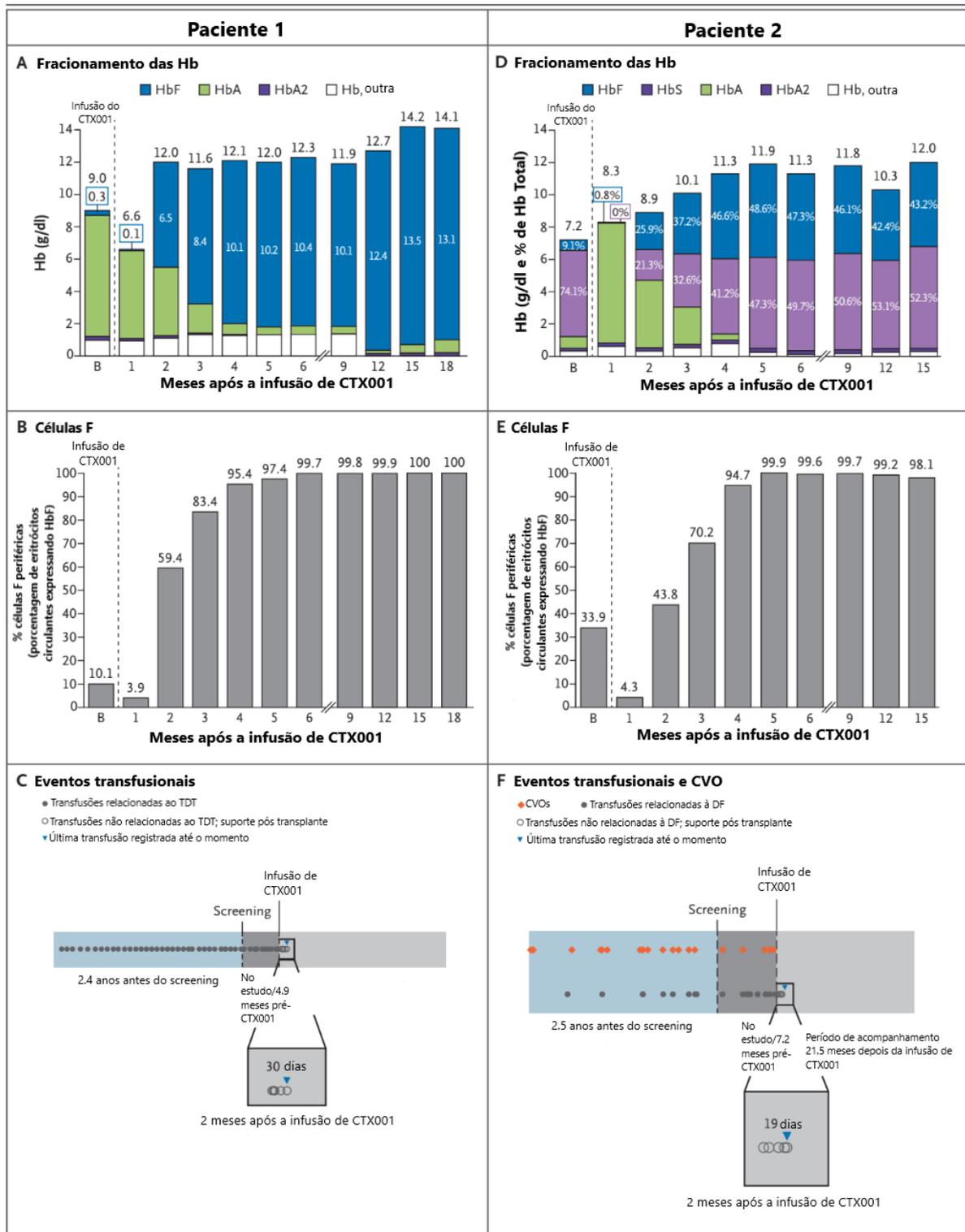


Figura 15: Hbs, Células F e eventos transfusionais dos pacientes. Níveis de fracionamento de Hb da Paciente 1, que foi tratada com CRISPR-Cas9 para beta-talassemia dependente de transfusão (A) e na Paciente 2, que foi tratado para doença falciforme (D). As mudanças nas porcentagens de células F ao longo do tempo são mostradas no Paciente 1 (B) e no Paciente 2 (E). Os níveis basais de

hemoglobina e F-células foram avaliados na visita pré-mobilização. Também é mostrada a ocorrência de eventos de transfusão ao longo do tempo na Paciente 1 (C) e crises vaso-oclusivas (VCOs) e eventos de transfusão na Paciente 2 (F). Transfusões de troca realizadas de acordo com o protocolo do estudo e que ocorreram durante o período do estudo antes da infusão de CTX001 não são mostradas. B = linha de base, HbS = hemoglobina falciforme. Adaptado de Frangoul et al. (2021).

Depois dessas duas pacientes acompanhadas por pelo menos 1 ano, os pesquisadores administraram CTX001 em mais oito pacientes (seis com TDT e dois com DF) e obtiveram dados de acompanhamento por mais de 3 meses, sendo eles consistentes com os das pacientes descritas. Dos seis pacientes com TDT tratados com CTX001, um paciente teve eventos adversos de hemofagocitose linfohistiocítica, síndrome do desconforto respiratório agudo, cefaleia e síndrome de pneumonia idiopática, todos resolvidos com tratamento.

Os resultados de mais de um ano de acompanhamento da paciente com DF tratada com CTX001 mostraram altos níveis de expressão de HbF e a eliminação de episódios vaso-oclusivos e da necessidade de transfusão. Tais resultados diferenciam daqueles encontrados por Han et al. (2022), visto que nesse ensaio, apenas a abordagem do silenciamento do *BCL11A* foi utilizada e, ainda assim, ao final do experimento, os níveis de Células F foram muito superiores (98,1%) a aqueles encontrados pelo uso das duas (35,3%) no estudo dele.

Além disso, apesar dos estudos de Han et al. (2022) e Lamsfus-Calle et al. (2020) terem demonstrado que a edição única do sítio de ligação dos promotores dos genes *HBG1/2* obtêm um valor mais alto de HbF quando comparada com aquela obtida do silenciamento do *BCL11A*, é o silenciamento que faz parte de uma das únicas terapias gênicas aprovada pela FDA para tratar a AF (FDA, 2023).

Segundo o site oficial da FDA (2023), essa terapia, intitulada exagamglogene autotemcel (exa-cel) ou CASGEVY foi aprovada em dezembro de 2023 e teve como base o ensaio clínico discutido anteriormente, intitulado CLIMB SCD-121 (CTX-001-121, NCT03745287, Estudo 121), em conjunto com o seu sucessor para avaliar segurança a longo prazo, o CTX-001-131 (NCT04208529, Estudo 131).

O seu mecanismo de ação consiste em mimetizar uma das mutações que ocorrem na HPFH. Para tanto, o CASGEVY faz uso das células-tronco retiradas do próprio paciente, posteriormente modificadas e então reinfundidas como HSPCs CD34+ em uma dose única no paciente. Essas HSPCs CD34+ possuem um complexo RNP composto por Cas9 e um gRNA específico (SPY101). Esse complexo tem como

alvo o sítio de ligação do fator de transcrição *GATA1* na região acentuadora eritroide do gene *BCL11A* no cromossomo 2, onde o CRISPR faz quebras duplas de DNA. A reparação dessas quebras pela união de NHEJ produz INDELS no DNA que interrompem a ligação de *GATA1*, o que conseqüentemente reduz a transcrição de *BCL11A* nas hemácias. Diminuindo *BCL11A*, ocorre o aumento na produção de  $\gamma$ -globina e, portanto, um aumento de HbF e redução de HbS.

O esperado pelos fabricantes é que as hemácias pós tratamento alcancem entre 30% e 50% de HbF e que a edição seja permanente, o que pode potencialmente ser terapêutico. Isso porque, no Estudo 121, a paciente que passou pelo tratamento parou de ter crises vaso-oclusivas, uma das principais causas de desconforto e complicações para pessoas com AF. A indicação da terapia é que seja para pacientes acima de 12 anos com DF e crises vaso-oclusivas recorrentes (STN 125787) ou TDT (STN 125785).

Apesar disso, ainda que tenha resultados promissores, essa ainda é uma terapia de difícil acesso para a maioria dos pacientes, dado a sua recente aprovação e a sua complexidade, por exemplo. Além dos riscos pós-tratamento como neutropenia e plaquetopenia, no período pré-tratamento o paciente é obrigado a se abster de sua terapia padrão, como a HU, 8 semanas antes da preparação. Além disso, o custo médio dessa terapia é de aproximadamente 2.2 milhões de dólares (LIN, 2023) o que é completamente inviável para grande parte da população.

Sendo assim, de modo geral, muitos avanços ainda precisam ser feitos para consolidar essa metodologia como método efetivo para o tratamento da doença, entre eles a realização de mais ensaios clínicos com foco no uso a longo prazo, para assegurar um melhor perfil de segurança e gerar uma competitividade no mercado, baixando assim o valor do tratamento e tornando-o mais acessível aos pacientes.

## 5 CONCLUSÃO

Diante desses achados, conclui-se que a modulação do *BCL11A* através do CRISPR-Cas9 é uma forma eficiente e consideravelmente segura de aumentar a HbF para reduzir os sintomas de pacientes com AF, sendo de modo geral a que obteve melhores resultados entre os artigos discutidos. Dentro das duas abordagens de modulação aqui abordadas, e apesar da edição única no sítio de ligação dos promotores dos genes *HBG1* e *HBG2* terem obtidos valores mais altos de HbF nos estudos, o silenciamento do *BCL11A* possui o melhor perfil de segurança, além de ser a única entre os dois aprovada pela FDA. Além disso, o ensaio clínico realizado com ele mostrou altos níveis de expressão de HbF e a eliminação de episódios vasculares e da necessidade de transfusão nos pacientes falciformes.

Porém, faz-se necessário um maior número de estudos com foco nessa abordagem para tentar melhorar o perfil de segurança a longo prazo e popularizar o seu uso terapêutico, melhorando assim a qualidade de vida dos pacientes falciformes.

## REFERÊNCIAS

- AMLIE-LEFOND et al. The Genetic Landscape Of Cerebral Steno-Occlusive Arteriopathy And Stroke In Sickle Cell Anemia. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 27, n. 11, p. 2897–2904, 27 nov. 2018.
- ANELE U. A. et al. How I Treat Priapism. **Blood**, v. 125, n. 23, p. 3551–3558, 4 jun. 2015.
- ARDUINI, G. A. O.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Prevalence And Characteristics Of Priapism In Sickle Cell Disease. **Hemoglobin**, v. 42, n. 2, p. 73–77, mar. 2018.
- AZAR, S.; WONG, T. E. Sickle Cell Disease: A Brief Update. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 2, p. 375–393, mar. 2017.
- BHASIN, N.; SARODE, R. Acute Chest Syndrome In Sickle Cell Disease. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 37, n. 3, p. 1–6, jul. 2023.
- BRANDOW, A. M.; LIEM, R. I. Advances In The Diagnosis And Treatment Of Sickle Cell Disease. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 15, n. 20, p. 1–13, 3 mar. 2022.
- FDA. CASGEVY. **FDA**, 2023. Disponível em: <<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/casgev>>. Acesso em: 15 mar 2024.
- CONRAN, N.; BELCHER, J. D. Inflammation In Sickle Cell Disease. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 68, n. 2–3, p. 263–299, 2018.
- CISNEROS, G. S.; THEIN, S. L. Recent Advances In The Treatment Of Sickle Cell Disease. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 1-15, 20 mai. 2020.
- DEMIRCI, S.; UCHIDA, N; TISDALE, J. Gene Therapy For Sickle Cell Disease: An Update. **Cytotherapy**, v. 20, n. 7, p. 899-910, 30 mai. 2018.
- DEMIRCI, S. et al. CRISPR-Cas9 To Induce Fetal Hemoglobin For The Treatment Of Sickle Cell Disease. **Molecular Therapy - Methods and Clinical Development**, v. 23, p. 276-285, dez. 2021.
- DEMIRCI, S. et al. CRISPR/Cas9 For Sickle Cell Disease: Applications, Future Possibilities, And Challenges. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1144, p. 37-52, 2019.
- DESAI, P. C.; ATAGA, K. I. The Acute Chest Syndrome Of Sickle Cell Disease. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 8, p. 991-999, 28 mar. 2013.
- EL HOSS, S.; BROUSSE, V. Considering The Spleen In Sickle Cell Disease. **Expert Review of Hematology**, v. 12, n. 7, p. 563-573, jul. 2019.
- ELENDU, C. et al. Understanding Sickle Cell Disease: Causes, Symptoms, And

Treatment Options. **Medicine (United States)**, v. 102, n. 38, p. 1-7, 22 set. 2023.

FERREIRA, R.; GOUVÊA, C. Recentes Avanços no Tratamento da Anemia Falciforme. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28, n.1984, p.1-6, 2018.

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

FRANGOUL, A. et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 3, p.252-260, 21 jan. 2021.

HAN, Y. et al. CRISPR/Cas9-based Multiplex Genome Editing Of BCL11A And HBG Efficiently Induces Fetal Hemoglobin Expression. **European Journal of Pharmacology**, v. 918, p.1-11, 28 jan. 2022.

HARIHARAN, P.; NADKARNI, A. Insight Of Fetal To Adult Hemoglobin Switch: Genetic Modulators And Therapeutic Targets. **Blood Reviews**, v. 49, n. 100823, p.1-9, set. 2021.

HIRTZ, D.; KIRKHAM, F. J. Sickle Cell Disease And Stroke. **Pediatric Neurology**, v. 95, p.34-41, jun. 2019.

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, 2017.

JAIN, S.; BAKSHI, N.; KRISHNAMURTI, L. Acute Chest Syndrome In Children with Sickle Cell Disease. **Pediatric, Allergy, Immunology, and Pulmonology**, v. 30, n. 4, p. 191-201, 1 dez. 2017.

KASSIM, A. A.; DEBAUN, M. R. The Case For And Against Initiating Either Hydroxyurea Therapy, Blood Transfusion Therapy Or Hematopoietic Stem Cell Transplant In Asymptomatic Children With Sickle Cell Disease. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 15, n. 3, p. 325-336, 7 jan. 2014.

KATO, G. J. et al. Sickle Cell Disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-22, 15 mar. 2018.

KHOSRAVI, M. A. et al. Targeted Deletion Of BCL11A Gene By CRISPR-Cas9 System For Fetal Hemoglobin Reactivation: A Promising Approach For Gene Therapy Of Beta Thalassemia Disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 854, p. 398-405, 27 abr. 2019.

LAKHANI. J. D. et al. Prevalence of Splenomegaly and Splenic Complications in Adults with Sickle Cell Disease and Its Relation to Fetal Hemoglobin. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 16, n. 4, p. 198-208, 1 out. 2022.

LAMSFUS-CALLE, A. et al. Comparative Targeting Analysis Of KLF1, BCL11A, And HBG1/2 In CD34+ Hspcs By CRISPR/Cas9 For The Induction Of Fetal Hemoglobin. **Scientific Reports**, v. 10, n. 10113, p.1-12, 2020.

LETTRE, G.; BAUER, D. E. Fetal Haemoglobin in Sickle-cell Disease: From Genetic Epidemiology to New Therapeutic Strategies. **The Lancet**, v. 387, n. 10037, p.2554-2564, 18 jun. 2016.

LIN, K. Will the High Price of Gene Therapy for Sickle Cell Disease Put This Cure out of Reach? **American Family Physician**, 2023. Disponível em: <<https://www.aafp.org/pubs/afp/afp-community-blog/entry/will-the-high-price-of-gene-therapy-for-sickle-cell-disease-put-this-cure-out-of-reach.html>>. Acesso em: 15 mar 2024.

LINDER, G. E.; CHOU, S. T. Red Cell Transfusion And Alloimmunization In Sickle Cell Disease. **Haematologica**, v. 106, n. 7, p.1805-1815, 1 jul. 2021.

MA, L. et al. CRISPR/Cas9-Based Gene-Editing Technology For Sickle Cell Disease. **Gene**, v. 874, p.1-12, 20 jul. 2023.

MARTYN, G. E. et al. Natural Regulatory Mutations Elevate The Fetal Globin Gene Via Disruption Of BCL11A Or ZBTB7A Binding. **Nature**, v. 50, n.4, p.498-503, 2 abr. 2018.

ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Emerging Genetic Therapy For Sickle Cell Disease **Annual Review of Medicine**, v. 70, p.257-271, jan. 2019.

PAIKARI, A.; SHEERAN, V. Fetal Haemoglobin Induction in Sickle Cell Disease. **British Journal of Haematology**, v. 180, n. 2, p. 189-200, 2018.

PASCHOUDI, K.; YANNAKI, E.; PSATHA, N. Precision Editing as a Therapeutic Approach for  $\beta$ -Hemoglobinopathies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 1-20, 31 mai. 2023.

PIEL, F.; STEINBERG, M.; REES, D. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n.16, p.1561-1573, 20 abr. 2017.

POLLOCK, G.; NEGRE, O; RIBEIL, J. A. Gene-Addition/Editing Therapy In Sickle Cell Disease. **Presse Medicale**, v. 52, n.4, p.1-5, dez. 2023.

RUMANNEY, M. B. et al. The Co-inheritance of Alpha-thalassemia and Sickle Cell Anemia is Associated With Better Hematological Indices and Lower Consultations Rate in Cameroonian Patients and Could Improve Their Survival. **PLoS ONE**, v. 9, n.6, p.1-10, 30 jun. 2014.

SAAH, E. et al. Sickle Cell Disease Pathophysiology and Related Molecular and Biophysical Biomarkers. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 36, n.6, p.1077-1095, dez. 2022.

STEINBERG, M. H. Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia. **Blood**, v. 136, n.21, p.2392-2400, 19 nov. 2020.

STEINBERG, M. H. et al. Perspectives Fetal Hemoglobin In Sickle Cell Anemia: A Glass Half Full? **Blood**, v. 123, n.4, p.481-485, 23 jan. 2014.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Pathology**, v. 14, p. 263-292, 24 jan. 2019.

TISDALE, J. F.; THEIN, S. L.; EATON, W. A. Treating Sickle Cell Anemia: New Drugs, Stem Cell Transplants, And Gene Therapy Show Promise In Treating Sickle Cell Anemia **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1198-1199, 13 mar. 2020.

WALTERS, M. C. et al. Indications and Results of HLA-Identical Sibling Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 22, n. 2, p. 207-211, 2016.

WARE, R. E. et al. Sickle Cell Disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311-323, 31 jan. 2017.

WEBER, L. et al. Editing a  $\gamma$ -globin Repressor Binding Site Restores Fetal Hemoglobin Synthesis And Corrects The Sickle Cell Disease Phenotype. **Science Advances**, v. 6, n. 7, p. 9392-9404, 12 fev. 2020.

WHITE, S.; HART, K.; KOHN, D. B. Diverse Approaches to Gene Therapy of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Medicine**, v. 74, p. 473-487, 2023.

WIENERT, B. et al. Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for  $\beta$ -Hemoglobinopathies. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 12, p. 927-940, 1 out. 2018.

WILLIAMS, T. N.; THEIN S. L. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. **Annu Rev Genomics Hum Genet.**, v. 19, p. 113-147, 31 ago. 2018.

YIN, J. et al. BCL11A: A Potential Diagnostic Biomarker And Therapeutic Target In Human Diseases. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 11, p. 1-13, 29 nov. 2019.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Anemia Falciforme. COSTA, F. F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K. Y. Tratado de Hematologia. 1ªEd. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte. **EDITORA ATHENEU**, 2013. p. 205-223.

ZARGHAMIAN, P.; KLERMUND, J.; CATHOMEN, T. Clinical Genome Editing To Treat Sickle Cell Disease—A Brief Update **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 1-10. 113-147, 9 jan. 2023.