



REVISÃO

Avanços da terapia gênica com CRISPR/CAS na abordagem da doença falciforme: uma revisão de literatura

Advances in CRISPR/CAS gene therapy in the approach to sickle cell disease: a literature review

Avances en la terapia génica CRISPR/CAS en el abordaje de la enfermedad de células falciformes: una revisión de la literatura

Paulo Emanuel Bezerra dos Santos Silva¹; Paullina Ledo Araújo²; Fáila Martins Da Costa³; Pamera da Silva Santos⁴

RESUMO

OBJETIVOS: O estudo visa apresentar e discutir as aplicações inovadoras da terapia gênica, com foco na técnica CRISPR/Cas9, no tratamento da anemia falciforme. **MÉTODOS:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura em que foram utilizadas as bases de dados BVS e PubMed. **RESULTADOS:** A investigação mostrou que a edição genética com CRISPR/Cas9, especialmente a terapia Casgevy, tem se mostrado promissora no tratamento da doença falciforme. A técnica aumenta a produção de hemoglobina fetal ao inativar o gene BCL11A ou regiões promotoras dos genes HBG1/HBG2. Ensaios clínicos e pré-clínicos indicam eficácia, segurança e potencial terapêutico, embora desafios como a eficiência do enxerto e efeitos colaterais ainda existam. **CONCLUSÃO:** A edição genética representa uma promissora fronteira terapêutica para a Doença Falciforme, com potencial para transformar o tratamento de doenças hereditárias. Embora os avanços sejam significativos, ainda há desafios a superar, o que reforça a importância de pesquisas contínuas. **PALAVRAS-CHAVE:** anemia falciforme; terapia genética; sistemas CRISPR-Cas.

ABSTRACT

OBJECTIVES: The study aims to present and discuss the innovative applications of gene therapy, with a focus on the CRISPR/Cas9 technique, in the treatment of sickle cell anemia. **METHODS:** This is a systematic review of the literature in which the VHL and PubMed databases were used. **RESULTS:** Research has shown that gene editing with CRISPR/Cas9, especially Casgevy therapy, has shown promise in the treatment of sickle cell disease. The technique increases the production of fetal hemoglobin by inactivating the BCL11A gene or promoter regions of the HBG1/HBG2 genes. Clinical and preclinical trials indicate efficacy, safety, and therapeutic potential, although challenges such as graft efficiency and side effects still exist. **CONCLUSION:** Gene editing represents a promising therapeutic frontier for sickle cell disease, with the potential to transform the treatment of inherited diseases. Although the advances are significant, there are still challenges to overcome, which reinforces the importance of continuous research. **KEYWORDS:** genome editing; CRISPR/Cas9; sickle cell disease.

RESUMEN

OBJETIVOS: El estudio tiene como objetivo presentar y discutir las aplicaciones innovadoras de la terapia génica, con un enfoque en la técnica CRISPR/Cas9, en el tratamiento de la anemia falciforme. **MÉTODOS:** Se trata de una revisión sistemática de la literatura en la que se utilizaron las bases de datos BVS y PubMed.

¹Estudante do curso de Medicina da Afya Faculdade de Ciências Médicas de Guanambi; Guanambi, Bahia; E-mail: pauloemanuelgbi@gmail.com

²Estudante do curso de Medicina da Afya Faculdade de Ciências Médicas de Guanambi; Guanambi, Bahia; E-mail: paullina.araujo@aluno.fip-gbi.edu.br

³Estudante do curso de Medicina da Afya Faculdade de Ciências Médicas de Guanambi; Guanambi, Bahia; E-mail: faila.costa@aluno.fip-gbi.edu.br

⁴Licenciada em Ciências Biológicas. Especialista em Gestão ambiental com tecnologias limpas. Mestre em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia- UFBA; Professora do curso de Medicina da Afya Faculdade de Ciências Médicas de Guanambi; Guanambi, Bahia; E-mail: pamera.santos@fip-gbi.edu.br

RESULTADOS: La investigación ha demostrado que la edición genética con CRISPR/Cas9, especialmente la terapia Casgevy, se ha mostrado prometedora en el tratamiento de la enfermedad de células falciformes. La técnica aumenta la producción de hemoglobina fetal mediante la inactivación del gen BCL11A o regiones promotoras de los genes HBG1/HBG2. Los ensayos clínicos y preclínicos indican eficacia, seguridad y potencial terapéutico, aunque aún existen desafíos como la eficiencia del injerto y los efectos secundarios.

CONCLUSIÓN: La edición genética representa una frontera terapéutica prometedora para la enfermedad de células falciformes, con el potencial de transformar el tratamiento de las enfermedades hereditarias. Aunque los avances son significativos, aún quedan retos por superar, lo que refuerza la importancia de la investigación continua.

PALABRAS CLAVE: anemia falciforme. terapia génica. sistemas CRISPR-Cas.

INTRODUÇÃO

A Doença Falciforme (DF) é uma condição hereditária autossômica recessiva que resulta de uma mutação no gene da cadeia β -globina da hemoglobina, localizado no cromossomo 11, onde o aminoácido glutamato é substituído por valina, gerando uma globina alterada chamada β_s . Essa alteração modifica a estrutura dos eritrócitos. A combinação de dímeros de globina β_s com dímeros de globina α - proteínas normais codificadas no cromossomo 16 - forma o tetrâmero de globinas α/β_s . A ligação de quatro átomos de ferro aos grupos heme do tetrâmero configura a Hemoglobina S, ou HbS (Brasil, 2024).

Quando a Hemoglobina S está desoxigenada, ela forma longas fibras dentro dos glóbulos vermelhos, compostas por sete fios duplos que se enroscam entre si (Hoffbrand; Moss, 2018). Isso transforma o citosol dos eritrócitos de um estado líquido para gelatinoso. Com a falta crescente de oxigênio e a expansão das fibras dentro dos glóbulos vermelhos, as células mudam de forma, assumindo a aparência de uma foice, tornando-se frágeis, desidratadas e menos flexíveis, reduzindo sua vida útil (Kumar *et al.*, 2016).

As hemácias deformadas comprometem a circulação, causando estagnação do sangue, inchaço, dores articulares ou abdominais e lesões isquêmicas nos tecidos. Esses glóbulos vermelhos deformados são fagocitados pelos macrófagos, resultando em anemia. Por essa razão, a vida média de um eritrócito homocigoto para HbS é de cerca de 20 dias, em comparação com os 120 dias das células normais. Além disso, os macrófagos liberam citocinas que se difundem na microcirculação do

sistema nervoso, provocando contração vascular, aumento da frequência cardíaca e da pressão sanguínea, alterações metabólicas, febre e dor (Telles *et al.*, 2024).

A condição heterocigota (HbAS) é, em grande parte, assintomática, permitindo que os pacientes levem uma vida quase normal, devido à menor presença de HbS em comparação com HbA. No entanto, existe a preocupação de que pessoas heterocigotas para a hemoglobina S possam gerar uma criança com anemia falciforme, ou seja, homocigota, o que representa a forma mais grave da doença (Manfredini *et al.*, 2013).

Não há um tratamento específico para a anemia falciforme; medidas gerais e preventivas são adotadas para combater a anemia crônica, a desidratação e os episódios de dor (crises de falcização). Essas práticas incluem o diagnóstico precoce de infecções, boa nutrição, hidratação e acompanhamento médico. O hemograma é recomendado, pelo menos, duas vezes ao ano, pois a diminuição dos níveis normais de hemoglobina pode indicar condições como insuficiência renal crônica ou crises aplásticas, que são a paralisação da produção de glóbulos vermelhos pela medula óssea (Brasil, 2024).

No Brasil, a portaria nº 55 de 29 de janeiro de 2010 estabelece o protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas para a Doença Falciforme. O objetivo foi definir critérios, reduzir a morbimortalidade e melhorar a qualidade de vida das pessoas com a doença, que apresentam um amplo espectro de manifestações e complicações clínicas (Brasil, 2010).

O prognóstico para pacientes com doença falciforme melhorou substancialmente nos últimos vinte anos. Um ponto crucial no tratamento é a

utilização de hidroxiureia, que aumenta os níveis de hemoglobina fetal (HbF) eritrocitária e, quando a HbF está presente em níveis mais altos, ela reduz a proporção de HbS nos glóbulos vermelhos; além disso a hidroxiureia promove efeitos anti-inflamatórios devido à inibição da produção de leucócitos. O transplante de células-tronco hematopoiéticas é uma opção que pode oferecer uma chance de cura; no entanto, há dificuldades em encontrar doadores compatíveis. É nesse contexto que a terapia gênica surge como uma opção eficaz (Kumar *et al.*, 2016).

A terapia gênica começou a se desenvolver após a descoberta da estrutura de fita dupla do DNA por James Watson e Francis Crick, quando, então, foi possível investigar e descobrir formas de alterar o código genético. A terapia gênica é uma abordagem de tratamento que envolve a correção de genes mutados ou a modificação específica de genes em locais determinados no DNA. O objetivo é tratar ou curar doenças ao melhorar ou restaurar a função normal dos genes afetados (Gonçalves; Paiva, 2017).

A terapia gênica com CRISPR/Cas9, que é uma ferramenta de edição genética que permite a inserção, deleção ou modificação de sequências específicas de DNA em células vivas, representa uma abordagem altamente relevante e promissora para o tratamento da doença falciforme dentro da linha de pesquisa em Biotecnologia e Saúde, oferecendo esperança para pacientes afetados por essa condição e impulsionando avanços significativos na medicina molecular.

Os objetivos deste estudo são apresentar e discutir as descobertas da literatura sobre as aplicações inovadoras da terapia gênica, com ênfase na técnica CRISPR/Cas9, no tratamento da anemia falciforme.

MÉTODO

Este estudo foi desenvolvido por meio da aplicação do método de Revisão Sistemática da Literatura, que consiste na organização sistemática de estudos, conforme indicado por Galvão e Ricarte

(2019). Utilizaram-se as bases de dados BVS e PubMed. A pesquisa dos descritores foi conduzida através da consulta ao DeSC (Descritores em Ciências da Saúde) e MeSH (Medical Subject Headings). Os descritores utilizados nas bases de dados foram usados em 01 associação composta por 03 dos seguintes descritores: “Anemia, Sickle Cell”, “Genetic Therapies” e “CRISPR Cas Systems”, todos combinados pelo operador booleano “AND”. A associação de descritores está exposta na Tabela 01.

Os critérios de inclusão adotados para os artigos foram a integralidade do conteúdo, acesso gratuito, textos em português ou inglês, artigos publicados a partir de 2019, estudos que associavam a terapia gênica no tratamento da anemia falciforme e estudos que comparavam a CRISPR Cas com outras endonucleases. Foram excluídos estudos que não consideraram aspectos práticos e clínicos da terapia gênica com CRISPR, artigos com acesso pago ou incompleto, duplicatas, publicações anteriores a 2019 ou que não estavam relacionados à anemia falciforme.

Esta revisão sistemática se baseará exclusivamente em dados previamente publicados, dispensando assim a necessidade de revisão ética prevista pela Resolução 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Brasil, a qual estabelece diretrizes para pesquisas nas áreas de Ciências Humanas e Sociais, em que os procedimentos metodológicos incluam a obtenção direta de dados dos participantes, informações que possam apresentar riscos na vida cotidiana ou identificação dos indivíduos.

Como etapa final da metodologia, após os procedimentos de busca, seleção e filtragem dos resultados, os artigos coletados foram organizados em um software de gerenciamento de referências, Zotero®.

Tabela 01 - Estratégia de busca utilizada na revisão de literatura e os resultados encontrados nas bases de dados.

Estratégia de busca (inglês)	Estratégia de busca (português)	Pubmed	BVS
------------------------------	---------------------------------	--------	-----

“Anemia, Sickle Cell” AND “Genetic Therapies” AND “CRISPR Cas Systems”	“Anemia Falciforme” AND “Terapia Genética” AND “Sistemas CRISPR-Cas”	47	62
--	--	----	----

Fonte: Autoria própria.

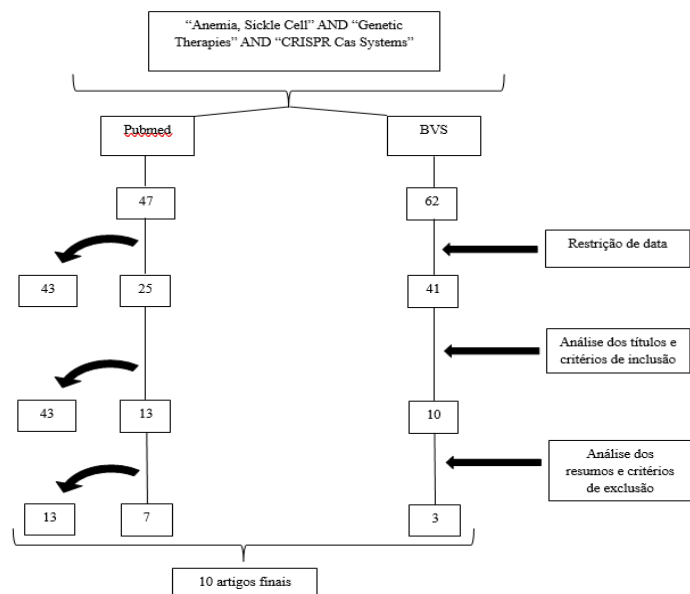
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao consultar a base de dados, encontrou-se 62 artigos na BVS. Após a leitura dos títulos dos artigos, notou-se que alguns não preenchiam os critérios deste estudo. Foram selecionados 41 artigos, dos quais 31 foram excluídos pela leitura do título. Finalmente, dos 10 artigos restantes, 7 foram excluídos pela leitura do resumo e apenas 3 trabalhos compuseram a amostra para a leitura dos artigos na íntegra.

De modo análogo, na base de dados PubMed, foram encontrados 47 artigos, dos quais apenas 25 atendiam ao critério dos últimos 5 anos. Desta forma, 12 artigos foram excluídos após a leitura do título e 6 após a leitura dos resumos. Assim, apenas 7 artigos foram selecionados para a leitura do texto completo.

Na seleção, foram aplicados critérios de exclusão para assegurar a relevância ao tema, além de revisar autores, títulos, anos e periódicos de publicação, resultando na eliminação de 18 duplicatas. Assim, ao término do processo, foram escolhidos um total de 10 artigos para compor esta revisão. Os fluxos de pesquisa estão expostos na Figura 01.

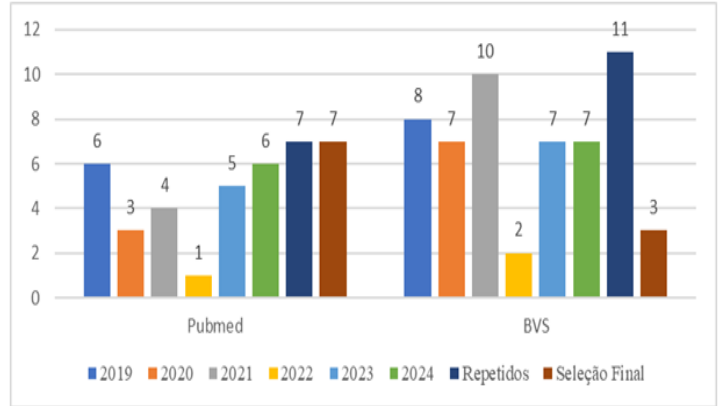
Figura 01 - Diagrama de fluxo da seleção e exclusão dos artigos na revisão de literatura.



Avanços da terapia gênica com CRISPR/CAS ...

Fonte: Autoria própria.
A Figura 02 mostra a quantidade de artigos encontrados em cada base, organizada por ano de publicação.

Figura 02 - Gráfico de resultados do processo de seleção dos artigos por ano e base após restrição de data.



Fonte: Autoria própria.

Nesse contexto, foram identificadas 7 repetições de artigos na plataforma PubMed e 11 na BVS. A Tabela 02 apresenta detalhes sobre os 10 artigos selecionados, incluindo informações sobre cada referência utilizada no estudo, como o objetivo, a metodologia aplicada, os principais resultados e as conclusões obtidas.

Tabela 02 - Dados referentes aos artigos incluídos na presente revisão.

AUTOR; (BASE DE DADOS);	OBJETIVO	MÉTODOS	PRINCIPAIS RESULTADOS	CONCLUSÃO
Bhokisham, N. <i>et al.</i> , 2023 (PubMed)	Discutir os avanços mais recentes na criação de modelos animais utilizando ferramentas de edição genética baseadas no sistema CRISPR-Cas.	Foram analisados ensaios clínicos que utilizam CRISPR-Cas como terapia para doenças humanas, discutindo desafios e explorando novas ferramentas, como edição de base, edição prime, regulação transcricional, edição de epigenoma e edição de RNA.	O uso de CRISPR-Cas para criar modelos animais de grande porte que replicam doenças humanas é crucial para testar a segurança e eficácia de tratamentos. Animais como macacos, porcos e cães, com fisiologia e órgãos semelhantes aos humanos, permitem a aceleração dos testes terapêuticos.	A maioria das terapias celulares editadas por CRISPR-Cas9 está em ensaios clínicos iniciais, e há uma necessidade urgente de ensaios de longa duração com maior eficiência de edição genética para avaliar melhor sua segurança.
Frangoul, H. <i>et al.</i> , 2021 (PubMed)	Relatar os dois primeiros pacientes, um com talassemia beta (TDT) e outro com doença falciforme (SCD) que receberam CTX001, células-tronco editadas por CRISPR-Cas9 para reativar a produção de hemoglobina fetal.	Nos ensaios CLIMB THAL-111 e CLIMB SCD-121, pacientes com TDT e SCD receberam uma infusão de CTX001, sendo que a elegibilidade foi restrita a indivíduos de 18 a 35 anos.	Nos HSPCs CD34+ editados e diferenciados para a linhagem eritróide, os níveis de hemoglobina fetal aumentaram para uma média de 29,0±10,8%, em comparação com 10,5±5,2% nas células não editadas.	Serão necessárias análises adicionais com mais pacientes e maior tempo de seguimento para caracterizar melhor o perfil da terapia CTX001.

Park, Sh. <i>et al.</i> , 2019 (PubMed)	Demonstrar o uso de CRISPR/Cas9 e um oligonucleotídeo para corrigir a mutação falciforme no gene da β -globina em HSPCs de pacientes com doença falciforme.	Os cálculos foram realizados com o SPSS Statistics, e os dados analisados usando testes t de Student, ANOVA one-way e testes post hoc. Diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.	Nossos resultados mostram correção eficaz da mutação falciforme, redução da falcização dos glóbulos vermelhos, sucesso no enxerto de HSPCs editados e a necessidade de minimizar efeitos fora do alvo.	CRISPR/Cas9 tem grande potencial para tratar a doença falciforme, corrigindo mutações e aumentando a produção de hemoglobina fetal. No entanto, são necessários mais estudos para garantir segurança e evitar complicações.
Métais, Jean-Yves <i>et al.</i> , 2019 (PubMed)	Fornecer novas evidências pré-clínicas que respaldam a segurança, viabilidade e eficácia de uma abordagem mecânica para induzir HbF no tratamento de hemoglobinopatias.	Células CD34+ mobilizadas por plerixafor de pacientes com DF foram coletadas seguindo o protocolo aprovado pelos conselhos institucionais do NIH e St. Jude Children's Research Hospital, com consentimento livre e esclarecido dos pacientes.	Os resultados desses estudos mostram que as HSPCs CD34+ editadas com Cas9-3xNLS/sgRNA-1 RNP mantiveram níveis consistentemente elevados de edição após o xenotransplante.	A edição precisa dos promotores HBG1/HBG2 em células CD34+ mobilizadas não prejudica a hematopoiese e induz HbF a níveis terapêuticos, sem efeitos adversos como DSBs fora do alvo ou rearranjos cromossômicos.
Romero, Zulema <i>et al.</i> , 2019 (PubMed)	Comparar as endonucleases ZFNs e CRISPR/Cas9, combinadas com métodos virais e não virais, para corrigir a mutação falciforme no locus HBB.	O CB umbilical foi usado sem necessidade de revisão ética, sendo considerado resíduo médico anônimo. O sangue periférico mobilizado foi coletado de doadores saudáveis após estimulação com G-CSF e adquirido da HemaCare.	A edição de genes usando ZFNs ou CRISPR/Cas9 mostrou eficácia semelhante, com doadores AAV6 resultando em frequências de HDR mais altas em comparação com ssODN.	Considerando as avaliações in vitro e in vivo de endonucleases e modelos de doadores homólogos, a próxima etapa é testar reagentes adequados para ambientes clínicos.
Hollister, Brittany M. <i>et al.</i> , 2019 (PubMed)	Examinar as opiniões da comunidade sobre a doença falciforme (DF).	Adotou-se uma abordagem de métodos mistos para analisar as opiniões dos envolvidos na doença falciforme nos Estados Unidos.	As partes interessadas na doença falciforme apoiam mais a edição do genoma hereditário e os profissionais de saúde genética do que o público em geral, assumindo que a tecnologia seja segura e eficaz.	Destaca-se a importância de incluir as opiniões das comunidades de pacientes no debate sobre o HGE e sugerem que essas populações oferecem uma perspectiva única, moldada pela carga das doenças.
Wilkinson, Ac. <i>et al.</i> , 2021 (PubMed)	Analisar a correção do HBB mediada por Cas9-AAV6 em HSCs funcionais no contexto de transplante autólogo.	A edição gênica foi realizada por eletroporação utilizando um Nucleofector Lonza (código de pulso EO100) e a Solução P3 (Lonza), conforme o protocolo do fabricante.	HSCs multipotentes podem ser corrigidas ex vivo, e a produção estável de hemoglobina-A pode ser alcançada in vivo após transplante autólogo.	O aumento do quimerismo mielóide corrigido por HBB correlaciona-se com características normais dos glóbulos vermelhos, e níveis robustos de hemoglobina-A foram observados mesmo com baixos níveis de quimerismo.
Lattanzi, Annalisa <i>et al.</i> , 2021 (BVS)	Demonstrar a viabilidade pré-clínica, eficácia e toxicidade da correção do gene HBB em células CD34 mobilizadas por plerixafor de doadores saudáveis e de pacientes com DF (GCHBB-SCD).	Os estudos de fabricação em pequena escala seguiram um protocolo aprovado pelo Comitê de Cuidados com Animais da Universidade de Stanford.	Após o transplante em camundongos NSG, foi alcançada uma correção gênica de 20% com enxerto de múltiplas linhagens.	Os dados pré-clínicos sustentam a segurança, eficácia e reprodutibilidade da estratégia de correção gênica para iniciar um ensaio clínico de fase 1/2 em pacientes com DF.
Weber, Leslie <i>et al.</i> , 2020 (BVS)	Identificar o local de ligação LRF como um alvo eficaz para a edição do genoma na doença falciforme.	O estudo usou o CRISPR para projetar gRNAs para os promotores HBG e clonamos os duplexes de oligonucleotídeos no plasmídeo MA128 para expressão em linhagens de células eritróides.	A edição do local de ligação LRF em HSPCs de pacientes levou à desrepressão da γ -globina e correção do fenótipo falciforme.	O estudo valida uma nova abordagem para tratar a doença falciforme, visando um local repressor na γ -globina para aumentar a Hb fetal e reduzir a HbS.
Rosanwo, Tolulope O. <i>et al.</i> , 2021 (BVS)	Comparar a edição do genoma com outras terapias genéticas, explorar diferentes estratégias de edição e discutir os desafios e perspectivas da implementação da edição do genoma como tratamento.	Trata-se de uma revisão da literatura.	A edição do genoma realiza alterações genéticas em células somáticas, abrindo novas possibilidades de cura para a doença falciforme e a β -talassemia.	As hemoglobinopatias, sendo distúrbios monogênicos comuns, estão na vanguarda da aplicação clínica da edição do genoma e oferecem promissora abordagem para tratar doenças na sua origem.

A análise da literatura mostrou que, em um tratamento terapêutico, células-tronco hematopoiéticas CD34 e células progenitoras (HSPCs), que são células essenciais para a formação e manutenção do sangue e do sistema imunológico, foram retiradas do paciente e modificadas com a terapia Casgevy (exagamglogene autotemcel), anteriormente chamada de CTX001 ou exa-cel, a qual é um exemplo de tratamento baseado na tecnologia CRISPR. Esta terapia inibe um gene chamado BCL11A, que normalmente bloqueia a produção de hemoglobina fetal, uma forma de hemoglobina presente apenas em fetos. Como resultado, aumenta-se a quantidade de hemoglobina fetal no sangue, compensando a falta de hemoglobina adulta. As células editadas são, então, reintroduzidas no paciente. O objetivo terapêutico é reduzir a necessidade de transfusões sanguíneas, em casos de β -talassemia, e minimizar as crises vaso-oclusivas, em casos de doença falciforme (Bhokisham *et al.*, 2023).

Os primeiros desdobramentos do monitoramento de duas pacientes iniciais, uma com β -talassemia dependente de transfusão (TDT) e a outra com DF, ambas submetidas ao tratamento com CTX001, indicaram uma bem-sucedida edição do gene BCL11A através da tecnologia CRISPR-Cas9 em células-tronco hematopoiéticas de longa duração. Evidenciou-se um enxerto robusto, expressão sustentada de hemoglobina fetal em níveis elevados e a notável ausência de episódios vaso-oclusivos ou necessidade de transfusões (Frangoul *et al.*, 2021).

Park *et al.* (2019) evidenciou que as células-tronco hematopoiéticas e progenitoras (HSPCs) CD34, provenientes da medula óssea de pacientes com DF, após correção genética, foram capazes de enxertar-se em camundongos imunodeficientes NOD-SCID-gama (NSG). No entanto, observou-se uma diminuição na porcentagem de alelos geneticamente corrigidos 16 semanas após o transplante, indicando possivelmente uma redução na capacidade de enxerto das células editadas, o que pode apontar que o congelamento e descongelamento das células transplantadas

Fonte: Autoria própria.

influencia na capacidade de enxertia.

Uma das estratégias anteriormente mencionadas para tratar a Doença Falciforme com terapia genética envolve a inativação laboratorial do gene BCL11A, responsável pela codificação da proteína BCL11A, a qual normalmente reprime a expressão da hemoglobina fetal. Todavia, uma alternativa viável consiste na inativação laboratorial das posições próximas aos promotores dos genes HBG1 e HBG2, uma vez que a proteína produzida pelo BCL11A se liga a regiões específicas no DNA perto da região promotora desses genes, impedindo a transcrição gênica, e consequentemente, a codificação das cadeias gama da hemoglobina fetal por eles (Weber *et al.*, 2020).

Métais *et al.* (2019) utilizou da inativação de regiões próximas aos promotores dos genes HBG1 e HBG2, e evidenciou que é viável alcançar uma edição de alto nível nessas regiões em células CD34+ mobilizadas pelo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) de indivíduos saudáveis e células CD34+ mobilizadas por plerixafor, medicamento responsável por fazer com que as células-tronco hematopoiéticas saiam da medula óssea e entrem na corrente sanguínea, de indivíduos com DF. Além disso, foi constatado que a edição não compromete a hematopoiese e sendo bem-sucedida, leva à indução de HbF a níveis potencialmente terapêuticos, sem a detecção de Lesões de Fita Dupla no DNA (DSBs) fora do alvo ou rearranjos cromossômicos.

Técnicas convencionais empregam CRISPR/Cas9 ou outras endonucleases que reconhecem locais específicos, como nucleases dedo de Zinco (ZFNs) e TALENs, para desencadear o reparo dirigido por homologia (HDR) em um ponto associado à doença falciforme nas células-tronco hematopoiéticas e progenitoras. Esse reparo é feito com um doador da sequência do DNA a ser introduzido na célula, que pode ser um oligodesoxinucleotídeos, que são pequenos fragmentos de DNA de fita simples projetados, ou vetores virais como o vírus adenoassociado sorotipo 6 (AAV6) que é conhecido por seu tropismo, ou seja, sua capacidade de infectar uma variedade de tipos

Avanços da terapia gênica com CRISPR/CAS ...

celulares pela alta eficiência na transdução, facilitando a introdução do DNA corretivo nas células (Romero *et al.*, 2019).

Diante disso, no estudo realizado por Rosanwo e Bauer (2021) foi observado que tanto ZFNs quanto CRISPR/Cas9 mostraram frequências semelhantes de corte do DNA. Já no reparo dirigido por homologia, o AAV6 foi o mais eficiente em laboratório (in vitro) para corrigir a mutação, mas essa eficiência foi menor em testes com camundongos (in vivo) em que tanto o AAV6 e os oligodesoxinucleotídeos tiveram frequências semelhantes. Todavia, o AAV6 também causou problemas no crescimento e na formação de colônias de células progenitoras, o que é um efeito colateral indesejado. Isso sugere que são necessárias manipulações adicionais para melhorar a eficiência da correção genética.

Hollister *et al.* (2019) buscou investigar a opinião da população sobre os benefícios e riscos da Engenharia Genética Humana (HGE) demonstrou que as partes interessadas em anemia falciforme expressam maior apoio à HGE do que a população geral nos Estados Unidos, demonstrando um nível de apoio equivalente ao dos profissionais de genética.

Finalmente, Wilkinson *et al.* (2021) evidenciou que as células-tronco hematopoéticas de longa duração (LT-HSCs) multipotentes e funcionais podem ser alvo de edição genética por meio da tecnologia Cas9-AAV6. Nesse contexto, demonstrou-se que a correção do gene da globina beta nesse tipo celular que se encontra mutado em pacientes com doença falciforme, resulta em uma melhoria nos níveis de hemoglobina A in vivo após o transplante autólogo.

Ademais, ao investigar camundongos diabéticos-scid-gama (NSG) com idade entre seis e oito semanas foram avaliados a eficácia do protocolo de produção em escalas pequena, média e clínica de HSPCs CD34 corrigidas no gene que codifica a hemoglobina B (HBB). Evidenciou-se uma correção gênica de 20% com enxerto de múltiplas linhagens. Além disso, os resultados pré-clínicos evidenciaram perfis de segurança e eficácia que sustentam o início de um ensaio clínico de fase 1/2

em pacientes que sofrem de DF grave (Lattanzi *et al.*, 2021).

Em resumo, a doença falciforme (DF) é uma candidata ideal para a edição genética, uma vez que ela é causada por uma única mutação genética. A resolução da DF não beneficiaria apenas o paciente, mas também contribuiria significativamente para o progresso da pesquisa em ciências médicas.

Desse modo, verifica-se o intrínseco progresso na tecnologia da edição de genes no tratamento da Doença Falciforme. Os resultados evidenciaram que existem diversas técnicas sendo testadas para chegar em um resultado clínico relevante.

Por fim, espera-se que essa pesquisa possa consolidar e organizar informações sobre os avanços mais recentes no uso da tecnologia CRISPR/Cas para a terapia gênica na doença falciforme, proporcionando um recurso valioso para outros pesquisadores e acadêmicos. Ao destacar os avanços terapêuticos, o estudo em questão proporciona esperança a pacientes e suas famílias, mostrando que há progressos sendo feitos em direção a tratamentos mais eficazes e potencialmente curativos.

CONCLUSÃO

Observa-se o progresso significativo na tecnologia de edição de genes para o tratamento da Doença Falciforme. Os resultados mostram que diversas técnicas estão sendo testadas para alcançar resultados clínicos relevantes. A inativação de genes como BCL11A e HBG1/HBG2 tem demonstrado eficácia na indução da expressão de hemoglobina fetal e na melhoria dos sintomas dessas condições. Esses achados sugerem um potencial significativo para a engenharia genética humana como uma abordagem terapêutica viável e destacam a importância contínua da pesquisa nesse campo para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com doenças hematológicas.

Encontrar cura ou tratamentos eficientes para a anemia falciforme é crucial para melhorar a

Avanços da terapia gênica com CRISPR/CAS ...

qualidade de vida dos pacientes, reduzir complicações graves, impactar positivamente comunidades desfavorecidas e representar um avanço significativo na medicina ao demonstrar o potencial da terapia genética e outras abordagens inovadoras para tratar doenças genéticas hereditárias.

À título de palavras finais, destaca-se que este trabalho se limitou a analisar as associações entre a anemia falciforme, terapia genética e sistemas CRISPR-Cas, sem explorar variáveis aleatórias ou conjecturas. Além disso, é necessário enfatizar que o percurso metodológico deste estudo faz parte de uma proposta maior, que abrange estudos mais aprofundados e diversificados sobre o tema. Portanto, conclui-se este estudo enaltecendo a necessidade e a relevância do tema abordado, e sugere-se a realização de novos e futuros trabalhos que possam confirmar os resultados apresentados.

REFERÊNCIAS

- BHOKISHAM, N.; LAUDERMILCH, E.; TRAEGER, LL.; BONILLA, TD.; RUIZ-ESTEVEZ, M.; BECKER, JR. CRISPR-Cas System: The Current and Emerging Translational Landscape. *Cells*, v. 12, n. 8, p. 1103, 7 abr. 2023. Disponível em: [10.3390/cells12081103](https://doi.org/10.3390/cells12081103). Acesso em: 16 jan. 2024.
- BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme**. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/pcdt/d/doenca-falciforme/view>. Acesso em: 19 jun. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria 55 de 29 de janeiro de 2010**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0055_29_01_2010.html. Acesso em: 25 jan. 2024.
- BRASIL. **Resolução no 510, de 7 de abril de 2016**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2016/res0510_07_04_2016.html. Acesso em: 15 jan. 2024.
- FRANGOUL, H. et al. CRISPR-Cas9 Edição de genes para doença falciforme e β -talassemia. *N Engl J Med*, v. 384, n. 3, p. 252-260, 21 jan. 2021. Disponível em: [10.1056/NEJMoa2031054](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054). Acesso em: 15 jan. 2024.

GALVÃO, Maria Cristiane Barbosa; RICARTE, Ivan Luiz Marques. Revisão sistemática da literatura:

conceituação, produção e publicação. **Logeion: Filosofia da informação**, v. 6, n. 1, p. 57-73, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21728/logeion.2019v6n1.p57-73>. Acesso em: 14 jan. 2024.

GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. DE M. A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (São Paulo)**, v. 15, n. 3, p. 369-375, jul. 2017. Disponível em: doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024. Acesso em: 11 jan. 2024.

HOFFBRAND, A V.; MOSS, P. A H. **Fundamentos em hematologia de Hoffbrand**. Porto Alegre: Grupo A, 2018. E-book. ISBN 9788582714515. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582714515/>. Acesso em: 26 mai. 2024.

HOLLISTER, BM. et al. Perspectives of Sickle Cell Disease Stakeholders on Heritable Genome Editing. **CRISPR J**, v. 2, n. 6, p. 441-449, dec. 2019. Disponível em: [10.1089/crispr.2019.0034](https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0034). Acesso em: 16 jan. 2024.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul; ASTER, Jon. **Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2016. E-book. ISBN 9788595150966. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595150966/>. Acesso em: 07 jan. 2024.

LATTANZI, Annalisa et al. Desenvolvimento da correção do gene da globina β em células-tronco hematopoéticas humanas como potencial tratamento durável para doença falciforme. **Transl. Med**, v. 13, n. 598, p. eabf2444, 16 jun. 2021. Disponível em: [10.1126/scitranslmed.abf2444](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf2444). Acesso em: 16 jan. 2024.

MANFREDINI, Vanusa et al. A fisiopatologia da anemia falciforme. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 19, n. 1/2, p. 3-6, jan. 2013. ISSN 2318-9312. Disponível em: <https://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=216>. Acesso em: 14 jan. 2024.

MÉTAIS, JY. et al. Genome editing of HBG1 and HBG2 to induce fetal hemoglobin. **Blood Adv**, v. 3, n. 21, p. 3379-3392, 12 nov. 2019. Disponível em: [10.1182/bloodadvances.2019000820](https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000820). Acesso em: 16 jan. 2024.

PARK, SH.; LEE, CM.; DEVER, DP.; DAVIS, TH.; CAMARENA, J.; SRIFA, W.; ZHANG, Y.; PAIKARI, A.; CHANG, AK.; PORTEUS, MH.; SHEEHAN, VA.; BAO, G.; Highly efficient editing of the β -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. **Nucleic Acids Res**, v. 47, n. 15, p. 7955-7972, 5 set. 2019. Disponível em: [10.1093/nar/gkz475](https://doi.org/10.1093/nar/gkz475). Acesso em: 16 jan. 2024.

ROMERO, Z. et al. Editing the Sickle Cell Disease Mutation in Human Hematopoietic Stem Cells: Comparison of Endonucleases and Homologous

Donor Templates. **Mol Ther**, v. 27, n. 8, p. 1389-1406, 7 ago. 2019. Disponível: [10.1016/j.ymthe.2019.05.014](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.05.014). Acesso em: 16 jan. 2024.

ROSANWO, Tolulope O.; BAUER, Daniel E. Editing outside the body: Ex vivo gene-modification for β -hemoglobinopathy cellular therapy. **Molecular Therapy**, v. 29, n. 11, p. 3163-3178, 03 nov. 2021. Disponível em: doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.10.002. Acesso em: 16 jan. 2024.

TELLES, L. et al. Epidemiological profile trends and cost of pediatric sickle cell disease in Brazil from 2008 to 2022. **J Pediatr (Rio J)**, v. 101, n. 1, p. 110-116, 2025. Disponível em: [10.1016/j.jped.2024.07.010](https://doi.org/10.1016/j.jped.2024.07.010). Acesso em: 19 jun. 2025.

WEBER, Leslie et al. Editing a γ -globin repressor binding site restores fetal hemoglobin synthesis and corrects the sickle cell disease phenotype. **Sci. Adv.**, v. 6, n. 7, p. eaay9392, 12 fev. 2020. Disponível em: doi.org/10.1126/sciadv.aay9392. Acesso em: 16 jan. 2024.

WILKINSON, AC. et al. Cas9-AAV6 gene correction of beta-globin in autologous HSCs improves sickle cell disease erythropoiesis in mice. **Nat Commun**, v. 12, n. 1, p. 686, 29 jan. 2021. Disponível em: [10.1038/s41467-021-20909-x](https://doi.org/10.1038/s41467-021-20909-x). Acesso em: 16 jan. 2024.