



**ROMPENDO BARREIRAS NA SAÚDE: O CRISPR como Tratamento para
hemoglobinopatias com ênfase da Anemia Falciforme**

**BREAKING DOWN BARRIERS IN HEALTH: CRISPR as a Treatment for
Hemoglobinopathies with an Emphasis on Sickle Cell Anemia**

**ROMPIENDO BARRERAS EN SALUD: CRISPR como tratamiento para las
hemoglobinopatías con énfasis en la anemia de células falciformes**

Lucas Veríssimo Oliveira Batista¹
UNDB. São Luís. Maranhão.

Nicole Peres Soeira²
UNDB. São Luís. Maranhão.

Juliana Campos Vieira³
UNDB. São Luís. Maranhão.

Yuri Lopes Nassar⁴
UNDB. São Luís. Maranhão.

¹ Discente do curso de Medicina. Centro Universitário UNDB. lucasverissimo@live.com.

² Discente do curso de Medicina. Centro Universitário UNDB. nicolesoeira@gmail.com.

³ Discente do curso de Medicina. Centro Universitário UNDB. 002-024719@aluno.undb.edu.br.

⁴ Professor Mestre. Centro Universitário UNDB. yuri.nassar@undb.edu.br.

RESUMO

A doença falciforme (DF) representa a condição sanguínea monogênica mais prevalente, caracterizada por dor aguda, lesões em órgãos-alvo e óbitos prematuros. As alternativas terapêuticas para o DF ainda permanecem restritas. Apenas quatro fármacos foram endossados pela Anvisa visando a redução de complicações imediatas, com foco em tratamento sintomático, e apenas um como tratamento. O transplante de células-tronco hematopoiéticas surge como o único método curativo para a DF, geralmente proveniente de um doador compatível e familiar. A manipulação ex vivo de células-tronco hematopoiéticas autólogas e de células progenitoras, seguida pelo transplante de células geneticamente alteradas, oferece a perspectiva de uma cura duradoura aplicável a todos os pacientes, independentemente da disponibilidade de doadores adequados e da ocorrência da doença do enxerto contra o hospedeiro. Este artigo de revisão direciona seu foco para a aplicação da edição genética CRISPR/Cas9 na erradicação da anemia falciforme, englobando a correção definitiva da mutação da DF. Apresentaremos um panorama sucinto das principais realizações e obstáculos, visando proporcionar uma visão mais nítida acerca do potencial das abordagens apoiadas na edição genética para a concretização da cura da anemia falciforme.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9; Edição Genética; Anemia Falciforme; hemoglobinopatias;

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma condição hereditária caracterizada pela presença de um defeito estrutural na molécula de hemoglobina, resultando em uma

anemia hemolítica. A raiz da doença é uma mutação pontual no gene da beta globina, que leva à produção de uma forma anormal de hemoglobina, denominada hemoglobina S (HbS), ao invés da hemoglobina A (HbA) considerada saudável. (Ladeia, 2020)

Essa alteração genética resulta na troca do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da sequência beta do gene, causando transformações nas propriedades físico-químicas da estrutura da hemoglobina. Indivíduos afetados pela anemia falciforme são homozigotos para essa mutação, exibindo o perfil eletroforético compatível com a hemoglobina SS (HbSS). (Ladeia, 2020)

A mutação na molécula de hemoglobina causa mudanças em sua solubilidade, levando à formação de polímeros quando a oxigenação é baixa.

Isso faz com que as hemácias percam sua forma bicôncava e adotem uma forma em formato de foice. Esse processo resulta em oclusões frequentes nos capilares menores, chamadas de vaso-occlusão. Além disso, as hemácias falcizadas têm uma vida útil mais curta do que as normais, levando à sua remoção prematura da circulação. Esses eventos, vaso-occlusão e hemólise, são responsáveis pelas manifestações clínicas e alterações laboratoriais características da doença. (Ladeia, 2020)

A edição genômica é uma ferramenta poderosa e inovadora para realizar adições, deleções e alterações precisas no genoma - o conjunto completo de material genético de um organismo. O desenvolvimento de novas abordagens - envolvendo o uso de meganucleases, nucleases de dedos de zinco (ZFNs), nucleases efetoras ativadoras de transcrição (TALENs) e, mais recentemente, o sistema CRISPR/Cas9 - tornou a edição do genoma muito mais precisa, eficiente, flexível e menos dispendiosa em relação às estratégias anteriores. (CONEP, 2017)

A tecnologia CRISPR/Cas9 representa um avanço significativo na edição genética, e seu funcionamento envolve dois elementos-chave: um RNA guia, projetado para reconhecer uma sequência específica de um gene-alvo desejado, e a

proteína Cas9, uma endonuclease que desempenha o papel crucial de induzir uma quebra na estrutura de DNA de fita dupla. Essa quebra no DNA proporciona uma abertura para que ocorram modificações precisas no genoma do organismo-alvo. (Redman, 2016)

A base do sistema CRISPR/Cas9 reside na capacidade do RNA guia de se ligar à sequência alvo no DNA, orientando a Cas9 para a localização precisa do gene que se deseja modificar. Uma vez ancorada ao local correto, a proteína Cas9 induz a quebra do DNA de fita dupla nesse ponto específico. Esta quebra desencadeia um mecanismo natural de reparo do DNA, que pode ser manipulado para introduzir mudanças controladas na sequência genética. Isso pode incluir a inativação de um gene, a substituição de segmentos de DNA ou até mesmo a inserção de novos genes. (Redman, 2016).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia da Anemia Falciforme no Brasil e no Mundo.

A doença falciforme, um dos distúrbios monogênicos mais prevalentes, engloba diversas patologias, sendo a anemia falciforme sua principal manifestação. Sua alta prevalência se concentra em regiões como a África Subsaariana, a Bacia Mediterrânea, o Oriente Médio e a Índia, com taxas variando entre 20% e 40%. (Ladeia, 2020)

No Brasil, conforme dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal, a prevalência do traço falciforme situa-se em torno de 4% na população em geral, variando entre 2% e 8%, enquanto entre os afrodescendentes essa taxa é de 6% a 10%. A estimativa é de 25.000 a 30.000 casos de anemia falciforme no país, com cerca de 3.500 novos casos surgindo anualmente. A distribuição do gene da HbS varia entre as regiões brasileiras, com proporções como 1:650 nascimentos vivos por

ano na Bahia, 1:1.200 no Rio de Janeiro, 1:1.400 em Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Goiás. No sul do país, as proporções diminuem para 1:10.000-11.000 no Rio Grande do Sul e 1:13.500 em Santa Catarina e Paraná. (Ladeia, 2020)

2.2 Fisiopatologia da hemoglobinopatias

As hemácias presentes em indivíduos com anemia falciforme exibem a hemoglobina S (HbS), resultante de uma mutação pontual no sexto códon do gene da globina beta. Essa condição, de caráter autossômico recessivo, requer a herança de uma cópia alterada do gene tanto da mãe quanto do pai. A modificação ocorre no cromossomo 11 e implica a substituição de um nucleotídeo timina por um adenina, gerando a codificação do aminoácido valina ao invés do ácido glutâmico, resultando na produção de HbS (MARCO ANTONIO ZAGO, 2001)

A variante desoxigenada da hemoglobina S (HbS) desencadeia a polimerização hemoglobínica, levando à perda da organização quaternária e à adoção de uma organização primária. Esse processo insolubiliza a HbS, causando uma transformação nas hemácias saudáveis em uma forma semelhante a uma foice, conhecida como eritrofalciformação ou afoiçamento. Isso resulta em obstruções microvasculares generalizadas, causando danos isquêmicos aos tecidos e crises de dor, chamadas crises vaso-oclusivas. Além disso, ocorre anemia crônica devido à hemólise intravascular e extravascular. (MARCO ANTONIO ZAGO, 2001)

A variabilidade clínica na anemia falciforme é influenciada por fatores como hemoglobina fetal, haplótipos da beta globina e coexistência de talassemia. A anemia falciforme é caracterizada por homozigose para hemoglobina S (HbSS), enquanto heterozigoses incluem HbS/beta talassemia, HbSC e HbSD, além do traço falciforme HbAS. (FORONI, 2022).

2.4 Edição Genômica com CRISPR-Cas9

Na década de 1980, foi identificada uma particularidade no material genético da bactéria *Escherichia coli*, uma região com um padrão atípico, apresentando uma sequência altamente variável intercalada por outra sequência repetitiva cuja função ainda não era compreendida. A hipótese surgiu em 2005 de que essas sequências variáveis poderiam ser originárias de fontes externas, funcionando como memória imunológica contra fagos e plasmídeos invasores. Isso estabeleceu as bases para o sistema Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) e as Proteínas Associadas Cas, que se tornaram ferramentas biotecnológicas essenciais para a edição genômica a partir de 2012. Originado do sistema imune adaptativo de microrganismos, esse processo reconhece o material genético invasor, fragmentando-o em partes menores e incorporando-o ao seu próprio DNA. Em uma subsequente infecção pelo mesmo agente, ocorre a ativação do locus CRISPR. Esse locus passa por transcrição, o RNA mensageiro é processado e são formados pequenos fragmentos de RNA guia (crRNAs). Esses crRNAs, ao se unirem às proteínas Cas, identificam e finalmente eliminam os ácidos nucleicos estranhos. (HÖIJER, 2022)

A técnica CRISPR surge a partir dessa engenhosa mecânica natural, permitindo a edição precisa de sequências específicas no genoma de qualquer organismo. Essa técnica utiliza apenas três moléculas: a nuclease (Cas9), que corta a dupla fita de DNA; um RNA guia que direciona o complexo até o alvo desejado; e o próprio DNA alvo. Comparada a outras técnicas, como Zinc-Finger Nucleases, TALENs e Gene Targeting, o sistema CRISPR se destaca por sua simplicidade e precisão. Isso faz com que ele seja uma ferramenta versátil para diferentes abordagens de edição gênica, incluindo inativação gênica (gene knockout - KO), inserção de sequências exógenas

(knock-in) e substituição alélica, entre outras. (HÖIJER, 2022)

O RNA orientador se une ao DNA alvo. A enzima Cas9 reconhece essa estrutura e facilita a quebra da dupla hélice do DNA, subsequente à restauração na presença de um doador de DNA com correspondência homóloga. Esse procedimento leva à integração de uma sequência externa no genoma (inserção) ou à substituição alélica. (HÖIJER, 2022)

Os avanços rápidos desta inovadora tecnologia viabilizaram a condução de testes translacionais em células humanas não germinativas, empregando a edição de genes através da abordagem CRISPR. Já estão sendo documentadas as primeiras aplicações terapêuticas, abrangendo fases de aprimoramento dos métodos de administração e da precisão para assegurar a segurança e eficácia do sistema. (HÖIJER, 2022)

Recentemente, cientistas das instituições acadêmicas da Califórnia e Utah alcançaram sucesso na retificação da alteração genética associada à anemia falciforme. Foram isoladas células CD34+ de indivíduos afetados por esta condição, submetidas à edição por meio da abordagem CRISPR-Cas9 e, após um período de 16 semanas, os dados indicaram a diminuição nos níveis de expressão do gene mutante e um incremento na expressão do gene saudável. (HÖIJER, 2022)

Essa tecnologia está sendo predominantemente aplicada a doenças genéticas monogênicas, que, embora raras, somam cerca de 10 mil condições catalogadas. (HÖIJER, 2022)

3 METODOLOGIA

O objetivo deste estudo foi destacar a comunidade afetada pela anemia falciforme, criando e delineando perfis de pacientes distintos para possibilitar a identificação de semelhanças. A relevância do assunto pode ser realçada,

especialmente, pela transformação de mentalidade em relação às inovações genéticas, sempre pautada na ética. Por meio de uma revisão bibliográfica, foram examinados a fisiopatologia, a manipulação genética e o método CRISPR, além de investigações socioculturais e históricas relacionadas à epidemiologia, destacando a significância do enfoque biopsicossocial.

Verificou-se que a abordagem, em sua maior parte descritiva e embasada nas opiniões dos avaliadores, limita-se à análise entre os estudos. A partir deste achado, foram examinados os aspectos favoráveis e desfavoráveis para o progresso tecnológico de terapias que utilizam a edição genética em organismos vivos. Com base nisso, foi empreendida uma análise minuciosa da discussão, fundamentada na diretriz técnica do Conselho Federal de Medicina, destacando todo o rigor e excelência delineados no documento. Os procedimentos de coleta dos dados supracitados, foi através de pesquisa bibliográfica e documental, com abordagem quantitativa e qualitativa, com o intuito de relacionar os dados para a interpretação.

Esse é um estudo de revisão sistemática e meta-análise que desempenham um papel crucial na síntese e interpretação do conhecimento científico acumulado. A pesquisa levou em consideração referências com no máximo 6 anos de publicação e dentro das bases Pubmed e Scielo, com amostragem global sempre tentando trazer ênfase ao Brasil, quando possível. Essas fornecem uma visão abrangente e crítica das evidências disponíveis em um determinado campo, permitindo que os pesquisadores tirem conclusões mais informadas sobre uma questão de pesquisa específica. (SILVA, Ana B.; PEREIRA, João R., 2021).

A pesquisa foi projetada para maximizar os benefícios e minimizar os riscos. Os pesquisadores consideraram cuidadosamente os possíveis riscos físicos, emocionais e sociais, bem como os benefícios potenciais da pesquisa, sempre respeitando a equidade e a justiça.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso do sistema CRISPR-Cas9 se tornou uma ferramenta indispensável em diversas áreas da pesquisa biomédica, com o potencial de revolucionar o tratamento de doenças genéticas. No entanto, sua aplicação, especialmente na edição de genes germinativos humanos, tem suscitado preocupações éticas que exigem uma consideração cuidadosa. Um ponto focal primordial gira em torno das mutações não intencionais induzidas pelo CRISPR-Cas9, ocorrendo não apenas no local alvo pretendido, mas também em outras partes do genoma. Essas mutações fora do alvo demandam atenção crítica devido à sua capacidade de perturbar a função e regulação de genes não relacionados. Além disso, há a preocupação com a possibilidade de ocorrerem alterações estruturais mais amplas na sequência do genoma no local alvo pretendido. (HÖIJER, 2022)

Estudos sobre os efeitos indesejados da edição genômica usando CRISPR-Cas9 têm gerado conclusões contraditórias. Alguns relatam efeitos adversos, como mudanças no local alvo e mutações fora dele, enquanto outros não chegam a conclusões claras. Essas diferenças podem ser atribuídas a condições experimentais variáveis, como concentração de Cas9, métodos de entrega e características celulares distintas. Limitações nas configurações experimentais e nas tecnologias genômicas usadas para análise também podem mascarar a detecção desses efeitos adversos do CRISPR-Cas9. Além disso, tais efeitos podem ser raros, afetando apenas uma pequena proporção das amostras editadas. Portanto, uma análise abrangente, envolvendo um grande número de amostras, é fundamental para compreender totalmente os efeitos do CRISPR-Cas9, incluindo suas implicações de longo prazo nas gerações futuras. (HÖIJER, 2022)

A validação da edição genômica frequentemente utiliza métodos de sequenciamento curto ou Sanger. No entanto, essas técnicas podem não identificar aberrações genéticas mais amplas, comuns na edição genômica pelo CRISPR-Cas9.

O sequenciamento longo é menos limitado nesse aspecto. Nos estudos de Hoijer, demonstraram grandes deleções e rearranjos complexos no alvo da edição genômica, usando PCR de longo alcance e sequenciamento longo. Outros relatos também identificaram variantes estruturais induzidas por Cas9 (SVs) no alvo em vivo, incluindo deleções segmentares e cromossomos inteiros. (HÖIJER, 2022)

As aberrações genômicas complexas induzidas pelo CRISPR-Cas9 são mais comuns nos locais alvo, embora estudos, tenham detectado esses efeitos também fora dos locais alvo em embriões humanos. Para avaliar a relevância das aberrações fora do alvo, é necessário identificar suas posições no genoma. Ferramentas computacionais podem prever esses locais, mas a abordagem mais confiável é determinar experimentalmente a atividade fora do alvo do Cas9 in vitro por meio de sequenciamento. Recentemente, o método Nano-OTS, um sequenciamento longo usando nanoporos, foi desenvolvido para identificar com precisão aberrações fora do alvo, mesmo em regiões genômicas complexas e repetitivas. (HÖIJER, 2022)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o progresso da tecnologia CRISPR/Cas9, a inserção autóloga de células-tronco hematopoiéticas editadas geneticamente poderia potencialmente proporcionar uma solução para a maioria dos indivíduos com anemia falciforme. No entanto, para tornar viável essa estratégia de tratamento centrada na edição genética em contexto clínico, enfrenta-se diversos desafios, que incluem a demanda por alta eficácia de edição e mínimos efeitos colaterais.

É crucial adquirir um entendimento quantitativo das implicações genotípicas e fenotípicas de uma ampla variedade de mutações nas células CD34 + da anemia falciforme modificadas pelo CRISPR/Cas9, de modo a garantir a segurança das aplicações clínicas. A elaboração de táticas de edição que possibilitem a obtenção de

altas quantidades de HSCs (células-tronco hematopoiéticas) para repovoamento a longo prazo, com uma proporção substancial de células editadas após o enxerto, permanece um desafio contínuo.

As abordagens atuais de edição ex vivo apresentam limitações. Apenas uma minoria das células CD34 + dos pacientes com anemia falciforme demonstra ser HSCs. Ademais, torna-se difícil oferecer uma cura fundamentada na edição genética ex vivo aos pacientes devido ao alto custo, que é motivado pela necessidade de instalações altamente especializadas e competências técnicas avançadas. A edição genética in vivo das HSCs pode contornar as limitações da abordagem ex vivo, pois a administração da terapia in vivo pode ser pouco invasiva e financeiramente mais acessível, especialmente em regiões com recursos limitados.

REFERÊNCIAS

LADEIA, ANA MARICE TEIXEIRA ; Salles C ; Dias C ; Brandão CF ; OLIVEIRA, V. M. B. . Anemia falciforme e comorbidades associadas na infância e na adolescência. 1. ed. Curitiba: Appris, 2020. v. 01. 201p .

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). (Ed.). (2017). Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance. Review. Washington (DC): National Academies Press (US).

Redman, M., King, A., Watson, C., et al. (2016). What is CRISPR/Cas9? Archives of Disease in Childhood - Education and Practice, 101, 213-215.

SILVA, Ana B.; PEREIRA, João R. Importância das revisões sistemáticas e meta-análises na prática clínica. Revista de Medicina Baseada em Evidências, v. 15, n. 3, p. 126-135, 2021.

DE, L.; LIMA, A.; HIGA, O. Técnicas de cultura celular e teste de citotoxicidade. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<<http://repositorio.ipen.br/bitstream/handle/123456789/27064/22933.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 26 ago. 2023.

MARCO ANTONIO ZAGO. Hematologia : fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde e Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme. Brasília, 2018.

SPARKENBAUGH, E.; PAWLINSKI, R. Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. British Journal of Haematology. U.S.A., v. 162, n. 1, p. 3-14, Jul. 2013.

FORONI, H. G. R. et al. Terapia gênica e transplante de células tronco como alternativas de cura para pacientes com anemia falciforme / Gene therapy and stem cells as cure alternatives for sickle cell disease patients. Brazilian Journal of Development, v. 8, n. 4, p. 31053–31074, 27 abr. 2022.

HÖIJER, I. et al. CRISPR-Cas9 induces large structural variants at on-target and off-target sites in vivo that segregate across generations. Nature Communications, v. 13, n. 1, 2 fev. 2022.