

TERAPIA GÊNICA ENVOLVENDO O SISTEMA CRISPR-CAS-9 NO TRATAMENTO DA BETA-TALASSEMIA: UMA REVISÃO DA LITERATURA

¹Gabriel Wilker de Alencar Farias; ²Afonso Leoncio Saraiva Junior; ³Guendalina Giulia Corsi;
⁴Mireia de Oliveira Correia; ⁵Tiago Lima Sampaio.

^{1, 2, 3, 4}Graduando (a) em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará – UFC; ⁵Doutor em Farmacologia pela Universidade Universidade Federal do Ceará – UFC.

Área temática: Biotecnologia e Inovação em Saúde

Modalidade: Comunicação Oral Online

E-mail dos autores: gwilker2001@gmail.com¹; afonsoleonciosj@outlook.com²;
guendalina.farma2021@alu.ufc.br³; mireiadeoliveira1318@gmail.com⁴; tiagosampaio@ufc.br⁵

RESUMO

INTRODUÇÃO: A beta-talassemia é uma doença caracterizada pela mutação no cromossomo 11 do gene da cadeia beta da hemoglobina, afetando a síntese de hemoglobina. O sistema *CRISPR-Cas9* é um sistema de edição genética capaz de alterar sequências de DNA alvo e tratar doenças genéticas. **OBJETIVO:** Expor a aplicabilidade do sistema *CRISPR-Cas9* no tratamento da beta-talassemia. **MÉTODOS:** Trata-se de uma revisão de literatura realizada nas bases de dados Biblioteca Virtual em Saúde, PubMed e Periódicos da CAPES utilizando os descritores "*CRISPR-Cas9 System*", "*CRISPR-Cas9*", "*Genetic therapy*", "*Gene Therapy*", "*beta-Thalassemia*"; e os operadores booleanos "*AND*" e "*OR*". **RESULTADOS:** Nove trabalhos foram selecionados. A maioria dos estudos aplicou *CRISPR-Cas9* em testes *in vivo* e *in vitro* a fim de editar genes relacionados à produção de hemoglobina fetal (HbF), produção de cadeias de beta-globina e de alfa-globina. Um estudo clínico demonstrou aumento da produção de HbF após a administração de células-tronco hematopoiéticas CD34+ editadas em uma paciente com beta-talassemia. **CONCLUSÃO:** A edição genética por *CRISPR-Cas9* apresentou ótimos resultados, principalmente relacionados ao aumento de HbF. Contudo, são necessários mais estudos de efeitos colaterais e clínicos para determinar sua viabilidade como opção terapêutica.

Palavras-chave: Beta-talassemia, *CRISPR-Cas9*, Edição genética.

1 INTRODUÇÃO

A beta-talassemia constitui uma doença hematológica hereditária de caráter quantitativo ocasionada por alterações genéticas no gene HBB no cromossomo 11 que codifica a cadeia de globina beta. Essa mutação acarreta diminuição (β^+) ou ausência da produção (β^0) de cadeia beta, reduzindo consequentemente a síntese de hemoglobina (Galanello; Origa, 2010). O perfil de mutação e a expressão desses genes influenciam na gravidade da condição, que varia de um estado mais brando e assintomático até uma manifestação mais grave, que pode cursar com uma anemia

grave e demandar transfusão de sangue regular. Atualmente, o tratamento curativo é com base no transplante de células-tronco hematopoéticas (CTH), porém é uma opção limitada devido às complicações imunológicas e risco de reação hemolítica autoimune. Mais recentemente a terapia gênica foi introduzida com o intuito de prover mais uma opção terapêutica (Rahimmanesh *et al.*, 2022).

O sistema *CRISPR-Cas9* (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas-Caspase9) é uma tecnologia de edição genética que permite a alteração de genes diretamente na molécula de DNA. *CRISPR* são sequências de DNA repetitivas e curtas encontradas no genoma de algumas bactérias, que expressam DNA viral que, associado à nuclease *Cas9*, funcionam como sistema de proteção contra a inserção de ácidos nucleicos exógenos (Hryhorowicz *et al.*, 2017). Segundo Savić e Schwank (2016), sequências de DNA de interesse são incorporadas ao *locus CRISPR* de bactérias e transcritas a uma molécula de RNA guias (sgRNAs), responsáveis por direcionar a *Cas9* para o sítio de DNA-alvo. Além disso, após a clivagem, é possível utilizar a *Cas9* para introduzir sequências desejadas ao material genético.

Assim, é possível utilizar esse sistema de edição genética para remover genes associados a doenças em células humanas e inserir outras benéficas em células-alvo. Com isso, esse sistema pode ser utilizado para corrigir mutações em doenças hereditárias, como a beta-talassemia. Portanto, objetivou-se, por meio deste trabalho, expor a aplicabilidade do sistema *CRISPR-Cas9* no tratamento da beta-talassemia.

2 MÉTODO

Trata-se de um estudo exploratório do tipo revisão de literatura. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados Medline, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e Periódicos da CAPES utilizando os descritores, conforme Decs/Mesh: "*CRISPR-Cas9 System*", "*CRISPR-Cas9*", "*Genetic therapy*", "*Gene Therapy*", "*beta-Thalassemia*"; e os operadores booleanos "*AND*" e "*OR*". Como critérios, foram incluídos trabalhos em inglês, espanhol e português, publicados entre 2020 e 2024, que abordavam a temática. Revisões de literatura, trabalhos repetidos, tangenciais e fora do período adotado foram excluídos da análise.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados trinta e nove trabalhos, sendo que nove foram selecionados para análise seguindo os critérios adotados. A maioria dos estudos analisados aplicava o sistema *CRISPR-Cas9* em modelos *in vitro* em células-tronco hematopoiéticas ou embrionárias, e *in vivo* em ratos. Apenas um dos estudos trabalhou com aplicação em humanos.

O principal objetivo dos estudos foi alterar sequências genômicas relacionadas aos genes que reprimem a produção de hemoglobina fetal (HbF), principalmente o BCL11A, ou genes que promovem sua produção. A hemoglobina fetal não possui beta-globina em sua estrutura, portanto ao aumentar sua produção é possível restabelecer a produção de hemácias, além de aumentar a perfusão de oxigênio, característica essencial da HbF.

Durante a transição da eritropoiese fetal para a adulta, o BCL11A promove a supressão da produção de gama-globina em favor do aumento de beta-globina. Na beta-talassemia, a produção de beta-globina é comprometida, portanto, os estudos mostram a importância de inibir a expressão do gene BCL11A (Zeng *et al.*, 2020; Psatha *et al.*, 2021; Lamsfus-Calle *et al.*, 2021). A inativação do gene *enhancer* de BCL11A, responsável por aumentar a expressão do gene BCL11A, em células-tronco hematopoiéticas positivas para CD34 (CD34+) de pacientes com beta-talassemia, foi capaz de aumentar a produção de células vermelhas com HbF em $39,7\% \pm 10,1\%$. Além disso, a edição dos genes promotores da regulação da expressão de HbF, HBG-115 e HBG-197, que promovem a produção de cadeias de gama-globina, também aumentaram a produção de HbF em níveis superiores a 50% (Psatha *et al.*, 2021).

Outro alvo em potencial para aumentar a produção de hemoglobina fetal é o alelo HBB-b1 do gene HBB, que está relacionado à supressão de HbF. No estudo conduzido por Ajami *et al.* (2020), a edição dos *exons* HBB-b1 usando o sistema *CRISPR-Cas9* em CTH conseguiu reverter essa supressão. Concomitantemente, notou-se um aumento na expressão do gene HBB-b2. Possivelmente, a expressão de cadeias de hemoglobinas é influenciada por uma relação competitiva entre os genes promotores de globina HBB-b1 e HBB-b2 no *locus* da beta-globina, sendo HBB-b2 responsável por aumentar a expressão de HbF. Portanto, a inibição do alelo HBB-b1 permitiu uma maior expressão do alelo HBB-b2 e, consequentemente, a produção de HbF.

Ademais, o sistema *CRISPR-Cas9* pode ser utilizado também para corrigir mutações de bases específicas e restabelecer a produção de beta-globina. A edição de base no realçador +58 do gene BCL11A resultou em conversão de citosina por timina, induzindo uma produção robusta de

HbF em CTH humano (Zeng *et al.*, 2020). A correção da mutação IVS1-110 [G>A] no alelo da beta-globina (HBB) foi outra abordagem utilizando edição de bases específicas. Essa mutação causa uma parada prematura na transcrição da cadeia de beta-globina, sendo relacionada à forma grave da doença. A conversão de adenina em guanina usando *Cas9* foi capaz de corrigir a mutação em quase 90% das CTH CD34+. Essa metodologia foi considerada de baixa toxicidade por não utilizar edição nucleotídica, assim diminuindo a possibilidade de mutações secundárias em *exons* ou em grandes regiões (Hardouin *et al.*, 2022).

A diminuição da produção de alfa-globina também apresentou bons resultados. Um dos estudos utilizou *CRISPR-Cas9* para deletar o gene HBA2 a fim de restabelecer o equilíbrio na produção de alfa e beta-globina e gerar menos hemácias defeituosas. Percebeu-se que, na redução de alfa-globina, a expressão de beta-globina poderia suplantiar a produção de hemoglobina. A remoção de ambos os genes HBA1 e HBA2 reduziram a produção de alfa-globina em 50 a 75%. Essa abordagem poderia ajudar no tratamento de beta-talassemia moderada. Para pacientes que não produzem beta-globina. Além disso, foi utilizada a integração do gene AAV6^{AS3} no gene HBB concomitantemente com a remoção de HBA2 para induzir uma expressão de beta-globina em células que não a produziam. Essa abordagem demonstrou bons resultados, podendo ser uma opção para pacientes com beta-talassemia que não produzem beta-globina (Pavani *et al.*, 2021).

Em um dos estudos, foi fabricado um fármaco experimental a partir da edição de células-tronco hematopoiéticas CD34+ utilizando o sistema *CRISPR-Cas9* em CTH CD34+ de pessoas saudáveis. O fármaco foi capaz de editar alelos de CTH CD34+ da medula óssea e células vermelhas periféricas nucleadas, com uma taxa de 68,9%. Após a administração em uma paciente com genótipo beta β^0/β^+ , os níveis de HbF subiram de 0,3 g/dL no início do estudo para 13,1 g/dL após 18 meses. Apenas dois eventos adversos de maior gravidade foram observados: pneumonia com neutropenia e doença hepática vaso-oclusiva, porém este último foi relacionado ao histórico prévio da paciente (Frangoul *et al.*, 2020). Esses resultados demonstram uma boa viabilidade para sua aplicação em estudos clínicos.

4 CONCLUSÃO

Os estudos apresentaram ótimos resultados com a aplicação do sistema *CRISPR-Cas9* no tratamento da beta-talassemia. Ela pode ser aplicada para aumentar a produção de hemoglobina

fetal, restabelecer a produção de beta-globina ou diminuir a síntese de cadeias de alfa-globina. Contudo, ainda é cedo para afirmar a aplicabilidade desse método como opção terapêutica. Fazem-se necessários mais estudos para avaliar os efeitos colaterais advindos desses métodos e sua capacidade de gerar mutações secundárias, bem como estudos clínicos para entender as repercussões no genoma humano e estimar sua eficácia terapêutica.

REFERÊNCIAS

AJAMI, M. *et al.* Generation of an in vitro model of β -thalassemia using the CRISPR/Cas9 genome editing system. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 2, p. 1420–1430, 1 fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.29377>

FRANGOUL, H. *et al.* CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 3, 5 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejmoa2031054>

GALANELLO, R.; ORIGA, R. Beta-thalassemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, n. 1, 21 maio 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-11>

HARDOUIN, G. *et al.* Adenine base editor-mediated correction of the common and severe IVS1-110 (G>A) β -thalassemia mutation. **Blood**, 12 dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.2022016629>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1007%2Fs00005-016-0427-5>

LAMSFUS-CALLE, A. *et al.* Universal Gene Correction Approaches for β -hemoglobinopathies Using CRISPR-Cas9 and Adeno-Associated Virus Serotype 6 Donor Templates. **The CRISPR Journal**, v. 4, n. 2, p. 207–222, 1 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0141>

PAVANI, G. *et al.* Correction of β -thalassemia by CRISPR/Cas9 editing of the α -globin locus in human hematopoietic stem cells. **Blood Advances**, v. 5, n. 5, p. 1137–1153, 26 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001996>

PSATHA, N. *et al.* Enhanced HbF reactivation by multiplex mutagenesis of thalassemic CD34+ cells in vitro and in vivo. **Blood**, v. 138, n. 17, p. 1540–1553, 28 out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.2020010020>

RAHIMMANESH, I. et al. Gene Editing-Based Technologies for Beta-hemoglobinopathies Treatment. **Biology**, v. 11, n. 6, p. 862, 1 jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology11060862>

SAVIĆ, N.; SCHWANK, G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. **Translational Research**, v. 168, p. 15–21, fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.09.008>

ZENG, J. *et al.* Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells. **Nature medicine**, v. 26, n. 4, p. 535–541, 1 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0790-y>