

CRISPR-CAS9 e a terapia gênica na reprogramação do gene HBB da anemia falciforme

CRISPR-CAS9 and gene therapy in the reprogramming of the HBB gene of sickle cell anemia

Clecio Junior Bezerra de Almeida

Faculdade Maurício de Nassau, Caruaru, PE, Brasil

Lucas Gabriel Sousa Santos

Faculdade Maurício de Nassau, Caruaru, PE, Brasil

DOI: 10.47573/aya.5379.2.95.14

RESUMO

Essa pesquisa apresenta o uso da ferramenta de edição genética CRISPR- Cas9 como possível ferramenta para a correção do gene HBB causador da anemia falciforme. O objetivo do trabalho foi fazer um levantamento de artigos científicos para demonstrar o uso dessa ferramenta para a edição de DNA para correção do gene HBB da anemia falciforme. Foi realizado um levantamento de artigos nos bancos de dados PUBMED, SCIENCE DIRECT e GOOGLE ACADÊMICO, publicados entre os anos de 2015 a 2021, utilizando os descritores: “CRISPR-Cas Systems”, “CRISPR-Associated Protein 9”, “Genetic Therapy” e “Anemia, Sickle Cell”, usados isoladamente ou unidos usando o operador booleano AND. Após a análise dos artigos encontrados, foi construído um quadro com os artigos selecionados de acordo com propósito da pesquisa. É demonstrado nesse trabalho como pode acontecer à correção do gene HBB (modificado, causador da anemia falciforme) mediada pela técnica CRISPR-cas9, de maneira que mostrou-se que a edição do gene HBB foi eficiente, como é evidenciado em estudos in vitro e in vivo em modelo de camundongos com tal modificação, nos artigos levantados. Destaca-se que é preciso reforçar as pesquisas com a técnica CRISPR-Cas9 em modelos válidos e modernos, para buscar uma forma de entrega deste sistema, mais segura às células, determinando a toxicidade, segurança e eficácia dessa técnica para futuros estudos clínicos.

Palavras-chave: edição de genes. engenharia genética. doenças hematológicas. hemoglobinas.

ABSTRACT

This research presents the use of the CRISPR-Cas9 gene editing tool in the correction of the HBB gene that causes sickle cell anemia. Aiming to survey scientific articles to demonstrate the use of this tool for editing DNA to correct the HBB gene for sickle cell anemia. A survey of articles was carried out in the PUBMED, SCIENCE DIRECT and GOOGLE ACADEMIC databases, published between the years 2015 to 2021, using the descriptors: “CRISPR-Cas Systems”, “CRISPR-Associated Protein 9”, “Genetic Therapy” and “Anemia, Sickle Cell”, used alone or together using the Boolean AND operator. After analyzing the articles found, a table was built with the articles selected according to the purpose of the research. This work demonstrates how the correction of the HBB gene (modified, causing sickle cell anemia) mediated by the CRISPR-cas9 technique can happen, so that the editing of the HBB gene was shown to be efficient, as evidenced in in vitro studies and in vivo in a mouse model with such modification, in the articles surveyed. It is noteworthy that it is necessary to reinforce research with CRISPR-Cas9 in a cell and animal culture model to seek a way to deliver the CRISPR system to cells, determining the toxicity, safety and efficacy of this technique in clinical studies.

Keywords: gene editing. genetic engineering. hematologic diseases. hemoglobin S.

INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é a doença hereditária hematológica mais frequente em todo o mundo e se manifesta em homozigose. A mutação na célula falciforme resulta de uma substituição de aminoácidos na posição 6 da cadeia β -globina, onde acontece a troca de uma simples base nitrogenada timina, por adenina (GAT \rightarrow GTT), no cromossomo 11, causando o surgimento

de uma hemoglobinopatia. (WEATHERALL; PROVAN, 2000; GAZILA NETO; PINTOMBEIRA, 2003).

A alteração dá origem a HbS, que em baixos níveis de oxigênio presente nos pequenos vasos capilares, faz com que essas hemoglobinas se polimerizem formando as hemácias em formato de foice, daí o nome da doença. Isso acontece porque a HbS libera o oxigênio mais rápido que a HbA, e essa falcização depois de um tempo é irreversível, contudo a tecnologia de alterações genéticas a nível de mutações de DNA, esta virando realidade, como e o caso da ferramenta A CRISPR-Cas9 que é usada para correção de mutações genéticas em diversas doenças, como no caso da AF, que tem o gene HBB defeituoso. Essa tecnologia pode ser usada para corrigir o defeito genético preexistente nas hemácias com tal modificação (LORENZI, 2006; GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Existem 3 tipos de sistemas CRISPR, o tipo I, tipo II e tipo III, mas o sistema mais simples utilizado na edição genética é o tipo II, que é composto pela enzima Cas9, que usa um guia chamado gRNA, além do domínio motivo protoespaçador adjacente (PAM) que é um local do DNA que a CRISPR se liga especificamente para acontecer a quebra de cadeia (DSB). Em geral após a CRISPR utilizar a gRNA para identificar a sequência – alvo e ligação à sequência PAM, acontece a clivagem do DNA pela Cas9, onde o locus alvo pode ser reparado via União final não homóloga (NHEJ) ou pelo Reparo Direcionado por Homologia (HDR) (JIANG; DOUDNA, 2017, ISHINO; KRUPOVIC; FORTERRE, 2018, MAIDANA *et al.*, 2020).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo realizar um levantamento em artigos científicos para demonstrar o uso da CRISPR focada na correção do gene HBB, e de que modo pode ser usada na terapia gênica da AF.

METODOLOGIA

Tipos de pesquisa

O presente estudo realizou uma pesquisa qualitativa do tipo descritiva, executada através de uma revisão integrativa com a finalidade de analisar em artigos científicos a aplicabilidade da CRISPR-Cas9 focando no gene HBB, e de que modo pode ser usada na terapia gênica da anemia falciforme.

Dados a serem obtidos

A pesquisa foi realizada nos bancos de dados PUBMED, SCIENCE DIRECT e GOOGLE ACADÊMICO no período de 2021 selecionando artigos publicados nos periódicos nacionais e internacionais.

Forma de obtenção dos dados

Para levantamento dos descritores foi usado o DECS MESH, onde foram utilizados os descritores “CRISPR-Cas Systems”, “CRISPR-Associated Protein 9”, “Genetic Therapy” e “Anemia, Sickle Cell” isoladamente ou também em combinação usando o operador booleano AND e para seleção dos artigos foram usados também em consideração a relevância, que consiste no

número de vezes que o artigo foi citado. Foram selecionados artigos com texto na íntegra, em inglês.

Período

A pesquisa foi composta de materiais coletados entre os anos de 2015 a 2021.

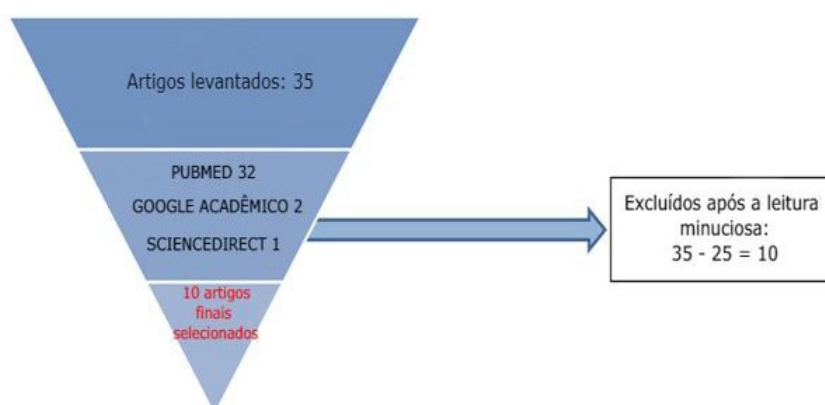
Tratamento e análise dos dados

Os artigos selecionados que continham as palavras-chave foram lidos de forma minuciosa começando pelo abstract, e aqueles que eram interessantes para a presente pesquisa foram separados e partes deles destacadas para servirem como base para se realizar o artigo proposto.

Os critérios de inclusão dos artigos foram: artigos que falem da área que usam a CRISPR como ferramenta de terapia genética da anemia falciforme, artigos que abordam a correção do gene HBB, artigos com estudos in vitro ou in vivo, estudos de fontes primárias e artigos com textos na íntegra publicados entre o ano de 2015 a 2021. Dentre os critérios de exclusão: artigos que não abordem a temática proposta, estudos feitos com outros genes que não sejam o gene HBB, estudo de casos, teses, relatos de caso, editoriais e artigos que não estão disponíveis na forma completa.

Foram levantados 35 artigos, porém com a leitura de todos de forma minuciosa somente 10 artigos foram incluídos por discutirem a temática procurada. Desses 35 artigos, 32 foram selecionados no banco de dados PUBMED, 2 no GOOGLE ACADÊMICO e 1 no SCIENCE DIRECT.

Figura 1 - Síntese da busca dos artigos levantados



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foram encontrados 10 artigos para construção do trabalho, os quais foram explorados tendo como foco a busca por artigos científicos para demonstrar o uso da CRISPR focada na correção do gene HBB, direcionado para anemia falciforme. Logo após foi construído o quadro 1, onde é demonstrado estudos que abordam a temática proposta.

Quadro 1 - Apresentação dos 10 artigos selecionados incluídos nesta revisão.

Título	Autores
Engenharia de Expressão do gene da globina	DAVIS et al. (2019)
Um mutante Cas9 de alta fidelidade distribuído como um complexo de ribonucleoproteína permite a edição de genes eficiente em células-tronco hematopoéticas humanas e células progenitoras	VAKULSKAS et al. (2018)
Direcionamento do gene β -globina CRISPR / Cas9 em células-tronco hematopoéticas humanas	DEVER et al. (2016)
O sistema de entrega supramolecular mediado por nanossustrato permite o knockin CRISPR-Cas9 do gene beta da hemoglobina para hemoglobinopatias	YANG et al. (2020)
Edição de genoma altamente eficiente e sem marcadores de células-tronco pluripotentes humanas por CRISPR-Cas9 RNP e AAV6 recombinação homóloga mediada por doador	MARTIN et al. (2019)
Otimização da entrega CRISPR / Cas9 para células-tronco hematopoéticas humanas e células progenitoras para rearranjos genômicos terapêuticos	LATTANZI et al. (2019)
Edição altamente eficiente do gene β -globina em células-tronco hematopoéticas derivadas de pacientes e células progenitoras para tratar a doença falciforme	PARK et al. (2019)
Edição do genoma livre de seleção da mutação falciforme em células-tronco hematopoéticas / progenitoras humanas adultas	DEWITT et al. (2016)
Correção da mutação falciforme mediada por CRISPR / Cas9 em células CD34 + humanas	HOBAN et al. (2016)
Produção de proteína beta globina adulta corrigida por genes em eritrócitos humanos diferenciada de iPSCs de paciente após a edição do genoma da mutação do ponto de foice	HUANG et al. (2015)

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

O uso da CRISPR-Cas9 como ferramenta para terapia genética no tratamento da anemia falciforme

Anemia Falciforme e o traço falciforme

A doença falciforme ocorre devido à troca da base nitrogenada timina por adenina na posição 6 da cadeia beta da globina, no cromossomo 11, dando origem a hemoglobina S (HbS), que é estruturalmente anormal em relação a hemoglobina normal (HbA). A troca dessa base nitrogenada ao invés de codificar o ácido glutâmico irá produzir o aminoácido valina e irá modificar a estrutura da hemoglobina. Os portadores heterozigotos possuem uma cadeia β normal e uma cadeia β afetada (β_s) e produzem cerca de 60% da hemoglobina A e 40% hemoglobina S, já os homozigotos produzem em sua maioria a hemoglobina S, com quantidades relativas de hemoglobina fetal (WEATHERALL e PROVAN, 2000; GAZILA NETO; PINTOMBEIRA, 2003).

O traço falciforme é uma condição onde apenas um gene para hemoglobina S é transferido por um dos pais para o filho, resultando na HbAS. O traço falciforme constitui uma condição relativamente comum e clinicamente benigna para portadores desta condição. Além de não apresentar nenhuma anormalidade física, sua expectativa de vida é semelhante ao da população geral. Seus achados hematológicos costumam ser normais, sem anemia, com níveis de hemoglobina variando de 13 a 15 g/dL e VCM de 80 a 90 fL. A sobrevivência das hemácias é normal, não havendo hemólise, mas podendo acarretar microcitose ou eritrócitos em “alvo”. Embora não sejam vistos eritrócitos falciformes clássicos, pode haver pequeno número de eritrócitos com duas extremidades pontiagudas, assim o uso de técnicas sensíveis e de execução prática se faz ne-

cessário na rotina dos laboratórios de análises clínicas para a detecção desta hemoglobinopatia (WOITOWICZ *et al.*, 2010).

O diagnóstico se baseia nos achados do hemograma, que mostra a presença de anemia hemolítica. Existem também alterações qualitativas nas hemácias, como poiquilocitose, policromasia, eritroblastos circulantes, corpúsculo de howell-jolly, hemácias em alvo e numerosos eritrócitos alongados, lembrando o formato de uma foice. O diagnóstico é confirmado pela prova da falcização e pela eletroforese de hemoglobina que revela a HbS sendo a mais significativa. (LORENZI, 2006).

Tratamentos disponíveis atualmente para a anemia falciforme

Atualmente os tratamentos disponíveis para hemoglobinopatias incluindo a doença falciforme, são o transplante de células-tronco hematopoéticas (HCS), transfusão de sangue e o uso do medicamento hidroxiuréia (DAVIS *et al.*, 2019).

O paciente com AF quase sempre vai precisar receber transfusões sanguíneas. A AF é uma doença que acarreta em uma anemia hemolítica intensa por causa do surgimento de hemácias em formato de foice (falcização). A falcização acarreta na destruição das hemácias. A transfusão sanguínea serve para aumentar o nível de hemoglobina funcional no organismo. Todavia, as transfusões de sangue frequentes levam à sobrecarga de ferro tóxico e requerem terapia com quelante de ferro (DAVIS *et al.*, 2019).

Entre os medicamentos a Hidroxiuréia (HU) é o único que demonstrou um impacto na melhoria de vida, diminuindo as crises vaso-oclusivas e redução da taxa de mortalidade. Esse medicamento vai elevar a concentração da Hemoglobina fetal (HbF) no organismo e essa elevação é muito útil na proteção contra os eventos de vaso-oclusão e eritrofalcização (FERREIRA; GOUVÊA, 2018).

O Transplante de HCS é o único que fornece uma cura definitiva, para receber esse transplante o paciente utiliza medicamentos que destroem as próprias células doentes da medula óssea. Então recebe uma medula óssea saudável pela corrente sanguínea, essas vão chegar até a medula óssea e ocupar o local daquelas que foram destruídas e se desenvolverem. Esse transplante atualmente ainda é muito restrito a doadores que tenham compatibilidade do complexo histoquímico principal (MHC) e está associado ao risco de o organismo rejeitar o transplante e causar mortalidade. Os pacientes que recebem esse transplante usam por muito tempo ou para o resto da vida medicamentos imunossupressores para diminuir os riscos imunológicos da rejeição (DAVIS *et al.*, 2019).

Terapia gênica

Atualmente, a terapia gênica tem ganhado espaço na ciência e nos laboratórios de pesquisas por ter um potencial de corrigir genes defeituosos nos portadores que possuem diferentes distúrbios, que até hoje não possuem cura. Dentre eles estão a hemofilia, distrofia muscular, artrite reumática, anemia falciforme e doenças genéticas que podem ser adquiridas durante a vida, como o câncer e a AIDS (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

A tecnologia de terapia gênica consiste na capacidade de fazer modificações pontuais no DNA humano. O principal objetivo é fazer correções de genes que estão alterados (mutados) ou

fazer modificações em sítio-específicos. O alvo principal é o tratamento de doenças recessivas (hemofilia, fibrose cística, distrofia muscular e anemia falciforme) e doenças genéticas adquiridas por infecções virais, AIDS e câncer (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

No Brasil aconteceu um feito inédito. Em outubro de 2019 um paciente terminal com linfoma se tornou o primeiro caso da América Latina onde houve a remissão do câncer por terapia gênica. De tal forma que foram coletadas, separadas e modificadas as células sanguíneas do paciente para reconhecer os genes específicos a serem combatidos. Depois que as células foram modificadas, foram infundidas no paciente, e duas semanas após a infusão das células reprogramadas, uma grande parte do tumor havia regredido, havendo melhora significativa na sensação de dor e logo após foi recobrando os movimentos. (SALLES, 2019).

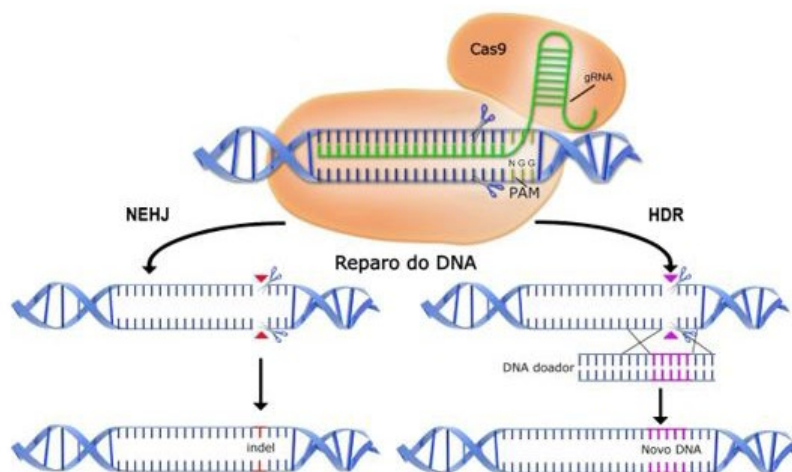
Terapias alternativas usando engenharia genética a para o tratamento da anemia falciforme

Na edição genética podem ser usados diferentes sistemas de nucleases (CRISPR/Cas9, nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TELEN) e Nucleases de dedo de zinco (ZFN)). Cada sistema identifica uma região específica por pareamento de nucleotídeo e cliva a fita do DNA. Na presença do DNA molde acontece a recombinação homóloga, resultando na incorporação do segmento desejado concluindo a correção genética. Por consequência, na ausência do DNA molde ocorre o reparo de junção de extremidades que tem por efeito knockout genético. Esse knockout é a inativação de um gene específico ocasionando o bloqueio da expressão de uma determinada proteína (DAVIS *et al.*, 2019).

Dentre as opções, a ferramenta mais usada é a CRISPR/Cas9 tendo várias vantagens em comparação com as outras ferramentas como, ZFN e TALEN, como a eficiência na edição e especificidade na clivagem do DNA. A CRISPR/Cas9 é uma ferramenta com valor mais acessível, assim sendo facilmente empregada na reprogramação do gene beta - globina S nas células que tem a AF, muito usada em *in vitro* e em camundongos com estudos em laboratórios (DAVIS *et al.*, 2019).

A edição do genoma para correção dos genes pontuais representa uma possível estratégia no tratamento da AF. Após a nuclease se ligar a região do DNA desejada, acontece uma quebra de fita dupla (DSB) e logo após o reparo dessa fita de DNA. O reparo pode acontecer por união de extremidade não homóloga (NHEJ) ou reparo direcionado por homologia (HDR). O NHEJ altera o genoma por uma inserção ou deleção de nucleotídeos onde ocorreu a quebra do DNA, já no HDR, uma sequência de DNA doador é fornecida juntamente com uma nuclease direcionada para mediar o HDR em que a sequência defeituosa pode ser trocada por uma sequência normal (DAVIS *et al.*, 2019).

Figura 1 - Esquema ilustrativo do reparo por NHEJ e HDR após quebra da fita dupla de DNA pela CRISPR - Cas9



Adaptado de: (Profissão Biotec, 2019).

Métodos que buscam a correção do gene HBB da anemia falciforme usando a CRISPR-Cas9

Uma ferramenta promissora para a correção do gene HBB em células falciformes, é o sistema CRISPR-Cas9 com a proteína cas9 modificada para ter alta precisão na edição, como é no caso da alta fidelidade (HiFi) cas9, que é produzida após uma mutação de ponto único, p.r691a na cas9 que faz com que a atividade da cas9 seja mais específica em relação a cas9 do tipo selvagem (VAKULSKAS *et al.*, 2018).

A correção do gene HBB, pode ser feita usando vetores de entrega do sistema CRISPR até o interior da célula. Dever *et al.*, 2016, mostram que foi usado o vetor viral recombinante adeno-associado do sorotipo 6 (rAAV6), um tipo de lentivírus usado em células-tronco hematopoiéticas (HSCs) de camundongos para correção do gene HBB. No estudo realizado, *in vitro* e *in vivo*, usando vetores rAAV6 para introduzir a CRISPR em HSCs com o defeito falciforme e depois introduzir essas células modificadas em camundongos NSG, que são imunodeficientes. Após 16 semanas do enxerto, foi observado que os camundongos exibiam as células editadas na medula óssea, e depois da análise por RT – qPCR em eritrócitos diferenciados de HSCs editados, constatou-se que 56% expressaram mRNA de HbA (DEVER *et al.*, 2016).

Os métodos de entrega do sistema CRISPR intracelular ainda são um desafio para os pesquisadores. Muitos dos métodos causam uma grande mortalidade às células, como é no caso da eletroporação e biobalística. Assim, os métodos baseados em vírus são a escolha mais frequente, como é mostrado no estudo de Dever *et al.* 2016. No seu artigo, ele mostra a utilização do vírus adeno-associado (AAV). No entanto, há limitações em se usar vírus, como a capacidade de embalagem de material genético, alto custo e a falta de segurança da imunogenicidade associada aos AVV (YANG *et al.*, 2020).

Uma maneira mais segura é usar a estratégia de nanopartícula supramolecular (SMNP), que é um vetor de entrega do sistema CRISPR, mediada por nanosubstrato supramolecular (SNSMD), que exerce um papel de facilitador para melhor absorção dos vetores SMNP nas células, permitindo a entrega do CRISPR nas células de maneira segura e eficiente causando o knocking down desejado, a edição do DNA mediada por HDR no gene HBB (YANG *et al.*, 2020).

A estratégia de usar a CRISPR-Cas9 ribonucleoproteína (RNP) e AAV6 se mostram muito eficazes, pois diferente da apresentada por DEVER *et al.*, 2016, os autores MARTIN *et al.*, 2019, usam duas técnicas para a entrega do sistema CRISPR. A primeira é a entrega da proteína cas9 unida a um RNA guia (gRNA) quimicamente modificado, também chamado de complexo de RNP por eletroporação. O uso de AAV6 aqui é usado para facilitar a entrega do gene HBB normal em um local específico do genoma em linhas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) para assim haver uma segurança maior da correção do gene HBB por HDR (MARTIN *et al.*, 2019).

Uma otimização de diferentes técnicas de entrega da CRISPR é de grande valia, pois diminui a toxicidade causada nas células e aumenta a eficiência da edição. A entrega do sistema gRNA e da Cas9 é muito importante para que haja a correta edição do DNA, sem a ocorrência de danos às células. No estudo de Lattanzi *et al.*, 2019, são comparadas as formas de entrega da CRISPR-Cas9 mediado por vetor lentiviral (LV), RNA, complexo de ribonucleoproteína (RNP) e plasmídeos. Tendo por objetivo a edição de parte do genoma responsável pelo locus β -globina associado à persistência hereditária da hemoglobina fetal (HPFH), utilizando esses vetores de entrega em células-tronco hematopoiéticas humanas e células progenitoras (HSPCs) em cultivo de células in vitro (LATTANZI *et al.*, 2019).

Os autores PARK *et al.*, 2019 mostraram neste estudo com relação a otimização da CRISPR, corroboram com as pesquisas realizadas por LATTANZI *et al.*, 2019, porém o presente estudo foi utilizado para quantificar a edição do gene HBB usando modelos de gRNA e oligonucleotídeos de DNA de fita simples (ssODNs) em Células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras (HSPCs) do sangue periférico e da medula óssea. Logo após, as células editadas foram enxertadas na medula óssea de camundongos, onde foi mostrado que os alelos com os genes corrigidos permaneceram estáveis por 19 semanas após a realização do enxerto (PARK *et al.*, 2019).

A estratégia de correção do gene HBB usando a cas9 unido ao ssODNs é muito eficiente, como é mostrado na pesquisa de PARK *et al.*, 2019. Eles também usam ssODNs unida a CRISPR, porém diferentemente do trabalho de PARK *et al.* 2019, no trabalho de DEWITT *et al.*, 2016, é usada também a cas9 RNP, para desenvolver uma edição mais rápida e eficiente testadas em HSPCs.

Foi mostrado que após a edição, as HSPCs produziam menos RNA da hemoglobina S, ocasionando um aumento da hemoglobina normal. Quando essas células foram enxertadas em camundongos imunocomprometidos, a edição do gene HBB se manteve estável por 16 semanas em níveis de proporcionar benefícios clínicos, como a redução da produção da proteína falciforme e aumento da hemoglobina natural (DEWITT *et al.*, 2016).

Os autores HOBAN *et al.*, 2016, avaliaram a eficácia do uso das ferramentas CRISPR-Cas9 e TALENs para corrigir o gene alterado no locus da β -globina humana. Para testar a eficácia das duas nucleases, em células CD34+ derivadas de sangue do cordão umbilical (que abrigava a mutação falciforme) foram eletroporadas com plasmídeos para expressão tanto da CRISPR quanto do TALENs.

Logo após foi observado a clivagem do gene HBB usando ambas as ferramentas, a clivagem usando a TALENs foi de 10 a 15% nas células transfectadas, e utilizando a CRISPR a clivagem foi de 17 a 39%. As duas técnicas se mostram eficientes e podem ser usadas juntas

para um maior sucesso e na edição do locus defeituoso na AF (HOBAN *et al.*, 2016).

As células-tronco pluripotentes induzidas (IPSCs) fornecem uma maneira precisa de gerar células-tronco de maneira mais fácil e barata, as IPSCs usadas no estudo dos autores HUANG *et al.*, 2015, foram geradas a partir de pacientes com AF que tinham a mutação do gene HBB. Foi direcionado ao locus HBB de IPSCs (com mutação falciforme) o sistema CRISPR Cas9 que tem como alvo o locus HBB. As IPSCs usadas *in vitro* contendo a mutação foram transfectadas com um plasmídeo que contém os DNAs para expressão do sistema CRISPR Cas9 e um DNA doador com o gene HBB sem a mutação, para acontecer substituição do gene via HDR. Após a transfecção dos plasmídeos foi detectado que 85% das células em estudos expressavam a proteína β -globina natural (HUANG *et al.*, 2015).

As IPSCs podem resolver muitos problemas que são ocasionados pelos transplantes de medula óssea. Como as IPSCs são células pluripotentes, podem ser estimuladas a se transformar em qualquer célula madura. Por serem células do próprio paciente, resolveria os problemas de rejeição do sistema imunológico através do MHC self, além de diminuir a toxicidade, e maior eficiência na edição usando a CRISPR por usar as próprias células do indivíduo (HUANG *et al.*, 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho buscou entender como a CRISPR-Cas9 pode ser usada para terapia genética na correção do gene HBB da anemia falciforme, visando a melhor compreensão do uso dessa ferramenta em doenças hereditárias. A partir disto foram buscados artigos que abordassem essa correção do gene HBB, por intermédio da técnica de edição genética CRISPR.

Portanto, pesquisas futuras devem ser elaboradas para melhor entendimento da técnica CRISPR, demonstrando a toxicidade, eficiência e segurança da edição do gene HBB. As pesquisas com o uso da CRISPR-Cas9 no gene HBB da anemia falciforme devem ser bem elaboradas com pesquisas em modelos de animais, para buscar um vetor de entrega que seja eficaz para levar a maquinaria da CRISPR ao local do DNA desejado para uma edição segura.

REFERÊNCIAS

DAVIS, R. *et al.* Engineering globin gene expression. *Molecular Therapy-Methods e Clinical Development*, v. 12, p. 102-110, 2019.

DEVER, D. P. *et al.* CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*, v. 539, n. 7629, p. 384-389, 2016.

DEWITT, M. A. *et al.* Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Science translational medicine*, v. 8, n. 360, p. 360ra134-360ra134, 2016.

FERREIRA, R; GOUVÊA, C.M.C.P. Recentes avanços no tratamento da anemia falciforme. *Rev Med Minas Gerais*, v. 2018, n. 28, 2018. 2018.

GALIZA NETO, G.T.L; PITOMBEIRA, M.R.A. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

- GONÇALVES, A.G.T.; PAIVA, R.Q.L. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. Einstein (São Paulo), v. 15, n. 3, p. 369-375, 2017.
- HOBAN, M.D. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated correction of the sickle mutation in human CD34+ cells. *Molecular Therapy*, v. 24, n. 9, p. 1561-1569, 2016.
- HUANG, X. *et al.* Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient i PSC s After Genome Editing of the Sickle Point Mutation. *Stem cells*, v. 33, n. 5, p. 1470-1479, 2015.
- ISHINO, Y.S.H.Z.M; KRUPOVIC, M.R.T; FORTERRE, P.T.R.C.K. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of bacteriology*, v. 200, n. 7, 2018.
- JIANG, F.G.O; DOUDNA, J.N.N.F.R. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics*, v. 46, p. 505-529, 2017.
- JORNAL DA USP. Terapia inédita na América Latina devolve futuro a paciente com câncer terminal. Disponível em: <https://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-da-saude/terapia-inedita-na-america-latina-devolve-futuro-a-paciente-com-cancer-terminal/>. Acesso em: 12 nov. 2021.
- KATO, G.R.G.Y. *et al.* Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, n. 1, p. 1-22, 2018.
- KHURMI, N., GORLIN, A., MISRA, L. Perioperative considerations for patients with sickle cell disease: a narrative review. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*, v. 64, n. 8, p. 860-869, 2017.
- LATTANZI, A. *et al.* Optimization of CRISPR/Cas9 delivery to human hematopoietic stem and progenitor cells for therapeutic genomic rearrangements. *Molecular Therapy*, v. 27, n. 1, p. 137-150, 2019.
- LORENZI, T.Z.N.H Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 1-724.
- MAIDANA, R.C *et al.* Sistema CRISPR/Cas: Edición genómica de precisión. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, v. 18, n. 1, 2020.
- MANFREDINI, V.N.S *et al.* A fisiopatologia da anemia falciforme. *Infarma-Ciências Farmacêuticas*, v. 19, n. 1/2, p. 3-6, 2013.
- MARTIN, R. M. *et al.* Highly efficient and marker-free genome editing of human pluripotent stem cells by CRISPR-Cas9 RNP and AAV6 donor-mediated homologous recombination. *Cell stem cell*, v. 24, n. 5, p. 821-828. e5, 2019.
- PARK, S. H. *et al.* Highly efficient editing of the β -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. *Nucleic acids research*, v. 47, n. 15, p. 7955-7972, 2019.
- PROFISSÃO BIOTEC. Sistema CRISPR/Cas – Da bactéria à terapia gênica. Disponível em: <https://profissaobiotec.com.br/sistema-crispr-cas-da-bacteria-a-terapia-genica/>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- VAKULSKAS, C. A. *et al.* A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nature medicine*, v. 24, n. 8, p. 1216-1224, 2018.

WEATHERALL, D. J.; PROVAN, A. B. Red cells I: inherited anaemias. *The Lancet*, v. 355, n. 9210, p. 1169-1175, 2000.

WOITOWICZ, E.R.K *et al.* Traço falciforme: estudo comparativo de técnicas laboratoriais utilizadas para a triagem da doença. *Visão Acadêmica*, v. 11, n. 2, 2010.

YANG, P. *et al.* Supramolecular nanosubstrate-mediated delivery system enables CRISPR-Cas9 knockin of hemoglobin beta gene for hemoglobinopathies. *Science advances*, v. 6, n. 43, p. eabb7107, 2020.

ZHANG, F; WEN, Y; GUO, X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human molecular genetics*, v. 23, n. R1, p. R40-R46, 2014.