

TERAPIA GÊNICA PARA PORTADORES DE TALASSEMIA BETA ATRAVÉS DO SISTEMA CRISPR/CAS 9

Luíza Nayara M. de Oliveira 

Graduanda em biomedicina pela Faculdade de Americana – FAM.

Beatriz Bonvicini Serpeloni 

Graduanda em biomedicina pela Faculdade de Americana – FAM.

Patrícia Ucelli Simioni 

Pós-doutoranda em Imunologia pela UNICAMP. Coordenadora e Docente do Curso de Biomedicina da Faculdade de Americana – FAM.

Submetido: 11 fev. 2022.

Aprovado: 16 fev. 2022.

Publicado: 10 mar. 2022.

E-mail para correspondência:

luiza01nayara@hotmail.com

Este é um trabalho de acesso aberto e distribuído sob os Termos da *Creative Commons Attribution License*. A licença permite o uso, a distribuição e a reprodução irrestrita, em qualquer meio, desde que creditado as fontes originais.

Imagem: StockPhotos (Todos os direitos reservados).



Open Access

Introdução

O complexo CRISPR, sigla do inglês para repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas, conhecida inicialmente, por promover a imunidade adaptativa contra ácidos nucleicos exógenos nas bactérias. É constituído por sequências altamente variáveis que captam material genético de plasmídeos invasores e de bacteriófagos, desenvolvendo uma imunidade herdada que passará a ser codificada em DNA ao decorrer do tempo ⁽¹⁾. Mediante estudos envolvendo as bactérias *Streptococcus pyogenes*, houve a descoberta do CRISPR/Cas9 do tipo II que, posteriormente, foi adaptado para editar sequências genéticas. A Cas9 possui uma região rica em arginina, responsável por mediar a ligação dos ácidos nucleicos ⁽²⁾.

O RNA guia atua direcionando a sequência alvo após ser inserido na célula desejada junto a Cas9, que em seguida, faz o reconhecimento da sequência específica do DNA. E só então permite que a Cas9 clive o sítio de interesse no genoma, proporcionando também a inserção de uma nova sequência desejada, através da recombinação homóloga ⁽³⁾.

Equiparado aos mecanismos convencionais de edição gênica, que aplicam vírus como fonte do material genético a ser inserido no genoma, o CRISPR/Cas9 pode realizar alterações direcionadas e precisas no DNA de células vivas e tem sido promissor para atuar como terapia gênica em indivíduos portadores de hemoglobinopatias ⁽⁴⁾. A fim de que a sobrevida de pacientes portadores de talassemia beta seja garantida, são necessárias transfusões sanguíneas regulares, com a finalidade de manter os níveis de hemoglobina adequados e reduzir as deformidades ósseas ⁽³⁾. O propósito da terapia gênica é expandir a produção de hemoglobina fetal, isolando as células-tronco dos pacientes a partir do sangue periférico. Em seguida, o CRISPR/Cas9 atua silenciando o gene BCL11A, modificando as células e causando o aumento da produção de hemoglobina fetal. As células que foram editadas são então transfundidas para o paciente após passarem pelo condicionamento mieloblastivo da medula óssea, promovendo a reposição das hemoglobinas funcionais e a substituição das hemoglobinas defeituosas ⁽⁴⁾.

A hemoglobina fetal, é produzida no período pré-natal, cerca de 2 a 6 meses do período de gestação, e tende a ter uma maior afinidade com o oxigênio quando comparada a hemoglobina adulta. Durante os primeiros meses de vida após o nascimento, essa produção cessa, prevalecendo a síntese de hemoglobina beta-globina ⁽⁴⁾.

Metodologia

Nesta pesquisa, utilizou-se a metodologia qualitativa e exploratória, construída entre os meses de julho a dezembro de 2020, por meio de revisões bibliográficas e pesquisas documentais. No que tange a revisão bibliográfica, a busca por materiais que corroborassem para a construção do estudo, se deu por meios de artigos, livros e monografias indexadas em bancos de dados como o Google Acadêmico, Portal de Periódicos SciELO, Elsevier e PubMed.

Resultados e Discussões

Talassemia beta e suas complicações

A talassemia beta é uma hemoglobinopatia, que faz parte de um conjunto de doenças hematológicas hereditárias que resultam em anemia de graus variáveis, ocasionadas pelo ritmo anômalo de produção das cadeias polipeptídicas que compõem a hemoglobina ⁽⁶⁾. Sua herança é autossômica e recessiva, sendo necessários os dois genes anormais de globina beta para o indivíduo apresentar os sinais e sintomas ⁽⁷⁾. Os principais tipos são: *minor*, que a pessoa possui apenas um gene afetado e normalmente é assintomática ⁽⁷⁾. Intermediária, em que o indivíduo possui ambos os genes afetados e anemia de grau leve a moderado ⁽⁷⁾. E a *major*, é o tipo mais grave e mais característico, o doente apresenta anemia severa e se torna dependente de transfusões sanguíneas ⁽⁷⁾. Os sinais e sintomas condizem com qualquer outro tipo de anemia, como cansaço e fraqueza, além de deformidades nos ossos longos que se apresentam desde a infância ⁽⁸⁾.

Terapia gênica em prática

Patrocinada pela Vertex Pharmaceuticals Incorporated a CRISPR Therapeutics, selecionou 30 participantes de 12 a 35 anos, do sexo masculino e feminino, com critério chave de inclusão: diagnóstico de talassemia beta dependente de transfusão definido por talassemia beta homozigótica documentada, ou talassemia beta heterozigótica composta, com confirmação do genótipo pelo laboratório central do estudo, antecedente ao condicionamento de busulfan ⁽⁴⁾. Um histórico nos últimos 2 anos antes da assinatura do consentimento de cerca 100 mL/kg/ano de transfusões de hemácias embaladas, e compatível perante o investigador para o transplante autólogo de células tronco ⁽⁵⁾. Os critérios chaves de exclusão incluem, a existência de um doador compatível com o antígeno leucocitário humano disponível, Alo-HSCT anterior, portadores de talassemia alfa associadas com mais de uma deleção de cadeia alfa, portadores de variantes de beta talassemia falciforme, infecção bacteriana, fúngica, viral, ou parasitária, clinicamente ativa, analisada pelo investigador, contagem de leucócitos menores que $3 \times 10^9/L$ ou de plaquetas menores que $50 \times 10^9/L$ não associados ao hiperesplenismo ⁽⁵⁾.

O estudo intervencional de fase 1 de 2, braço único, multilocal e de dose única nos Estados Unidos teve início em 14 de setembro de 2018, com o intuito de avaliar e assegurar a eficácia de células tronco humanas de origem hematopoiéticas e progenitoras CD 34+, modificadas pelo método CRISPR-Cas9 autólogas, usando o CTX001 em portadores de talassemia beta dependente de transfusão sanguínea ⁽⁵⁾.

No final de julho de 2019, a CRISPR Therapeutics anunciou que o primeiro paciente com hemoglobinopatia do tipo anemia falciforme havia sido tratada por edição de genes com

a tecnologia CRISPR/Cas9, em um estudo de fase 1 nos EUA.⁽⁴⁾ O tratamento com CTX001 envolve isolar as células-tronco do sangue periférico de um paciente e, em seguida, editar as células com o CRISPR/Cas9 projetadas para interromper o gene BCL11A, resultando em um aumento na produção de hemoglobina fetal. As células editadas são então devolvidas ao paciente após condicionamento mieloablativo na medula óssea. Com a expressão diminuída do gene BCL11A nesse meio, a função repressiva da hemoglobina fetal é suprimida levando a uma proporção maior. Antes de receber as células editadas os pacientes passaram por um tratamento em que as células que carregavam o gene defeituoso foram “eliminadas” gradualmente e logo em seguida, supridas pelas atuais células modificadas ⁽⁴⁾.

Os resultados iniciais são promissores, pois um paciente de 20 anos, portador de beta-talassemia dependente de transfusão, permaneceu independente de transfusão por mais de 9 meses após o enxerto das células tratadas com CTX001, impulsionados por um aumento significativo nos níveis de hemoglobina fetal cerca de 99,8%, antecedente ao tratamento eram realizadas cerca de dezesseis transfusões sanguíneas por ano ⁽⁴⁾.

Após o tratamento com CRISPR o paciente portador de talassemia beta, apresentou pneumonia, uma leve diminuição dos glóbulos brancos e um aumento do fígado com icterícia, esses efeitos colaterais, já eram esperados e foram tratados com sucesso ⁽⁹⁾. A paciente portadora de anemia do tipo falciforme, também obteve resultados satisfatórios, conseguiu atingir níveis normais, destes 47% correspondiam a hemoglobina fetal, segundo os médicos, níveis de 25% a 30% já eram suficientes para curar a doença, além de não ter sido relato nenhuma crise oclusiva desde o início do tratamento. As crises oclusivas são ocasionadas quando os glóbulos vermelhos geram a sensação de “entupimento” dos vasos sanguíneos, provocando dor intensa. Anteriormente ao tratamento, a paciente tinha cerca de sete crises por ano, que exigiam períodos longos de hospitalização. A paciente apresentou caso clínico de sepse, cálculos biliares e dor abdominal após o tratamento, o qual também foi tratado com sucesso ⁽⁹⁾.

Conclusão

A biotecnologia e suas evoluções têm mostrado que doenças geneticamente herdadas podem ser corrigidas e isso tem aumentado as expectativas dos cientistas nesse campo laboratorial. As pesquisas realizadas envolvendo o uso da tecnologia de CRISPR/Cas9 para tratamento da talassemia beta tem se mostrado promissoras até o momento, entretanto, permanece em estudo, devido à ausência de evidências que mostrem que o seu uso não afete bases nitrogenadas fora do alvo, ocasionando efeitos off-target. A duração de uma terapia celular hematopoiética autóloga depende da capacidade da modificação permanente das células tronco o que será avaliado futuramente. Contudo, esta tecnologia está se destacando das demais por ser extremamente promissora, de fácil manipulação e precisa, não envolvendo a utilização de plasmídeos.

Palavras-chave: CRISPR. Cas9. Talassemia beta. Terapia gênica. Hemoglobinopatias.

Referências

1 Zheng YM, Lin FL, Gao H, Zou G, Zhang JW, Wang GQ, et al. Development of a versatile and conventional technique for gene disruption in filamentous fungi based on CRISPR-Cas9 technology. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, ago. 2017.



2 Frogue K, Schwartz C, Ramesh A, Misa J, Wheeldon I. CRISPRi repression of nonhomologous end-joining for enhanced genome engineering via homologous recombination in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 114, n. 12, p. 2896-2906, ago. 2017. DOI 10.1002 / bit.26404.

3 Castrignano SB. Enzimas em biologia molecular. III. Tecnologia CRISPR-Cas9. Núcleo de Doenças Respiratórias - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz. *Bollnst Adolfo Lutz*. 2017;27:art.3.

4 The Lancet Hematology. CRISPR-Cas9 gene editing for patients with haemoglobinopathies. *The Lancet Hematology*, 2019, v. 6, n. 9, p. 438, 1 set. 2019. DOI [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(19\)30169-3](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30169-3).

5 Vertex Pharmaceuticals Incorporated. A safety and efficacy study evaluating CTX001 in subjects with transfusion-dependent beta-Thalassemia. Vertex. 2018. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT03655678?view=record>.

6 Freire IA, Deolindo AMR, Sanches MSF, Arcanjo FPN. β -Talassemia major: um relato de caso. *Rev Med da UFC*. 2019; 59(2): 66.

7 Carvalho LB. Avaliação da expressão da talassemia do tipo beta no Brasil pela co-herança com defeitos de hemocromatose São José do Rio Preto 2003. [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2003.

8 Verrastro TL, Neto TF. *Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica*. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

9 Begley S, Feustein A. First CRISPR treatment for blood diseases shows early benefits in two patients. *STAT*. 2019. Disponível em: <https://www.statnews.com/2019/11/19/first-crispr-treatment-for-blood-diseases-shows-early-benefits/>.