

**FACULDADE DE ENFERMAGEM NOVA ESPERANÇA DE MOSSORÓ
CURSO DE BACHAREL EM BIOMEDICINA**

**ANTÔNIO LEANDRO LINO COSTA
MARÍLIA ROCHELLY DA COSTA**

**O USO DA TERAPIA GENÉTICA CRISPR-CAS9 NO TRATAMENTO DA
ANEMIA FALCIFORME: UMA REVISÃO INTEGRATIVA**

**MOSSORÓ
2022**

**ANTÔNIO LEANDRO LINO COSTA
MARÍLIA ROCHELLY DA COSTA**

**O USO DA TERAPIA GENÉTICA CRISPR-CAS9 NO TRATAMENTO DA
ANEMIA FALCIFORME: UMA REVISÃO INTEGRATIVA**

Artigo Científico apresentado a Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró (FACENE/RN), como requisito obrigatório, para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Prof. Dr. André Menezes do Vale.

**MOSSORÓ
2022**

Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró/RN – FACENE/RN.
Catalogação da Publicação na Fonte. FACENE/RN – Biblioteca Sant'Ana.

C837u Costa, Antônio Leandro Lino.

O uso da terapia genética CRISPR-CAS9 no tratamento da anemia falciforme / Antônio Leandro Lino Costa; Marília Rochelly da Costa – Mossoró, 2022.

24 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. André Menezes do Vale.

Monografia (Graduação em Biomedicina) – Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró.

1. Anemia Falciforme. 2. CRISPR. 3. Terapia Genética.
I. Costa, Marília Rochelly da. II. Vale, André Menezes do. III.
Título.

CDU 616.155.194

**ANTÔNIO LEANDRO LINO COSTA
MARÍLIA ROCHELLY DA COSTA**

**O USO DA TERAPIA GENÉTICA CRISPR-CAS9 NO TRATAMENTO DA
ANEMIA FALCIFORME: UMA REVISÃO INTEGRATIVA**

Artigo Científico apresentado a Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró (FACENE/RN), como requisito obrigatório, para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Menezes do Vale – Orientador (a)
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró

Prof. Me. Francisco Vicente – Avaliador (a)
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró

Prof. Dr. Wesley Adson – Avaliador (a)
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró

O USO DA TERAPIA GENÉTICA CRISPR-CAS9 NO TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

THE USE OF CRISPR-CAS9 GENE THERAPY IN THE TREATMENT OF SICKLE CELL ANEMIA: AN INTEGRATIVE REVIEW

**ANTÔNIO LEANDRO LINO COSTA
MARÍLIA ROCHELLY DA COSTA**

RESUMO

Anemia falciforme é a hemoglobinopatia mais comum na espécie humana e apresenta alta mortalidade. É causada pela mutação pontual, uma substituição A-T (GAG→GTG) no primeiro éxon do gene β -globina, que determina a substituição de glutamato por valina na posição 6 da cadeia proteica. Desta forma, origina-se uma variante estrutural da hemoglobina, denominada S (HbS), fazendo com que, em condições de hipóxia, os eritrócitos adquiram o formato de foice, impedindo o transporte eficiente de oxigênio. Os tratamentos amplamente disponíveis no momento apenas atenuam as complicações da doença. Nesse contexto, a técnica de CRISPR-Cas9, permite a edição gênica diretamente no DNA, surgindo como uma solução que possibilita corrigir a mutação e/ou aumentar a expressão de hemoglobina fetal. Diante disto, o presente estudo tem como objetivo caracterizar o uso da terapia genética CRISPR em pacientes com anemia falciforme, assim, destacando as vantagens do tratamento para utilidade clínica na área. A pesquisa é do tipo integrativa que foi executada pela busca de artigos publicados nas bases de dados: Pubmed, Scielo e biblioteca virtual em saúde cujo período está compreendido de 2002 a 2022. E para a coleta de dados, os descritores selecionados foram: anemia falciforme, terapia genética e CRISPR Cas-9.

PALAVRAS-CHAVE: Anemia Falciforme; CRISPR; Terapia Genética.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is the most common hemoglobinopathy in humans and has high mortality. It is caused by a point mutation, an A-T substitution (GAG→GTG) in the first exon of the β -globin gene, which determines the substitution of glutamate for valine at position 6 of the protein chain. In this way, a structural variant of hemoglobin is created, called S (HbS), causing, under hypoxic conditions, the erythrocytes to acquire a sickle shape, preventing the efficient transport of oxygen. The treatments widely available at the moment only mitigate the complications of the disease. In this context, the CRISPR-Cas9 technique allows gene editing directly in the DNA, emerging as a solution that makes it possible to correct the mutation and/or increase the expression of fetal hemoglobin. In view of this, the present study aims to characterize the use of CRISPR gene therapy in patients with sickle cell anemia, thus highlighting the advantages of the treatment for clinical utility in the area. The research is exploratory, of the integrative type, which will be carried out by searching for articles published in the databases: Pubmed, Scielo and the virtual health library whose period is between 2002 and 2022. And for data collection, the selected descriptors will be: sickle cell anemia, gene therapy and CRISPR Cas-9. Thus, it is expected that at the end of the review, it will be possible to identify the importance of technology in people's lives regarding the characterization of the CRISPR-Cas9 technique in the treatment of sickle cell anemia.

KEYWORDS: Sickle cell anemia; CRISPR; Gene Therapy.

INTRODUÇÃO

Em 1987 foi descoberto por pesquisadores japoneses uma posição fixa e específica em um cromossomo da bactéria *Escherichia Coli* (locus), por meio de análises realizadas no genoma dessas bactérias. Posteriormente, foi identificado um conjunto de genes presentes e próximos ao locus da bactéria, denominados de genes CAS, que podem cortar precisamente o DNA e eliminar vírus invasores, os bacteriófagos¹.

Em 2005, descobriu-se que sequências espaçadoras têm origem extracromossômica e são compostas por plasmídeos ou vírus. Verificou-se ainda que os vírus não são capazes de infectar organismos bacterianos que possuem espaçadores, cujas sequências são análogas àqueles referentes ao seu material genético. Através dessas descobertas, em 2012, as pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna desenvolveram a técnica do CRISPR-CAS9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), uma terapia genética que tem como função editar (trocar, remover e adicionar) uma sequência de DNA de qualquer organismo vivo. Em síntese, a técnica do CRISPR necessita de 3 moléculas específicas: um RNA guia, uma endonuclease (a enzima da CAS 9) e um alvo, que será a parte do DNA clivado pela endonuclease e modificado².

O processo de funcionamento da metodologia descrita permite a clivagem de uma parte específica da dupla hélice de DNA, abrindo espaço para a inserção de um novo trecho, tornando possível a edição gênica. As aplicações da CRISPR-CAS9 são variadas, compreendem diversos campos como o agronegócio, pesquisa básica, indústria e medicina, onde tais ferramentas genéticas permitem a possibilidade de cura para doenças monogênicas, como a anemia falciforme³.

No contexto da referida condição anêmica, verifica-se que esta é causada por uma alteração para o gene que codifica a B-globina, uma importante cadeia polipeptídica da molécula da hemoglobina. Essa mutação faz com que o aminoácido glutamato que é polar, seja substituído pela molécula de valina, apolar, gerando uma forma de hemoglobina anômala e denominada S. Tal alteração estrutural induz uma modificação morfológica na hemácia, a qual deixa de ser esférica e passa a apresentar um formato de foice ou drepanócito, resultando em uma deficiência no transporte de oxigênio aos tecidos². Tal prejuízo poderia ser atenuado mediante uma correção na dupla fita de DNA com defeito, justamente pela modificação no trecho de DNA em que é acoplado a CRISPR-CAS9 de

modo que ao ser inserida na célula imatura, ela possa identificar corretamente o trecho defeituoso e substituí-lo⁴.

A grande relevância que o CRISP-Cas9 proporciona no tratamento da patologia impacta de forma significativa na qualidade de vida dos indivíduos acometidos e, principalmente, no combate da doença. Frente a tal cenário, o objetivo desta pesquisa é discorrer acerca da tecnologia CRISPR-Cas9 e sua utilização como alternativa de tratamento da anemia falciforme, expondo o efeito benéfico que a terapia gênica tem a oferecer mediante as investigações já realizadas que cumprem as medidas e diretrizes da bioética.

REFERENCIAL TEÓRICO

Em 1987 foi descoberto um locus no material genético da bactéria *Escherichia coli*, onde suas funções eram desconhecidas e constituído por sequências repetidas e espaçadoras. Para denominar essas sequências, em 2002, foi criado o epônimo CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas)¹.

Em seguida, foi identificado um conjunto de genes próximo ao locus CRISPR, que foram denominados de genes Cas, capazes de codificar uma família de proteínas que apresentam domínios funcionais típicos de nucleases, helicases, polimerases e proteínas de ligação a polinucleotídeos; e contribuem significativamente para o funcionamento integral do locus das bactérias¹.

Em 2005, ficou claro que as sequências espaçadoras são derivadas de plasmídeos ou vírus, ou seja, têm origem extracromossômica. Concluiu-se também que os vírus são incapazes de infectar com sucesso bactérias que possuem espaçadores cujas sequências são análogas às sequências do seu genoma, logo tornou-se notável que o CRISPR-Cas seria um sistema imune adaptativo de procariontos onde os espaçadores serviriam de “memória contra invasores anteriores”, assim, tornando-se uma maquinaria de defesa adaptativa de seres procariontes, auxiliando em sua defesa contra invasão de bacteriófagos⁶.

A CRISPR é uma técnica de biologia molecular atualmente mais popular devido seu baixo custo e fácil acesso, usada para fins de edições genômicas. As aplicações da CRISPR são variadas e compreendem desde a investigação científica básica até aplicações para saúde humana, agronegócio e indústria. A CRISPR-Cas9 torna possível a inserção, remoção e correção do DNA de forma simples e eficiente⁷.

Nesse sentido, a referida metodologia mostra-se eficaz em sua especificidade em determinada célula alvo. A enzima Cas tem função de nuclease, ou seja, promove um recorte na dupla fita da hélice do DNA, abrindo espaço e tornando possível a inserção de um novo trecho e sendo muito útil para alterar uma única base nitrogenada no genoma⁸.

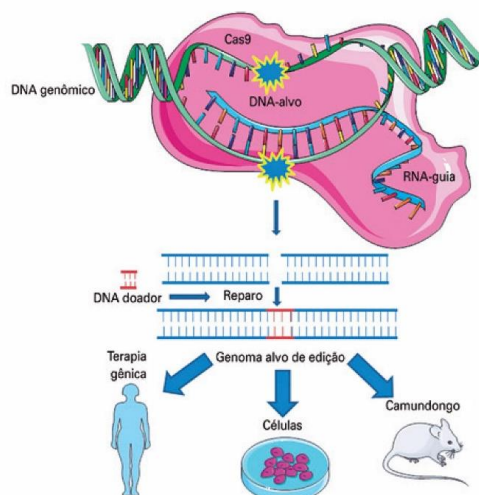
Nessa perspectiva, uma sequência de DNA bacteriano muito particular, com trechos curtos e que se repetem a intervalos regulares, e que podem ser lidos da mesma maneira, mesmo que o sentido de leitura seja invertido (ou seja, como palíndromos), mas na linguagem do DNA. Essa nova tecnologia de edição de genes Crispr-Cas9 é descrita como

uma ‘tesoura molecular’ por sua capacidade de tornar feitos antes improváveis na engenharia genética em simples exercícios de cortar e colar⁸.

Além de seu potencial de edição, o sistema CRISPR-Cas9 oferece possibilidades interessantes para regulação genética e epigenética. Um ponto forte da tecnologia CRISPR reside no fato de que ela reúne DNA, RNA e proteína de maneira previsível e facilmente programável. Isso significa que o complexo Cas9-sgRNA pode atuar como um andaime para recrutar uma ampla gama de efetores ou marcadores para sequências de DNA específicas. É esta propriedade do CRISPR-Cas9 que tem sido explorada para regular a expressão gênica no nível transcricional, seja para ativar genes (CRISPRa) ou para reprimir genes (CRISPRi)⁹.

Em síntese, a técnica de CRISPR-Cas9 necessita de três moléculas vide figura 1: uma nuclease (habitualmente a Cas9 tipo selvagem proveniente de *Streptococcus pyogenes*), um RNA-guia (single guide RNA) e o alvo (o DNA que será alvo da modificação); essa sequência alvo de DNA precisa ser flanqueada por PAMs (5’ NGG 3’), fundamentais para a ancoragem da nuclease ao sítio de clivagem. O processo de funcionamento da técnica tem como princípio a ativação e direcionamento da Cas9, que é mediado por moléculas de RNA: crRNA (CRISPR-derived RNA) e tracrRNA (trans-activating RNA). Para a aplicação laboratorial do CRISPR-Cas9, foi desenvolvido o single guide RNA (sgRNA ou gRNA), uma molécula quimérica resultante da junção dos crRNA e tracrRNA, para ativar e direcionar a Cas9².

Figura 1: Esquema de funcionamento da técnica CRISPR-Cas9. O sistema envolve basicamente três moléculas: uma nucleasse (Cas-9), um RNA guia e o sítio alvo.



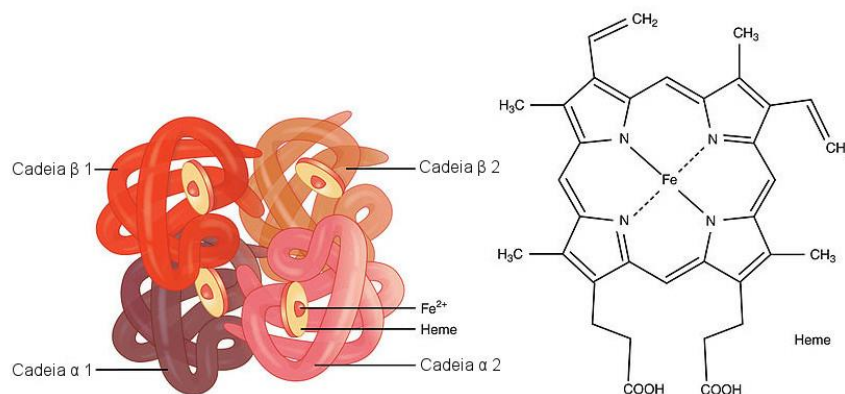
Fonte: GONÇALVES E PAIVA, 2017.

Em genomas maiores, a CRISPR-Cas9 pode clivar além das sequências do DNA alvo, as sequências de DNA altamente homólogas ou idênticas, resultando em mutações em locais indesejados, denominadas mutações fora de alvo (off-target mutations), que podem ser deletérias, resultando em morte ou transformação celular. Assim, para garantir a especificidade da CRISPR-Cas9 e evitar mutações fora de alvo, deve-se selecionar os locais de destino com maior compatibilidade entre o gRNA e sua sequência complementar; além de melhorar e controlar a dosagem de CRISPR-Cas9¹¹.

A finalidade do uso dessa técnica seria de curar doenças genéticas na linha germinativa, o que acarretará e melhorias para a descendência⁸. As ferramentas de edição genética criaram possibilidades de cura para doenças monogênicas, como a anemia falciforme, por meio de diferentes mecanismos².

Desse modo, tem-se que a hemoglobina humana é uma proteína cuja função resulta no transporte de oxigênio aos tecidos por meio da movimentação intravascular dos eritrócitos. A hemoglobina do adulto é formada por dois pares de polipeptídios diferentes divididos em cadeias alfa (α) e beta (β) de globina, conforme a figura 2. Cada cadeia de globina é constituída por seu próprio grupo heme, que contém ferro no interior¹².

Figura 2: Estrutura da molécula de hemoglobina de adulto.



Fonte: NASCIMENTO, 2017.

As hemoglobinopatias correspondem a uma gama de patologias associadas a disfunções hematológicas hereditárias das hemoglobinas (Hb), caracterizadas por mutações dos genes das globinas humanas, levando a alterações quantitativas da sua síntese ou à formação de hemoglobinas estruturalmente anormais. Essa condição pode ser adquirida por mutação genética, de forma dominante ou recessiva, possibilitando a manifestações homocigóticas ou heterocigóticas, sendo a primeira de prognóstico mais reservado. As alterações relacionadas a essa condição podem levar a disfunções, ocasionando hemólise, policitemia, cianose ou falcização das hemácias¹⁴.

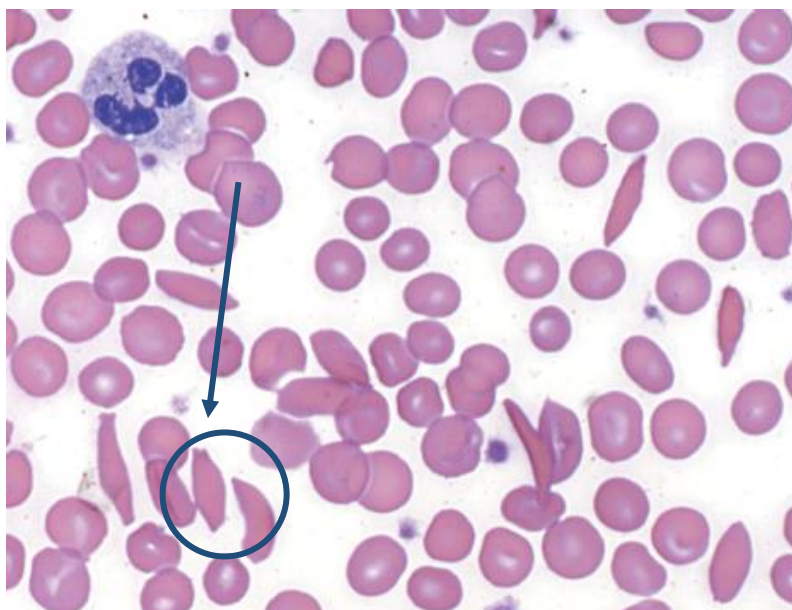
As hemoglobinas humanas, com padrão de herança definido geneticamente, apresentam variações polimórficas características dentro da população, na dependência dos grupos raciais que formam cada região. Quando há anomalias, variantes hemoglobínicas como anemia falciforme e ainda as talassemias podem emergir como condições anêmicas e hemolíticas¹⁵.

A hemoglobinopatia mais frequente em nosso meio é a Anemia Falciforme (AF), podendo ser entendida como uma anomalia genética de caráter hereditário, no qual acarreta disfunção na hemoglobina S (HbS) dos eritrócitos. Os portadores dessa condição são homocigotos (herdam pares de alelos iguais) e devido a uma mutação pontual nas bases nitrogenadas timina → adenina, de uma alteração na cadeia beta globina das hemácias. Essa modificação a nível de Hb é caracterizada pela troca do ácido glutâmico por valina (aminoácidos localizados no cromossomo onze no sexto códon) das cadeias globínicas, afetando assim, diretamente na formação e na eficiência das hemoglobinas do organismo.

Tal alteração genética leva ao desenvolvimento de polimerização e falcização, processo em que muda o formato das hemácias (ganham um formato de foice) e podem levar ao bloqueio da passagem do fluxo sanguíneo¹⁴.

A mutação causadora da anemia falciforme gera uma dobra anormal na hemoglobina, tendo tendência a se polimerizar e agregar em situação de hipóxia, transformando os glóbulos vermelhos em células com um formato de foice e mais rígidas, conforme a figura 3. Essas células inflexíveis tendem a grudar umas nas outras e nas paredes dos vasos sanguíneos, causando vaso-oclusão, o que diminui o fluxo sanguíneo, desfavorecendo o fornecimento de oxigênio aos tecidos¹².

Figura 3: Esfregaço sanguíneo de paciente com anemia falciforme demonstrando a presença de drepanócitos.



Fonte: KASVI, 2019.

O diagnóstico laboratorial da anemia falciforme é feito através de eletroforese de hemoglobina, focalização isoelétrica ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As cadeias β globínicas são detectáveis em fase precoce da vida fetal, a partir da 10^a a 12^a semana de gravidez, o que possibilitaria o diagnóstico pré-natal da anemia falciforme³. A doença falciforme manifesta-se em indivíduos homozigóticos para a hemoglobina S e em combinação com outras hemoglobinas anormais, o que pode resultar em doença falciforme com diversos graus de gravidade: coherança com um gene da

hemoglobina C (SC), um gene da β^+ talassemia (SAF), ou um gene da β^0 talassemia (SF), em ordem decrescente de frequência¹⁷.

O tratamento conservador da anemia falciforme é feito através transfusões de sangue, terapias preventivas com profilaxia com penicilina e vacinação pneumocócica, terapia com hidroxiureia, que aumenta os níveis de hemoglobina fetal, diminuindo a polimerização da hemoglobina S e o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas de doadores saudáveis. Embora o transplante de células-tronco hematopoiéticas seja uma estratégia de tratamento promissora com uma taxa de sucesso de 85 a 90%, esse método não está disponível para todos os pacientes devido à rara disponibilidade de doadores compatíveis e aos efeitos colaterais associados ao transplante¹⁸.

As ferramentas de edição genética criam possibilidades para a cura de doenças monogênicas, como a anemia falciforme, através de diversos mecanismos diferentes. A reprogramação gênica de células diferenciadas através da CRISPR Cas-9 permitiu a obtenção de células-tronco pluripotentes induzidas (induced pluripotent stem cells, iPSCs) que apresentam hemoglobina fetal e não indicam risco de rejeição imunológica, o que apresenta uma vantagem adicional²⁴.

Pode-se corrigir a mutação subjacente nas células-tronco hematopoiéticas derivadas do paciente (HSPC, hematopoietic stem and progenitor cells) e/ou induzir a expressão da hemoglobina fetal para contornar a falência das hemácias do adulto. As células hematopoiéticas derivadas do paciente possuem um alto potencial de longevidade e capacidade de autorrenovação, por isso são alvo em transferências gênicas. Nessas situações, o objetivo é gerar uma diferenciação das mesmas de modo a proporcionar o fenótipo desejado, que no caso seria a síntese de hemoglobina fetal²⁵.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta é uma pesquisa sistemática do tipo integrativa de estudos que abordam a temática da aplicabilidade clínica da técnica de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme.

O desenvolvimento da pesquisa se dará pela busca dos artigos nas seguintes plataformas: Biblioteca Nacional de Medicina (Pubmed); Scientific Electronic Library Online (Scielo); Biblioteca Virtual em Saúde (BVS).

Para coleta de dados, os descritores selecionados serão: Anemia Falciforme, terapia genética e CRISPR CAS-9.

Como critérios de inclusão, foram selecionados artigos publicados entre o ano de 2002 a 2022 que abordam a aplicabilidade e a variabilidade da terapia genética CRISPR-Cas9 além de estudos voltados a anemia falciforme. A sequência de pesquisa é originada a partir dos descritores com os operadores booleanos AND. No que se refere a exclusões, não são considerados artigos publicados fora do período selecionado, artigos que fogem do tema, nem estudos incompletos.

O presente estudo de caráter exploratório obedecerá a todas as recomendações dispostas por esse código, assim como também as estabelecidas pela Resolução CNS 466/2012. Além disso, por não se tratar de pesquisa em seres humanos, o trabalho não necessitará ser submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP).

Quanto aos fins, espera-se que ao concluirmos a pesquisa seja possível identificar a importância da tecnologia na vida das pessoas quanto a nova técnica CRISPR-Cas9.

Em última instância, pretende-se contribuir para a síntese do conhecimento científico produzido sobre esta temática, contribuindo para identificação das lacunas nas áreas de estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 25 artigos que contemplaram o objetivo da pesquisa. No quadro abaixo se encontram os artigos e sua breve descrição.

Quadro 1: Descrição dos artigos selecionados para a pesquisa.

Autor, Ano	Título	Tipo de Estudo	Objetivos	Resultados	Conclusão
Arend, 2016	O Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia	Estudo transversal	Destacar o uso da terapia genética de CRISPR em doenças cardiovasculares.	Edição para ativação de genes de maneira a estimular funções relacionadas, por exemplo, à sobrevivência de cardiomiócitos no pós-infarto, indução de homing (migração, proliferação e diferenciação de células-tronco), aumento do nível de citocinas anti-inflamatórias e de proteínas inibidoras de metaloproteinases, além de outros mecanismos, pode vir a ser explorada no âmbito das DCV.	São realizadas aplicações de terapias alternativas, como a celular e gênica, para tratamento de DCV, criando o primeiro estudo clínico do país para promoção de angiogênese, por expressão exógena em pacientes portadores de angina refratária, mostrando que a técnica é segura e melhora a fração de ejeção ventricular, com ênfase cardiomiopatia dilatada (CMD) e cardiopatias isquêmicas.
Bernardes, 2021	A utilização da técnica de CRISPR-CAS9 na Terapia Gênica	Revisão integrativa	Apontar progresso da terapia gênica e o impacto positivo de uma nova técnica inovadora capaz de trazer grandes benefícios devido sua simplicidade em trabalhar numa larga escala de genomas, facilitando prevenção de doenças genéticas inatas ou adquiridas.	A ferramenta de edição genética que mais se destaca é a CRISPR-Cas9 cujo desenvolvimento até os dias de hoje vem trazendo enormes benefícios de valor científico no campo terapêutico, os sucessos pontuais já solidificam a viabilidade de tratamentos.	Apesar da sua simplicidade e eficiência sendo cada dia mais e mais comprovadas, os riscos do mau uso são iminentes e não podem ser ignorados pelo simples entusiasmo científico de uma “cura para tudo”. Não há como ignorar o iminente risco de ocorrer um desbalanceamento sem precedentes na sociedade caso haja desregulamentação ou acesso ilimitado às tecnologias da edição de genes.
Bolotin, 2005	Clustered regularly	Estudo in silico	Revelar os genes associados a	Dois genes franqueadores, str0657	Existe uma correlação entre o número de espaçadores em

	interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin		estruturas CRISPR em muitas espécies bacterianas.	e str0659, que denominamos aqui cas5 e cas6, respectivamente, têm homólogos que estão agrupados em numerosas espécies bacterianas, pertencentes a grupos filogenéticos amplamente divergentes.	um locus e a resistência de <i>S. thermophilus</i> à infecção por fagos, sugerindo que os CRISPRs podem ter um papel biológico diferente, protegendo as bactérias contra o ataque de fagos. Um mecanismo possível para essa proteção ser medida é através da inibição do RNA anti-sentido da expressão do gene do fago.
Golçalves, 2017	Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas	Revisão integrativa	Otimização dos veículos de entrega (vetores) que, em sua maioria, são plasmídeos, nanoestruturados ou vírus.	Sucessos pontuais já solidificam a viabilidade de tratamentos por terapia gênica na prática clínica, sendo uma forma alternativa para pacientes com doenças congênitas ou desordens monogênicas e câncer.	A terapia gênica, assim como qualquer nova tecnologia necessita de mais estudos pré-clínicos elucidatórios. Futuramente, há a promessa da aplicação destas técnicas em vários campos da medicina e um maior percentual de estudos clínicos.
Jansen, 2002	Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes	Estudo in silico	Estudo de uma nova família de sequências de DNA repetitivas que está presente entre os dois domínios dos procariontes (Archaea e Bacteria), mas ausente em eucariotes ou vírus.	Quatro genes associados a CRISPR (cas) foram identificados em procariontes contendo CRISPR que estavam ausentes de procariontes negativos. Os genes cas foram invariavelmente localizados adjacentes a um locus CRISPR, indicando que têm uma relação funcional.	A coerência espacial dos genes CRISPR e cas pode estimular novas pesquisas sobre a gênese e o papel biológico dessas repetições e genes.
Kasvi, 2019	Como é realizado a técnica de esfregaço sanguíneo?	Revisão integrativa	Explicar a técnica de esfregaço de sangue, desde como é realizada até sua importância para exames.	Foi descrito a função do esfregaço de sangue, para que serve, como realizar a técnica e como é feita a coloração da lâmina.	O esfregaço pode fornecer informações importantes sobre o paciente, auxiliando o médico no diagnóstico de doenças relacionadas ao sangue.
Davis, 2018	Engineering globin gene expression	Revisão integrativa	Descrever e comparar os atuais procedimentos de engenharia genética que podem ser transformados em terapias seguras e eficientes para hemoglobinopatias	A injeção de nanopartículas contendo os PNAs e DNA doador terapêutico mais fator de células-tronco (SCF) em camundongos talassêmicos reduziu o fenótipo da doença e	Resultados promissores foram obtidos em camundongos e primatas usando um inibidor de LSD1. Além disso, estudos recentes implicaram o eIF2 α (HRI) regulado por heme na repressão da expressão

			em um futuro próximo.	resultou em 7% de correção do gene da β -globina em HSCs.	gênica da γ -globina.
Mataveia, 2021	Aplicabilidade clínica da técnica CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme: uma revisão integrativa	Revisão integrativa	Realizar uma revisão sistemática do tipo integrativa dos estudos que abordam a aplicabilidade clínica da técnica de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme.	Melhorias precisam ser feitas tanto na área de pesquisa quanto na área da assistência à saúde aos pacientes com anemia falciforme. É necessário educar a população quanto aos fundamentos da edição gênica, de forma a quebrar os tabus quanto à temática	O único ensaio clínico realizado em humanos com resultados publicados, aponta que os pacientes submetidos à intervenção com CRISPR-Cas9 apresentaram altos níveis de expressão de hemoglobina adulta e fetal, o que reduziu a morbidade associada à doença.
Mojica, 2005	Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements	Revisão integrativa	Realizar uma busca sistemática por identidades de espaçadores, encontrando semelhanças significativas com uma variedade de moléculas de DNA.	Cerca de 65% dos homólogos espaçadores encontrado correspondem a bacteriófagos ou plasmídeos conjugativos, e os 35% restantes a sequências cromossômicas não diretamente relacionadas ao DNA estranho.	O controle da mobilidade e manutenção de elementos genéticos extra cromossômicos pode ser uma tarefa relevante dos loci CRISPR, mas as homologias encontradas com sequências cromossômicas não relacionadas ao DNA estranho indicam que o CRISPR pode ser constituinte de um sistema regulatório mais versátil.
Nascimento, 2022	Hemoglobina	Revisão integrativa	Relatar a importância/função da hemoglobina e sua estrutura globular na anemia falciforme.	Indica a capacidade do sangue de transportar oxigênio para os tecidos, isto é, quando o corpo não recebe oxigênio suficiente é sinal que a hemoglobina está baixa e a pessoa possivelmente adquiriu a anemia, o que causa fadiga e fraqueza.	A anemia falciforme diminuiu as taxas de hemoglobina no sangue pela distribuição precoce das hemácias, doença causada por um defeito genético e hereditário que resulta em uma estrutura anormal da molécula de hemoglobina.
TASAN, I.; JAIN, S.; ZHAO, H, 2016	Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease.	Revisão integrativa	Estratégias no campo da edição do genoma para tratar SCD empregando nucleases programáveis: nucleases de dedo de zinco, nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição e endonucleases guiadas por RNA, comumente conhecidas como clustered regularmente	Devido aos graves efeitos colaterais dos vetores virais, conforme mencionado na introdução, seria crucial entregar as nucleases programáveis por métodos não virais para uso clínico.	A inserção de praticamente qualquer sequência artificial desejada no genoma é uma aplicação relevante para o tratamento de distúrbios genéticos. Por ser uma doença monogênica, a DF tem alto potencial para ser tratada por nucleases programáveis.

			repetições palindrômicas curtas interespaçadas (CRISPR) - proteína 9 associada a CRISPR (CRISPR/Cas9).		
Broedrs, 2020	Sharpening the molecular scissors: advances in gene-editing technology.	Revisão integrativa	Apresentar uma visão geral desses desenvolvimentos recentes, com foco na provável implementação clínica de estratégias de edição de genes, bem como discutir a eficácia e entrega que são relevantes para a implementação clínica.	A iteração contínua do sistema CRISPR/Cas em versões com especificidade e eficácia aprimoradas é uma grande promessa para uma ampla gama de aplicações clínicas.	A estratégia de entrega mais apropriada para a intervenção de edição genética dependerá da abordagem de direcionamento celular mais adequada para o tratamento de uma doença específica.
Hu, 2016	CRISPR/Cas9 system and its applications in human hematopoietic cells.	Revisão integrativa	Revisar brevemente a descoberta do sistema CRISPR-Cas9 e, em seguida, focarei nas aplicações do CRISPR-Cas9 na edição do genoma em células hematopoiéticas humanas.	O domínio de ligação ao DNA em TALENs são efetores TAL construídos a partir de matrizes de 33 a 35 módulos de aminoácidos. Cada módulo reconhece um único nucleotídeo. Com diferentes combinações dos módulos, os investigadores podem direcionar quase todos os genes em uma ampla gama de tipos de células e organismos.	Nos últimos anos, o desenvolvimento de várias tecnologias de edição de genes, ZFN, TALEN e CRISPR-Cas9, promoveu muito a pesquisa em biologia e os ensaios clínicos para terapia genética. Entre essas três biotecnologias, a CRISPR-Cas9 é a mais recente no campo, mas recebeu grande atenção e aplicações.
Wienert, 2018	Reactivating Fetal Globin for β -Hemoglobinopathies	Revisão integrativa	A pesquisa tem se concentrado na reativação terapêutica dos <i>genes</i> γ -globina fetais.	As células-tronco hematopoiéticas (HSCs) são prontamente acessíveis, tornando as hemoglobinopatias um dos alvos mais promissores para a terapia gênica autóloga ex vivo.	A base molecular de HPFH levou a uma apreciação dos papéis de BCL11A e ZBTB7A como principais repressores da <i>globina</i> fetal que reprimem diretamente a γ -globina através do promotor.
Nuzzo, 2014	Anemia falciforme e infecções	Revisão integrativa	Relatar a alta prevalência da anemia falciforme em nosso meio e a elevada morbimortalidade por infecções associadas a esta condição.	Foram abordados alguns tópicos sobre as infecções mais frequentemente observadas no paciente com anemia falciforme, assim como a profilaxia medicamentosa das	Visa fornecer a comunidade pediátrica informações sobre o binômio anemia falciforme e infecções, a fim de minimizar suas complicações nesta comunidade específica.

				imunizações disporeis, além de informações gerais a respeito da doença falciforme.	
Pereira, 2016	Introdução à técnica CRISPR	Revisão integrativa	Obtenção da técnica de biologia molecular que tem como função editar (trocar, remover e adicionar) uma sequência de DNA de qualquer organismo vivo.	As aplicações da CRISPR CAS 9 são variadas, compreendem diversos campos como agronegócio, pesquisa básica, indústria e medicina, onde tais ferramentas genéticas permitem a possibilidade e cura para doenças monogênicas, como a anemia falciforme.	Estudos avaliaram e comprovaram a eficácia da terapia genética da CRISPR no tratamento da anemia falciforme mediante a suas vantagens e desvantagens que são extremamente importantes de serem realizados em toda comunidade científica.
Sganzerla, 2020	Educação de humanos por meio da técnica CRISPR CAS 9: entusiasmo científico e inquietações éticas	Estudo experimental	Analisar a ética científica em torno da técnica crispr cas-9 e a necessidade de fazer ciência com a consciência, prudência e responsabilidade.	Pode-se dizer que, por meio dessa técnica, é possível atuar diretamente no gene defeituoso, como um míssil teleguiado, atingindo as células-alvo.	A imediata aplicação clínica de edição do genoma será em células somáticas humanas para o tratamento ou prevenção de doenças ou deficiências.
Simões, 2010	Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoiéticas : comitê de hemoglobinopatias	Revisão integrativa	Definir os riscos e os benefícios da terapêutica e caracterizar a história natural após o transplante de células-tronco hematopoiéticas.	A doença falciforme é fenotipicamente muito variável sendo que a existência de potências fatores preditivos de evolução da doença poderiam guiar as decisões terapêuticas.	O transplante de células-tronco hematopoiéticas allogenético constitui-se na única opção curativa em pacientes com hemoglobinopatias.
Ernst, 2020	Gene Editing Enters the Clinic for the Treatment of Human Disease	Revisão integrativa	A edição de genes in vivo mediada por AAV é aplicada para explorar o fígado para produção sistêmica de proteínas terapêuticas em hemofilia e mucopolissacaridoses, e no olho para restaurar o splicing do gene CEP920 na amaurose congênita de Leber.	Embora os desenvolvimentos científicos no campo da edição de genes continuem com uma velocidade estonteante, será importante fornecer educação no campo e monitorar e regular de perto os desenvolvimentos clínicos.	A consideração cuidadosa dos aspectos de segurança e a educação das partes interessadas serão essenciais para uma implementação bem-sucedida da tecnologia de edição de genes na clínica.
Torres, 2018	Células-tronco pluripotentes induzidas a edição de gene: avanços tecnológicos da	Estudo experimental	Revisar as principais questões metodológicas relativas às tecnologias das iPSCs e do Crispr-cas 9.	O avanço científico representado pelas iPSCs resulta do acúmulo de conhecimento ao longo de cinco décadas de pesquisa.	As tecnologias de iPSCs e Crispr-cas 9 permitem a obtenção de modelos celulares de edição gênica específicos ao paciente, tornando-se promissoras na pesquisa sobre novas

pesquisa em medicina regenerativa e terapia gênica				abordagens terapêuticas em medicina regenerativa e terapia gênica.
--	--	--	--	--

Quando se desenhou o esquema desta revisão de literatura, esperava-se encontrar estudos empíricos, do tipo ensaios clínicos, nos quais tivesse havido intervenção com a técnica de CRISPR-Cas9 em pacientes com anemia falciforme, e que permitissem averiguar e determinar manifestações clínicas da doença pós intervenção, como infartos vaso-occlusivos, dactilite, asplenia viável, bem como a qualidade de vida e as taxas de morbimortalidade. Contudo, nunca foram encontrados estudos clínicos conduzidos com CRISPR-Cas9 e anemia falciforme publicados até a data desta revisão. Identificou-se vários estudos *in vitro* e pré-clínicos, desenvolvidos em modelos animais. O fato de até então não existirem resultados de ensaios clínicos utilizando-se CRISPR-Cas9 para terapêutica da anemia falciforme, reforça o quão negligenciada esta doença é, e que precisa da atenção de pesquisadores e não só, tendo em conta inclusive que a maioria das pessoas afetadas são africanas e afro-americanas.

Na maioria dos estudos do tipo “revisão narrativa” selecionados nesta revisão sistemática (2; 10; 21; 22; 23) foi demonstrado que, *in vitro*, a técnica de CRISPR-Cas9 é capaz de corrigir a mutação causadora da anemia falciforme em HSPCs. Com a correção *in vitro*, os níveis de expressão de hemoglobina fetal aumentaram; porém, *in vivo*, os desafios são: evitar toxicidade, evitar efeitos off-target (mutações fora do alvo) e garantir a eficiência do transplante. Apesar destes desafios a serem superados, a partir da análise dos artigos selecionados, apreende-se que a técnica de CRISPR-Cas9 tem grande potencial para uso clínico no tratamento da anemia falciforme.

Foram localizados três ensaios clínicos em condução no momento utilizando CRISPR-Cas9 em pacientes com hemoglobinopatias: dois em pacientes com beta-talassemia e um terceiro em pacientes com anemia falciforme. O estudo sob responsabilidade da companhia “Allife Medical Science and Technology”, sobre beta-talassemia, ainda não teve seus resultados divulgados. Os dois estudos sob responsabilidade da indústria farmacêutica que são sobre beta-talassemia e anemia falciforme, respectivamente, tiveram seus resultados iniciais publicados conjuntamente em uma comunicação breve (brief report) no “New England Journal of Medicine” em 05 de dezembro de 2020²⁰. Essa comunicação foi localizada durante a discussão dos resultados

desta revisão, embora não estivesse incluída no MEDLINE/PubMed quando a identificação dos artigos foi conduzida, em 15 de setembro de 2022.

A análise citada acima ⁽²⁰⁾ trata-se do primeiro que apresenta resultados clínicos do uso da CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme, representando um avanço enorme tanto para medicina como para pesquisa. Este estudo tinha como objetivo reduzir a expressão de BCL11A nas células dos eritrócitos, reparar a síntese de gama-globina e reativar a produção de hemoglobina fetal. Para o primeiro ensaio clínico os critérios de inclusão foram: idade entre 18-35 anos, ter sido diagnosticado com anemia falciforme e ter um histórico de pelo menos 2-3 infartos vaso-oclusivos por ano. Neste ensaio apenas 1 paciente foi submetida a infusão intravenosa de CTX001 – uma terapia autóloga ex vivo de CRISPR-Cas9 na qual células-tronco hematopoiéticas derivadas do paciente são geneticamente modificadas para produzirem altos níveis de hemoglobina fetal nos eritrócitos. Antes da infusão a paciente foi tratada com bussulfano, um medicamento antineoplásico capaz de alquilar o DNA. Após a infusão, foram retiradas as células da medula óssea para análise da quantidade de DNA que tivesse sido editado. Observou-se que antes da infusão a paciente apresentava 9,1% de hemoglobina fetal e após 15 meses passou a ter 43,2%. Quanto a hemoglobina S antes da infusão constituía 74,1% e após 15 meses passou para 52,3%. A paciente manifestou alguns sintomas considerados graves que foram pneumonia na presença de neutropenia, colelitíase e dor abdominal; e um sintoma considerado não grave que foi linfopenia. Mais 2 pacientes com anemia falciforme foram submetidos ao ensaio clínico e acompanhados por 3 meses e os resultados não diferem dos apresentados na paciente do primeiro ensaio clínico. Dois pacientes foram removidos em meio ao ensaio clínico por decisão do médico responsável devido a complicações clínicas, 1 paciente foi excluído devido a dificuldades de comunicação com o mesmo dificultando o acompanhamento e 1 paciente desistiu após assinar o contrato. Portanto, no intervalo de 3-15 meses os 3 pacientes demonstraram um aumento nos níveis de hemoglobina do adulto e de hemoglobina fetal e não apresentaram crises vaso-oclusivas, o que é um efeito bastante gratificante, tratando-se de uma das manifestações da doença que pode decorrer em derrames, síndrome torácica aguda, necrose papilar renal, auto-esplenectomia, úlceras nas pernas, priapismo, necrose óssea asséptica e dano visual. Conforme os autores, ainda é um desafio o uso de células-tronco derivadas do próprio paciente para corrigir a mutação ⁽²⁰⁾. Apesar de se ter ainda pouca informação sobre a pesquisa, os resultados obtidos e divulgados demonstram que há sim potencial para uso da

CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme. Esta análise não faz a comparação entre CRISPR-Cas9 e os tratamentos convencionais da anemia falciforme como por exemplo a hidroxiureia que aumenta os níveis da síntese de hemoglobina fetal, de modo a se avaliar a capacidade de ambos tratamentos e qual deles proporciona maior síntese de hemoglobina fetal.

Dos artigos selecionados finais, três deles são estudos qualitativos (¹⁹; ²⁵; ²⁵) focados em pacientes, familiares, investigadores e profissionais de saúde, nos quais se discutiu a implementação da CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme e buscou-se obter as perspectivas do público alvo sobre a temática. Os resultados destes estudos apontam que tanto pacientes como familiares, investigadores e profissionais de saúde se predispõem a participar de ensaios clínicos, porém não possuem conhecimento sobre a temática: os procedimentos, as implicações e efeitos colaterais pós-intervenção. Com o rápido avanço da CRISPR-Cas9 e sua ampla atuação, os autores revisados expressam sua preocupação sobre a possível falta de regularização ética do uso desta tecnologia em seres humanos. Questões como avaliação de risco, segurança do procedimento e consciência das implicações precisam ser discutidas. Portanto, há uma necessidade de se criar programas educacionais destinados a população em geral para abordar esta temática, facilitando dessa forma a adesão da mesma em futuros ensaios clínicos.

CONCLUSÃO

Os estudos in vivo (em humanos e modelos animais) e in vitro desenvolvidos até então evidenciam que existe grande potencial no uso desta técnica para o tratamento da anemia falciforme. Diante dos estudos e pesquisas em humanos com resultados publicados, expõe que os pacientes submetidos à intervenção com CRISPR Cas-9 apresentaram altos níveis de expressão de hemoglobina adulta e fetal, o que reduziu a morbidade associada à doença, visto que já se tem mais de sete pessoas curadas da anomalia genética através do uso da edição genética com CRISPR Cas-9 no EUA.

Apesar da anemia falciforme ser uma doença que gera grandes impactos e sintomas severos em seus portadores, é notável que a patologia descrita não impulsionou o suficiente as instituições médicas governamentais para que contribuam e tomem medidas para incentivar pesquisadores e estudiosos a respeito do tema, visto que se tem a CRISPR Cas-9 como grande ferramenta de edição genômica com baixo custo e fácil acesso, com contribuição significativa e comprovada em relação a anemia falciforme.

REFERÊNCIAS

1. JANSEN R, EMBDEN JDV, GAASTRA W, SCHOOLS LM. Identificação de genes que estão associados a repetições de DNA em procariontes. *Mol Microbiol* [Internet]. 2002 [cited 2022 Sep 20];43:1565-1575. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11952905/>.
2. MATAVEIA ERF. Aplicabilidade clínica da técnica CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) no tratamento da anemia falciforme: uma revisão integrativa. Universidade Federal de São Carlos [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 13];:1-62. Available from: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/13669?show=full#:~:text=Conclus%C3%B5es%3A%20A%20tecnologia%20de%20CRISPR,em%20rela%C3%A7%C3%A3o%20aos%20ensaios%20cl%C3%ADnicos>
3. VASCONCELOS MJV, FIGUEIREDO JEF. Tecnologia CRISPR-Cas para edição genômica. *Embrapa Milho e Sorgo* [Internet]. 2015 [cited 2022 May 3];:1-37. Available from: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1039785/tecnologia-crispr-cas-para-edicao-genomica>
4. AREND MC, PEREIRA JO, MARKOSKI MM. O Sistema CRISPR/Cas9 e a Possibilidade de Edição Genômica para a Cardiologia. *Ponto de Vista* [Internet]. 2017 [cited 2022 Apr 23];01(108):81-3. DOI 10.5935/abc.20160200. Available from: <https://www.scielo.br/j/abc/a/S7rhCRLnYjVmCDfTrdSYTDs/?lang=pt>
5. BERNARDES VA, RODRIGUES GM, CABRAL MRL, NERES LLFG. A utilização da técnica de CRISPR-CAS9 na Terapia Gênica. *Research, Society and Development* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 14];10(14):1-7. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/21778/19358/261866#:~:text=A%20t%C3%A9cnica%20CRISPR%2DCas9%20tem,no%20DNA%20da%20pr%C3%B3pria%20bact%C3%A9ria>.
6. BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, EHRLICH SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* [Internet]. 2005 [cited 2022 May 18];151:2551–561. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16079334/>.
7. FURTADO RN. Edição genética: riscos e benefícios da modificação do DNA humano. *Revista Bioética* [Internet]. 2019 [cited 2022 Apr 30];27(02):223-33. Available from: <https://www.scielo.br/j/bioet/a/jFptVvKR7RJHWXwmsKpZFrh/?lang=pt>
8. SGANZERLA A, PESSINI L. Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas. *SAÚDE DEBATE* [Internet]. 2020 [cited 2022 May 25];44(125):527-40. Available from: <https://www.scielo.br/j/sdeb/a/8z84LrTTPq6Xzr77D3jtWDG/?lang=pt>

9. RUSSA MFL, QI LS. The New State of the Art: Cas9 for Gene Activation and Repression. American Society for Microbiology [Internet]. 2015 [cited 2022 Apr 14];35(15):3800-809. Available from: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/MCB.00512-15>
10. GONÇALVES GAR, PAIVA RMA. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. REVENDO CIÊNCIAS BÁSICAS [Internet]. 2017 [cited 2022 May 5];15(3):379-75. Available from: <https://www.scielo.br/j/eins/a/cPw3g6fGY8srqk5hs83dDKR/?format=pdf&lang=pt>
11. ZHANG F, WEN Y, GUO X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. Human Molecular Genetics [Internet]. 2014 [cited 2022 May 3];23:40-6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24651067/>.
12. TURNPENNY P, ELLARD S. Emery's Genética Médica. [place unknown]: Elsevier; 2017. 408 p.
13. Hemoglobina [Internet]. [place unknown]: Priscila Soares do Nascimento; 2017. Hemoglobina; [cited 2022 Apr 6]; Available from: <https://www.infoescola.com/sangue/hemoglobina/>.
14. EMILIANO BRB, PEDRA HTS, RODRIGUES JA, RESENDE R. PERSPECTIVAS DA TERAPIA GÊNICA NO TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME. CENTRO UNIVERSITÁRIO UNA BETIM [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 14];1-39. Available from: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/bitstream/ANIMA/20303/1/TCC%20ANEMIA%20FALCIFORME%2014.12.2021%20-%20VERS%C3%83O%20CORRIGIDA%20%281%29.pdf>
15. LEONELI GG, IMPERIAL RE, MRCHI-SALVADOR DP, NAOUM PC, BONINI-DOMINGOS CR. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. Rev.bras.hematol.hemoter [Internet]. 2000 [cited 2022 May 4];22(3):396-403. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/sGGMNzvFqp9kJfscYPVNPYB/abstract/?lang=pt#>
16. Hematologia: Como é realizada a técnica de esfregaço de sangue? [Internet]. KASVI: KASVI; 2019. APLICAÇÃO DO ESFREGAÇO DE SANGUE: APLICAÇÃO DO ESFREGAÇO DE SANGUE; [cited 2022 May 12]; Available from: <https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/>.
17. DI NUZZO DVP, SONSECA SF. Anemia falciforme e infecções. Jornal de Pediatria [Internet]. 2004 [cited 2022 Jun 11];80(5):347-54. Available from: <https://www.scielo.br/j/jped/a/zRptkT8xVg3d3mzkZ8DKpkh/?lang=pt&format=pdf>
18. SIMOES BP, PIERONI F, BARROS GMN, MACHADO CL, CANÇADO RD, AGULO I, VOLTARELLI JC, SALVINO MA. Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias. Rev. Bras. Hematol. Hemoter [Internet]. 2010 [cited 2022 Jun 8];32(1):46-53. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/NSQMNK9ykwX8ZshwHSvvtDt/?format=pdf&lang=pt>

19. DENISE S, HOLLISTER BM, ABDALLAH KE, PERSAUD A, HULL SC, BONHAM VL. The Meaning of Informed Consent: Genome Editing Clinical Trials for Sickle Cell Disease. *AJOB Empirical Bioethics* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 17];11(4):195-207. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33044907/>.
20. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia [Internet]. *The New England journal of medicine: The New England journal of medicine*; 2020. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia; [cited 2022 Apr 14]; Available from: <https://crisprmedicineneeds.com/company/card/allife-medical-science-and-technology/>.
21. HU X. CRISPR/Cas9 system and its applications in human hematopoietic cells. *Blood Cells Mol Dis* [Internet]. 2016 [cited 2022 May 5];62:6-12. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S107997961630136X>
22. DAVIS R, GURUMURTHY A, HOSSAIN MA, BURGERT J. Engineering globin gene expression. *Mol Ther Methods Clin Dev* [Internet]. 2018 [cited 2022 May 11];12:102-10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30603654/>.
23. TASAN I, JAIN S, JHAO H. Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease. *Human genetics* [Internet]. 2016 [cited 2022 May 11];135(9):1011-028. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5002234/>.
24. HOLLISTER BM, GATTER MC, ABDALLAH KE, ARMSBY AJ, BUSCETTA AJ, BYEON YJJ, COOPER KE, DENISE S, PERSAUD A, ORMOND KE, BONHAM EL. Perspectives of Sickle Cell Disease Stakeholders on Heritable Genome Editing. *The CRISPR Journal* [Internet]. 2019 [cited 2022 May 18];2(6):441-49. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/crispr.2019.0034>
25. TORRES CBB, PESSOA WS. Células-tronco pluripotentes induzidas e edição de gene: avanços tecnológicos da pesquisa em medicina regenerativa e terapia gênica. *Jorn. Inter. Bioc* [Internet]. 2018 [cited 2022 Aug 17];3(1):52-6. Available from: <https://revistas.ufpi.br/index.php/jibi/article/view/52/4217>