

**Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Curso de Graduação em Biotecnologia**

**Elly Raquelina Flor Mataveia**

**Aplicabilidade clínica da técnica CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly  
Interspaced Short Palindromic Repeats*) no tratamento da anemia falciforme:  
uma revisão integrativa**

**São Carlos / 2021**

**Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Curso de Graduação em Biotecnologia**

**Aplicabilidade clínica da técnica CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) no tratamento da anemia falciforme:  
uma revisão integrativa**

**Elly Raquelina Flor Mataveia**

**Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Biotecnologia da Universidade  
Federal de São Carlos para a obtenção  
do título de Bacharel em Biotecnologia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Débora  
Gusmão Melo**

**São Carlos / 2021**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a toda comunidade afetada pela anemia falciforme, particularmente à Consciência Falciforme, uma associação moçambicana sem fins lucrativos, composta por pessoas diagnosticadas pela doença, que visa educar a população e dar assistência tanto aos doentes como às suas famílias.

Em especial, dedico este trabalho à Mei Lee, minha irmã da vida, que foi diagnosticada com esta doença. Faço esta dedicatória com esperança que avanços sejam feitos no sentido de se encontrar uma cura permitindo melhor qualidade de vida a todos os afetados.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por tudo que é e tem feito por mim e pelos meus; por permitir que eu embarcasse neste desafio acadêmico e por sempre ter me acompanhado.

Aos meus pais pelo sacrifício, apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos.

Aos meus amigos no Brasil, obrigada por serem minha família quando mais precisei e por me apoiarem sempre que puderam.

À Professora Doutora Débora Gusmão Melo por ter aceito entrar neste desafio comigo, por partilhar seu muito saber, pela sua didática impecável, mas acima de tudo, pela sua paciência comigo.

“Ser jovem e não ser revolucionário é uma  
contradição genética.”

*Che Guevara (1928-1967)*

## Resumo

**Introdução e objetivo:** Anemia falciforme é a hemoglobinopatia mais comum na espécie humana e apresenta alta morbimortalidade. É causada pela mutação pontual, uma substituição A-T (GAG→GTG) no primeiro éxon do gene  $\beta$ -globina, que determina a substituição de glutamato por valina na posição 6 da cadeia proteica, originando uma variante estrutural da hemoglobina (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 amenizam as complicações da doença. Nesse contexto, a técnica de CRISPR-Cas9, que permite a edição gênica diretamente no DNA, surge como uma solução que possibilita corrigir a mutação e/ou aumentar a expressão de hemoglobina fetal. Esta revisão sistemática integrativa pretendeu responder a seguinte pergunta: qual a aplicabilidade clínica da técnica de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme? **Metodologia:** Foram selecionados estudos teóricos ou empíricos, primários ou secundários, desenvolvidos com metodologia qualitativa, quantitativa ou mista, publicados até 15 de novembro de 2020, em língua inglesa, que retratam a temática referente a esta revisão. A pesquisa foi realizada em três bases de dados a partir de descritores escolhidos pelo “Medical Subject Headings”. **Resultados:** Inicialmente foram identificados 79 estudos primários. Com a exclusão dos artigos repetidos em diferentes bases de dados, permaneceram 75 estudos que foram avaliados a partir dos seus títulos e resumos, sendo então selecionados 28 artigos. Esses 28 artigos foram lidos na íntegra, tendo sido excluídos 10 artigos. Assim, foram selecionados 18 artigos no final desta revisão. Não foram identificados estudos clínicos. Observa-se que 12 artigos são revisões narrativas de estudos in vitro ou pré-clínicos que discutem a aplicabilidade clínica; 4 estudos são estudos qualitativos ou descritivos sobre a temática; e 2 estudos são artigos de opinião. Os estudos selecionados mostraram que in vivo (em modelos animais) e in vitro, a técnica de CRISPR-Cas9 é capaz de corrigir a mutação causadora da anemia falciforme e/ou aumentar os níveis de expressão de hemoglobina fetal. Porém, in vivo, os desafios são evitar toxicidade, evitar mutações fora do alvo e garantir a eficiência do transplante. Tanto pacientes como familiares, investigadores e profissionais de saúde se dispõem a participar de ensaios clínicos envolvendo CRISPR-Cas9, porém não possuem conhecimento sobre a temática. **Conclusões:** A tecnologia de CRISPR-Cas9 tem grande potencial para uso clínico no tratamento da anemia falciforme. É necessário educar a população quanto aos fundamentos da edição gênica, facilitando dessa forma a aceitação e a disponibilidade da mesma em relação aos ensaios clínicos. Uma preocupação adicional é a regularização ética do uso desta tecnologia em seres humanos.

**Palavras-chave:** CRISPR, Proteína 9 Associada à CRISPR, Anemia falciforme, Revisão integrativa.

## **Abstract**

**Introduction and objective:** Sickle cell disease is the most common hemoglobinopathy in humans and has a high morbidity and mortality rates. It is caused by a point mutation, an A-T substitution (GAG→GTG) in the first exon of the  $\beta$ -globin gene, which determines the replacement of glutamate for valine at position 6 of the protein chain, giving rise to a structural variant of hemoglobin (HbS), causing, under hypoxia conditions, erythrocytes to acquire a sickle shape compromising the efficient oxygen transport. The treatments widely available at the moment only ease the complications of the disease. In this context, the CRISPR-Cas9 technology, which allows gene editing directly into DNA, appears as a solution that allows the mutation to be corrected and/or improve fetal hemoglobin expression. This systematic integrative review aimed to answer the following question: what is the clinical applicability of the CRISPR-Cas9 technology in the treatment of sickle cell disease? **Methodology:** Theoretical or empirical studies, primary or secondary, developed with qualitative, quantitative or mixed methodology, published until November 15<sup>th</sup> 2020, in English, which portrays the theme related to this review were selected. The research was carried out in three databases based on descriptors chosen by the "Medical Subject Headings". **Results:** Initially, 79 primary studies were identified. With the exclusion of repeated articles in different databases, 75 studies remained, which were evaluated based on their titles and abstracts, and 28 articles were then selected. These 28 articles were read in full and 10 articles were excluded. Thus, 18 articles were selected at the end of this review. No clinical studies have been identified. It is observed that 12 articles are narrative reviews of in vitro or preclinical studies that discuss the clinical applicability; 4 studies are qualitative or descriptive studies about the theme; and 2 studies are opinion articles. The selected studies showed that in vivo (in animal models) and in vitro, the CRISPR-Cas9 technology is able to correct the mutation that causes sickle cell disease and/or increase the levels of fetal hemoglobin expression. However, in vivo, the challenges are to avoid toxicity, off-target effects and ensure the efficiency of the transplant. Patients, family members, researchers and health professionals are predisposed to participate in clinical trials involving CRISPR-Cas9, but do not have enough knowledge about the subject. **Conclusions:** The CRISPR-Cas9 technology has great potential for clinical use in the treatment of sickle cell disease. It is necessary to educate the population about the fundamentals of gene editing, thus facilitating its acceptance and availability in regard to clinical trials. An additional concern is the ethical regularization of the use of this technology in human beings.

**Keywords:** CRISPR, CRISPR-Associated Protein 9, Sickle cell disease, Integrative review.

## Lista de ilustrações

FIGURA 1: ESQUEMA DA CLIVAGEM DE DNA MEDIADA POR CRISPR-CAS9.....	14
FIGURA 2: QUEBRA DA FITA DUPLA DE DNA E REPARO POR NHEJ E HDR.....	16
FIGURA 3: DIVERSIDADE DE APLICAÇÕES DA CRISPR .....	17
FIGURA 4: ESTRUTURA E MOLÉCULA DA HEMOGLOBINA DO ADULTO .....	19
FIGURA 5: ORGANIZAÇÃO DOS GENES DAS GLOBINAS HUMANAS E AS HEMOGLOBINAS PRODUZIDAS EM CADA ESTÁGIO DO DESENVOLVIMENTO HUMANO.....	20
FIGURA 6: ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO MOSTRANDO HEMÁCIAS AFOIÇADAS E NORMAIS.....	23
FIGURA 7: EPIDEMIOLOGIA GLOBAL DA ANEMIA FALCIFORME .....	24
FIGURA 8: EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME NO BRASIL.....	25
FIGURA 9: ETAPAS DE UMA REVISÃO INTEGRATIVA .....	31
FIGURA 10: FLUXOGRAMA QUE ILUSTRA A METODOLOGIA UTILIZADA NESTA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	36
FIGURA 11: SÍNTESE DOS RESULTADOS DE BUSCA E SELEÇÃO DOS ARTIGOS.....	38

## **Lista de tabelas**

TABELA 1: DIFERENÇAS ENTRE SISTEMAS CRISPR-CAS .....	13
TABELA 2: DIFERENÇAS ENTRE ZFN, TALEN E CRISPR .....	18
TABELA 3: RELAÇÕES ENTRE CONDIÇÕES CLÍNICAS E TIPOS DE HEMOGLOBINAS .....	22
TABELA 4: PROTOCOLO DESTA REVISÃO INTEGRATIVA FUNDAMENTADO PELO PARÂMETRO PICOD .....	32
TABELA 5: NÍVEIS DE EVIDÊNCIA DAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS SELECIONADAS.....	35
TABELA 6: ARTIGOS EXCLUÍDOS COM BASE NOS TÍTULOS E RESUMOS (N=47) .....	38
TABELA 7: ARTIGOS EXCLUÍDOS APÓS LEITURA INTEGRAL DO TEXTO (N=10) .....	42
TABELA 8: ARTIGOS SELECIONADOS FINAIS (N=18).....	43
TABELA 9: QUALIDADE DA EVIDÊNCIA DOS 18 ARTIGOS SELECIONADOS .....	46
TABELA 10: INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS 18 ARTIGOS SELECIONADOS .....	49

## Lista de abreviaturas e siglas

BCL11A	- B-cell lymphoma/leukemia 11A
Cas	- CRISPR associated genes
CRISPR	- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DNA	- Deoxyribonucleic acid
DSB	- Double strand break
FDA	- Food and Drug Administration
gRNA	- Guide RNA
HbA	- Hemoglobina do Adulto (normal)
HbF	- Hemoglobina Fetal
HBFH	- Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin
HbS	- Hemoglobina S
HDR	- Homology directed repair
HRI	- Regulador fisiológico da expressão gênica em eritrócitos
HSC	- Hematopoietic stem cell
HSPC	- Hematopoietic stem and progenitor cell
iPSC	- Induced pluripotent stem cell
LSD1	- Lysine-specific demethylase 1
NHEJ	- Non-homologous end joining
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PAM	- Protospacer Adjacent Motif
PB	- Pares de Bases
PBE	- Prática Baseada em Evidências
PNTN	- Programa Nacional de Triagem Neonatal
RNA	- Ribonucleic Acid
SUS	- Sistema Único de Saúde
TALENs	- Transcription activator-like effector nucleases
ZFNs	- Zinc finger nucleases

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
CRISPR .....	12
ANEMIA FALCIFORME .....	19
JUSTIFICATIVA PARA A REVISÃO .....	28
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
GERAL.....	29
ESPECÍFICOS .....	29
<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>30</b>
TIPO DE PESQUISA .....	30
DEFINIÇÃO DA QUESTÃO DA PESQUISA ESTRUTURADA NO FORMATO DO ACRÔNIMO PICOD .....	31
CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS ESTUDOS PRIMÁRIOS .....	33
<i>Critérios de inclusão</i> .....	33
<i>Tipos de estudo</i> .....	33
IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS ESTUDOS .....	33
AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE EVIDÊNCIA DOS ESTUDOS SELECIONADOS .....	34
EXTRAÇÃO DE DADOS DOS ESTUDOS .....	35
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS ARTIGOS .....	37
AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE EVIDÊNCIA DOS ESTUDOS SELECIONADOS .....	45
EXTRAÇÃO DE DADOS DOS ESTUDOS .....	45
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>61</b>
ANEXO 1: FICHA A - FICHA DE ELEGIBILIDADE DOS ESTUDOS PRIMÁRIOS IDENTIFICADOS NAS BASES DE DADOS ELETRÔNICAS PESQUISADAS .....	61
ANEXO 2: FICHA B - FICHA DE EXTRAÇÃO DE DADOS DOS ARTIGOS SELECIONADOS .....	62

## INTRODUÇÃO

### **CRISPR**

Em 1987 foi identificado um *locus* no genoma da bactéria *Escherichia coli*, constituído por sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas, cujas funções eram desconhecidas. Em 1993, essas sequências foram analisadas e, posteriormente, em 2000, as mesmas foram encontradas em genomas de bactérias e arqueias (MOJICA et al., 2000). 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) (JANSEN et al., 2002).

Em seguida, foi identificado um conjunto de genes próximo ao *locus* CRISPR, que foram denominados de genes Cas (*CRISPR associated genes*), os quais podem 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* (JANSEN et al., 2002).

Em 2005, foi constatado 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 (BOLOTIN et al., 2005).

Tendo em conta todas essas descobertas, em 2005 aventou-se a hipótese de que CRISPR-Cas seria um sistema imune adaptativo de procariotos onde os espaçadores serviriam de “memória contra invasores anteriores” (MOJICA et al., 2005). Dessa forma, haveria complementaridade entre as moléculas de RNA geradas a partir desses espaçadores e o patógeno (re)invasor, o que possibilitaria combatê-lo. Em seguida, vários estudos demonstraram que esta hipótese é verdadeira (PEREIRA, 2016).

O sistema CRISPR-Cas é, portanto, uma maquinaria de defesa adaptativa que permite aos procariotos protegerem-se da reinvasão de bacteriófagos,

transposons e plasmídeos. Neste sistema, a imunidade é mediada pelas nucleases Cas e por pequenos RNA-guias (gRNA) que especificam o sítio de clivagem no genoma. As proteínas Cas funcionam como catalisadoras e o *locus* CRISPR como memória genética (PEREIRA, 2016).

Existem três sistemas CRISPR-Cas (Tipo I, Tipo II e Tipo III), 11 subtipos (IA-F, IIA-C e IIIA-B) e 9 proteínas Cas que compõem esses sistemas. Os sistemas são agrupados de acordo com a conservação dos genes Cas e a organização do operon (PEREIRA, 2016). As diferenças entre os sistemas são ilustradas na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Diferenças entre sistemas CRISPR-Cas.

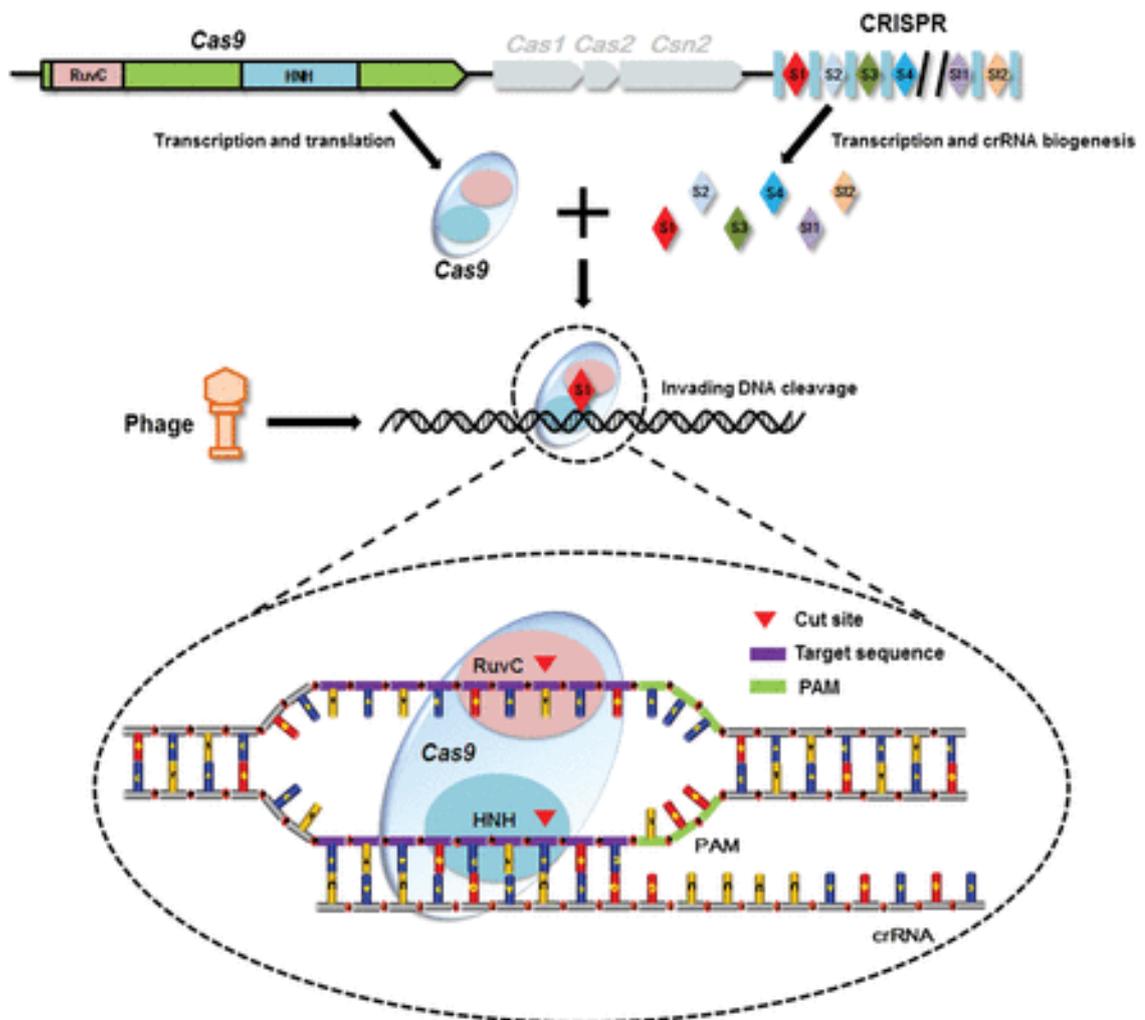
Sistemas CRISPR-Cas	Proteína Cas*	Características
<b>Tipo I</b>	Cas1, Cas2, <b>Cas3</b> , Cas5, Cas6, Cas7 e <b>Cas8</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Direcionado ao invasor pelo reconhecimento do domínio PAM (<i>Protospacer Adjacent Motif</i> ou Motivo Adjacente ao Protoespaçador)</li> <li>– Cas3 é responsável pela destruição do material genético exógeno.</li> </ul>
<b>Tipo II</b>	Cas1, Cas2 e <b>Cas9</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Sistema mais simples de todos</li> <li>– o RNA-guia direciona a endonuclease Cas9 que combate o DNA invasor baseando-se no domínio PAM</li> </ul>
<b>Tipo III</b>	Cas1, Cas2, Cas5, Cas6, Cas7 e <b>Cas10</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Sistema mais complexo</li> <li>– Não requer domínio PAM para reconhecimento da sequência alvo ou para sua clivagem</li> <li>– Dividido em dois subtipos: III-A degrada o DNA invasor e III-B degrada o RNA invasor</li> </ul>

\*As proteínas Cas em negrito são exclusivas para cada tipo de sistema. **Fonte:** Adaptado de PEREIRA, 2016

Entretanto, é preciso distinguir o processo biológico da técnica de CRISPR. CRISPR é um *locus* bacteriano codificador de RNA-guias de origem viral. As proteínas Cas agrupam-se a este *locus*, criando o sistema CRISPR-Cas que está envolvido no processo de imunidade antiviral adquirida. O sistema CRISPR-Cas

baseia-se na captura e inserção de pequenos pedaços de DNA advindos da invasão por vírus ou plasmídeos, que são incorporados ao genoma da bactéria e contra os quais ela então adquire resistência (PEREIRA, 2016).

Com base nesse processo biológico natural, as pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer A. Doudna desenvolveram a técnica de CRISPR-Cas9 que se utiliza de um RNA-guia e apenas uma proteína Cas, a endonuclease Cas9. Nesta técnica, ilustrada na **Figura 1**, a endonuclease cliva o DNA na parte interna da molécula e é direcionada ao alvo específico através do RNA-guia (PEREIRA, 2016). O desenvolvimento desta técnica pelas pesquisadoras, em 2012, fez com que o prêmio Nobel em Química em 2020 fosse atribuído às mesmas (THE NOBEL PRIZE, 2020).



**Figura 1:** Esquema da clivagem de DNA mediada por CRISPR-Cas9. Fonte: ZHANG et al., 2014.

A técnica de CRISPR-Cas9 é uma tecnologia de edição genética que permite alterar a sequência nucleotídica, através de: (1) deleção, inserção ou substituição de um ou poucos nucleotídeos, (2) deleção ou (3) integração de elementos genéticos, como os transgenes. CRISPR-Cas9 pode ainda ser usada para outros fins, além de edição genética: marcação de DNA, regulação da expressão gênica, clivagem de RNA, mapeamento de genes e rastreamento de DNA (ZHANG et al., 2014).

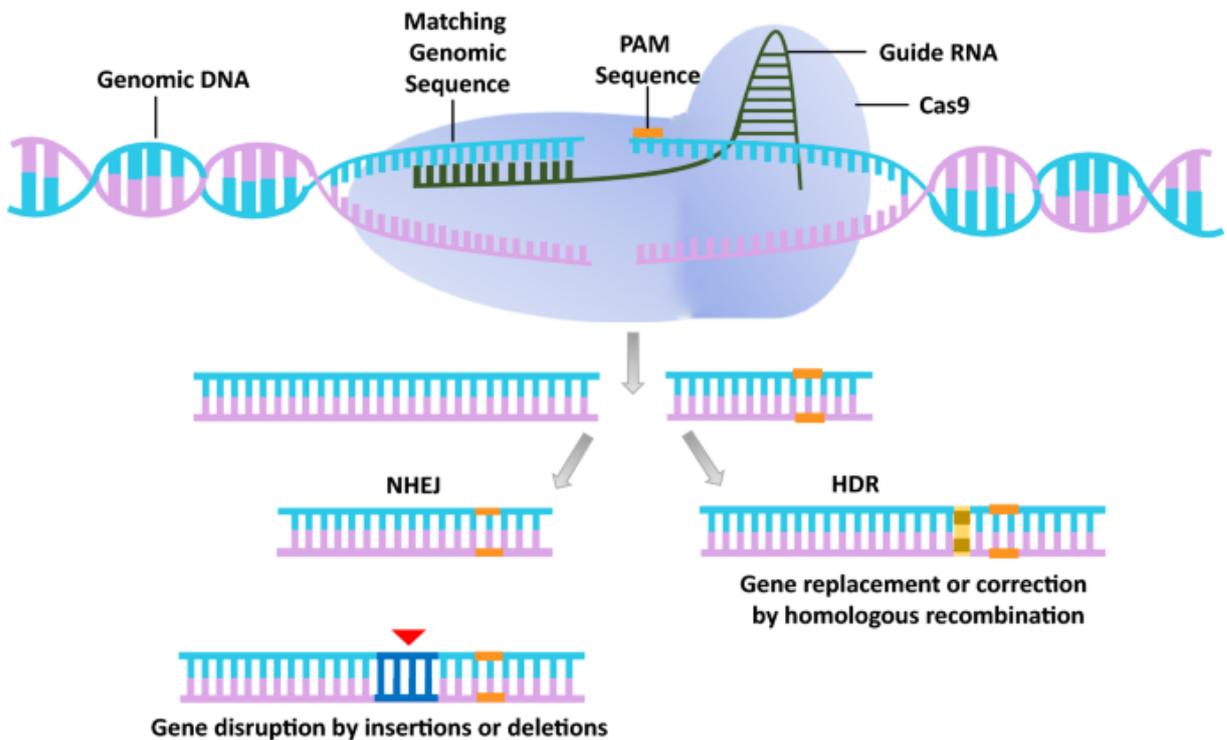
Em síntese, a técnica de CRISPR-Cas9 necessita de três moléculas: uma nuclease (habitualmente a Cas9 tipo selvagem proveniente de *Streptococcus pyogenes*), um RNA-guia (*single guide RNA*) e o alvo (o DNA que será alvo da modificação); essa sequência alvo de DNA precisa ser flanqueada por PAMs (5' NGG 3'), fundamentais para a ancoragem da nuclease ao sítio de clivagem (ZHANG et al., 2014).

O processo de ativação e direcionamento da Cas9 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 Cas9 (PEREIRA, 2016).

A clivagem do DNA pela Cas9 gera quebra da dupla fita de DNA (*double strand break, DSB*), que posteriormente precisa ser reparada pela célula através de dois mecanismos: *NHEJ* (*non-homologous end joining* ou junção de pontas não homólogas) e *HDR* (*homology directed repair* ou reparo direcionado por homologia), ilustrados na **Figura 2** (GHOSH et al., 2019). NHEJ é propensa a erro, gerando mutações do tipo indel (inserção ou deleção de um ou poucos nucleotídeos) no sítio de junção. A funcionalidade final do gene-alvo é comprometida por estas mutações indel, de forma que a ação conjunta de Cas9-NHEJ frequentemente resulta na inativação do gene (nocauteamento). Já o desencadeamento da HDR é fundamental quando o objetivo é gerar células/organismos “knock-in” (introdução de uma nova sequência de DNA no genoma) ou realizar substituição alélica (PEREIRA, 2016).

Em genomas maiores, a CRISPR-Cas9 pode clivar para 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-Cas9 (ZHANG et al., 2014).



**Figura 2:** Quebra da fita dupla de DNA e reparo por NHEJ e HDR. **Fonte:** GHOSH et al., 2019.

A CRISPR é uma tecnologia de biologia molecular utilizada para edições genômicas, sendo atualmente mais popular devido a sua eficiência e baixo custo (ZHANG et al., 2014). As aplicações da CRISPR são variadas (**Figura 3**) e compreendem desde a investigação científica básica até aplicações para saúde humana, agronegócio e indústria. A técnica CRISPR-Cas9 torna possível para os cientistas inserir, remover ou corrigir o DNA de forma simples e eficiente. Na área da saúde em particular, ela mantém a perspectiva de tratar ou mesmo curar certas enfermidades, especialmente aquelas que têm etiologia monogênica, como doença falciforme, fibrose cística e alguns tipos de síndromes hereditárias de câncer; através

de células-tronco hematopoiéticas derivadas de paciente (HSPC, *hematopoietic stem and progenitor cells*), células-tronco hematopoiéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*) e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) (PEREIRA, 2016).



**Figura 3:** Diversidade de aplicações da CRISPR. **Fonte:** PASSOS et al. Aplicações da Técnica. In: PEREIRA, 2016.

A edição genética não é uma abordagem nova e tem sido usada desde a década de 1970. Antes do surgimento da técnica de CRISPR, foram desenvolvidas outras ferramentas, nas quais o uso de nucleases permitem a clivagem do sítio-alvo e a manipulação genética de diversos organismos, viabilizando os primeiros experimentos de supressão e edição de genes. Entre estas outras técnicas destacam-

se: RNAs antisense, ribozimas, RNAs de interferência, nucleases dedo de zinco (*zinc finger nucleases*, ZFNs) e TALENs (*Transcription activator-like effector nucleases*). A **Tabela 2** mostra as principais diferenças entre as técnicas de ZFN, TALEN e CRISPR (PEREIRA, 2016).

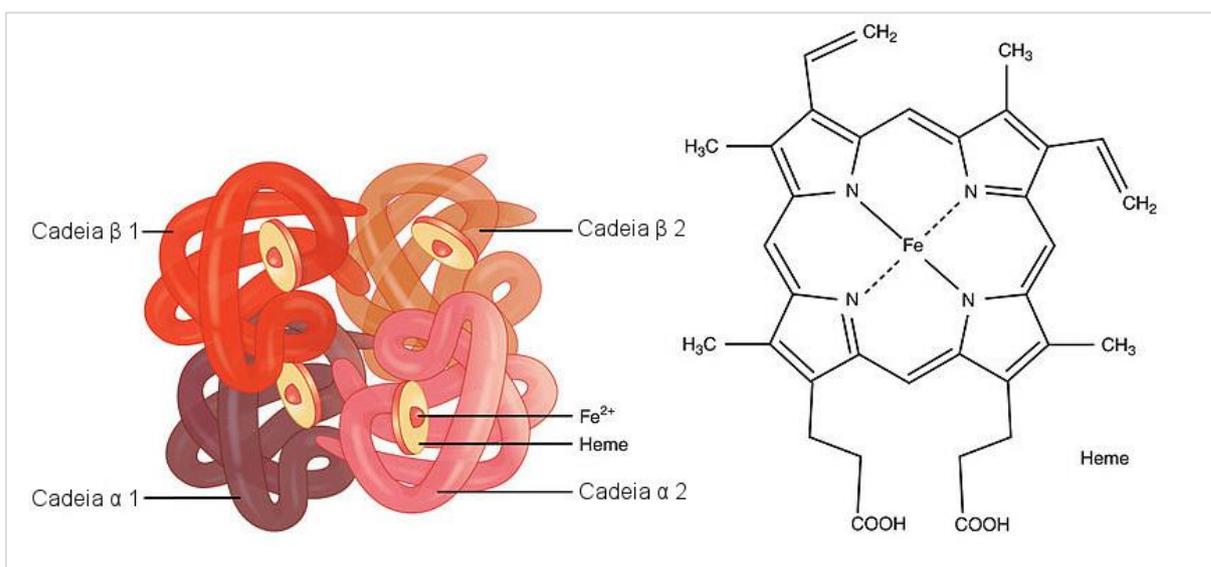
**Tabela 2:** Diferenças entre ZFN, TALEN e CRISPR.

Características	ZFN	TALEN	CRISPR
Determinantes da especificidade ao DNA	Domínios dedo de zinco	TALEN	gRNA
Nuclease	FokI	FokI	Cas9
Taxa média de mutação fora de alvo	Baixa	Alta	Alta
Tamanho do sítio-alvo	18-36pb	30-40pb	17-22pb
Restrições do sítio-alvo	Deve ser rico em Guanina	Começar com Timina e terminar com Adenina	Terminar com NGG (PAM)
Densidade de sítios-alvo	1 a cada 100pb	1 a cada 35pb	1 a cada 8pb
Efeitos off-target (mutação fora do alvo)	Alta	Baixa	Variável
Toxicidade	Variável-Alta	Baixa	Baixa
Tamanho da construção	~ 1kb x 2	~ 3kb x 2	4,2kb (Cas9) + 0,1kb (gRNA)
Possibilidades de construir bibliotecas para edição em escala genômica	Não	Sim, porém tecnicamente difícil	Sim

**Fonte:** Adaptado de PEREIRA, 2016.

## **Anemia falciforme**

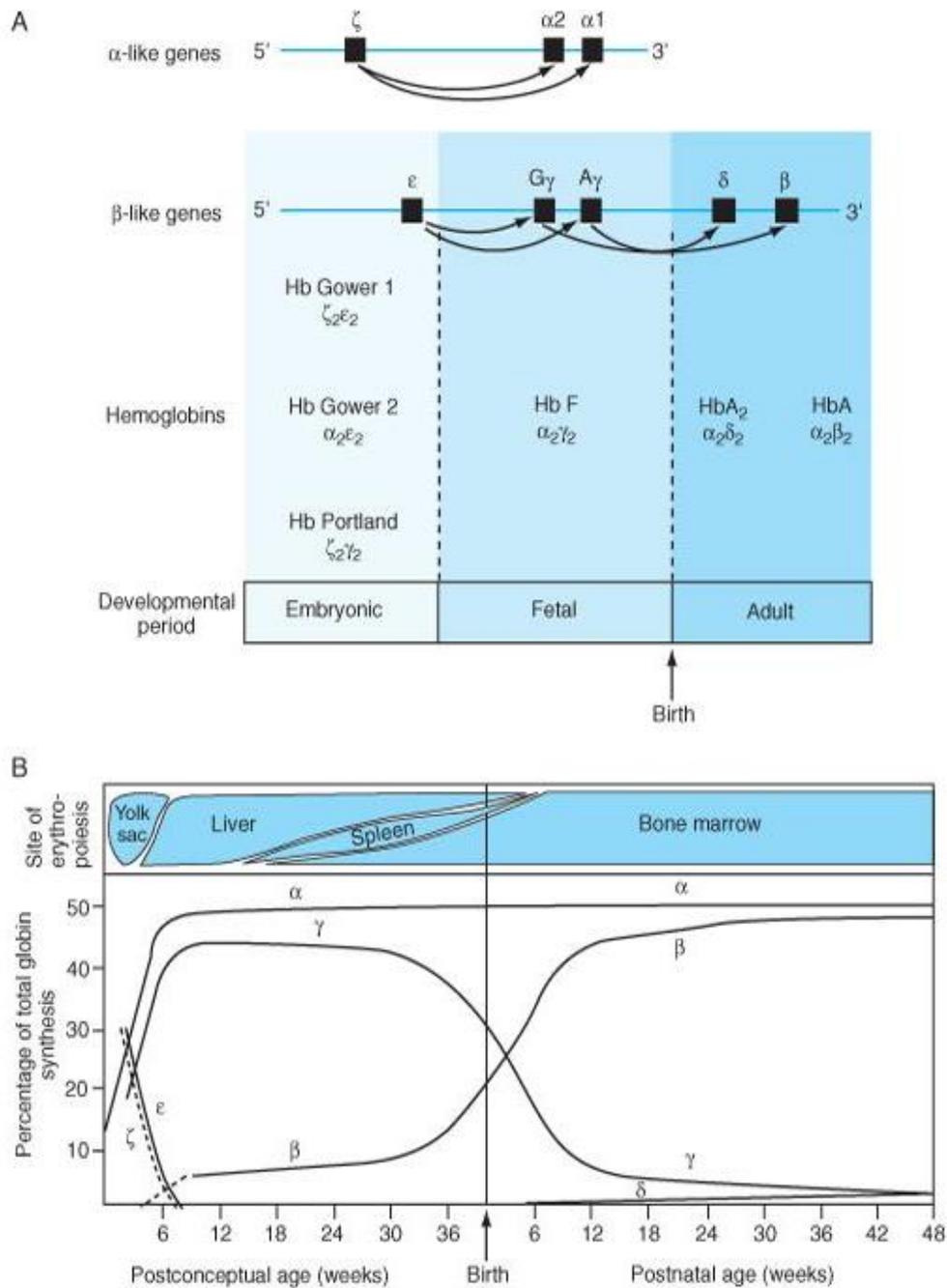
A hemoglobina é a proteína responsável por transportar oxigênio e está presente nas hemácias ou eritrócitos. A hemoglobina humana do adulto é um tetrâmero que consiste em dois pares de polipeptídeos diferentes chamados de cadeias alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) de globina. Cada cadeia de globina é constituída por seu próprio grupo heme, que contém ferro no interior (TURNPENNY e ELLARD, 2017), como pode ser observado na **Figura 4**.



**Figura 4:** Estrutura e molécula da hemoglobina do adulto. **Fonte:** NASCIMENTO, 2017.

Na espécie humana existem diferentes tipos de hemoglobina e ocorre uma sucessão desenvolvimental dessas distintas hemoglobinas (**Figura 5**): na fase embrionária hemoglobina Gower I ( $\xi_2\varepsilon_2$ ), Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) e Portland I ( $\zeta_2\gamma_2$ ); na fase fetal hemoglobina F (fetal) ( $\alpha_2\gamma_2$ ); e na fase adulta hemoglobina A ( $\alpha_2\beta_2$ ) e A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), embora possa persistir até 0,5% da hemoglobina F (TURNPENNY e ELLARD, 2017). Durante o desenvolvimento ocorre uma mudança da expressão de genes da globina denominada “*globins witching*”. “*Switches*” são as mudanças temporais na síntese de globina e são acompanhadas pelas alterações no local principal de eritropoiese, processo de produção e maturação das hemácias. Durante a fase embrionária a síntese de globina ocorre no saco vitelino. Próximo à quinta semana de gestação, o local principal de eritropoiese passa a ser o fígado fetal, onde há predominância de

cerca de 70% da hemoglobina fetal. A síntese das cadeias  $\beta$  torna-se significativa ao nascimento, possibilitando assim que aos seis meses de idade quase toda hemoglobina presente na criança seja do tipo adulto (NUSSBAUM et al., 2016).



**Figura 5:** A) Organização dos genes das globinas humanas e as hemoglobinas produzidas em cada estágio do desenvolvimento humano. As setas curvas referem-se aos efeitos de “liga-e-desliga” (*switches*) na expressão gênica durante o desenvolvimento. B) Desenvolvimento da eritropoiese no feto e no recém-nascido. O esquema mostra os tipos celulares responsáveis pela síntese de hemoglobina, os órgãos envolvidos e os tipos de cadeia de globina sintetizada nos sucessivos estágios. **Fonte:** NUSSBAUM et al., 2016.

Os distúrbios de hemoglobina podem ser, basicamente, de dois tipos: variantes das cadeias estruturais de globina (como, por exemplo, a anemia falciforme) e distúrbios de síntese de cadeia de globina (talassemias) (TURNPENNY e ELLARD, 2017).

Os distúrbios de síntese de cadeia de globina ocorrem devido a mutações ou deleções de genes que reduzem a síntese dos tipos alfa e beta da globina causando um desequilíbrio quantitativo na produção de cadeias de hemoglobina. Esses distúrbios incluem as talassemias alfa e beta. Indivíduos normais possuem quatro genes codificantes para as cadeias alfa da hemoglobina. No caso das alfa-talassemias, estas estão relacionadas à deleção de um, dois, três ou quatro genes alfa: a deleção de um gene alfa resulta na forma assintomática, com alterações laboratoriais mínimas ou ausentes; a deleção de dois genes resulta no traço talassêmico e manifesta-se por anemia leve e microcitose; a deleção de três genes resulta na doença da hemoglobina H caracterizada por anemia, microcitose, hipocromia, icterícia e esplenomegalia; e a deleção dos quatro genes resulta na forma mais grave das síndromes talassêmicas, a hidropsia fetal. As beta-talassemias resultam da alteração quantitativa da síntese de globinas beta, normalmente causadas por uma única substituição de par de bases nos genes, e podem ser classificadas como talassemias beta zero, caso não ocorra síntese de globina, e talassemias beta mais, caso ocorra alguma síntese. Pelo fato das cadeias beta estarem presentes somente na hemoglobina A, a beta-talassemia é uma doença que não apresenta sintomatologia clínica no período intrauterino (NUSSBAUM et al., 2016).

Nos distúrbios nos quais há variações nas cadeias estruturais de globina ocorre a alteração do peptídeo de globina sem, no entanto, afetar a sua taxa de síntese. A anemia falciforme é a alteração que mais se destaca neste grupo de patologias devido à grande incidência mundial. Outro distúrbio estrutural prevalente é a hemoglobina C, que resulta em mutação no gene da globina beta, havendo substituição do ácido glutâmico (GAG) pela lisina (AAG), conferindo à hemácia uma tendência maior de cristalização (TURNPENNY e ELLARD, 2017).

A anemia falciforme, uma doença genética autossômica recessiva é a hemoglobinopatia estrutural mais comum na espécie humana (TURNPENNY e ELLARD, 2017). A doença foi primeiro reconhecida no século XIX e, em 1940, as hemácias de indivíduos com anemia falciforme foram vistas ao microscópio na sua

forma distorcida sob condições desoxigenadas. Ao analisar por eletroforese a hemoglobina de pacientes com anemia falciforme, notou-se que a hemoglobina S possuía uma mobilidade diferente da hemoglobina A (TURNPENNY e ELLARD, 2017).

Na anemia falciforme, a diferença entre a hemoglobina normal do adulto (A) e a hemoglobina em forma de foice (S) é resultado de uma mutação de ponto: o gene da globina beta, localizado em 11p15.4, sofre mutação resultando na substituição de ácido glutâmico (GAG) pela valina (GTG) na posição 6 da cadeia proteica, originando uma variante estrutural da hemoglobina (HbS) (TURNPENNY e ELLARD, 2017). A **Tabela 3** compara as hemoglobinas A e S.

**Tabela 3:** Relações entre condições clínicas e tipos de hemoglobinas.

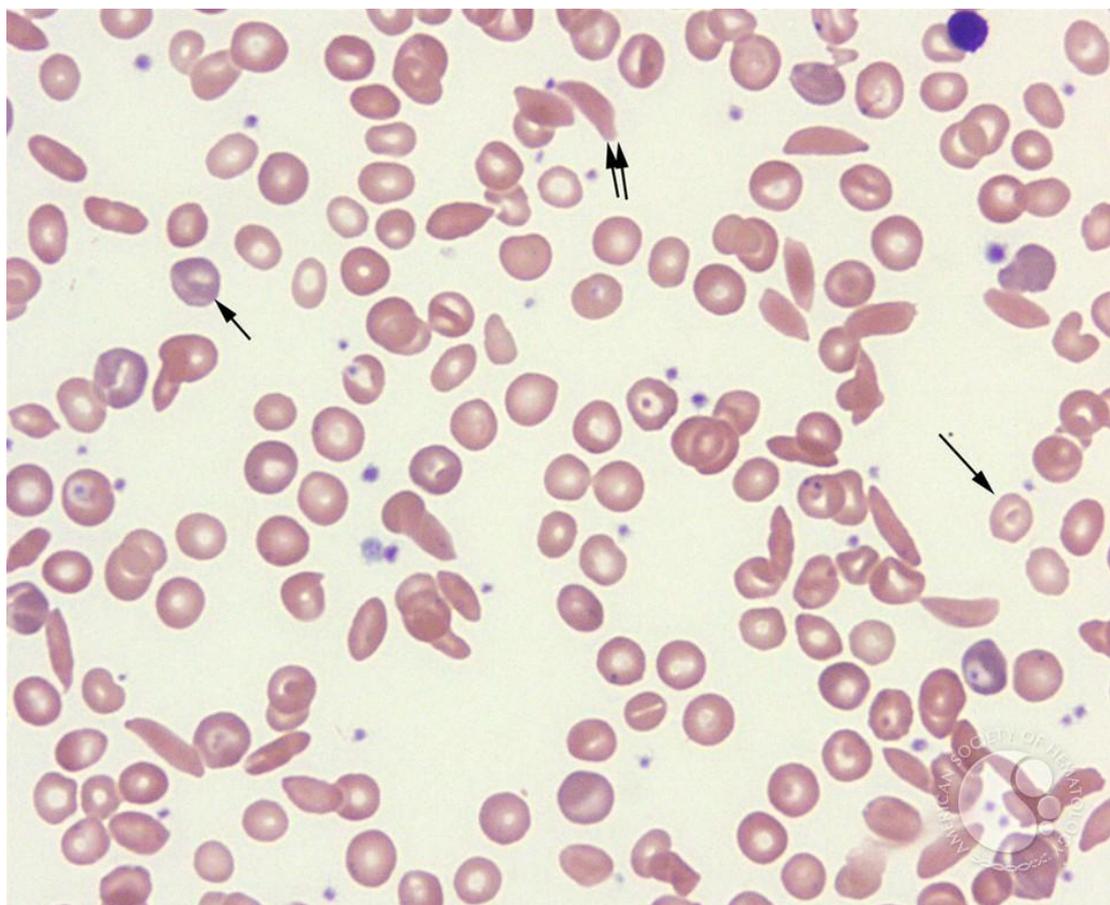
Hemoglobina	Composição	Genótipo	Condição clínica
HbA	$\alpha^A_2\beta^A_2$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ $\beta/\beta$	Normal
HbA, HbS	$\alpha^A_2\beta^A_2$ $\alpha^A_2\beta^S_2$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ $\beta/\beta^S$	Traço falcêmico
HbS	$\alpha^A_2\beta^S_2$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ $\beta^S/\beta^S$	Anemia falciforme

Fonte: Adaptado de NUSSBAUM et al., 2016.

A mutação causadora da anemia falciforme resulta na dobra anormal da hemoglobina, como pode ser observado na **Figura 6**, fazendo com que, em situações de hipóxia, esta tenha uma tendência a se polimerizar e agregar, transformando os glóbulos vermelhos em células rígidas em forma de foice. Essas células inflexíveis tendem a grudar umas nas outras e nas paredes dos vasos sanguíneos, causando vaso-oclusão, o que diminui o fluxo sanguíneo, diminuindo o fornecimento de oxigênio aos tecidos (TURNPENNY e ELLARD, 2017).

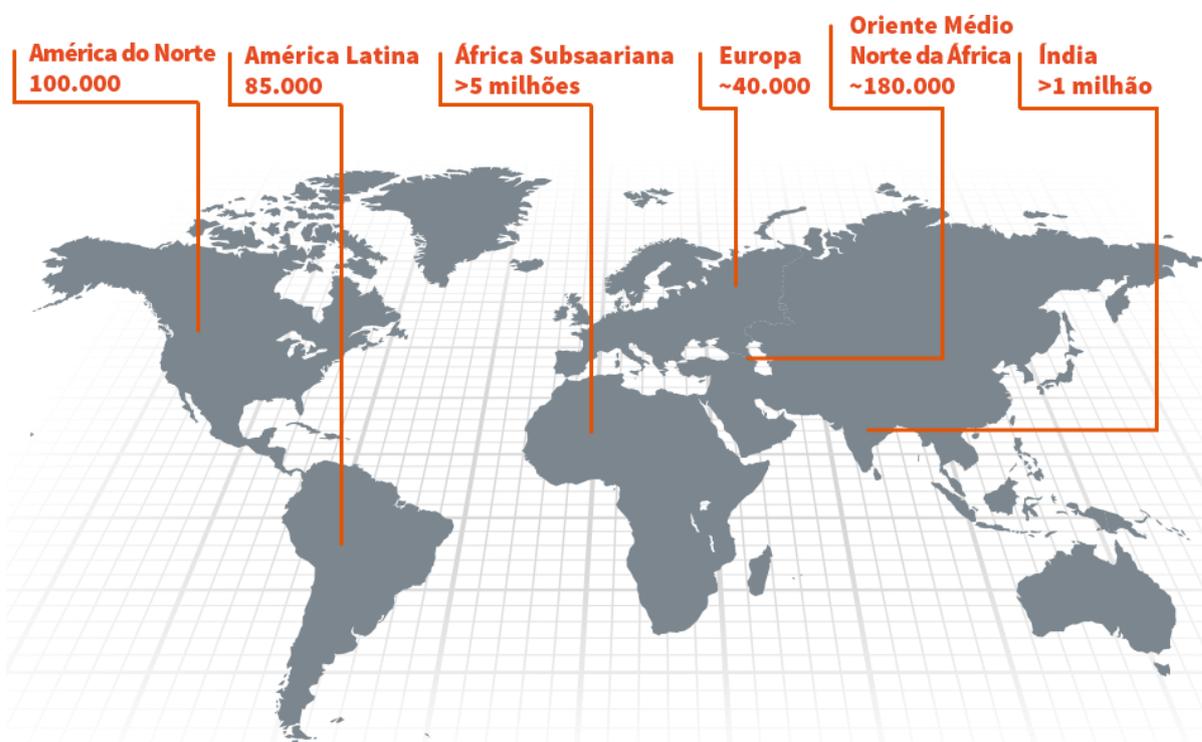
Geralmente, nos primeiros dois anos de vida, pacientes com anemia falciforme apresentam atraso no crescimento pômbero-estatural, esplenomegalia,

infecções repetidas e dactilite. Derrames, síndrome torácica aguda, necrose papilar renal, auto-esplenectomia, úlceras nas pernas, priapismo, necrose óssea asséptica e perda visual são causados pelos infartos vaso-oclusivos. A suscetibilidade destes pacientes às infecções bacterianas, como sepse pneumocócica e osteomielite por *Salmonella*, é devido a alteração da fagocitose e, com a evolução da doença, a asplenia funcional, sendo as infecções a maior causa de morte dos pacientes em todas idades. Outras causas comuns de morte entre os 40 a 50 anos são a insuficiência renal progressiva e a insuficiência pulmonar. A infecção por parvovírus faz com que estes pacientes desenvolvam anemia aplásica que também pode levar a morte, uma vez que esta infecção causa uma cessação temporária da produção de eritrócitos (NUSSBAUM et al., 2016).



**Figura 6:** Esfregaço de sangue periférico mostrando hemácias afoiçadas e normais. Eritrócitos policromatofílicos (reticulócitos) estão presentes (seta única pequena). Eritrócitos em alvo (seta única grande) e falciformes (seta dupla) podem ser vistos. **Fonte:** LAZARCHICK, 2009.

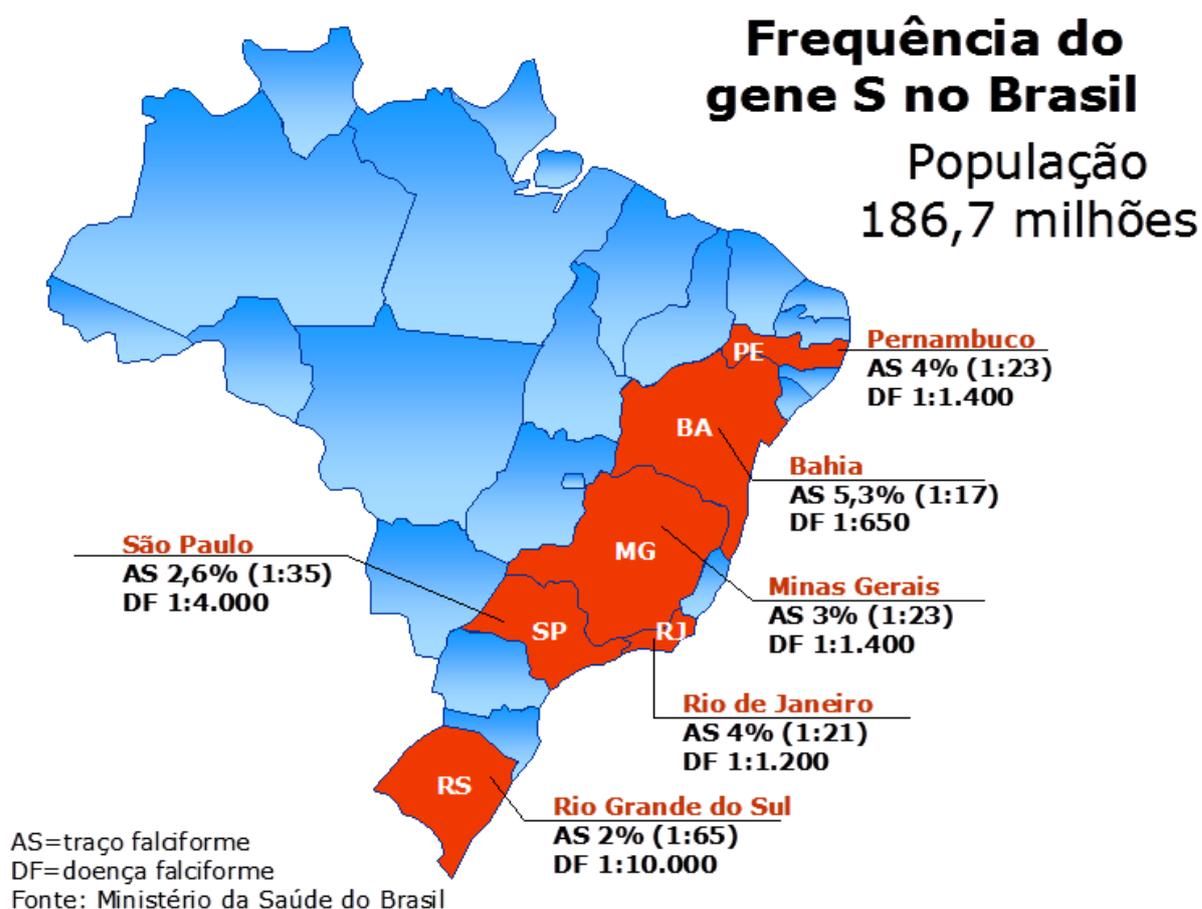
Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 5% da população mundial é portadora de genes responsáveis por hemoglobinas anormais. A anemia falciforme, especificamente, é mais frequente na África e em populações cujos ancestrais são provenientes do continente Africano, como América do Norte, Central e do Sul; é comum também na Arábia Saudita, Índia e na região do Mediterrâneo como Grécia, Turquia e Itália. Aproximadamente 1 em 600 afro-americanos nasce com anemia falciforme. A condição heterozigota desta doença encontra-se presente em 8% dos afro-americanos, porém, em regiões como centro-oeste da África até 25% dos recém-nascidos são heterozigotos (NUSSBAUM et al., 2016). A **Figura 7** ilustra a epidemiologia global da anemia falciforme.



**Figura 7:** Epidemiologia global da anemia falciforme. Os números apresentam os casos de doentes com anemia falciforme em cada continente. **Fonte:** NOT ALONE IN SICKLE CELL. (<https://www.notaloneinsicklecell.com/Global-Impact-Of-SCD/>).

No Brasil, a anemia falciforme possui incidência de 1-3/1.000 recém-nascidos e é mais frequente nas regiões Norte e Nordeste do país (6 a 10%) onde maior parte da população é afrodescendente, quando comparadas às regiões Sul e

Sudeste, onde a prevalência é menor (2 a 3%). Segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se a existência de cerca de 2 milhões de indivíduos com o traço falciforme e 8 mil afetados com doença falciforme no Brasil. A miscigenação entre populações indígenas, imigrantes europeus e africanos, contribuiu bastante para a dispersão dos genes das mutações das hemoglobinas, tornando a anemia falciforme a doença hereditária mais prevalente no país (RAMALHO et al., 2003). A **Figura 8** ilustra a epidemiologia da anemia falciforme no Brasil.



**Figura 8:** Epidemiologia do traço e da doença falciforme no Brasil. **Fonte:** CANÇADO e JESUS, 2007.

Em 2001, Ministério da Saúde criou, através da Portaria 822, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS), que abrangia inicialmente as doenças: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito,

fibrose cística e hemoglobinopatias, permitindo o diagnóstico precoce e orientação terapêutica dos pacientes (LEÃO e AGUIAR, 2008). Mais recentemente, foram incluídas as seguintes doenças no PNTN: deficiência de bionitidase e hiperplasia congênita de adrenal (BRASIL, 2016). Devido ao perfil epidemiológico das hemoglobinopatias no Brasil e o reconhecimento das mesmas como um problema de saúde pública, as hemoglobinopatias não poderiam ficar fora da triagem neonatal no país. A triagem neonatal é a única forma de diagnóstico precoce destas patologias, assumindo um papel muito importante na alteração da história natural da doença e na diminuição de custos para o sistema de saúde. Quando feita de forma devida, causa um grande impacto nas taxas de morbimortalidade e aumenta a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes (LEÃO e AGUIAR, 2008). Nos últimos anos foi feita uma análise do impacto do PNTN e observou-se que houve um progresso na acessibilidade a testes laboratoriais, a automação dos processos e a facilidade que este programa proporciona à pesquisa científica (BRASIL, 2016).

O PNTN baseia-se na realização do teste de triagem neonatal mais conhecido como “teste do pezinho”, que é feito a partir de uma amostra de sangue retirada por punção cutânea de uma das regiões laterais do calcâneo do recém-nascido, que deve ter entre 3 a 7 dias de vida. O profissional de enfermagem faz a coleta da amostra de sangue em papel filtro na Unidade Básica de Saúde mais próxima à casa da família, e após a secagem do material, o papel é enviado para o laboratório responsável pela realização dos testes. Por se tratar apenas de uma triagem ou rastreio, quando há alteração na triagem é necessária a realização de exames diagnósticos confirmatórios (LEÃO e AGUIAR, 2008). Na triagem, a identificação das diferentes hemoglobinas habitualmente é feita por meio de ensaios laboratoriais de eletroforese, o que permite o diagnóstico das hemoglobinopatias tanto estruturais como as de síntese (LEÃO e AGUIAR, 2008).

Os heterozigotos para a mutação (portadores do traço falcêmico) não apresentam nenhum risco à saúde, mas em condições de hipóxia muito grave os eritrócitos podem se afoiçar e provocar sintomas semelhantes aos da doença clássica (NUSSBAUM et al., 2016). Por isso, o PNTN, quando identifica um indivíduo doente, permite a prevenção de complicações; enquanto a identificação do portador permite que seja realizado aconselhamento genético, com definição do risco de recorrência na família e possibilidade de diagnóstico pré-natal (LEÃO e AGUIAR, 2008).

O tratamento conservador da anemia falciforme inclui 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 hematopoéticas de doadores saudáveis. Embora o transplante de células-tronco hematopoéticas 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 transplante (SIMÕES et al., 2010).

No momento apenas três medicamentos foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para diminuir as complicações da doença, uma vez que ainda não existe cura. Porém, todos eles apresentam efeitos colaterais que podem ser significativos. Os medicamentos são: (1) *ADAKVEO (crizanlizumab-tmca)*; (2) *Endari (L-glutamine)*; e (3) *Oxbryta (voxelotor)*. O Adakveo (crizanlizumab-tmca) é um anticorpo monoclonal IgG2 kappa humanizado que se liga à P-selectina e bloqueia as interações com seus ligantes, incluindo P-selectina glicoproteína ligante 1. A ligação da P-selectina na superfície do endotélio ativado bloqueia as interações de plaquetas entre o endotélio, plaquetas, glóbulos vermelhos e leucócitos, reduzindo a frequência das crises vaso-oclusivas. Pode ser administrado através de infusão intravenosa em adultos e crianças maiores de 16 anos (CENTER WATCH, 2019a). O Endari (L-glutamina) reduz o dano oxidante aos glóbulos vermelhos, melhorando o potencial redox do dinucleotídeo de adenina nicotinamida, uma coenzima que foi identificada como o regulador primário da oxidação. Pode ser administrado oralmente em adultos e crianças maiores de 5 anos (CENTER WATCH, 2017). O Oxbryta (voxelotor) é um inibidor da polimerização da hemoglobina S (HbS) que se liga à HbS com uma estequiometria 1:1 e exhibe partição preferencial para os glóbulos vermelhos. Ao aumentar a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, o Voxelotor demonstra a inibição da polimerização da HbS dependente da dose. Estudos não clínicos sugerem que o Voxelotor pode inibir a falcização dos eritrócitos, melhorar a deformabilidade dos eritrócitos e reduzir a viscosidade do sangue total. Pode ser administrado em forma de comprimido em adultos e crianças maiores de 12 anos (CENTER WATCH, 2019b).

A anemia falciforme é um distúrbio monogênico hereditário que resulta em grave mortalidade e morbidade em todo o mundo. Ainda que nos últimos 30 anos se tenha conhecido melhor a base molecular da doença, os enfoques terapêuticos disponíveis hoje em dia para evitar o processo de afoiçamento têm tido benefícios limitados (TURNPENNY e ELLARD, 2017).

### ***Justificativa para a revisão***

As ferramentas de edição genética criaram possibilidade de cura para doenças monogênicas, como a anemia falciforme, por meio de diferentes mecanismos.

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 fetal (GONÇALVES e PAIVA, 2017).

Por meio da técnica de CRISPR é possível também gerar células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) que expressem hemoglobina fetal. Estas células têm capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares e previnem a rejeição imunológica em terapia celular, o que representa uma vantagem adicional (ZHANG et al., 2014).

A descoberta recente do CRISPR-Cas9 não apenas revolucionou a engenharia do genoma, mas também trouxe a possibilidade de traduzir esses conceitos em uma realidade clinicamente significativa para pacientes com anemia falciforme, o que suscitou esta revisão integrativa.

As ferramentas de edição genética criaram possibilidade de cura para doenças monogênicas, como a anemia falciforme, por meio de diferentes mecanismos.

## **OBJETIVOS**

### ***Geral***

Realizar uma revisão sistemática do tipo integrativa dos estudos que abordam a aplicabilidade clínica da técnica de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme.

Em última instância pretendeu-se contribuir para síntese do conhecimento científico produzido sobre esta temática, contribuindo para identificação de lacunas nas áreas de estudos.

### ***Específicos***

- ✓ Identificar e selecionar artigos científicos que apresentem dados primários ou discutam sobre a aplicabilidade clínica da técnica de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme.
- ✓ Avaliar o nível de evidência dos artigos selecionados.
- ✓ Analisar e sintetizar os textos selecionados.
- ✓ Mapear o estado de conhecimento sobre o assunto, problematizando e refletindo sobre o tema.
- ✓ Explicitar perspectivas de pesquisa e de utilidade clínica na área.

## METODOLOGIA

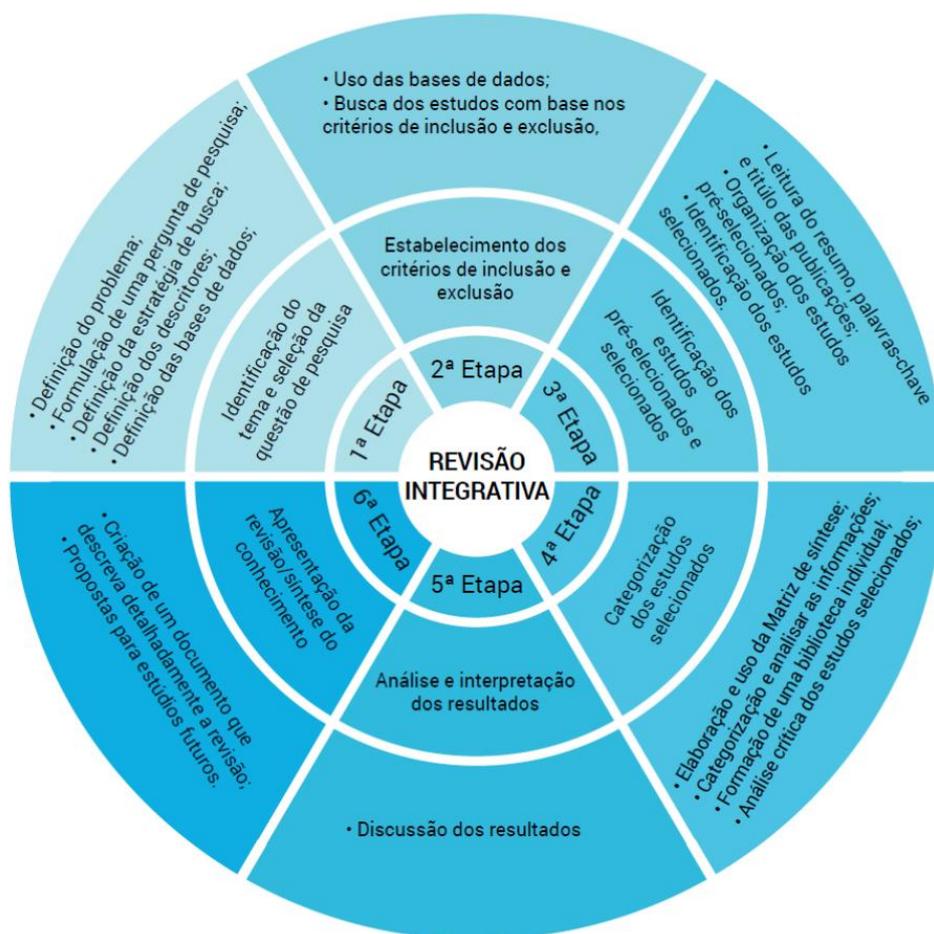
### *Tipo de pesquisa*

Esta é uma pesquisa exploratória. Trata-se de uma revisão sistemática do tipo integrativa (GAE, 2014) de estudos que abordam a temática da aplicabilidade clínica da técnica de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme.

A revisão integrativa surge da necessidade de se proporcionar aos profissionais de saúde melhor acesso às evidências científicas uma vez que, cada vez mais, existe um grande número e complexidade de informações. Ela permite a síntese do conhecimento e aplicabilidade de resultados de estudos significativos na prática de saúde. Este método de revisão, ferramenta da Prática Baseada em Evidências (PBE), permite a inclusão de estudos experimentais e não experimentais para uma compreensão mais ampla do estudo realizado, e é a abordagem mais completa no que se refere às revisões sistemáticas (WHITTEMORE e KNAFL, 2005; SOUZA et al., 2010; HOPIA et al., 2016; CASARIN et al., 2020).

Nas revisões integrativas, a inclusão simultânea de estudos com diferentes delineamentos de pesquisas, proporciona uma compreensão mais completa do tema de interesse. Este método também permite a combinação de dados de literatura teórica e empírica (BIBLIOTECA PROF. PAULO DE CARVALHO MATTOS, 2015). A diversidade na composição de uma amostra da revisão integrativa em conjunto com a multiplicidade de propósitos deste método fornece um quadro completo de conceitos, teorias ou problemas complexos relacionados aos cuidados de saúde (WHITTEMORE e KNAFL, 2005; SOUZA et al., 2010).

Para a construção de uma revisão integrativa, é necessário seguir seis etapas distintas: (1) identificação do tópico e seleção de hipótese ou questão de pesquisa; (2) estabelecimento dos critérios de inclusão e exclusão para os estudos/ amostra ou busca na literatura; (3) definição das informações a serem extraídas dos estudos selecionados/categorização dos estudos; (4) avaliação dos estudos incluídos; (5) interpretação de resultados; e (6) apresentação da revisão/síntese do conhecimento (SOUZA et al., 2010; CASARIN et al., 2020). A **Figura 9** ilustra as diferentes etapas de uma revisão integrativa.



**Figura 9:** Etapas de uma revisão integrativa. **Fonte:** BOTELHO et al., 2011.

### ***Definição da questão da pesquisa estruturada no formato do acrônimo PICOD***

A sigla PICOD significa: (P) população alvo; (I) intervenção; (C) comparação das intervenções; (O) resultados obtidos; e (D) desenho dos estudos. O formato PICOD fornece uma estrutura eficiente para busca de dados em bases eletrônicas (STILLWELL et al., 2010; GAE, 2014; CASARIN et al., 2020).

A questão desta pesquisa, estruturada no formato PICOD está apresentada na **Tabela 4** e pode ser sintetizada como: **qual a aplicabilidade clínica da técnica de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme?**

**Tabela 4:** Protocolo desta revisão integrativa fundamentado pelo parâmetro PICOD.

<b>P</b>	População (participantes)	Quem foi estudado?	Pacientes (humanos) com anemia falciforme
<b>I</b>	Intervenção	O que foi feito?	Terapia com CRISPR-Cas9
<b>C</b>	Comparação das intervenções	Comparação entre resultados	Quando disponível, comparação entre a técnica de CRISPR-Cas9 e os métodos conservadores de tratamento da anemia falciforme
<b>O</b>	Desfechos observados	Quais foram os resultados ou efeitos?	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Mutações fora de alvo (efeitos off-target)<sup>1</sup></li> <li>– Toxicidade<sup>2</sup></li> <li>– Transplante eficiente<sup>3</sup></li> <li>– Taxa de expressão de HbF<sup>4</sup></li> <li>– HSPCs/iPSCs corrigidas <sup>5</sup></li> <li>– Potencial para aplicação clínica<sup>6</sup></li> </ul>
<b>D</b>	Desenho do estudo	Como é?	Estudos teóricos ou empíricos; primários ou secundários; intervencionais ou não, desenvolvidos com metodologia qualitativa, quantitativa ou mista.

---

<sup>1</sup> Efeitos off-target – são mutações, podendo ser deleções ou inserções fora da sequência alvo.

<sup>2</sup> Toxicidade – quando a célula libera citotoxinas como resposta imune à alguma modificação genética que tenha sofrido.

<sup>3</sup> Eficiência do transplante – quando as células corrigidas/modificadas são inseridas no tecido/órgão/organismo alvo e este não desenvolve uma reação de rejeição permitindo assim com que se atinja o objetivo desejado.

<sup>4</sup> Taxa de expressão de HbF – a percentagem de expressão de HbF na célula após a correção da mutação.

<sup>5</sup> HSPCs/iPSCs corrigidas – quão eficiente a técnica de CRISPR-Cas9 foi na correção da mutação causadora da anemia falciforme nas células hematopoiéticas derivadas do paciente (HSPC, *hematopoietic stem and progenitor cells*) e nas células pluripotentes induzidas (iPSC, *induced pluripotent stem cells*)

<sup>6</sup> Potencial para a aplicação clínica – se o estudo apresenta metodologia segura e eficiente para que se avance para a aplicação clínica.

## ***Critérios de inclusão e exclusão dos estudos primários***

### Critérios de inclusão

Artigos publicados até 15 de novembro de 2020, em línguas portuguesa ou inglesa, que retratam a temática referente à revisão desta pesquisa.

### Tipos de estudo

Inicialmente, buscou-se estudos clínicos intervencionais. Estudos clínicos intervencionais caracterizam-se pela manipulação artificial da intervenção por parte do pesquisador, administrando-se uma intervenção e observando-se seu efeito sobre o desfecho em pacientes (NEDEL e SILVEIRA, 2016). Dividem-se normalmente em ensaio clínico randomizado e ensaio clínico não-randomizado (HOCHMAN et al., 2005).

Em função da natureza do tipo de revisão bibliográfica e considerando-se o objeto de estudo, poderiam ser selecionados também: revisões sistemáticas do tipo metanálise, estudos clínicos do tipo caso-controle, estudos clínicos do tipo coorte, revisões narrativas de estudos in vitro ou pré-clínicos que discutem a aplicabilidade clínica, estudos qualitativos ou descritivos sobre a temática, estudos de opinião (HOCHMAN et al., 2005; NEDEL e SILVEIRA, 2016).

Foram excluídos estudos primários in vitro (em modelos celulares) ou estudos primários pré-clínicos (experimentais, desenvolvidos em modelos animais).

## ***Identificação e seleção dos estudos***

A pesquisa foi realizada nas bases de dados eletrônicas: (1) Biblioteca Virtual em Saúde (que inclui as bases Lilacs e Scielo), (2) MEDLINE/PubMed, e (3) Cochrane.

O endereço eletrônico de cada uma das bases de dados utilizada encontra-se listado abaixo:

1. Biblioteca Virtual em Saúde - [www.bvsalud.org](http://www.bvsalud.org)
2. MEDLINE/PubMed - [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)
5. Cochrane - <http://www.cochranelibrary.com/>

A consulta foi conduzida pelos seguintes descritores, definidos do “Medical Subject Headings” (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>): (*CRISPR OR Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats OR CRISPR-Associated Protein 9*) AND (*Sickle Cell Disease OR HbS Disease OR Hemoglobin S Disease OR Sickle Cell Anemia OR Sickle Cell Disorders OR Sickling Disorder Due to Hemoglobin S*).

A busca dos artigos foi feita pela estudante e pela orientadora, de forma independente. Em seguida, a estudante elaborou uma lista dos artigos selecionados e os textos repetidos nas diferentes bases de dados foram considerados uma única vez. Os artigos inicialmente identificados nas bases de dados foram analisados a partir dos títulos e resumos, realizando-se uma primeira seleção.

Os artigos selecionados foram então lidos integralmente pela estudante e submetidos a uma nova etapa de exclusão, considerando-se os critérios de elegibilidade. Para guiar essa etapa, foi utilizada uma ficha de avaliação de elegibilidade (**Ficha A, Anexo 1**), padronizada e elaborada previamente, que contém basicamente os critérios de elegibilidade (inclusão e exclusão) estabelecidos. As divergências foram resolvidas por consenso, depois de nova crítica do artigo em questão junto à orientadora, sendo os artigos excluídos justificados.

Os textos finalmente selecionados, que consistiram nos resultados da pesquisa, foram relidos integralmente, avaliados, analisados (com extração dos dados relevantes) e sintetizados.

### ***Avaliação do nível de evidência dos estudos selecionados***

Nesta pesquisa, para avaliar as características metodológicas dos estudos primários selecionados na revisão, foram utilizados os critérios apresentados na **Tabela 5**, adaptados de STILLWELL et al., 2010.

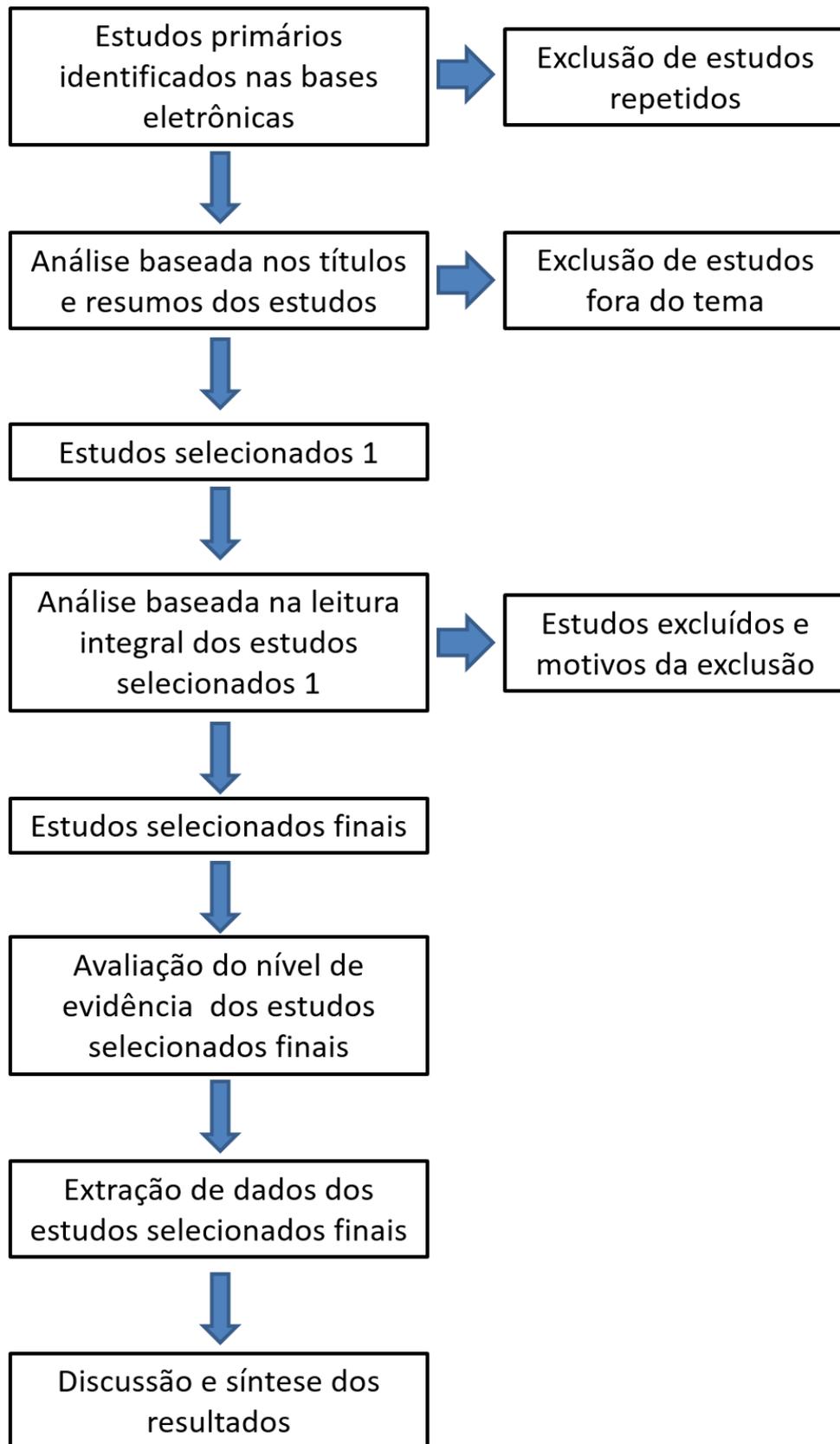
**Tabela 5:** Níveis de evidência das produções científicas selecionadas, adaptados de STILLWELL et al., 2010.

<b>Tipo de estudo</b>	<b>Nível de evidência</b>	<b>Descrição</b>
<b>Revisão sistemática do tipo metanálise</b>	I	Evidência proveniente de uma revisão sistemática do tipo metanálise de todos os estudos clínicos randomizados
<b>Ensaio clínico randomizado</b>	II	Evidência obtida de um estudo clínico aleatorizado, controlado e bem delineado
<b>Ensaio clínico não-randomizado</b>	III	Evidência proveniente de um estudo clínico controlado e bem delineado, mas sem aleatorização
<b>Estudo clínico caso-controle ou de coorte</b>	IV	Evidência proveniente de um estudo clínico do tipo caso-controle ou de coorte
<b>Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos que discutam a aplicabilidade clínica</b>	V	Evidência proveniente de uma revisão narrativa de estudos primários não clínicos
<b>Estudo qualitativo ou descritivo sobre a temática</b>	VI	Evidência de um único estudo descritivo ou qualitativo
<b>Estudo de opinião</b>	VII	Evidência proveniente de opinião de autoridades

### ***Extração de dados dos estudos***

Para extração sistemática dos dados dos estudos selecionados foi preenchida uma ficha específica para cada estudo, considerando-se as variáveis descritas na **Ficha B (Anexo 2)**. Essa extração de dados foi realizada pela estudante e revisada pela orientadora. As dúvidas e discordâncias foram resolvidas por consenso.

Uma vez extraídos os dados, foi feita síntese e discussão, com problematização e integração dos resultados. A **Figura 8** ilustra, na forma de fluxograma, a metodologia que foi usada nesta revisão sistemática integrativa.



**Figura 10:** Fluxograma que ilustra a metodologia utilizada nesta revisão sistemática.

## RESULTADOS

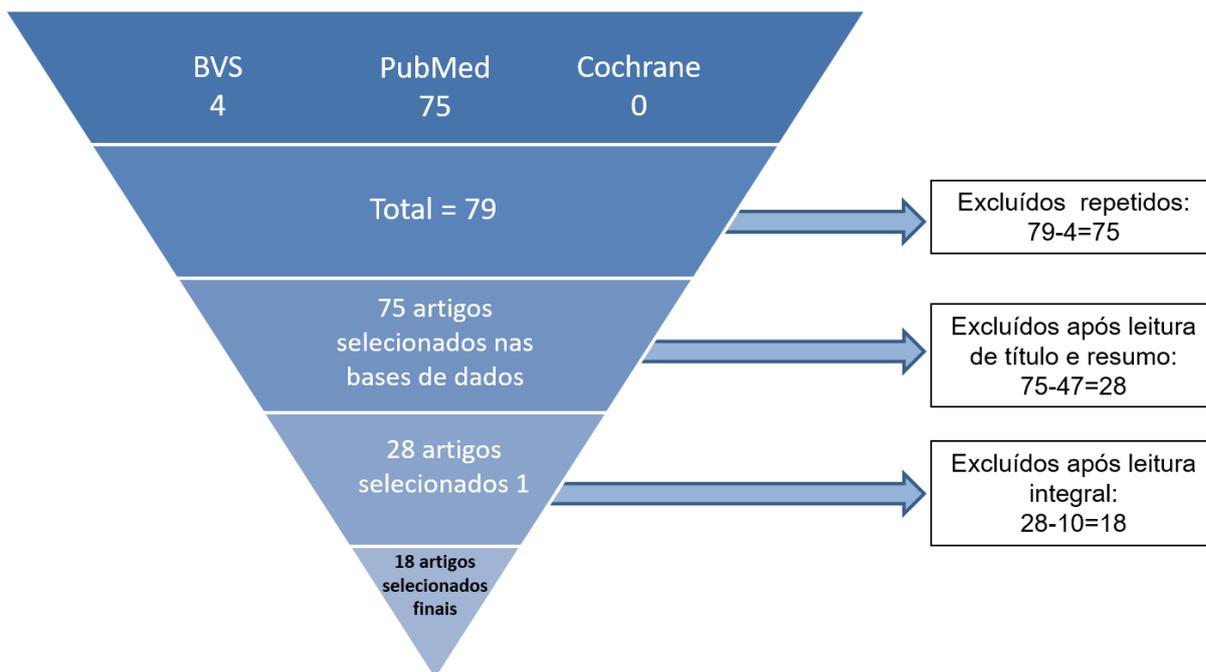
### *Identificação e seleção dos artigos*

A **Figura 11** sintetiza os resultados da busca e seleção de estudos primários nas bases de dados consideradas para esta revisão.

Após a elaboração da pergunta a ser respondida pela revisão e definição dos descritores, foi realizada a busca dos estudos primários nas três bases de dados definidas pelas pesquisadoras (*BVS*, *MEDLINE/PubMed* e *Cochrane*) com identificação de 79 estudos primários. Chama atenção que todos os 79 artigos estão em língua inglesa.

Os estudos encontrados inicialmente (N=79), após exclusão dos estudos repetidos (N=4;  $79-4=75$ ), foram avaliados pela estudante, com base no título e resumo, sendo selecionados aqueles que se aproximavam da temática desta revisão. Nessa etapa, foram excluídos 47 estudos (**Tabela 6**). Assim, permaneceram 28 estudos selecionados 1.

Os 28 estudos selecionados 1 foram lidos integralmente pela estudante e submetidos a novo processo de seleção. Para isso, foram preenchidas fichas de elegibilidade (**Ficha A, Anexo1**) de cada um destes 28 estudos. Nessa etapa, 10 estudos foram excluídos (**Tabela 7**) e, portanto, 18 estudos fazem parte dos estudos selecionados finais e compõem esta revisão (**Tabela 8**).



**Figura 11:** Síntese dos resultados de busca e seleção dos artigos.

A **Tabela 6** apresenta os títulos e bibliografia dos 47 artigos excluídos com base na leitura do título e do resumo, na primeira etapa da seleção dos estudos primários identificados nas bases de dados.

**Tabela 6:** Artigos excluídos com base nos títulos e resumos (N=47).

N	Título	Autores	Bibliografia	Justificativa da exclusão
1.	A natural regulatory mutation in the proximal promoter elevates fetal <i>globin</i> expression by creating a de novo GATA1 site.	Martyn GE, Wienert B, Kurita R, et al.	Blood 2019; 133(8):852-856.	O estudo foi feito <i>in vitro</i> em modelos celulares.
2.	Treating Genetic Disorders Using State-Of-The-Art Technology.	Jamal M, Ullah A, Ahsan M, et al.	Current Issues in Molecular Biology 2018; 26: 33-46.	O estudo aborda apenas a técnica de CRISPR e suas aplicações, não específica na anemia falciforme.
3.	Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics in vivo: advances and challenges.	Luther DC, Lee YW, Nagaraj H, et al.	Expert Opinion on Drug Delivery 2018; 15(9):905-913.	O estudo aborda apenas a técnica de CRISPR e suas aplicações, não específica na anemia falciforme.
4.	The promise and challenge of therapeutic genome editing.	Doudna JA.	Nature 2020; 578(7794):229-236.	Abordagem superficial sobre as técnicas de edição genômica. Não

				especifica em anemia falciforme.
5.	Genome editing of HBG1 and HBG2 to induce fetal hemoglobin.	Métais JY, Doerfler PA, Mayuranathan T, et al.	Blood advances 2019;12;3(21):3379-3392	O estudo foi feito <i>in vivo</i> porém em camundongos.
6.	Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human $\beta$ -globin locus.	Antoniani C, Meneghini V, Lattanzi A, et al.	Blood 2018; 131(17):1960-1973.	O estudo foi desenvolvido em modelos celulares.
7.	Direct promoter repression by BCL11A controls the fetal to adult hemoglobin switch.	Liu N, Hargreaves VV, Zhu Q, et al.	Cell 2018; 173(2):430-442.	O estudo não aborda a técnica de CRISPR e foi desenvolvido em modelos celulares.
8.	Highly efficient editing of the $\beta$ -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease.	Park SH, Lee CM, Dever DP, et al.	Nucleic acids research 2019; 47(15):7955-7972.	O estudo foi desenvolvido em camundongos.
9.	CRISPR-Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells.	Bak RO, Dever DP, Porteus MH.	Nature protocols 2018; 13(2):358-376.	O estudo foi desenvolvido em camundongos.
10.	Domain-focused CRISPR screen identifies HRI as a fetal hemoglobin regulator in human erythroid cells.	Grevet JD, Lan X, Hamagami N, et al.	Science 2018; 361(6399):285-290.	A pesquisa foi feita em culturas celulares.
11.	Enhancement of red blood cell transfusion compatibility using CRISPR-mediated erythroblast gene editing.	Hawthornth J, Satchwell TJ, Meinders M, et al.	EMBO molecular medicine 2018; 10(6):e8454.	O estudo foi feito em modelos celulares.
12.	A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells.	Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR, et al.	Nature Medicine 2018; 24(8):1216-1224.	O estudo foi feito em modelos celulares.
13.	CRISPR-CAS9 mediated correction of the sickle mutation in human CD34+ cells.	Hoban MD, Lumaquin D, Kuo CY, et al.	Molecular Therapy: The Journal of The American Society of Gene Therapy 2016; 24(9):1561-9.	O estudo foi desenvolvido <i>in vitro</i> e limitou-se a modelos celulares.
14.	EHMT1 and EHMT2 inhibition induces fetal hemoglobin expression.	Renneville A, Van Galen P, Canver MC, et al.	Blood 2015; 126(16):1930-9.	O estudo foi desenvolvido em roedores.
15.	Targeted deletion of BCL11A gene by CRISPR-Cas9 system for fetal hemoglobin reactivation: A promising approach for gene therapy of beta thalassemia disease.	Khosravi MA, Abbasalipour M, Concordet JP, et al.	European Journal of Pharmacology 2019; 854:398-405.	A pesquisa foi feita em modelos celulares.
16.	Optimization of CRISPR/Cas9 Delivery to Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Therapeutic Genomic Rearrangements.	Lattanzi A, Meneghini V, Pavani G, et al.	Molecular Therapy: The Journal of The American Society of Gene Therapy 2019; 27(1):137-150.	A pesquisa foi desenvolvida em modelos celulares.
17.	A Universal Approach to Correct Various HBB Gene Mutations in Human Stem Cells for Gene Therapy of Beta-Thalassemia and Sickle Cell Disease.	Cai L, Bai H, Mahairaki V, et al.	Stem Cells Translational Medicine 2018; 7(1):87-97.	A pesquisa limitou-se a nível celular.

18.	Editing the Sickle Cell Disease Mutation in Human Hematopoietic Stem Cells: Comparison of Endonucleases and Homologous Donor Templates.	Romero Z, Lomova A, Said S, et al.	Molecular Therapy: The Journal of The American Society of Gene Therapy 2019; 27(8):1389-1406.	O estudo foi desenvolvido em camundongos.
19.	Highly Efficient and Marker-free Genome Editing of Human Pluripotent Stem Cells by CRISPR-Cas9 RNP and AAV6 Donor-Mediated Homologous Recombination.	Martin RM, Ikeda K, Cromer MK, et al.	Cell Stem Cell 2019; 24(5):821-828.	O estudo foi desenvolvido em modelos celulares.
20.	CRISPR/Cas System for Genome Editing: Progress and Prospects as a Therapeutic Tool.	Sahel DK, Mittal A, Chitkara D.	The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2019; 370(3):725-735.	Estudo não experimental e superficial sobre a temática. Não especifica em anemia falciforme.
21.	Double-blind, randomized, multicenter phase 2 study of SC411 in children with sickle cell disease (SCOT trial).	Daak AA, Dampier CD, Fuh B, et al.	Blood advances 2018; 2(15):1969-1979.	A pesquisa não aborda CRISPR mas sim a administração de medicamentos.
22.	<i>Francisellanicida</i> Cas9 interrogates genomic DNA with very high specificity and can be used for mammalian genome editing.	Acharya S, Mishra A, Paul D, et al.	Proceeding of the National Academy of Science of The United States of America 2019; 116(42):20959-20968.	O estudo não foi feito/discutido em humanos.
23.	Using nanoBRET and CRISPR/Cas9 to monitor proximity to a genome-edited protein in real-time.	White CW, Vanyai HK, See HB, et al.	Scientific Reports 2019; 7(1):3187.	O estudo não aborda a anemia falciforme.
24.	CRISPR-Cas9 interrogation of a putative fetal globin repressor in human erythroid cells.	Chung JE, Magis W, Vu J, et al.	PLoSOne 2017; 14(1):e0208237.	A pesquisa foi feita em células.
25.	Reactivation of $\gamma$ -globin in adult $\beta$ -YAC mice after ex vivo and in vivo hematopoietic stem cell genome editing.	Li C, Psatha N, Sova P, et al.	Blood 2018; 131(26):2915-2928.	A pesquisa foi feita em camundongos.
26.	Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs.	Miller SM, Wang T, Randolph PB, et al.	Nature Biotechnology 2020; 38(4):471-481.	O estudo conduzido em células.
27.	Development of gene editing strategies for human $\beta$ -globin (HBB) gene mutations.	Kalkan BM, Kala EY, Yuce M, et al.	Gene 2020; 734:144398.	O estudo foi feito em células.
28.	The HRI-regulated transcription factor ATF4 activates BCL11A transcription to silence fetal hemoglobin expression.	Huang P, Peslak SA, Lan X, et al.	Blood 2020; 135(24):2121-2132.	O estudo foi feito em camundongos.
29.	In Vivo Outcome of Homology-Directed Repair at the HBB Gene in HSC Using Alternative Donor Template Delivery Methods.	Pattabhi S, Lotti SN, Berger MP, et al.	Molecular Therapy, Nucleic Acids 2019; 17:277-288.	O estudo foi feito em camundongos.
30.	The E3 ligase adaptor molecule SPOP regulates fetal hemoglobin levels in adult erythroid cells.	Lan X, Khandros E, Huang P, et al.	Blood advances 2019; 3(10):1586-1597.	O estudo foi feito em células.
31.	Rapid and Sensitive Assessment of Globin Chains for Gene and Cell Therapy of Hemoglobinopathies.	Loucarl CC, Patsali P, van Dijk TB, et al.	Human Gene Therapy Methods 2019; 29(1):60-74.	A pesquisa foi feita <i>in vitro</i> em células humanas mas posteriormente <i>in vivo</i> em camundongos.

32.	A chance to cut (the genome) is a chance to cure.	Montbleau KE, Sankaran VG.	Blood 2018; 131(17):1884-1885	Abordagem superficial sobre a temática e suas possibilidades. Não específica em anemia falciforme.
33.	Harnessing the potential of gene editing technology using CRISPR in inflammatory bowel disease.	Limanskiy V, Vyas A, Chaturvedi LS, et al.	World Journal of Gastroenterology 2019; 25(18):2177-2187	A anemia falciforme não é abordada no estudo.
34.	Cellular function reinstatement of offspring red blood cells cloned from the sickle cell disease patient blood post CRISPR genome editing.	Wen J, Tao W, Hao S, Zu Y.	Journal of Hematology and Oncology 2017; 10(1):119.	A pesquisa foi feita em células.
35.	Novel HDAd/EBV Reprogramming Vector and Highly Efficient Ad/CRISPR-Cas Sickle Cell Disease Gene Correction.	Li C, Ding L, Sun CW, et al.	Science Reports 2016; 6:30422.	A pesquisa foi feita em células.
36.	Interventions for preventing silent cerebral infarcts in people with sickle cell disease.	Estcourt LJ, Fortin PM, Hopewell S, et al.	The Cochrane database of systematic reviews 2020; 6;4(4):CD012389.	A pesquisa não aborda CRISPR.
37.	Building access to care in adult sickle cell disease: defining models of care, essential components, and economic aspects.	Kanter J, Smith WR, Desai PC, et al.	Blood Advances 2020; 4(16):3804-3813	A pesquisa não aborda CRISPR.
38.	HDAd5/35 ++ Adenovirus Vector Expressing Anti-CRISPR Peptides Decreases CRISPR/Cas9 Toxicity in Human Hematopoietic Stem Cells.	Li C, Psatha N, Gil S, et al.	Molecular Therapy. Methods and Clinical Development 2018; 9:390-401	Pesquisa feita a nível celular e em camundongos.
39.	Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sickle Point Mutation.	Huang X, Wang Y, Yan W, et al.	Stem Cell 2015; 33(5):1470-9	Estudo feito em células e sem discussão da aplicação clínica.
40.	Recent advances in globin research using genome-wide association studies and gene editing.	Orkin SH.	Annals of New York Academy of Science 2016; 1368(1):5-10	A pesquisa é sobre talassemias.
41.	Genetic disruption of the KLF1 gene to overexpress the $\gamma$ -globin gene using the CRISPR/Cas9 system.	Shariati L, Khanahmad H, Salehi M, et al.	The Journal of Gene Medicine 2016; 18(10):294-301.	A pesquisa não aborda anemia falciforme.
42.	In vivo Modeling Implicates APOL1 in Nephropathy: Evidence for Dominant Negative Effects and Epistasis under Anemic Stress.	Anderson BR, Howell DN, Soldano K, et al.	PLoS Genetics 2015; 11(7):e1005349.	O estudo é sobre os possíveis tratamentos de doenças renais.
43.	Looking into a Crystal Ball: An Interview with Ron Crystal.	Davies K.	Human Gene Therapy. Clinical Development 2019; 30(3):97-101	Temática do artigo não é explícita.
44.	In Vivo HSC Gene Therapy Using a Bi-modular HDAd5/35++ Vector Cures Sickle Cell Disease in a Mouse Model.	Li C, Wang H, Georgakopoulou A, et al.	Molecular Therapy 2020; 5:S1525-0016(20)30458-5.	A pesquisa foi conduzida em camundongos.

45.	Supramolecular nanosubstrate-mediated delivery system enables CRISPR-Cas9 knockin of hemoglobin beta gene for hemoglobinopathies.	Yang P, Chou SJ, Li J, et al.	Science advances 2020; 6(43):eabb7107	A pesquisa foi conduzida em camundongos.
46.	Viral myocarditis involves the generation of autoreactive T cells with multiple antigen specificities that localize in lymphoid and non-lymphoid organs in the mouse model of CVB3 infection.	Basavalingappa RH, Arumugam R, Lasrado N, et al.	Molecular Immunology 2020; 124:218-228.	A pesquisa foi feita em camundongos e não há abordagem quanto à Anemia Falciforme nem quanto á CRISPR.
47.	Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of BCL11A or ZBTB7A binding.	Martyn GE, Wienert B, Yang L, et al.	Nature Genetics 2018; 50(4):498-503.	O estudo foi feito em nível celular.

A **Tabela 7** apresenta os 10 artigos excluídos após leitura integral do texto.

**Tabela 7:** Artigos excluídos após leitura integral do texto (N=10).

N	Título	Autores	Bibliografia	Justificativa da exclusão
1.	Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells.	Wu Y, Zeng J, Roscoe BP, et al.	Nature Medicine 2019; 25(5):776-783.	O estudo foi conduzido em camundongos.
2.	CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells.	Dever DP, Bak RO, Reinisch A, et al.	Nature 2016; 539(7629):384-389.	O transplante das células hematopoiética foi feito em camundongos.
3.	A genome-editing strategy to treat $\beta$ -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition.	Traxler EA, Yao Y, Wang YD, et al.	Nature Medicine 2016; 22(9):987-90.	Não houve ensaio clínico, apenas celular.
4.	Genome editing using CRISPR-Cas9 to create the HPFH genotype in HSPCs: An approach for treating sickle cell disease and $\beta$ -thalassemia.	Ye L, Wang J, Tan Y, et al.	Proceeding of the National Academy of Science of The United States of America 2016; 113(38):10661-5 .	Não houve ensaio clínico, apenas celular.
5.	A Comprehensive, Ethnically Diverse Library of Sickle Cell Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells.	Park S, Gianotti-Sommer A, Molina-Estevez FJ, et al.	Stem Cell Reports 2017; 8(4):1076-1085.	Não houve ensaio clínico, apenas celular.
6.	Efficient Delivery and Nuclear Uptake Is Not Sufficient to Detect Gene Editing in CD34+ Cells Directed by a Ribonucleoprotein Complex.	Modarai SR, Man D, Bialk P, et al.	Molecular Therapy. Nucleic Acids 2018; 11:116-129.	O estudo foi feito em células de mamíferos.

7.	Gene correction in patient-specific iPSCs for therapy development and disease modeling.	Jang YY, Ye Z.	Human Genetics 2016; 135(9):1041-58.	Não aborda especificamente a CRISPR e não apresenta ensaios clínicos.
8.	Recent trends in the gene therapy of $\beta$ -thalassemia.	Finotti A, Breda L, Lederer CW, et al.	Journal of Blood Medicine 2015; 6:69-85.	O estudo aborda beta-talasseмии e o ensaio foi feito em camundongos.
9.	Editing a $\gamma$ -globin repressor binding site restores fetal hemoglobin synthesis and corrects the sickle cell disease phenotype.	Weber L, Frati G, Felix T, et al.	Science Advances 2020; 6(7):eaay9392.	O transplante das células foi feito para camundongos.
10.	Precise and error-prone CRISPR-directed gene editing activity in human CD34+ cells varies widely among patient samples.	Modarai SR, Kanda S, Bloh K, et al.	Gene Therapy 2020 (Online ahead of print)	O estudo não apresenta ensaios clínicos, apenas celular.

A **Tabela 8** apresenta os 18 artigos selecionados finais e incluídos nesta revisão.

**Tabela 8:** Artigos selecionados finais (N=18).

N	Título	Autores	Bibliografia
1.	Sharpening the Molecular Scissors: Advances in Gene-Editing Technology.	Broeders M, Herrero-Hernandez P, Ernst MPT, van der Ploeg AT, Pijnappel WWMP.	iScience 2020; 23(1):100789
2.	Engineering Globin Gene Expression.	Davis R, Gurumurthy A, Hossain MA, Gunn EM, Bungert J.	Molecular Therapy. Methods and clinical development 2018; 12:102-110.
3.	Ready for Repair? Gene Editing Enters the Clinic for the Treatment of Human Disease.	Ernst MPT, Broeders M, Herrero-Hernandez P, Oussoren E, van der Ploeg AT, Pijnappel WWMP.	Molecular Therapy. Methods and Clinical Development 2020; 18:532-557.
4.	Genome and Epigenome Editing to Treat Disorders of the Hematopoietic System.	Mussolino C, Alzubi J, Pennucci V, Turchiano G, Cathomen T.	Human Gene Therapy 2017; 28(11):1105-1115
5.	Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease.	Tasan I, Jain S, Zhao H.	Human genetics 2016; 135(9): 1011-28.
6.	CRISPR/Cas9 for Sickle Cell Disease: Applications, Future Possibilities, and Challenges.	Demirci S, Leonard A, Haro-Mora JJ, Uchida N, Tisdale JF.	Advances in Experimental Medicine and Biology 2019; 1144:37-52.

7.	Gene therapy for sickle cell disease: An update.	Demirci S, Uchida N, Tisdale JF.	Cytotherapy 2018; 20(7):899-910.
8.	Emerging genetic therapy for sickle cell disease.	Orkin SH, Bauer DE.	Annual review of medicine 2019; 70:257-271.
9.	Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for $\beta$ -Hemoglobinopathies.	Wienert B, Martyn GE, Funnell APW, Quinlan KGR, Crossley M.	Trends in Genetics 2018; 34(12):927-940.
10.	Perspectives of Sickle Cell Disease Stakeholders on Heritable Genome Editing.	Hollister BM, Gatter MC, Abdallah KE, Armsby AJ, Buscetta AJ, Byeon YJJ, Cooper KE, Desine S, Persaud A, Ormond KE, Bonham VL.	The CRISPR Journal 2019; 2(6):441-449.
11.	Improving the justice-based argument for conducting human gene editing research to cure sickle cell disease.	Chan B.	Bioethics 2020; 34(2):200-202.
12.	A CRISPR focus on attitudes and beliefs toward somatic genome editing from stakeholders within the sickle cell disease community.	Persaud A, Desine S, Blizinsky K, Bonham VL.	Genetics in Medicine 2019; 21(8):1726-1734.
13.	A justice-based argument for including sickle cell disease in CRISPR/Cas9 clinical research.	Baffoe-Bonnie MS.	Bioethics 2019; 33(6):661-668.
14.	The Meaning of Informed Consent: Genome Editing Clinical Trials for Sickle Cell Disease.	Desine S, Hollister BM, Abdallah KE, Persaud A, Hull SC, Bonham VL.	AJOB empirical bioethics 2020; 11(4):195-207.
15.	Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives.	Hirakawa MP, Krishnakumar R, Timlin JA, Carney JP, Butler KS.	Bioscience Reports 2020; 40(4):BSR20200127
16.	Efficient CRISPR/Cas9-based gene correction in induced pluripotent stem cells established from fibroblasts of patients with sickle cell disease.	Sato M, Saitoh I, Inada E.	Stem Cell Investig. 2016; 3:78.
17.	CRISPR/Cas9 system and its applications in human hematopoietic cells.	Hu X.	Blood cells, molecules and diseases 2016; 62:6-12.
18.	CRISPR in personalized medicine: Industry perspectives in gene editing.	Hong A.	Seminars in Perinatology 2018; 42(8):501-507.

### ***Avaliação do nível de evidência dos estudos selecionados***

Os 18 artigos selecionados finais foram avaliados com base nos níveis de evidência que estão na **Tabela 5** (metodologia) a partir dos critérios adaptados de STILLWELL et al. (2010).

A **Tabela 9** sintetiza esses resultados sobre os níveis de evidência dos 18 estudos selecionados finais. Observa-se que 12 artigos possuem nível de evidência V porque são revisões narrativas de estudos in vitro ou pré-clínicos que discutem a aplicabilidade clínica; 4 estudos possuem nível de evidência VI porque são estudos qualitativos ou descritivos sobre a temática; e 2 estudos possuem nível de evidência VII porque são estudos de opinião.

### ***Extração de dados dos estudos***

A extração de dados dos artigos selecionados finais foi elaborada com base na **Ficha B (Anexo 2)**.

Os dados extraídos dos 18 artigos selecionados finais são apresentados sinteticamente a seguir, na **Tabela 10**.

**Tabela 9:** Qualidade da evidência dos 18 artigos selecionados, de acordo com critérios adaptados de STILLWELL et al., 2010.

ARTIGOS	AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE EVIDÊNCIA		
	TIPO DE ESTUDO	NÍVEL DE EVIDÊNCIA	JUSTIFICATIVA
1. Sharpening the molecular scissors: advances in gene-editing technology.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Este estudo teórico é uma revisão narrativa baseada em estudos in vitro que abordaram os avanços tecnológicos de meganucleases, ZFNs, TALENs e CRISPR, assim como os desafios para a implementação das mesmas no tratamento de beta-talassemia, anemia falciforme, HIV, câncer e entre outras doenças.
2. Engineering globin gene expression.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Com base em outros estudos primários, este estudo teórico descreve e compara os procedimentos de engenharia genética que têm potencial para se tornarem terapias seguras e eficientes para o tratamento de hemoglobinopatias.
3. Ready for Repair? Gene editing enters the clinic for the treatment of human disease.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Este estudo teórico apresenta uma revisão sobre ensaios clínicos, ex vivo e in vivo, nos quais CRISPR, TALENs e ZFNs são usados para o tratamento de HIV, câncer, beta-talassemia e anemia falciforme.
4. Genome and epigenome editing to treat disorders of the hematopoietic system.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Nesta revisão narrativa são apresentados os fundamentos da edição genômica, bem como o estado atual na área da pesquisa, com base em outros estudos primários. Este estudo foca nos avanços feitos na implementação de nucleases em células tronco para o tratamento de imunodeficiências e hemoglobinopatias.
5. Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Esta revisão narrativa discute o uso de nucleases CRISPR-Cas9, ZFNs e TALENs para o tratamento da anemia falciforme, o uso das mesmas para a indução da hemoglobina fetal e faz uma comparação entre as três técnicas.
6. CRISPR/Cas9 for Sickle Cell Disease: Applications, Future	Revisão narrativa de	V	Esta revisão narrativa apresenta a engenharia genética, bem como o seu uso, para o tratamento da anemia falciforme.

Possibilities, and Challenges.	estudos in vitro ou pré-clínicos		
7. Gene therapy for sickle cell disease: An update.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Nesta revisão narrativa são abordadas terapias gênicas ex vivo nas quais a CRISPR-Cas9 foi usada em iPSCs e HSPCs para o tratamento da anemia falciforme, bem como as limitações para o avanço clínico.
8. Emerging genetic therapy for sickle cell disease.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Esta revisão narrativa apresenta e discute três possíveis mecanismos nos quais a CRISPR-Cas9 pode ser usada para o tratamento da anemia falciforme: terapia genética em células hematopoiéticas, edição genética para corrigir a mutação e manipulação genética para induzir a produção de hemoglobina fetal.
9. Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for $\beta$ -Hemoglobinopathies.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Esta revisão narrativa discute novas descobertas referentes ao uso de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme, focando nos genes da hemoglobina fetal de modo a serem reativados na fase adulta e induzir a sua expressão.
10. Perspectives of Sickle Cell Disease Stakeholders on Heritable Genome Editing.	Estudo qualitativo ou descritivo sobre a temática	VI	O público participante deste estudo qualitativo foi a comunidade da anemia falciforme (pacientes e familiares), bem como investigadores e profissionais de saúde. Os dados foram coletados por meios de grupos focais. O estudo apresenta as perspectivas dos participantes no que diz respeito à edição genética para o tratamento da anemia falciforme.
11. Improving the justice-based argument for conducting human gene editing research to cure sickle cell disease.	Estudo de opinião (comentário)	VII	A autora deste estudo de opinião (um comentário) apresenta argumentos para defender o uso de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme. Discute-se que essa terapia ajudaria a minimizar as injustiças que as comunidades afetadas por esta hemoglobinopatia enfrentam, tanto na área da pesquisa quanto na área da assistência à saúde.
12. A CRISPR focus on attitudes and beliefs toward somatic genome editing from stakeholders within the sickle cell disease community.	Estudo qualitativo ou descritivo sobre a temática	VI	Os participantes deste estudo qualitativo foram pacientes com anemia falciforme, seus pais e seus médicos. Os dados foram coletados por meio de grupos focais. O estudo faz um levantamento das perspectivas de pacientes, pais e médicos acerca do uso de CRISPR-Cas9 em ensaios clínicos para o tratamento da anemia falciforme.

13. A justice-based argument for including sickle cell disease in CRISPR/Cas9 clinical research.	Estudo qualitativo ou descritivo sobre a temática	VI	Este estudo descritivo reflete sobre as questões éticas relacionadas ao uso de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme bem como o histórico sócio-político que impede o mesmo.
14. The Meaning of Informed Consent: Genome Editing Clinical Trials for Sickle Cell Disease.	Estudo qualitativo ou descritivo sobre a temática	VI	Este estudo qualitativo teve como objetivo apresentar a pacientes com anemia falciforme, pais e profissionais de saúde os fundamentos da edição genética, bem como suas questões éticas envolvidas no procedimento. Os dados foram coletados por meio de grupos focais. Foi feito um levantamento sobre a pré-disposição para participar ou não de um ensaio clínico envolvendo CRISPR-Cas9 no tratamento de anemia falciforme.
15. Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Nesta revisão narrativa é abordado o uso de CRISPR-Cas9, ZFNs e TALENs no tratamento de câncer e anemia falciforme. O estudo apresenta também os desafios da terapia genética in vivo e perspectivas futuras.
16. Efficient CRISPR/Cas9-based gene correction in induced pluripotent stem cells established from fibroblasts of patients with sickle cell disease.	Estudo de opinião (editorial)	VII	Este editorial apresenta as perspectivas de cientistas envolvidos em estudos que abordam o uso de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme, tanto em iPSCs quanto em HSPCs.
17. CRISPR/Cas9 system and its applications in human hematopoietic cells.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Esta revisão narrativa aborda a descoberta de CRISPR-Cas9 e suas aplicações, bem como de outras nucleases (TALENs e ZFNs), na edição genética de células tronco hematopoiéticas para o tratamento de anemia falciforme e HIV.
18. CRISPR in personalized medicine: Industry perspectives in gene editing.	Revisão narrativa de estudos in vitro ou pré-clínicos	V	Esta revisão narrativa, baseada em outros estudos primários, discute o potencial clínico no uso da CRISPR-Cas9 em terapia humana, bem como seus desafios.

**Tabela 10:** Informações relativas aos 18 artigos selecionados.

Nº	Título	Síntese do artigo
1.	Sharpening the molecular scissors: advances in gene-technology.	O uso de CRISPR-Cas9 para o tratamento da anemia falciforme ex vivo permite maior controle de qualidade quanto à toxicidade, porém requer que o transplante de células seja bastante eficiente. Enquanto que terapias in vivo estão mais sujeitas à efeitos off-target (mutações fora de alvo).
2.	Engineering globin gene expression.	Inibidor de LSD1 e HRI induzem a expressão de hemoglobina fetal.
3.	Ready for repair? Gene editing enters the clinic for the treatment of human disease.	Os autores defendem que NHEJ é mais eficiente que HDR e que ambos são métodos promissores para o tratamento da anemia falciforme, reprimindo reguladores (BCL11A) que impedem a expressão da HbF.
4.	Genome and epigenome editing to treat disorders of the hematopoietic system.	Os autores defendem que CRISPR-Cas9 é mais eficiente que ZFNs e TALENs no que diz respeito ao potencial da aplicação clínica.
5.	Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease.	CRISPR-Cas9 apresenta um grande potencial para o tratamento de anemia falciforme bem como a indução de HbF, aliviando dessa forma as complicações clínicas da doença. O uso de edição gênica em HSCs é ineficiente. Efeitos off-target (mutações fora do alvo), métodos seguros de transplante de células e redução de toxicidade são aspectos que precisam ser melhorados.
6.	CRISPR/Cas9 for Sickle Cell Disease: Applications, Future Possibilities, and Challenges.	CRISPR-Cas9 apresenta um grande potencial clínico no tratamento da anemia falciforme.
7.	Gene therapy for sickle cell disease: An update.	Altos níveis de expressão de anti-slicking de beta globina e alta expressão de HbF através da co-herança de HBFH podem diminuir as complicações da doença.
8.	Emerging genetic therapy for sickle cell disease.	CRISPR-Cas9 apresenta um grande potencial clínico para o tratamento da anemia falciforme.
9.	Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for $\beta$ -Hemoglobinopathies.	Mutações que causam a expressão de HbF podem diminuir as complicações da anemia falciforme.
10.	Perspectives of Sickle Cell Disease Stakeholders on Heritable Genome Editing.	Investigadores apoiam o uso de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme tanto quanto profissionais de saúde, porém mais que o público em geral.

11.	Improving the justice-based argument for conducting human gene editing research to cure sickle cell disease.	A autora defende que o uso da CRISPR-Cas9 trará melhor qualidade de vida a quem é afetado pela doença; além disso a doença terá mais atenção de pesquisadores e profissionais de saúde.
12.	A CRISPR focus on attitudes and beliefs toward somatic genome editing from stakeholders within the sickle cell disease community.	Os participantes do estudo expressaram alguma esperança pois acreditam que o uso de CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme pode revolucionar o curso da doença. Mas apresentam preocupações no que diz respeito aos resultados de ensaios clínicos, bem como seu envolvimento.
13.	A justice-based argument for including sickle cell disease in CRISPR/Cas9 clinical research.	O uso da biotecnologia pode mudar o curso histórico que impede avanços no tratamento da anemia falciforme através da CRISPR-Cas9.
14.	The Meaning of Informed Consent: Genome Editing Clinical Trials for Sickle Cell Disease.	Investigadores preocupam-se com os efeitos colaterais do tratamento da anemia falciforme através da CRISPR-Cas9, mecanismo de ação, critérios de seleção para participação em ensaios clínicos e o impacto na qualidade de vida dos doentes.
15.	Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives.	A segurança e eficiência do uso da CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme in vivo ainda precisa ser discutida, bem como a eficiência do transplante, apesar de todos avanços que esta técnica apresentou ao longo dos anos. Os efeitos off-target (mutações fora do alvo) podem afetar tecidos e órgãos, representando um risco.
16.	Efficient CRISPR/Cas9-based gene correction in induced pluripotent stem cells established from fibroblasts of patients with sickle cell disease.	Comparando iPSCs e HSPCs, iPSCs são mais eficientes quanto a diferenciação podendo ser um melhor alvo para a correção da mutação e indução da expressão de HbF.
17.	CRISPR/Cas9 system and its applications in human hematopoietic cells.	CRISPR-Cas9 é simples, eficiente e apresenta versatilidade quanto à manipulação genética. Usando iPSCs e através de CRISPR-Cas9 foi-se capaz de corrigir mutações, permitir com que as iPSCs se diferenciem em eritrócitos maduros e expressem altos níveis de HbF. A eficiência do transplante de células, de modo a evitar rejeição e risco aos pacientes, precisa ser estudada.
18.	CRISPR in personalized medicine: Industry perspectives in gene editing.	O uso de CRISPR-Cas9 na área clínica necessita da aprovação do FDA e de uma série de procedimentos burocráticos ainda a serem cumpridos.

## DISCUSSÃO

Quando se desenhou o projeto desta revisão sistemática, 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 analisar e avaliar manifestações clínicas da doença pós intervenção, como infartos vaso-oclusivos, dactilite, asplenia funcional, bem como a qualidade de vida e as taxas de morbimortalidade. Porém, não 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 tratamento 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.

Foram localizados três ensaios clínicos em condução no momento utilizando CRISPR-Cas9 em pacientes com hemoglobinopatias: dois em pacientes com beta-talassemia ([NCT03728322](#) - ALLIFE MEDICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY CO. LTD, 2018 e [NCT03655678](#) - VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED, 2018a) e um terceiro em pacientes com anemia falciforme ([NCT03745287](#) - VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED, 2018b). O estudo NCT03728322, 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 Vetex - NCT03655678 e NCT03745287 – 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 2020 (FRANGOUL et al., 2020). 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 novembro de 2020.

O estudo mencionado acima (FRANGOUL et al., 2020) 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, restaurar 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 período 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 resultado bastante gratificante, tratando-se de uma das manifestações da doença que pode resultar em derrames, síndrome torácica aguda, necrose papilar renal, auto-esplenectomia, úlceras nas pernas, priapismo, necrose óssea asséptica e perda visual. Segundo os autores, ainda é um desafio o uso de células-tronco derivadas do próprio paciente para corrigir a mutação (FRANGOUL et al., 2020). 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. Este estudo 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 eficácia de ambos tratamentos e qual deles proporciona maior síntese de hemoglobina fetal.

Na maioria dos estudos do tipo “revisão narrativa” selecionados nesta revisão sistemática (TASAN et al., 2016; HU, 2016; DEMIRCI et al., 2017; MUSSOLINO et al., 2017; HONG, 2018; DAVIS et al. 2018; DEMIRCI et al., 2018; BROEDERS et al., 2020; ERNST et al., 2020; ORKIN e BAUER, WIENERT et al., 2020; HIRAKAWA et al., 2020) 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.

Dos artigos selecionados finais, três deles são estudos qualitativos (HOLLISTER et al., 2019; PERSAUD et al., 2019; DESINE et al., 2020) 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. 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.

O estudo original descritivo sobre a temática (BAFFOE-BONNIE, 2019), bem como os de opinião (SATO et al., 2016; CHAN, 2020), mostram que o uso da CRISPR-Cas9 no tratamento da anemia falciforme trará impactos históricos e sociais para a sociedade de um modo geral, mudando o percurso desta doença na área clínica (no que diz respeito à relação paciente-profissional de saúde, no tratamento) e

na pesquisa. Reverter a mutação causadora da anemia falciforme pode ser uma forma de permitir o tratamento, criando alguma possibilidade de erradicar esta doença.

Pensando na prevenção, é muito importante também a atuação de programas de rastreio populacional, como o PNTN do Brasil, que possibilitam oferecer aconselhamento genético para indivíduos heterozigotos. Há que se analisar também a acessibilidade à cuidados de saúde em regiões remotas tanto para diagnóstico como para prevenção terciária e tratamento da doença (DINIZ e GUEDES, 2006). Tudo isso, favorece potencializar esforços na pesquisa com relação aos ensaios clínicos.

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. É importante que se atente ao uso desta técnica para benefício da sociedade como um todo (por exemplo, tratamento de doenças) e não para benefício próprio ou para gerar capital. Outra reflexão que surge é sobre quão invasivo é o procedimento, se vai contra os princípios religiosos/culturais e em que etapa de vida do indivíduo seria permitido usar esta técnica: na fase adulta, na infância ou mesmo na fase embrionária. No caso de menores de idade, questiona-se também se seria justo e suficiente apenas o consentimento dos familiares ou se instâncias jurídicas precisariam ser acionadas. Outra questão que surge quanto ao uso desta técnica em seres humanos e talvez até seja um dos impasses para o avanço na pesquisa e medicina é a frequência com que podem ocorrer as mutações fora de alvo podendo causar fenótipos indesejados. Pesquisadores, pacientes, seus familiares, profissionais de saúde e a sociedade em geral têm algum receio quanto às implicações e possíveis consequências do uso desta tecnologia para o tratamento de doenças.

## CONCLUSÕES

Melhorias precisam ser feitas tanto na área de pesquisa quanto na área da assistência à saúde aos pacientes com anemia falciforme.

Os estudos in vivo (em modelos animais) e in vitro desenvolvidos até então demonstram que existe grande potencial no uso desta técnica para o tratamento da anemia falciforme. 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.

É necessário educar a população quanto aos fundamentos da edição gênica, de forma a quebrar os tabus quanto à temática, facilitando dessa forma a aceitação e a disponibilidade da mesma em relação aos ensaios clínicos.

Uma preocupação adicional é a regularização ética do uso desta tecnologia em seres humanos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLIFE MEDICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY CO. LTD. iHSCs With the Gene Correction of HBB Intervent Subjects With  $\beta$ -thalassemia Mutations. **ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03728322**, 2018. [Internet] Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03728322>. Acesso em: 06 dez. 2020.
2. BAFFOE-BONNIE M. S. A justice-based argument for including sickle cell disease in CRISPR/Cas9 clinical research. **Bioethics.**, v. 33, n. 6, p. 661-668, 2019.
3. BIBLIOTECA PROF. PAULO DE CARVALHO MATTOS. Tipos de revisão de literatura, 2015. Disponível em: <https://www.fca.unesp.br/Home/Biblioteca/tipos-de-revisao-de-literatura.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2020.
4. BOLOTIN, A. et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology (Reading, England)**, v. 151, n. 8, p. 2551-2561, 2005.
5. BOTELHO, L. L.R.; CUNHA, C. C. Al.; MACEDO, M. O método da revisão integrativa nos estudos organizacionais. **Gestão e Sociedade.-Belo Horizonte**, v. 5, n. 11, p. 121-136, 2011.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Triagem neonatal biológica: manual técnico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 80 p. Disponível em: [https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem\\_neonatal\\_biologica\\_manual\\_tecnico.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal_biologica_manual_tecnico.pdf). Acesso em: 07 jan. 2021.
7. BROEDERS, M. et al. Sharpening the molecular scissors: advances in gene-editing technology. **iScience**, v. 23, n. 1, p. 100789, 2020.
8. CANÇADO, R.; JESUS, J. E. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São José do Rio Preto**, v. 29, n. 3, p. 204-206, 2007.
9. CASARIN, S. T.; PORTO, A. R.; GABATZ, R. I. B.; BONOW, C. A.; RIBEIRO, J. P.; MOTA, M. S. Tipos de revisão de literatura: considerações das editoras do Journal of Nursing and Health. **J. nurs. Health**, v. 10, n (esp.), p. e20104031, 2020.
10. CENTER WATCH. **FDA approved drugs**. 2017. [Internet] Disponível em:

- <https://www.centerwatch.com/directories/1067-fda-approved-drugs/listing/3457-endari-l-glutamine-oral-powder>. Acesso em: 06 dez. 2020.
11. CENTER WATCH. **FDA approved drugs**. 2019a. [Internet] Disponível em: <https://www.centerwatch.com/directories/1067-fda-approved-drugs/listing/4558-adakveo-crizanlizumab-tmca>. Acesso em: 06 dez. 2020.
  12. CENTER WATCH. **FDA approved drugs**. 2019b. [Internet] Disponível em: <https://www.centerwatch.com/directories/1067-fda-approved-drugs/listing/4563-oxbryta-voxelotor>. Acesso em: 06 dez. 2020.
  13. CHAN, B. Improving the justice-based argument for conducting human gene editing research to cure sickle cell disease. **Bioethics.**, v. 34, n. 2, p. 200-202, 2020.
  14. DAVIS, R. et al. Engineering globin gene expression. **Mol Ther Methods Clin Dev.**, v. 12, p. 102-110, 2018.
  15. DEMIRCI, S. et al. CRISPR/Cas9 for Sickle Cell Disease: Applications, Future Possibilities, and Challenges. **Adv Exp Med Biol-Cell Biology and Translational Medicine**, v. 5, p. 37-52, 2019.
  16. DEMIRCI, S. et al. Gene therapy for sickle cell disease: An update. **Cytotherapy.**, v. 20, n. 7, p. 899-910, 2018.
  17. DESINE, S. et al. The Meaning of Informed Consent: Genome Editing Clinical Trials for Sickle Cell Disease. **AJOB empirical bioethics**, v. 11, n. 4, p. 195-207, 2020.
  18. DINIZ, D.; GUEDES, C. Informação genética na mídia impressa: a anemia falciforme em questão. **Ciênc. saúde coletiva, Rio de Janeiro**, v. 11, n. 4, p. 1055-1062, 2006.
  19. ERNST, M. et al. Ready for Repair? Gene Editing Enters the Clinic for the Treatment of Human Disease. **Molecular therapy. Methods & clinical development**, v. 18, p. 532-557, 2020.
  20. FRANGOUL H. et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia. **The New England journal of medicine**, 2020 (Online ahead of print).
  21. GAE, GRUPO ANIMA EDUCAÇÃO. **Manual Revisão Bibliográfica Sistemática Integrativa: a pesquisa baseada em evidências**. Belo

Horizonte: Grupo Anima Educação; 2014. Disponível em [http://biblioteca.cofen.gov.br/wp-content/uploads/2019/06/manual\\_revisao\\_bibliografica-sistemica-integrativa.pdf](http://biblioteca.cofen.gov.br/wp-content/uploads/2019/06/manual_revisao_bibliografica-sistemica-integrativa.pdf). Acesso em: 06 dez. 2020.

22. GHOSH, D.; VENKATARAMANI, P.; NANDI, S.; BHATTACHARJEE, S. CRISPR-Cas9 a boon or bane: the bumpy road ahead to cancer therapeutics. **Cancer Cell Int.**, v. 19, p. 12, 2019.
23. GONÇALVES, G.; PAULO, R. P.-E. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. **Einstein (São Paulo), São Paulo**, v. 15, n. 3, p. 369-375, 2017.
24. HIRAKAWA, M. et al. Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives. **Bioscience reports**, v. 40, n. 4, p. BSR20200127, 2020.
25. HOCHMAN, B. et al. Desenhos de pesquisa. Desenhos de pesquisa. **Acta Cir. Bras., São Paulo**, v. 20, supl. 2, p. 2-9, 2005.
26. HOLLISTER, B. M. et al. Perspectives of Sickle Cell Disease Stakeholders on Heritable Genome Editing. **The CRISPR journal**, v. 2, n. 6, p. 441-449, 2019.
27. HONG, A. CRISPR in personalized medicine: Industry perspectives in gene editing. **Semin Perinatol.**, v. 42, n. 8, p. 501-507, 2018.
28. HOPIA, H.; LATVALA, E.; LIIMATAINEN, L. Reviewing the methodology of an integrative review. **Scand J Caring Sci.** v. 30, n. 4, p. 662-669, 2016.
29. HU, X. CRISPR/Cas9 system and its applications in human hematopoietic cells. **Blood Cells Mol Dis.**, v. 62, p. 6-12, 2016.
30. JANSEN, R. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565-1575, 2002.
31. LAZARCHICK, J. **Hemoglobin SC Crystals**. Image Bank, 2009. [Internet] Disponível em: <https://imagebank.hematology.org/imageset/804/hemoglobin-sc-crystals>. Acesso em: 06 dez. 2020.
32. LEÃO, L. L.; AGUIAR, M. J. B. DE. Triagem neonatal: o que os pediatras deveriam saber. **J. Pediatr. (Rio J.), Porto Alegre**, v. 84, n. 4, supl. p. S80-S90, 2008.
33. MOJICA, F. J. et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. **Molecular microbiology**, v. 36, n. 1, p. 244-246, 2000.

34. MOJICA, F. J. M. et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 2, p. 174-182, 2005.
35. MUSSOLINO, C. et al. Genome and Epigenome Editing to Treat Disorders of the Hematopoietic System. **Human Gene Therapy**, v. 28, n. 11, p. 1105-1115, 2017.
36. NASCIMENTO, P. **Hemoglobina**. Infoescola, 2017. [Internet] Disponível em: <https://www.infoescola.com/sangue/hemoglobina>. Acesso em: 06 dez. 2020.
37. NEDEL, W. L.; SILVEIRA, F. Os diferentes delineamentos de pesquisa e suas particularidades na terapia intensiva. **Rev. bras. ter. intensiva, São Paulo**, v. 28, n. 3, p. 256-260, 2016.
38. NOT ALONE IN SICKLE CELL. **Global Impact of Sickle Cell Disease** [Internet]. Disponível em <https://www.notaloneinsicklecell.com/Global-Impact-Of-SCD/#s22>. Acesso em: 06 dez. 2020.
39. NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. **Thompson & Thompson. Genética Médica**. Editora: GEN Guanabara Koogan; 560 p., 2016.
40. ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Emerging Genetic Therapy for Sickle Cell Disease. **Annual review of medicine**, v. 70, p. 257-271, 2019.
41. PEREIRA, T. C. (organizador). **Introdução à técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2016. 250 p. Disponível em: [https://www.sbg.org.br/sites/default/files/livro\\_introducao\\_a\\_tecnica\\_de\\_crispr\\_1.pdf](https://www.sbg.org.br/sites/default/files/livro_introducao_a_tecnica_de_crispr_1.pdf). Acesso em: 06 dez. 2020.
42. PERSAUD, A. et al. A CRISPR focus on attitudes and beliefs toward somatic genome editing from stakeholders within the sickle cell disease community. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 8, p. 1726-1734, 2019.
43. RAMALHO, A.; MAGNA, L.; PAIVA-E-SILVA, R. A Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 19, n. 4, p. 1195-1199, 2003.
44. SATO, M. et al. Efficient CRISPR/Cas9-based gene correction in induced pluripotent stem cells established from fibroblasts of patients with sickle cell disease. **Stem cell investigation**, v. 3, p. 78, 2016.

45. SIMÕES, B. et al . Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, supl. 1, p. 46-53, 2010.
46. SOUZA, M. T. DE; SILVA, M. D. DA; CARVALHO, R. DE. Revisão integrativa: o que é e como fazer. **Einstein (São Paulo), São Paulo**, v. 8, n. 1, p. 102-106, 2010.
47. STILLWELL, S. B. et al. Evidence-based practice, step by step: searching for the evidence. **The American journal of nursing**, v. 110, n. 5, p. 41-47, 2010.
48. TASAN, I.; JAIN, S.; ZHAO, H. Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease. **Human genetics**, v. 135, n. 9, p. 1011-1028, 2016.
49. THE NOBEL PRIZE. **Prize announcement: The Nobel Prize in Chemistry 2020**. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/prize-announcement/>. Acesso em 06 jan. 2021.
50. TURNPENNY, P.; ELLARD, S. **Emery's Genética Médica**. Editora: Elsevier, 408 p., 2017.
51. VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED. A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia: **ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03655678**, 2018a. [Internet] Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03655678>. Acesso em: 06 dez. 2020.
52. VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED. A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Severe Sickle Cell Disease. **ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03745287**, 2018b. [Internet] Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03745287>. Acesso em: 06 dez. 2020.
53. WHITTEMORE, R.; KNAFL, K. The integrative review: updated methodology. **Journal of advanced nursing**, v. 52, n. 5, p. 546-553, 2005.
54. WIENERT, B. et al. Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for  $\beta$ -Hemoglobinopathies. **Trends in genetics: TIG**, v. 34, n. 12, p. 927-940, 2018.
55. 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.

## **ANEXOS**

### ***Anexo 1: Ficha A - Ficha de elegibilidade dos estudos primários identificados nas bases de dados eletrônicas pesquisadas.***

**NOME DO REVISOR** \_\_\_\_\_

#### **IDENTIFICAÇÃO DO ARTIGO**

Sobrenome do autor (se o autor pertencer a um grupo de pesquisa, indicar o nome do grupo) \_\_\_\_\_

Nome do jornal (abreviação comumente utilizada, nome no PubMed ou nome completo do Jornal) \_\_\_\_\_

Ano de publicação \_\_\_\_\_ Volume \_\_\_\_\_ Número da primeira página \_\_\_\_\_

#### **CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE**

1. TIPO DE ESTUDO: \_\_\_\_\_

#### 2. VERNÁCULO DO ESTUDO

( ) português      ( ) inglês

#### 3. PARTICIPANTES

Envolve discussão sobre pacientes com diagnóstico de anemia falciforme?

( ) Sim      ( ) Não      ( ) Não está claro

#### 4. INTERVENÇÃO

Foi realizada técnica de CRISPR-Cas9?

( ) Sim      ( ) Não      ( ) Não está claro

5. DESFECHOS AVALIADOS: \_\_\_\_\_

#### **DECISÃO FINAL**

( ) Incluir      ( ) Excluir

**Anexo 2: Ficha B - Ficha de extração de dados dos artigos selecionados.**

**CITAÇÃO BIBLIOGRÁFICA DO ARTIGO SELECIONADO:**

Desenho do estudo: \_\_\_\_\_

Detalhamento do desenho do estudo (metodologia):

\_\_\_\_\_

Local do estudo (país/cidade), período e cenário de coleta dos dados:

\_\_\_\_\_

Número de participantes nos diferentes grupos:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Critérios de inclusão e exclusão dos indivíduos investigados:

Inclusão - \_\_\_\_\_

Exclusão - \_\_\_\_\_

Comparação entre CRISPR-Cas9 e outros tratamentos para anemia falciforme:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Desfechos:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Descreva possíveis fatores de confusão que podem ter influenciado o desfecho do estudo:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Resultados principais – resuma os principais achados do estudo, relacionando-os aos objetivos dessa revisão:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Apresente as limitações do estudo:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_