

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Terapia Genética para Hemoglobinopatias

Carolina Isabel Rodrigues Rosa

Monografia orientada pela Professora Doutora Isabel Cristina Gomes Falcão
Bettencourt Moreira da Silva, Professora Auxiliar.

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2025

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Terapia Genética para Hemoglobinopatias

Carolina Isabel Rodrigues Rosa

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Isabel Cristina Gomes Falcão
Bettencourt Moreira da Silva, Professora Auxiliar.

2025

***“Gene therapy is not just about editing genes, it
is about rewriting people’s life stories.”***

Jennifer Doudna

Agradecimentos

Hoje termina esta bonita jornada, um longa e difícil caminhada mas da qual me orgulho imenso.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva pela orientação, pelo tempo dedicado e por todo o conhecimento partilhado durante este processo.

Ao meus pais agradeço por serem o meu pilar nos dias difíceis. Sem vocês, isto não se fazia. Obrigada por me darem sempre a força que precisei e por estarem lá nos momentos em que nem eu acreditava.

Ao meu irmão, obrigada por estares sempre presente, mesmo quando não sabias bem o que dizer, estavas lá, e isso bastava. Obrigada por me amparares as quedas e por seres, acima de tudo, o meu melhor amigo.

Um enorme obrigada ao meu avô, que tantas vezes me levou ao expresso, e à minha avó, que me ligava todos os dias para ter a certeza que estava bem e que acendia sempre uma velinha por mim nos dias dos exames. À minha bisavó, que esperou ansiosamente por este momento, por me ver chegar ao fim de mais esta etapa. Sempre torceu por mim e sei que está muito feliz e orgulhosa de mim. Obrigada também à avó Celeste, que sempre me incentivou a seguir este caminho. E à minha estrelinha, que nunca deixou de me acompanhar.

À Titaua e ao ti Silvino, não há palavras suficientes que retribuam tudo o que fizeram por mim. Tornaram este sonho possível.

Agradeço também aos meus padrinhos, que nunca desistiram de me tentar animar nos dias em que o estudo parecia não dar tréguas.

E por fim, mas não menos importante, às amigas que nasceram na bonita casa que é a FFUL. Foi um prazer enorme fazer este percurso ao lado destas pessoas incríveis.

E aos meus amigos de casa, que apesar da distância, estiveram sempre lá para me apoiar em todos os momentos.

Muito obrigada!

Declaração

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Resumo

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas hereditárias, caracterizadas pela síntese deficiente ou alterações estruturais nas cadeias polipeptídicas da hemoglobina, que resultam numa função anormal desta proteína, essencial para o transporte de oxigénio para os tecidos. Entre as formas mais prevalentes, destacam-se a anemia falciforme e a β -talassemia *major*, que afetam milhares de pessoas em todo o mundo, particularmente em regiões com histórico de malária endémica. Estas patologias representam um desafio relevante em termos de saúde pública, não apenas pela sua prevalência, mas também pelo impacto significativo que têm na qualidade de vida dos doentes.

As terapêuticas convencionais, como a hidroxiureia e as transfusões sanguíneas, são essenciais para o controlo das manifestações clínicas, mas não constituem um tratamento curativo, uma vez que não atuam na causa subjacente da doença, a mutação genética, e estão associadas a riscos a longo prazo.

Neste contexto, a terapia genética surge como uma abordagem promissora e inovadora, com o objetivo de atuar diretamente na etiologia genética destas doenças. As principais estratégias incluem a adição de uma cópia funcional do gene da β -globina e a edição genética, com destaque para ferramentas como o sistema CRISPR/Cas, a *base editing* ou a *prime editing*. Estas abordagens têm demonstrado resultados promissores, que se traduzem no aumento da produção de hemoglobina funcional e na redução, ou até mesmo eliminação, das manifestações clínicas da doença. Apesar das limitações e desafios ainda existentes, os resultados científicos obtidos já permitiram a aprovação de terapias eficazes e seguras, como o Zynteglo[®], Lyfgenia[®] e Casgevy[®], que representam um ponto de viragem no tratamento das hemoglobinopatias. Atualmente, decorrem vários ensaios centrados na avaliação da segurança a longo prazo das terapias já aprovadas, bem como na investigação da eficácia e segurança de novas estratégias terapêuticas, incluindo a terapia genética *in vivo*, que se antevê como uma alternativa menos invasiva e mais acessível.

Desta forma, a terapia genética representa uma nova era na medicina, com potencial para modificar profundamente o curso destas doenças e proporcionar uma melhoria significativa na qualidade de vida dos doentes.

Palavras-chave: Hemoglobina; Mutação; Anemia Falciforme; Talassemia; Terapia genética.

Abstract

Hemoglobinopathies constitute a group of hereditary genetic diseases, characterized by deficient synthesis or structural alterations in the polypeptide chains of hemoglobin, resulting in abnormal function of this protein, which is essential for the transport of oxygen to the tissues. Among the most prevalent forms are sickle cell anemia and β -thalassemia major, which affect thousands of people worldwide, particularly in regions with a history of endemic malaria. These pathologies represent a significant public health challenge, not only due to their prevalence but also because of the considerable impact they have on patients' quality of life.

Conventional therapies, such as hydroxyurea and blood transfusions, are essential for controlling clinical manifestations, but they do not constitute a curative treatment, as they do not act on the underlying cause of the disease, the genetic mutation, and are associated with long-term risks.

In this context, gene therapy emerges as a promising and innovative approach, aiming to act directly on the genetic etiology of these diseases. The main strategies include the addition of a functional copy of the β -globin gene and genetic editing, with emphasis on tools such as the CRISPR/Cas system, base editing, or prime editing. These approaches have shown promising results, leading to increased production of functional hemoglobin and a reduction or even elimination of the clinical manifestations of the disease. Despite the existing limitations and challenges, the scientific results obtained have already led to the approval of effective and safe therapies, such as Zynteglo[®], Lyfgenia[®], and Casgevy[®], which represent a turning point in the treatment of hemoglobinopathies. Currently, several trials are underway focusing on the long-term safety assessment of already approved therapies, as well as on the investigation of the efficacy and safety of new therapeutic strategies, including in vivo gene therapy, which is anticipated to be a less invasive and more accessible alternative.

In this way, gene therapy represents a new era in medicine, with the potential to profoundly modify the course of these diseases and provide a significant improvement in patient's quality of life.

Keywords: Hemoglobin; Mutation; Sickle Cell Anemia; Thalassemia; Gene Therapy.

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

α	Alfa
β	Beta
γ_A	Gama A
γ_G	Gama G
δ	Delta
ϵ	Epsilon
ζ	Zeta
η	Teta
2,3-BPG	2,3-bifosfoglicerato
AAV	Vetores adeno-associados
ABE	Editor de bases de adenina
AF	Anemia falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
<i>BCL11A</i>	<i>B-cell lymphoma/leukemia 11</i>
Beti-cel	Betibeglogene autotemcel
CBE	Editor de bases de citidina
CEH	Células estaminais hematopoiéticas
CHMP	<i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i>
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
CPG	Coproporfirinogénio
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CVO	Crise vaso-oclusiva
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DSB	Quebra de dupla hélice
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT	Fator de transcrição
G6PD	Glucose-6-fosfato desidrogenase
GATA-1	<i>GATA-binding factor 1</i>
G-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos
GSH	Glutationa
GV	Glóbulos vermelhos
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina Adulta
HbA ₂	Hemoglobina A ₂
HbE	Hemoglobina E
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HDR	Reparação dirigida por homologia
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMB	Hidroximetilbilano
HPFH	Persistência hereditária da HbF
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HS	Sítios hipersensíveis
HU	Hidroxiureia
INDEL	Inserções ou deleções
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
kDa	Quilodaltons
kDa	Quilodaltons

KLF1	<i>Krüppel-like factor 1</i>
LCR	<i>Locus Control Region</i>
LNP	Nanopartícula lipídica
Lovo-cel	Lovotibeglogene autotemcel
MCS	<i>Multi-Species Conserved Sequences</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
mRNA	RNA mensageiro
NF-E2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2</i>
NHEJ	Junção de extremidades não homólogas
nm	Nanómetros
NO	Monóxido de azoto
O ₂	Oxigénio
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PBG	Porfobilinogénio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pegRNA	<i>Prime editing guide</i>
PNCH	Programa Nacional de Controlo das Hemoglobinopatias
pO ₂	Pressão parcial de oxigénio
PP	Protoporfirina
PPG	Protoporfirinogénio
PNRN	Programa Nacional de Rastreio Neonatal
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SIN	<i>Design auto-inativante</i>

Succinil CoA	Succinil coenzima A
SSB	Quebra de cadeia simples
<i>SWOT</i>	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>
TadA	Adenina desaminase modificada
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
TCEH	Transplante de células estaminais hematopoiéticas
TDT	β -talassemia dependente de transfusão
UPG	Uroporfirinogénio
ZFN	<i>Zinc finger nucleases</i>

Índice Geral

1. Introdução.....	18
2. Objetivos	19
3. Materiais e métodos	20
4. Hemoglobina: aspetos bioquímicos e moleculares	21
• 4.1 Definição	21
• 4.2 Estrutura, composição e funções da hemoglobina	21
○ 4.2.1 Organização estrutural.....	21
○ 4.2.2 Cadeias globínicas.....	22
○ 4.2.3 Grupo heme e ligação ao oxigénio	23
○ 4.2.4 Síntese da hemoglobina ao longo do desenvolvimento humano.....	27
○ 4.2.5 Expressão e regulação dos genes das globinas.....	28
5. Mutações e deteção laboratorial das variantes de hemoglobina e de alterações quantitativas na sua síntese	32
• 5.1 Tipos de mutações nos genes das cadeias globínicas.....	32
• 5.2 Métodos de diagnóstico para deteção de mutações.....	33
6. Hemoglobinopatias.....	34
• 6.1 Definição e classificação	34
○ 6.1.1 Hemoglobinopatias qualitativas ou estruturais	35
▪ 6.1.1.1 Anemia falciforme.....	35
▪ 6.1.1.1.1 Manifestações clínicas.....	37
○ 6.1.2 Hemoglobinopatias quantitativas	39
▪ 6.1.2.1 Talassemias	39
▪ 6.1.2.1.1 Manifestações clínicas.....	41
• 6.2 Epidemiologia global	42

• 6.3 Abordagens terapêuticas convencionais.....	44
○ 6.3.1 Terapêutica farmacológica	45
▪ 6.3.1.1 Medidas de suporte.....	45
▪ 6.3.1.2 Hidroxiureia	45
▪ 6.3.1.3 L-glutamina	47
▪ 6.3.1.4 Voxelotor.....	48
▪ 6.3.1.5 Crizanlizumab	49
○ 6.3.2 Transfusões sanguíneas	50
○ 6.3.3 Transplante de células estaminais hematopoiéticas	51
7. Terapia genética para hemoglobinopatias	52
• 7.1 Introdução à terapia genética.....	52
• 7.2 Terapia <i>ex vivo</i> vs <i>in vivo</i>	53
• 7.3 Sistemas de <i>delivery</i> do material genético	54
• 7.4 Principais estratégias terapêuticas	56
○ 7.4.1 Adição genética	56
○ 7.4.2 Edição genética	57
▪ 7.4.2.1 Ferramentas de edição genética.....	58
▪ 7.4.2.1.1 CRISPR-Cas9, ZFN's e TALENS	58
▪ 7.4.2.1.2 <i>Base editing</i> vs <i>Prime editing</i>	60
▪ 7.4.2.2 Abordagens de edição específicas.....	62
▪ 7.4.2.2.1 Silenciamento do gene <i>BCL11A</i> e reativação da HbF.....	62
• 7.5 Terapias genéticas para as hemoglobinopatias.....	63
○ 7.5.1 Adição genética	63
▪ 7.5.1.1 Betibeglogene autotemcel (Zynteglo®)	63
▪ 7.5.1.2 Lovotibeglogene autotemcel (Lyfgenia®)	64
○ 7.5.2 Edição genética	65

▪ 7.5.2.1 Exagamglogene autotemcel (Casgevy®)	65
▪ 7.5.2.2 BEAM-101	66
▪ 7.5.2.3 EDIT-301	67
○ 7.5.3 Edição genética <i>in vivo</i>	67
• 7.6 Vantagens e limitações da terapia genética.....	68
8. Conclusões e perspectivas futuras	71
9. Referências bibliográficas.....	72

Índice de Figuras

Figura 1 Estrutura da hemoglobina.....	22
Figura 2 Estrutura do grupo heme.....	24
Figura 3 Biossíntese do heme e da hemoglobina no eritroblasto.....	25
Figura 4 Curva sigmoideal de dissociação da hemoglobina.....	27
Figura 5 Locais de eritropoiese ao longo do desenvolvimento humano.....	27
Figura 6 Organização dos genes globínicos nos cromossomas 16 e 11.....	29
Figura 7 Síntese e expressão das cadeias globínicas ao longo do desenvolvimento humano.....	30
Figura 8 Organização dos genes globínicos nos respetivos cromossomas com destaque para os promotores e para os elementos reguladores.....	32
Figura 9 Microscopia ótica de esfregaço sanguíneo de doente diagnosticado com drepanocitose – (1) células com hemoglobina S na forma de disco bicôncavo; (2) momento inicial da polimerização caracterizada pela condensação da hemoglobina S numa parte do eritrócito denso; (3) célula falciforme irreversível	36
Figura 10 Possíveis padrões de transmissão genética num casal portador de anemia falciforme	37
Figura 11 Manifestações clínicas e complicações associadas à anemia falciforme	39
Figura 12 Esfregaço sanguíneo de indivíduo com β -talassemia <i>major</i> demonstrando anisopoiquilocitose acentuada, presença de ponteados basófilos, pequenos fragmentos eritrocitários e corpos de Heinz.....	42
Figura 13 Distribuição geográfica de hemoglobinopatias	44
Figura 14 Mecanismo de ação do crizanlizumab.....	49
Figura 15 Distinção entre as terapias <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	54
Figura 16 Estratégia de adição genética.....	57
Figura 17 Estratégia de edição genética e posterior reparação	60
Figura 18 Estratégia de edição genética por <i>base editing</i> e <i>prime editing</i>	61
Figura 19 Análise <i>SWOT</i> sobre a terapia genética para hemoglobinopatias.....	70

Índice de Tabelas

Tabela 1 Cadeias globínicas: símbolo, nome e número de aminoácidos	23
Tabela 2 Distribuição das hemoglobinas ao longo do desenvolvimento humano, composição das cadeias globínicas e proporção das hemoglobinas	28

1. Introdução

A hemoglobina (Hb) é uma das proteínas mais estudadas, não só pelo seu papel essencial no transporte de oxigênio para os tecidos, mas também pela sua importância em diversas patologias hereditárias. As alterações genéticas que afetam a síntese ou a estrutura das cadeias de Hb resultam nas hemoglobinopatias, um grupo de doenças monogênicas hereditárias com elevada prevalência global, sendo as mais relevantes clinicamente a anemia falciforme (AF) e a β -talassemia *major*. (1)

O início do estudo das hemoglobinopatias remonta ao século XX, mais precisamente, a 1949, quando Linus Pauling descreveu a AF como uma doença hereditária causada por uma mutação no gene *HBB*, responsável pela alteração na estrutura das cadeias de Hb. Esta descoberta tornou-se um marco para a compreensão das doenças hereditárias uma vez que foi a primeira vez que se associou a mutação genética à doença. Nos anos seguintes, também as talassemias, caracterizadas pela síntese deficiente das cadeias de Hb, foram relacionadas com a mutação genética subjacente. (2) (3)

Com o surgimento da sequenciação do ácido desoxirribonucleico (DNA), em 1977, foi possível a identificação precisa das mutações genéticas responsáveis pelas hemoglobinopatias, o que representou um avanço crucial no diagnóstico molecular destas doenças. À medida que os mecanismos genéticos foram conhecidos, o interesse por abordagens que atuem diretamente na mutação genética foi crescendo. No final do século XX, os primeiros estudos sobre terapia genética começaram a surgir, com o objetivo de corrigirem diretamente as mutações genéticas que se encontravam na origem da patologia. Nos dias de hoje, várias são as terapêuticas aprovadas tanto com base em técnicas de edição genética, como o CRISPR/Cas, como em técnicas de adição genética. Para além de contribuírem para uma drástica mudança no paradigma da medicina contemporânea, prometendo um tratamento definitivo, permitem colmatar as desvantagens associadas aos tratamentos convencionais. Depois de décadas de investigação, a terapia genética assume-se, hoje, como uma das estratégias mais promissoras para o tratamento das β -hemoglobinopatias. (4) (5)

2. Objetivos

O principal objetivo desta monografia é aprofundar o conhecimento atual sobre a terapia genética aplicada às hemoglobinopatias, em particular à anemia falciforme e à β -talassemia *major*. Nesta dissertação de mestrado pretende-se descrever as características estruturais da molécula de hemoglobina, como é geneticamente codificada, explicar de que forma as hemoglobinopatias comprometem a sua função, apresentar os tratamentos convencionais atualmente disponíveis e analisar de que modo a terapia genética, através de diferentes abordagens, pode oferecer soluções mais eficazes e duradouras. Além disso, serão abordadas as principais técnicas utilizadas em terapia genética, apresentados exemplos de terapias já aprovadas e as perspectivas futuras nesta área em constante evolução.

3. Materiais e métodos

Para a realização desta monografia, foi efetuada uma revisão bibliográfica com o objetivo de reunir a informação mais relevante e atualizada sobre terapia genética aplicada às hemoglobinopatias, nomeadamente a anemia falciforme e a β -talassemia *major*. Numa fase inicial, procedeu-se à pesquisa e estudo da estrutura e função da hemoglobina, bem como das características clínicas, moleculares e epidemiológicas das principais hemoglobinopatias. Esta base teórica foi essencial para enquadrar e compreender as abordagens terapêuticas posteriormente exploradas.

A fase seguinte da pesquisa incidiu especificamente sobre os avanços na área da terapia genética, nomeadamente os tipos de abordagem, os vetores e as técnicas de modificação genética utilizadas. Por último, descrevemos as terapias que se encontram atualmente aprovadas ou em ensaios clínicos. De forma a complementar esta análise, foi realizada uma análise *SWOT* que abrangeu não só as vantagens como também as limitações da terapia genética para hemoglobinopatias.

As fontes de informação incluíram livros de Hematologia e Genética, artigos científicos e revisões sistemáticas. A pesquisa foi realizada através de bases de dados científicas como PubMed, ScienceDirect, Nature, UpToDate, ClinicalTrials.gov, bem como websites institucionais, como os da EMA, FDA e OMS.

A pesquisa foi realizada utilizando palavras-chave como “*hemoglobin*”, “*hemoglobinopathies*”, “*sickle cell disease*”, “*beta-thalassemia*”, “*gene therapy*”, “*gene addition*”, “*CRISPR-Cas9*”, “*BCL11A silencing*”, “*HbF reactivation*”, entre outros.

4. Hemoglobina: aspetos bioquímicos e moleculares

• 4.1 Definição

A Hb é uma metaloproteína encontrada nos eritrócitos (glóbulos vermelhos) e representa cerca de 95% do conteúdo citoplasmático destas células. Desempenha um papel essencial no transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos e na remoção do dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. A sua concentração intracelular média é de 34 g/dL, e o seu peso molecular é de, aproximadamente, 64 quilodaltons (kDa), com um diâmetro de cerca de 5,5 nanómetros (nm). Estas características refletem a sua estrutura complexa e altamente especializada. (1) (6)

• 4.2 Estrutura, composição e funções da hemoglobina

○ 4.2.1 Organização estrutural

A molécula de Hb pode ser descrita de acordo com quatro níveis de organização estrutural: primário, secundário, terciário e quaternário.

A estrutura primária corresponde à sequência de aminoácidos que compõe as 4 subunidades de globina – duas subunidades do tipo alfa (α_1 e α_2) e duas subunidades do tipo beta (β_1 e β_2) que são estruturalmente semelhantes, aproximadamente, do mesmo tamanho mas que diferem na sequência de aminoácidos. No entanto, dependendo do tipo de Hb presente no organismo, outras cadeias globínicas podem substituí-las, dando origem a variantes com características funcionais distintas. (7) (8)

Relativamente à estrutura secundária, esta refere-se ao arranjo das cadeias polipeptídicas em conformações específicas, como hélices α e segmentos não helicoidais. Na estrutura terciária, as hélices α organizam-se de forma compacta, criando uma configuração característica, frequentemente descrita como "*pretzel-like*". As ligações entre as subunidades α_1 - β_1 e α_2 - β_2 garantem a estabilidade dos dímeros que constituem a Hb sendo interações de afinidade extremamente alta. Esta disposição permite que cada cadeia polipeptídica se associe a um grupo prostético heme (ferroprotoporfirina), essencial para a ligação ao oxigénio. (6) (9)

A estrutura quaternária da Hb, um heterotetrâmero, constituído por dois dímeros análogos $\alpha\beta$, foi determinada por cristalografia de raios X na década 60, por Max Perutz. Foi

observada a organização da molécula como um todo, verificando-se que é estabilizada através de interações $\alpha_1-\beta_2$ e $\alpha_2-\beta_1$ que permitem mudanças conformacionais, facilitadoras tanto da captação de oxigênio como da sua liberação. A organização estrutural desta proteína globular (Figura 1) é essencial para a sua função biológica. (10)

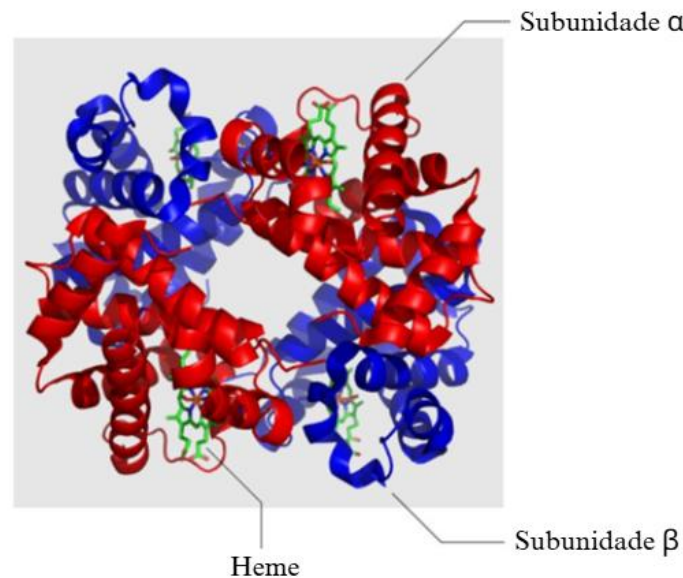


Figura 1 Estrutura da hemoglobina (Adaptado de (11))

○ 4.2.2 Cadeias globínicas

As cadeias globínicas são as proteínas que compõem a estrutura tetramérica da Hb e são sintetizadas nos polirribossomas das células precursoras dos eritrócitos (eritroblastos). A síntese das cadeias globínicas começa com a transcrição do DNA dos genes das globinas para o RNA mensageiro (mRNA). Esse mRNA é transportado do núcleo para os ribossomas no citosol, onde ocorre a tradução do mesmo e a síntese das cadeias polipeptídicas. (6) (9)

Como foi referido anteriormente, cada molécula de Hb é formada por quatro cadeias polipeptídicas, organizadas em dois pares idênticos porém de dois tipos distintos de cadeias: as cadeias α com 141 aminoácidos e as cadeias β com 146 aminoácidos ($\alpha_2\beta_2$). Cada cadeia é composta por 7 hélices α e 8 hélices β , separadas por sete segmentos não helicoidais e identificadas por letras de A a H. (7) (10) (12)

Cada uma das subunidades globínicas é representada por uma letra grega, variando de acordo com as alterações na sequência de aminoácidos (Tabela 1). Os aminoácidos das cadeias

globínicas são hidrofóbicos, enquanto os aminoácidos localizados no exterior das subunidades são hidrofílicos, o que confere à molécula solubilidade em água. (6) (1) (13)

Tabela 1 Cadeias globínicas: símbolo, nome e número de aminoácidos (Adaptado de (6))

Símbolo e Nome	Número de aminoácidos
α_1 (Alfa 1)	141
α_2 (Alfa 2)	141
β (Beta)	146
γ_A (Gama A)	146 (posição 136: alanina)
γ_G (Gama G)	146 (posição 136: glicina)
δ (Delta)	146
ϵ (Epsilon)	146
ζ (Zeta)	141
ϑ (Teta)	Desconhecido

Para a síntese dos vários tipos de Hb, as cadeias globínicas agrupam-se de diferentes formas com o objetivo de se adaptarem ao transporte de oxigénio ao longo do desenvolvimento humano.

No estadio embrionário e na transição deste para o período fetal, as Hbs podem ser de três tipos: Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$). A Hb Fetal (HbF), que predomina no feto, é constituída por duas cadeias α e duas cadeias γ ($\alpha_2\gamma_2$), o que lhe confere uma maior afinidade ao oxigénio. Já a HbA, a forma predominante no adulto, é composta por duas cadeias α e duas cadeias β ($\alpha_2\beta_2$). Uma outra Hb presente em menor proporção no adulto, é a HbA₂ que é constituída por duas cadeias α e duas cadeias δ ($\alpha_2\delta_2$). (14)

○ 4.2.3 Grupo heme e ligação ao oxigénio

O heme é um grupo prostético fundamental que integra a estrutura da Hb, tendo como principais funções o transporte de oxigénio no organismo, permitindo a sua captação, transporte e libertação nos tecidos. A sua estrutura consiste num anel de átomos de carbono, hidrogénio e nitrogénio chamado protoporfirina (PP) IX, com um átomo central de ferro no estado ferroso

(Fe^{2+}), como se pode observar na Figura 2. Está presente na molécula de Hb numa proporção 4:1, estando cada grupo heme está associado a uma cadeia globínica. A sua fórmula molecular é $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{FeN}_4\text{O}_4$ e apresenta uma massa molar de 616,487 g/mol. (7) (15)

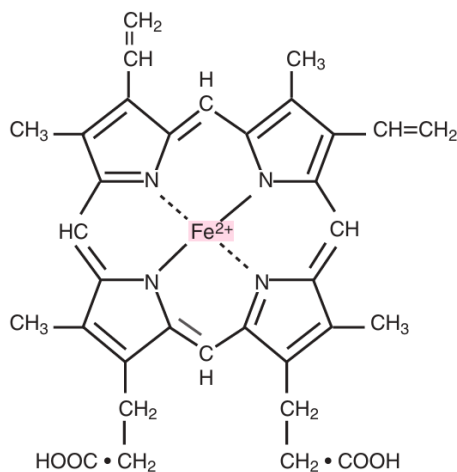


Figura 2 Estrutura do grupo heme (Retirado de (6))

A síntese do grupo heme ocorre, predominantemente, ao nível das mitocôndrias e do citosol das células, envolvendo uma série de reações bioquímicas. O processo tem início com a condensação da glicina e de succinil-coenzima A (succinil CoA) por ação da ácido δ -aminolevulínico sintetase e na presença de fosfato piridoxina (vitamina B6). Como resultado forma-se o ácido δ -aminolevulínico (ALA), que é transportado para o citosol e convertido em porfobilinogénio (PBG), graças à enzima ALA desidratase. De seguida, ocorre a desaminação e condensação de quatro moléculas de PBG para produzir hidroximetilbilano (HMB). A uroporfirinogénio (UPG) III sintase, uma enzima presente no citosol, catalisa a formação de UPG III a partir do HMB. Devido à remoção sequencial dos quatro grupos carboxílicos das cadeias laterais pela UPG descarboxilase, ocorre a produção de coproporfirinogénio (CPG) III. Este último é transportado para as mitocôndrias e convertido em protoporfirinogénio (PPG) III, pela enzima CPG III oxidase. O PPG III, por sua vez, é transformado em PP IX pela enzima protoporfirinogénio III oxidase. A etapa final da biossíntese do heme envolve a inserção de ferro na PP IX. A enzima ferroquelatase facilita a inserção de ferro ferroso (Fe^{2+}) no anel de PP, resultando na formação do heme. (12) (14) (16)

Após a síntese do grupo heme, este é transportado para o citosol, onde se vai combinar com as cadeias globínicas, já previamente sintetizadas (Figura 3). Este processo resulta na formação da molécula de Hb completa, na qual cada grupo heme se encontra associado a uma

cadeia polipeptídica através de uma cadeia lateral de histidina. O heme fica posicionado entre as hélices E e F de cada cadeia globínica. (6) (12)

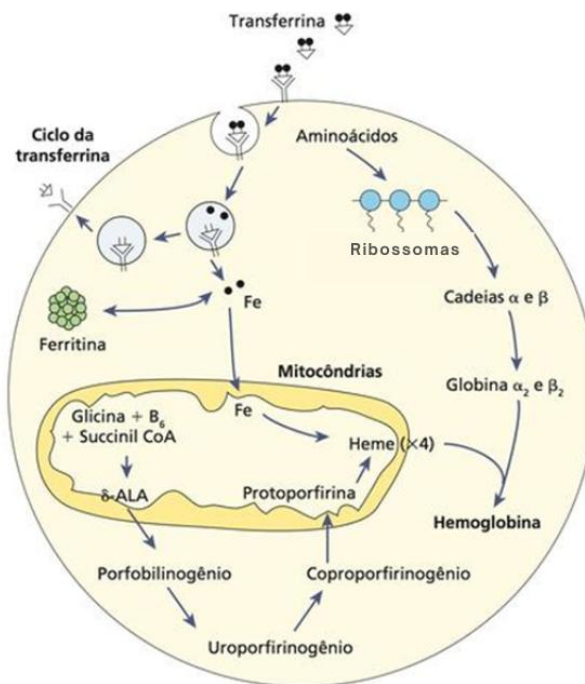


Figura 3 Biossíntese do heme e da hemoglobina no eritroblasto (Adaptado de (14))

Após a sua formação e incorporação na molécula de Hb, o grupo heme desempenha um papel essencial na ligação e transporte do oxigênio (O_2). A interação reversível entre o ferro ferroso (Fe^{2+}) do heme e a molécula de O_2 é fundamental para a função principal da Hb, sendo essa ligação influenciada por diversos fatores que modulam a afinidade da Hb ao O_2 . (6)

No estado ferroso (Fe^{2+}), o grupo heme pode ligar-se a diversos ligandos gasosos, incluindo o O_2 , o monóxido de carbono (CO) e o monóxido de azoto (NO). A interação entre o O_2 e a Hb ocorre na bolsa distal da proteína, onde é estabilizada por uma histidina localizada na posição E7 (His E7). Quando o Fe^{2+} é oxidado e passa ao estado férrico (Fe^{3+}), a Hb não se consegue ligar ao O_2 nem ao CO, pelo que se vai ligar ao NO, mas com uma afinidade muito menor do que o heme no estado ferroso. Alguns destes compostos atuam como inibidores competitivos, afetando a ligação do O_2 à Hb, uma vez que se ligam com uma afinidade significativamente maior. (6) (1) (7) (13)

A Hb é capaz de se ligar a um máximo de quatro moléculas de O_2 , uma para cada grupo heme. Esse processo ocorre de forma cooperativa, o que significa que a fixação de uma molécula de O_2 facilita a ligação das próximas, um fenómeno descoberto por Christian Bohr. A

conformação estrutural da Hb muda dependendo da presença ou ausência de oxigênio ligado ao ferro do grupo heme, caracterizando-a como uma proteína alostérica. Encontram-se descritas duas estruturas alternativas da Hb: o estado relaxado (R), que apresenta alta afinidade ao O_2 , e o estado tenso (T), caracterizado por baixa afinidade ao O_2 . Na sua forma desoxigenada, denominada desoxihemoglobina, os grupos heme encontram-se desprovidos de O_2 e a Hb encontra-se, essencialmente, no estado T. Já na presença de O_2 , a proteína assume a configuração de oxihemoglobina e encontra-se, maioritariamente, no estado R. O equilíbrio entre estes dois estados é afetado por diversos ligandos heterotrópicos endógenos, como o 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG), iões H^+ (que afetam o pH), dióxido de carbono (CO_2) e pela temperatura. Estes fatores influenciam diretamente a afinidade da Hb- O_2 , garantindo um fornecimento adequado consoante as necessidades metabólicas dos tecidos. O 2,3-BPG, um subproduto da glicólise, encontra-se presente em concentrações relativamente elevadas nos eritrócitos e desempenha um papel essencial na estabilização da Hb no estado T de modo a facilitar a libertação de O_2 nos tecidos. Na ausência de 2,3-BPG, a afinidade da Hb- O_2 seria cerca de 2 mmHg em vez dos 25 mmHg. (6) (1) (7) (9) (17)

Bohr, Hasselbalch e Krogh foram os primeiros a descrever a afinidade do O_2 à Hb, ao identificarem a forma sigmoide da sua curva de dissociação, que ilustra a cooperatividade da ligação Hb- O_2 . Esta ligação é, normalmente, expressa através do valor de P_{50} , que representa a pressão parcial de O_2 (pO_2) na qual a molécula de Hb está 50% saturada de O_2 . A P_{50} padrão da Hb humana adulta normal é de 26,9 mmHg, a pH 7,4 e a uma temperatura de 37°C. A Figura 4 ilustra a curva sigmoide e descreve a relação entre a pO_2 e a percentagem de saturação da Hb com o O_2 . Com o aumento da afinidade da Hb ao O_2 , a pO_2 necessária para a saturação diminui e a curva desloca-se para a esquerda (curva vermelha). Este desvio também ocorre com o aumento do pH e com a diminuição das concentrações de 2,3-BPG e da temperatura. Algumas outras Hbs também se enquadram neste desvio, como a HbF que apresenta menor sensibilidade ao 2,3-BPG e, conseqüentemente, apresenta uma maior capacidade de captar o O_2 da circulação materna. Relativamente à curva da direita (curva azul), esta desvia-se da normalidade devido à diminuição da afinidade ao O_2 , pelo que a pO_2 necessária para a saturação aumenta. Este desvio acontece em condições de elevadas concentrações de 2,3-BPG, temperaturas elevadas e pH baixo, bem como na presença de HbS (uma variante de Hb, associada à AF), em que o O_2 é libertado com mais facilidade. (14) (17)

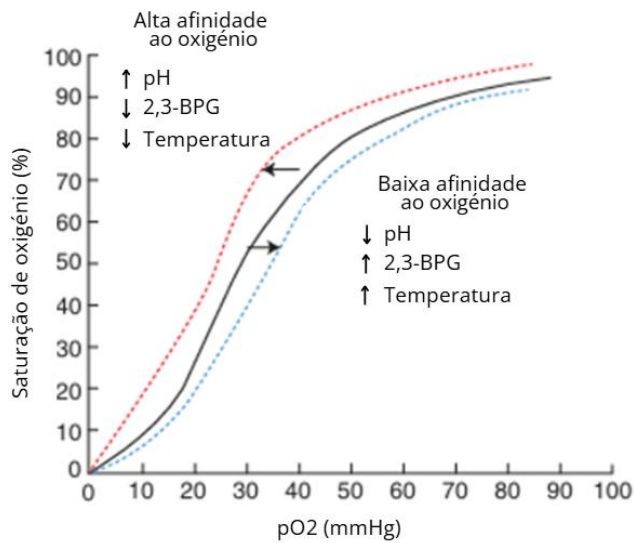


Figura 4 Curva sigmoide de dissociação da hemoglobina (Adaptado de (9))

○ 4.2.4 Síntese da hemoglobina ao longo do desenvolvimento humano

A síntese da Hb é um processo dinâmico e está diretamente relacionada com o local onde ocorre a eritropoiese (produção de eritrócitos). As alterações nos locais de eritropoiese estão associadas a alterações nos tipos de Hb produzidos. (18)

Ao longo do desenvolvimento humano, a produção de Hb ocorre em diferentes órgãos (Figura 5). Durante a vida embrionária, este processo ocorre no saco vitelino, enquanto que, durante a vida fetal, passa a ter lugar no fígado e no baço, até que, desde os últimos estádios da gestação até à idade adulta, passa a ocorrer na medula óssea, que se torna o local de eleição para a eritropoiese e consequente síntese da Hb. (18) (19)

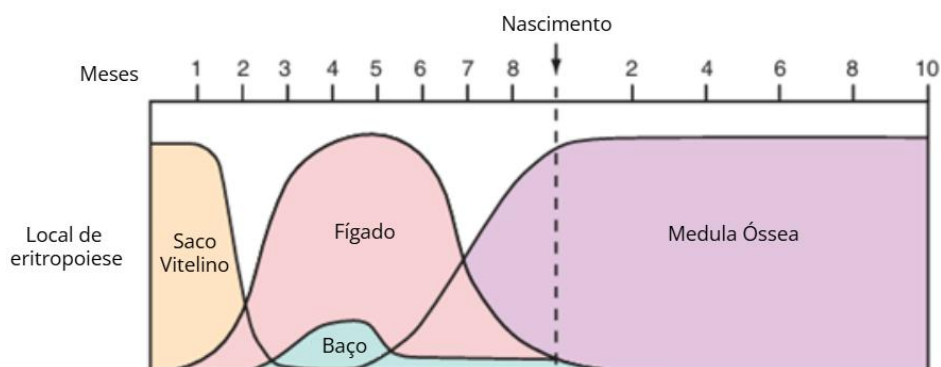


Figura 5 Locais de eritropoiese ao longo do desenvolvimento humano (Adaptado de (6))

A transição entre os diferentes tipos de Hb é um processo altamente regulado, e é essencial para a adaptação às diferentes necessidades de oxigenação nos diversos estádios de desenvolvimento. Durante a fase embrionária, as Hbs predominantes são as Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$), que são sintetizadas nos eritroblastos do saco vitelino. Estas formas de Hb apresentam uma elevada afinidade para o oxigénio, assegurando um fornecimento adequado ao embrião. Conforme o feto se desenvolve, ocorre a substituição pela HbF ($\alpha_2\gamma_2$), produzida principalmente no fígado e no baço. A HbF é a que predomina durante o segundo e terceiro trimestre da gravidez até ao nascimento e é a que apresenta maior afinidade ao oxigénio comparativamente à HbA. Depois do nascimento, inicia-se uma transição gradual para as Hbs adultas. A HbA ($\alpha_2\beta_2$) é a que predomina desde os 6 meses de idade até à idade adulta. Nos adultos, também se encontram presentes pequenas quantidades de HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e HbF, como demonstrado na Tabela 2. (6) (18) (20)

Tabela 2 Distribuição das hemoglobinas ao longo do desenvolvimento humano, composição das cadeias globínicas e proporção das hemoglobinas (Adaptado de (21))

Fase do desenvolvimento	Tipo de Hemoglobina	Composição das cadeias globínicas	Proporção (%)
Embrião	Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$	-
	Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$	
	Portland	$\zeta_2\gamma_2$	
Nascimento	HbF	$\alpha_2\gamma_2$	80%
	HbA	$\alpha_2\beta_2$	20%
Adulto	HbA	$\alpha_2\beta_2$	96-98%
	HbA ₂	$\alpha_2\delta_2$	2-3%
	HbF	$\alpha_2\gamma_2$	<1%

○ 4.2.5 Expressão e regulação dos genes das globinas

A expressão dos genes das globinas é um processo altamente regulado e essencial para a produção de Hb funcional. Durante o desenvolvimento humano, a expressão destes genes segue um padrão ontogenético, uma vez que são ativados e desativados em momentos específicos para produzir vários tipos de Hb. (22)

Os genes das globinas estão localizados em dois *clusters* principais: o *cluster* da α -globina (cromossoma 16, 16p13.3) que contém os genes que codificam para as cadeias α (*HBA1* e *HBA2*) e ζ (*HBZ*) e o *cluster* da β -globina (cromossoma 11, 11p15.5) que contém os genes que codificam para as cadeias β (*HBB*), γ (*HBG1* e *HBG2*), δ (*HBD*) e ϵ (*HBE1*). A cadeia α é codificada por dois genes duplicados, o gene *HBA1* que codifica a cadeia α_1 e o gene *HBA2* que codifica a cadeia α_2 , enquanto a cadeia γ resulta da expressão de dois genes distintos: *HBG1*, que codifica para a subunidade γ_A que contém alanina, e *HBG2* que codifica para a subunidade γ_G que contém glicina. Os genes α -like, encontram-se na ordem 5'- ζ - $\psi\zeta$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ_1 -3' e os genes β -like na ordem 5'- ϵ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\psi\beta$ - δ - β -3', como ilustrado na Figura 6. Relativamente ao primeiro agrupamento génico, este é constituído por três genes funcionais (α_1 , α_2 e ζ), três pseudogenes ($\psi\zeta$ - $\psi\alpha_2$ - $\psi\alpha_1$) e o gene da globina θ (*HBQ1*), com função ainda por determinar. No que diz respeito ao conjunto genético β -like, este é composto por cinco genes funcionais (β , δ , $G\gamma$, $A\gamma$ e ϵ) e um pseudogene ($\psi\beta$). Ambos apresentam a orientação 5' - 3' o que significa que são transcritos desde o telómero até ao centrómero, sendo dispostos pela ordem que são expressos ao longo do desenvolvimento humano. (23) (24)

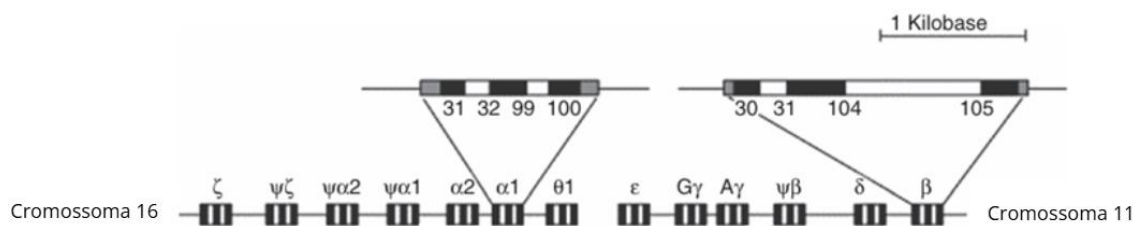


Figura 6 Organização dos genes globínicos nos cromossomas 16 e 11 (Adaptado de (25))

A expressão do gene *HBZ* ocorre, principalmente, nas primeiras 6 a 8 semanas de gestação, mas pequenas quantidades de ζ -globina ainda podem ser detetadas nos eritrócitos fetais e neonatais. No primeiro trimestre da gravidez, há também uma intensa expressão de *HBE1*, gene que codifica para uma forma embrionária da β -globina, conhecida como globina ϵ . Essa proteína é sintetizada por uma linhagem primitiva de eritrócitos localizada no saco vitelino e integra as Hbs Gower 1 e Gower 2. Assim que começa a produção dos primeiros eritrócitos definitivos no fígado fetal, aumenta a expressão do gene *HBG*, que codifica para a principal molécula de globina do tipo β , a γ -globina, que compõe a Hb Portland e a HbF. Esta continua a ser a Hb principal durante a maior parte da gravidez. Durante o terceiro trimestre, a produção de cadeias γ vai diminuindo, enquanto a síntese de cadeias β aumenta. O silenciamento do gene *HBG* continua após o nascimento até aos 6 meses de idade, altura em

que a percentagem de HbF começa a diminuir, até atingir a concentração de 1%. A sua inativação após a fase embrionária pode estar relacionada com a presença de um elemento silenciador na região promotora. (20) (22) (24) (26)

Na idade adulta, a Hb predominante é a HbA, devido ao aumento da expressão dos genes *HBA* e *HBB*, que codificam para as cadeias α e β , respetivamente. O *switch* da HbF para HbA resulta do silenciamento dos genes da γ -globina e da ativação do gene da β -globina, devido à ligação específica dos fatores de transcrição (FTs) aos genes da β -globina. Como referido no tópico anterior, a HbA₂ encontra-se em menor quantidade em comparação com a HbA devido à menor expressão dos genes que codificam para a cadeia δ em comparação com uma elevada expressão dos genes da globina β , apesar das semelhanças funcionais e estruturais entre as cadeias (Figura 7). Esta discrepância nos níveis de expressão pode ser atribuída a mecanismos de regulação tanto transcricionais quanto pós-transcricionais e parece estar relacionada com a instabilidade do mRNA da δ -globina em comparação com o β -mRNA. (20) (22) (26)

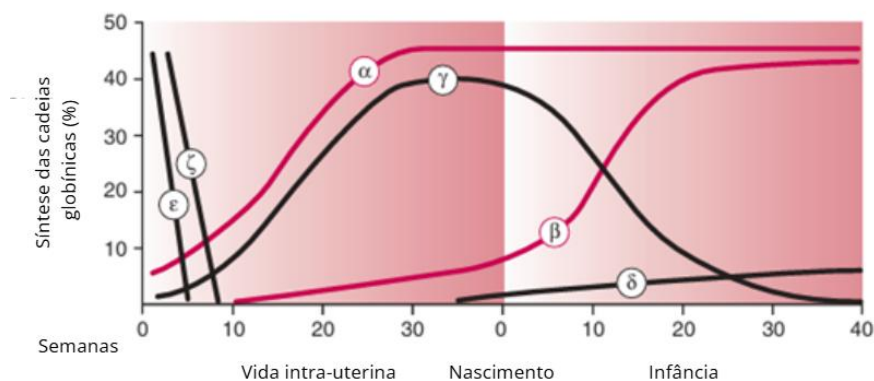


Figura 7 Síntese e expressão das cadeias globínicas ao longo do desenvolvimento humano (Adaptado de (6))

O controlo preciso da expressão dos genes das globinas permite o *switch* ordenado entre as diferentes formas de Hb garantindo a sua adaptação às necessidades fisiológicas. Deste modo, são necessários mecanismos regulatórios que coordenem a expressão génica de uma forma eficiente. (25)

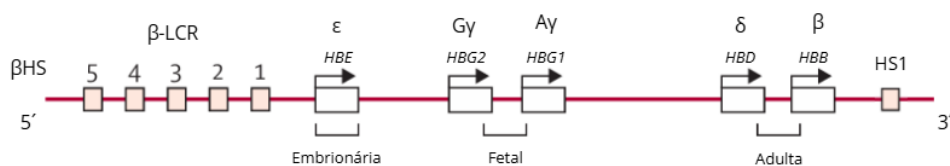
A expressão génica é controlada em três níveis distintos. O primeiro envolve uma regulação proximal, na qual os FTs se ligam aos promotores dos genes globínicos, fazendo com que estes sejam expressos. Alguns exemplos de FTs são o *GATA-binding factor 1* (GATA-1), o *Nuclear Factor Erythroid 2* (NF-E2), o *Krüppel-like factor 1* (KLF1) e o *B-cell*

lymphoma/leukemia 11A (*BCL11A*) que são expressos especificamente por células da linhagem eritroide. No que diz respeito ao GATA-1, este potencia a transcrição dos genes que codificam para a β -globina (em conjunto com o NF-E2) e γ -globina nos estádios mais precoces da eritropoiese e auxilia a repressão da γ -globina no *switch* entre a HbF e a HbA. O KLF1 atua como um ativador direto do gene da β -globina, promovendo a sua transcrição. Além disso, exerce um papel indireto na repressão da γ -globina, uma vez que regula a expressão de repressores como *BCL11A* e MYB, que inibem a transcrição do gene da γ -globina. (6) (27)

O segundo nível de regulação dos genes globínicos diz respeito à regulação distal, mediada pela *Locus Control Region* (LCR) dos genes que codificam para as β -globinas. A LCR encontra-se a montante no *cluster* correspondente à β -globina, no cromossoma 11. Esta região contém cinco sítios hipersensíveis (HS) à DNase I, que são marcadores de cromatina ativa e tornam o DNA acessível à ligação dos fatores de transcrição. Em relação ao *cluster* da α -globina, a regulação da expressão génica é feita através de quatro *Multi-Species Conserved Sequences* (MCS), localizadas também a montante, denominadas MCS R1–R4. As MCS correspondem, igualmente, a sítios hipersensíveis à DNase I sendo que, destes elementos, apenas a MCS R2 (também denominada de HS-40) demonstrou ser essencial para a expressão dos genes *HBA* (Figura 8). (18) (25) (23)

Por fim, o terceiro nível de regulação da expressão dos genes globínicos está associado a modificações epigenéticas, que modulam a sua ativação ou repressão de acordo com as marcas epigenéticas existentes. São conhecidas várias modificações que controlam o grau de compactação da cromatina e que permitem ou inibem a transcrição. A metilação do DNA é um dos exemplos, sendo que a hipermetilação inibe a transcrição devido a uma maior compactação da cromatina e a hipometilação tem o efeito contrário. O promotor do gene da γ -globina é altamente metilado na vida adulta, contribuindo para a sua repressão. As modificações nas histonas, como a sua acetilação e metilação também desempenham um papel essencial na regulação da expressão das cadeias globínicas. (23) (28)

Cromossoma 11



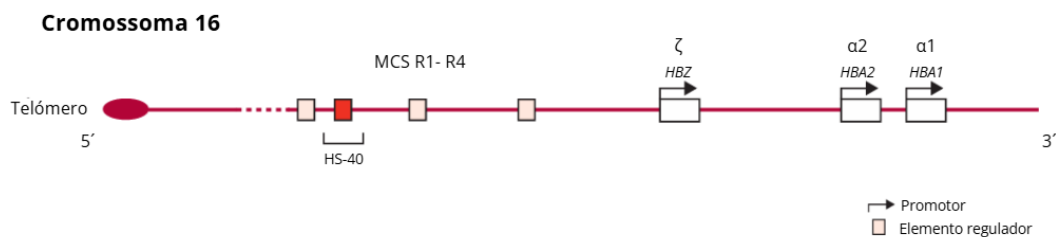


Figura 8 Organização dos genes globínicos nos respectivos cromossomas com destaque para os promotores e para os elementos reguladores (Adaptado de (18))

5. Mutações e detecção laboratorial das variantes de hemoglobina e de alterações quantitativas na sua síntese

• 5.1 Tipos de mutações nos genes das cadeias globínicas

Atualmente, encontram-se descritas mais de 1000 mutações associadas aos genes das cadeias globínicas. Estas podem afetar tanto a produção das proteínas globínicas como podem alterá-las estruturalmente, dando origem a variantes e distúrbios relacionados com a Hb, as hemoglobinopatias, que vamos abordar mais detalhadamente no tópico 6. Hemoglobinopatias. (13)

A maior parte das mutações identificadas e relacionadas com as variantes de Hb são as mutações pontuais *missense*, que afetam a estrutura das cadeias de globina. Estas mutações consistem na substituição de um ou mais nucleótidos no gene normal por um nucleótido distinto, o que leva à substituição de um aminoácido da cadeia, exatamente na posição afetada pela mutação. (6)

As variantes de Hb estão, também, associadas a outros tipos de mutações, menos usuais, como deleções, inserções, mutações antiterminação e *nonsense* que envolvem um ou mais dos seguintes genes: *HBA*, *HBB*, *HBG* ou *HBD*. As deleções, tal como o nome sugere, envolvem a remoção de um ou mais nucleótidos, enquanto as inserções resultam na adição de um ou mais nucleótidos, induzindo a leitura incorreta dos aminoácidos correspondentes. Em relação às mutações antiterminação, estas ocorrem quando o codão de terminação STOP é mutado, o que faz com que a tradução continue até atingir outro codão STOP. Em contrapartida, as mutações

nonsense envolvem a alteração de um nucleótido que promove o surgimento precoce de um codão de terminação STOP, resultando na degradação da cadeia globínica. (6) (9)

As mutações na Hb resultam em diversas anomalias, sendo que algumas delas desencadeiam sintomas clinicamente significativos. O termo zigosidade refere-se à associação entre o número de mutações genéticas e o nível de gravidade do efeito genético resultante. Entre as variantes de Hb mais frequentes e com maior impacto clínico destacam-se a HbS, HbC e HbE, que não só alteram a função da Hb como também influenciam a sua afinidade para o oxigênio. (9)

• 5.2 Métodos de diagnóstico para detecção de mutações

A detecção de mutações nas cadeias globínicas exige a utilização de múltiplas técnicas complementares. A maioria dos testes laboratoriais de rotina apenas fornecem informações sobre as propriedades físico-químicas da Hb. No entanto, para uma identificação clínica mais precisa, é normalmente necessário recorrer-se a pelo menos dois métodos distintos, cujos resultados devem ser interpretados tendo em conta o quadro clínico do doente em questão. (29)

O rastreio neonatal da drepanocitose envolve o teste do pezinho que é feito a partir do 3º dia de vida e, se possível, até ao 6º. A amostra de sangue é obtida através de uma ou duas picadas no calcanhar do recém-nascido e o diagnóstico laboratorial é feito por eletroforese capilar. Para a detecção de mutações, estão também disponíveis testes genéticos pré-natais bem como o diagnóstico genético pré-implantação, no caso de fertilização *in vitro*. (30)

Após a realização de um hemograma com resultados sugestivos de uma hemoglobinopatia e com o objetivo de se obter um diagnóstico preciso, são utilizadas diversas técnicas laboratoriais. As técnicas utilizadas dividem-se essencialmente em dois grupos: as técnicas analíticas baseadas em proteínas e as que permitem um diagnóstico a nível molecular. A metodologia mais rotineiramente utilizada e a abordagem inicial mais comum é a análise das Hbs através de eletroforese, uma vez que esta técnica permite separar as diversas frações da Hb e, assim, caracterizar as várias variantes. Para além desta, é também utilizada outra técnica, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que fornece um perfil mais detalhado e a quantificação exata das Hbs, pelo que é utilizada para a identificação e quantificação definitiva das variantes presentes. Como exemplo, temos a HbS e a HbC, que apresentam migração semelhante na eletroforese, pelo que, neste caso, seria necessário a utilização de HPLC para a distinção das duas variantes. (9)

Com base nos testes realizados inicialmente, pode haver suspeita da existência de mutações e, portanto, de hemoglobinopatias. Assim, poderá ser necessária a realização de técnicas moleculares para confirmação da mutação. A *polymerase chain reaction* (PCR) é um dos métodos mais utilizados, principalmente no estudo dos distúrbios relacionados com a globina α , sendo particularmente eficaz na detecção de deleções. Outro dos métodos utilizados é a *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA). Após a hibridação, ligação e amplificação por PCR das sondas-alvo da amostra, esta técnica permite a comparação com as sondas de uma amostra de referência, com número de cópias conhecido, com o objetivo de detetar anormalidades na amostra, nomeadamente, variações no número de cópias de DNA (deleções e/ou duplicações). A sequenciação de Sanger é, também, um dos métodos utilizados, principalmente, para detetar mutações específicas em certas regiões do DNA e as mutações pontuais. (4) (31)

6. Hemoglobinopatias

• 6.1 Definição e classificação

As hemoglobinopatias são caracterizadas pela síntese reduzida das cadeias polipeptídicas da Hb ou por alterações estruturais na Hb. Estima-se que, aproximadamente, 7% da população mundial seja portadora de uma hemoglobinopatia. (32) (33)

Estas doenças hereditárias são causadas por alterações nos genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas da Hb. As mutações podem afetar diretamente as cadeias globínicas ou podem interferir nas proteínas envolvidas no processo de síntese destas cadeias, pelo que podem ser classificadas em duas categorias: hemoglobinopatias qualitativas ou estruturais e hemoglobinopatias quantitativas. Nas hemoglobinopatias qualitativas, como o próprio nome sugere, a produção da Hb ocorre em níveis normais ou quase normais. No entanto, devido às mutações pontuais anteriormente referidas, ocorre uma modificação na estrutura da molécula de Hb (defeito estrutural), o que compromete também a sua função (defeito qualitativo). Um exemplo deste tipo de doença monogénica é a AF. Por outro lado, em relação às hemoglobinopatias quantitativas, estas resultam de uma produção reduzida de cadeias globínicas geralmente causadas por mutações que envolvem a deleção de nucleótidos. Como mecanismo compensatório, nestes casos, são sintetizadas outras formas de Hb não afetadas pela

mutação. Entre esta última categoria de hemoglobinopatias, destacam-se as talassemias, quer sejam elas *minor* ou *major*. (12)

○ 6.1.1 Hemoglobinopatias qualitativas ou estruturais

▪ 6.1.1.1 Anemia falciforme

A AF, também designada de drepanocitose, é uma doença hereditária monogénica, autossómica recessiva, e a hemoglobinopatia estrutural mais relevante em termos clínicos.

A alteração responsável por esta hemoglobinopatia está relacionada com a variante estrutural de Hb mais comum, a Hemoglobina S (HbS), que é formada por duas cadeias globínicas α normais combinadas com duas cadeias β mutadas. O defeito genético responsável pela produção desta Hb é a substituição de um único nucleótido no codão 6 do gene *HBB*. Esta mutação pontual resulta na substituição do ácido glutâmico (GAG) pela valina (GTG), na posição 6 da cadeia β . (6) (12) (33)

Esta substituição de aminoácidos tem várias implicações, tanto a nível estrutural como funcional. O ácido glutâmico, polar e hidrofílico, encontra-se presente na HbA e apresenta carga elétrica negativa, enquanto que a valina, apolar e hidrofóbica, é o aminoácido que o substitui na HbS e apresenta carga neutra. Esta alteração na carga elétrica afeta a mobilidade eletroforética da molécula de Hb e afeta a forma como as moléculas de Hb interagem entre si. Quando a HbS está totalmente oxigenada, a sua conformação não permite a ligação da valina às regiões hidrofóbicas. Deste modo, as moléculas de Hb permanecem solúveis no citosol eritrocitário, como acontece com a HbA e, assim, ocorre a preservação da forma normal, em disco bicôncavo, dos eritrócitos. Na presença de baixos níveis de oxigénio, a HbS forma vários polímeros que, ao se agruparem, causam a deformação dos eritrócitos e originam o formato de foice característico desta condição. A Figura 9 ilustra as diversas alterações morfológicas dos eritrócitos presentes na AF, resultantes da polimerização da HbS. Estas alterações funcionais e estruturais, que incluem a baixa motilidade e flexibilidade dos eritrócitos, tornam-nos mais densos. Deste modo, estas células encontram-se mais suscetíveis à hemólise e possuem uma vida útil mais reduzida de, aproximadamente, 20 dias, em comparação com os 120 dias dos eritrócitos normais. (6) (12) (33) (34) (35) (36)

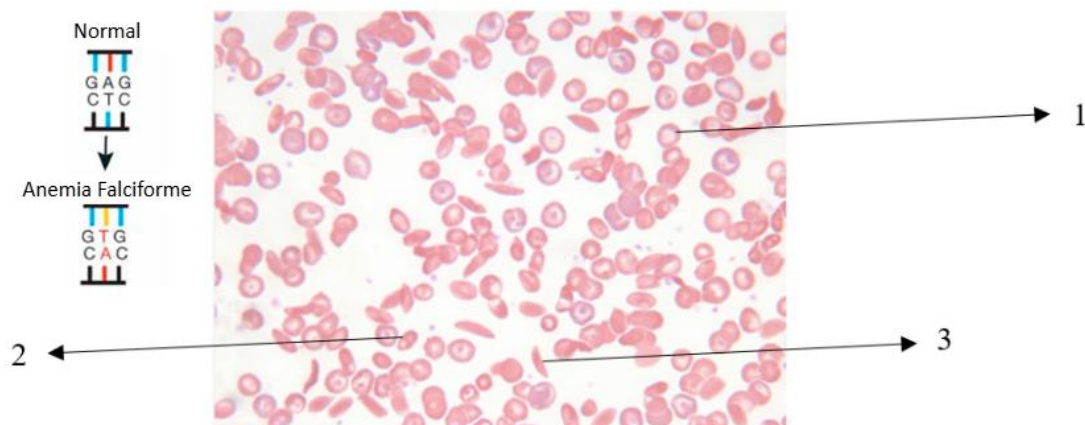


Figura 9 Microscopia ótica de esfregaço sanguíneo de doente diagnosticado com drepanocitose – (1) células com hemoglobina S na forma de disco bicôncavo; (2) momento inicial da polimerização caracterizada pela condensação da hemoglobina S numa parte do eritrócito denso; (3) célula falciforme irreversível (Adaptado de (37))

Desde o nascimento que a HbS se encontra presente nos indivíduos que apresentam o gene *HBB* mutado. No entanto, como foi referido anteriormente, a HbF é a que prevalece até ao nascimento e, posteriormente, ocorre o *switch* gradual para a HbA. A HbF não apresenta cadeias β na sua estrutura pelo que o gene mutado só começa a ser expresso quando ocorre a transição pós-natal da síntese de HbF para HbA. Neste caso, em vez de HbA, os indivíduos afetados começam a sintetizar HbS. (6) (12) (33)

O impacto fisiopatológico da presença de HbS é determinado pela herança genética do indivíduo. Existem vários genótipos da doença falciforme, sendo o mais grave o genótipo homocigótico HbSS, em que são herdados ambos os alelos mutados dos progenitores. Os indivíduos portadores são os que possuem o genótipo heterocigótico HbAS, que contém um alelo normal e um alelo mutado. A Figura 10 ilustra os possíveis padrões de transmissão genética num casal portador de AF. Curiosamente, embora a mutação no gene *HBB* provoque complicações graves para os indivíduos homocigóticos (HbSS), sabe-se que a forma heterocigótica (HbAS) confere uma proteção parcial contra formas graves de malária causadas pela infeção de *Plasmodium falciparum*. A polimerização da Hb nos eritrócitos infetados é responsável pela paragem do crescimento dos parasitas intra-eritrocitários antes da replicação do DNA, o que confere a resistência à malária. (6) (12) (35) (36) (38)

A par dos genótipos mais conhecidos, existem outras variantes genéticas mistas resultantes da combinação do alelo HbS com outras mutações nos genes da β -globina, como é o caso da HbS combinada com a HbC (HbSC) e da HbS combinada com a β -talassemia. A

hemoglobina C é formada devido à substituição do resíduo de ácido glutâmico por um resíduo de lisina na sexta posição de β -globina. (12) (35) (36)

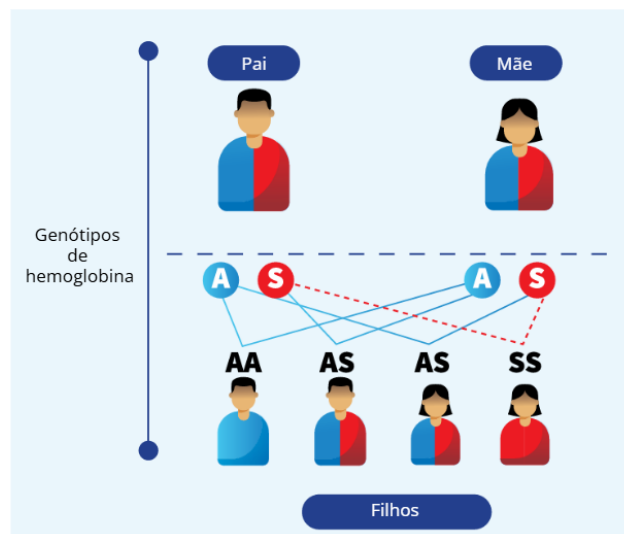


Figura 10 Possíveis padrões de transmissão genética num casal portador de anemia falciforme (Adaptado de (39))

Para além das alterações já mencionadas, a presença de HbS sob condições de hipóxia leva à inibição da produção de óxido nítrico provocando a adesão das células falciformes ao endotélio vascular. Consequentemente, o bloqueio do fluxo sanguíneo (crises vaso-oclusivas), e a lesão do endotélio vascular, originam complicações *major* como iremos abordar posteriormente. (35) (36)

▪ 6.1.1.1 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da AF variam de acordo com a expressão genotípica de cada indivíduo, a qual condiciona a gravidade e evolução da doença. A forma mais grave da doença ocorre nos indivíduos com a forma homocigótica da AF (HbSS), pelo que apresentam sintomas mais graves e potencialmente fatais. Por outro lado, os indivíduos portadores (HbAS) são geralmente assintomáticos ou apresentam sintomas leves. (6) (36)

Esta doença afeta diversos órgãos e sistemas devido a múltiplas complicações, tanto agudas como crónicas. Estas manifestações começam a surgir por volta dos 6 meses de idade, quando os níveis de HbF diminuem e os níveis de HbS aumentam. Até esse momento, os indivíduos afetados são, geralmente, assintomáticos. (6) (36) (40)

As crises vaso-oclusivas (CVO) são uma das manifestações mais comuns nesta condição e a que causa mais entradas nos serviços de urgências. A patogênese destas crises está relacionada com a polimerização da HbS e com a sua aderência às células endoteliais. Esse processo resulta na obstrução dos vasos sanguíneos e em dor intensa, principalmente, nos ossos, tórax e abdômen. A dor associada às crises resulta da ativação das fibras nervosas nociceptivas, provocada pela obstrução da microvasculatura que, em última instância, origina necrose e dano no órgão. A hipóxia, a exposição ao frio extremo e algum tipo de infecção podem ser os fatores desencadeadores de uma CVO. Nos primeiros anos de idade, as crises manifestam-se, essencialmente, pela síndrome mãos-pés (dactilite dolorosa) caracterizada por dor nas extremidades. Nos recém-nascidos a dor é manifestada com irritabilidade e possíveis distúrbios no desenvolvimento. (6) (14) (34) (36) (40)

Outro dos sinais cardinais para o diagnóstico desta patologia é a presença de anemia hemolítica crônica devido à redução do tempo de semi-vida dos eritrócitos em circulação. Em termos bioquímicos, caracteriza-se por diminuição dos níveis de Hb e do hematócrito, reticulocitose, como forma de compensação da anemia, e também por níveis elevados de bilirrubina, que se manifesta através da icterícia. (6) (14) (36)

O baço, um órgão linfóide que tem como uma das suas funções a remoção de eritrócitos defeituosos, fica sobrecarregado na AF. Os eritrócitos em forma de foice tornam o fluxo sanguíneo mais lento, reduzindo a oxigenação e aumentando a polimerização da HbS, fazendo com que ocorra, de forma progressiva, a esplenomegalia e posteriormente a autoesplenectomia. A falência funcional deste órgão, torna os indivíduos mais suscetíveis a infecções particularmente por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Parvovirus B19*. Além disso, este processo de falciformização das células sanguíneas e o seu aprisionamento, podem desencadear o sequestro esplênico. O sequestro esplênico é uma emergência médica uma vez que causa um choque hipovolémico que, se não intervencionado rapidamente, leva à morte em poucas horas. (14) (36) (40)

Para além das manifestações já mencionadas, a AF está associada a várias outras complicações sistémicas, relacionadas com a vaso-oclusão. A síndrome torácica aguda é uma delas e pode também ser desencadeada por infecções respiratórias. É caracterizada por febre e dor torácica e é a principal causa de morte em indivíduos com drepanocitose. O acidente vascular cerebral (AVC) é, também, uma das causas mais frequentes de morbidade e mortalidade em idade pediátrica, com risco significativo de sequelas a nível neurológico. A Figura 11 é representativa das múltiplas manifestações clínicas referidas, enfatizando a natureza

multissistémica da doença, que reduz tanto a esperança média de vida como a qualidade de vida do doente com AF. (6) (40) (41) (42)

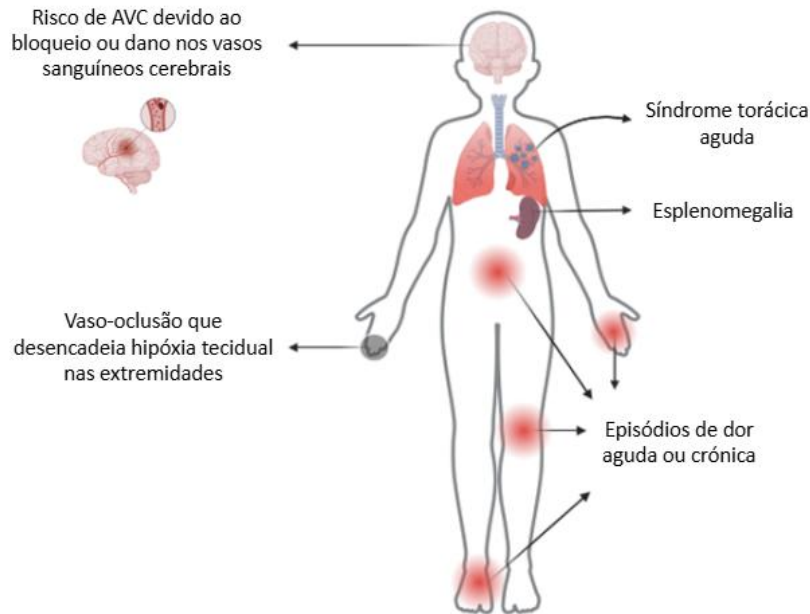


Figura 11 Manifestações clínicas e complicações associadas à anemia falciforme (Adaptado de (34))

○ 6.1.2 Hemoglobinopatias quantitativas

▪ 6.1.2.1 Talassemias

As talassemias são doenças genéticas de carácter autossómico recessivo. Pertencem ao grupo das hemoglobinopatias e são caracterizadas por alterações quantitativas na síntese das cadeias globínicas da Hb. Essa produção desequilibrada leva à acumulação de cadeias globínicas livres, não emparelhadas e insolúveis, que se depositam nos eritrócitos, comprometendo a sua função. (43)

As talassemias são classificadas de acordo com a cadeia cuja síntese se encontra reduzida ou ausente. Como mecanismo compensatório, existe um aumento da síntese das cadeias globínicas não-deficientes. A α -talassemia ocorre devido a anomalias na produção das cadeias α , codificadas pelo agrupamento génico α , presente no cromossoma 16, enquanto que a β -talassemia envolve a produção deficiente das cadeias β , codificadas pelo gene *HBB*, presente no cromossoma 11. (6) (4)

Cada indivíduo possui quatro genes responsáveis pela produção das cadeias α da Hb, dois em cada cromossoma 16, *HBA1* e *HBA2*, sendo que o genótipo é descrito como $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. A

α -talassemia ocorre quando há uma deleção ou mutação nos genes envolvidos na produção de α -globina, sendo que as deleções são as mais frequentes. A gravidade e as manifestações da doença variam conforme o número de genes afetados, pelo que podemos dividir a α -talassemia em quatro categorias:

- Portador silencioso: deleção de 1 gene ($-\alpha/\alpha\alpha$);
- α -talassemia *minor*: deleção de 2 genes ($-\alpha/-\alpha$; $--/\alpha\alpha$);
- Doença da HbH: deleção de 3 genes ($--/-\alpha$);
- Hidropisia fetal por Hb de Bart: deleção de 4 genes ($--/--$).

A doença da HbH e a hidropisia fetal por Hb de Bart são consideradas as formas mais graves da α -talassemia, pelo que são também denominadas como α -talassemia *major*. O surgimento de Hb anormais, como a HbH (β_4), deve-se à escassa produção de cadeias α , levando a um excesso de cadeias β a partir dos 6 meses de idade. A hidropisia fetal é caracterizada por um excesso de cadeias γ que se agrupam na forma de Hb de Bart (γ_4), geralmente incompatível com a vida devido à altíssima afinidade para o oxigênio. (6) (12) (40) (43)

A fisiopatologia da β -talassemia caracteriza-se pela deficiente produção de cadeias de β -globina, causando uma desproporção na razão entre as cadeias α e β . Ao contrário da α -talassemia em que este desequilíbrio se deve a deleções nos genes, no caso da β -talassemia, este desequilíbrio resulta, na maioria dos casos, de mutações pontuais no gene *HBB*. Em indivíduos com genótipo normal (β/β), ocorre uma produção equilibrada de cadeias α e β , permitindo a formação eficiente da HbA. No entanto, já foram descritas cerca de 400 mutações diferentes neste gene, o que explica a grande heterogeneidade molecular. (12) (18) (4)

As β -talassemias podem ser classificadas consoante o nível de síntese de β -globina e, consequentemente, tendo em conta o nível de produção de HbA. Se o gene mutado apresentar total incapacidade de produção de cadeias β , designamos de β^0 -talassemia, e os indivíduos não produzem HbA. Se o gene mutado produzir quantidades residuais de β -globina, estamos perante as β^+ -talassemias, caracterizadas por uma redução parcial na síntese de HbA. Como forma de compensação, há um aumento da produção das cadeias δ e, por vezes, das cadeias γ , resultando em níveis elevados de HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e, por vezes, de HbF ($\alpha_2\gamma_2$). (6) (18) (43)

De acordo com o grau de perda de expressão génica, podemos classificar a β -talassemia em três fenótipos distintos:

- β -talassemia *minor*: Indivíduo portador, que herdou apenas um gene mutado, pelo que é produzida uma quantidade significativa de HbA, característica da heterozigotia simples (β/β^0 ou β/β^+);
- β -talassemia *intermédia*: Indivíduo que herdou duas mutações nos genes β , que ainda permite alguma produção de β -globina, podendo ser heterozigótico composto (β^0/β^+) ou homozigótico para mutações menos graves (β^+/β^+);
- β -talassemia *major* ou Anemia de Cooley: Indivíduo que herdou mutações em ambos os genes da β -globina que comprometem completamente a produção de HbA, característica da homozigotia (β^0/β^0).

A β -talassemia *major* é a forma mais grave da doença, sendo caracterizada por uma ausência de produção das cadeias β -globínicas. Considerando a sua gravidade, impacto clínico e a sua maior relevância para a terapia genética, nos tópicos seguintes iremos focar apenas este tipo de talassemia. (12) (43)

▪ 6.1.2.1.1 Manifestações clínicas

À semelhança do que foi descrito para a AF, também os indivíduos com β -talassemia *major* se apresentam assintomáticos desde a vida fetal até, aproximadamente, aos 6 meses de idade. Nesse momento, começa a ocorrer o *switch* entre a HbF ($\alpha_2\gamma_2$) e a HbA ($\alpha_2\beta_2$). À medida que a síntese de cadeias β se torna essencial e está comprometida nos indivíduos com β -talassemia *major*, começam a surgir os primeiros sinais clínicos da doença. (6)

A anemia hemolítica e o atraso no desenvolvimento são das primeiras manifestações clínicas a surgir. Nestes indivíduos, a anemia tem características multifatoriais, está relacionada tanto com a eritropoiese ineficaz como com a destruição acentuada dos eritrócitos. Como referido no tópico anterior, nesta patologia ocorre um desequilíbrio entre a quantidade de cadeias α e β produzidas. A acumulação de cadeias α livres leva ao aparecimento de corpos de Heinz que são o resultado da desnaturação e precipitação das cadeias α instáveis. Estas inclusões eritrocitárias induzem stress oxidativo e dano nas membranas celulares, originando hemólise. Estão presentes nos GV, que são removidos pelos macrófagos do baço, e estão também presentes nos seus precursores, que são logo removidos ao nível da medula óssea. Este

processo compromete a maturação eritrocitária, resultando numa eritropoiese ineficaz. A Figura 12 ilustra a anisopoiquilocitose acentuada e as inclusões eritrocitárias. (6) (43)

As anomalias musculoesqueléticas também estão entre as manifestações clínicas frequentes, devido à hiperplasia compensatória da medula óssea em resposta à anemia severa. A fâcies, típica da β -talassemia *major*, é caracterizada por *bossing* frontal (testa proeminente), hipertrofia do maxilar superior e maçãs do rosto proeminentes. A hepatoesplenomegalia é também uma característica desta patologia devido à extensa eritropoiese, destruição e sequestro das células sanguíneas. Estes indivíduos são também mais suscetíveis a infeções, devido à sobrecarga do baço e ao comprometimento do sistema imunitário. (6) (14) (43)

Outra das complicações associadas à β -talassemia *major* é a hemossiderose, considerada a principal causa de morbidade nestes doentes. A sobrecarga de ferro advém das múltiplas transfusões a que os indivíduos com esta doença estão sujeitos e está associada a disfunções orgânicas. Para além disso, a intensa atividade eritropoiética inibe a síntese hepática de hepcidina, o que leva a um aumento da absorção de ferro pelos enterócitos intestinais. (6) (4)

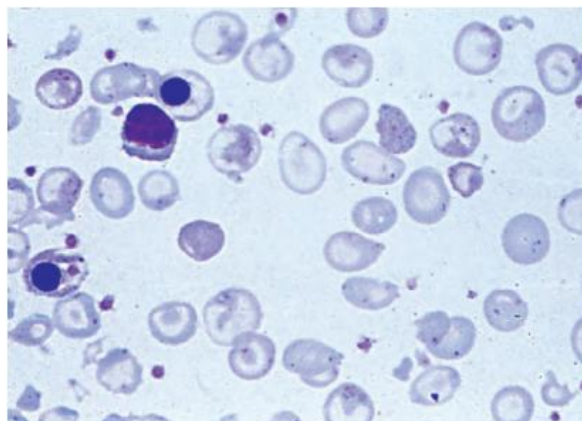


Figura 12 Esfregaço sanguíneo de indivíduo com β -talassemia *major* demonstrando anisopoiquilocitose acentuada, presença de ponteados basófilos, pequenos fragmentos eritrocitários e corpos de Heinz (Retirado de (44))

• 6.2 Epidemiologia global

As hemoglobinopatias são as doenças monogénicas mais comuns em todo o mundo. Entre elas, a AF e a β -talassemia destacam-se como sendo as mais prevalentes.

De acordo com as estimativas recentes, cerca de 75% dos aproximadamente 500.000 bebés nascidos com doença falciforme em 2021, terão nascido na África Subsaariana. Sabe-se que a frequência do gene HbS é elevada nas regiões com histórico de malária endémica como

é o caso da África Subsaariana, Índia, Sudeste Asiático e regiões mediterrânicas. Nestas áreas, os indivíduos heterozigóticos (HbAS) apresentam uma vantagem seletiva, como foi referido anteriormente, o que favorece a persistência e a disseminação do gene HbS na população, contribuindo para o elevado número de casos de AF registados nessas zonas. Na Europa, apesar da menor prevalência de AF, encontram-se diagnosticadas cerca de 40.000 pessoas. (6) (36) (39) (45)

Da mesma forma, também a β -talassemia apresenta maior prevalência em regiões historicamente afetadas pela malária, como no subcontinente indiano, partes do Sudeste Asiático, no Médio Oriente mas também no Mediterrâneo. Apesar de existir este fator diferenciador entre os países endémicos e a Europa, ainda é nestes países que a morbidade e mortalidade associadas às hemoglobinopatias são mais elevadas. (46)

No entanto, tanto a AF como a β -talassemia estão presentes e a aumentar em diversas regiões do mundo devido à migração de pessoas com ascendência africana. A Figura 13 representa a distribuição geográfica de hemoglobinopatias. (46)

Nos países desenvolvidos vão sendo feitos esforços de modo a aumentar a esperança média de vida e a melhorar a qualidade de vida dos doentes. Tal é alcançado através de programas de rastreio neonatal, de medidas profiláticas e do acesso a diversas opções terapêuticas, como a hidroxureia (HU), o transplante de células estaminais hematopoiéticas (TCEH) e, mais recentemente, a terapia genética. Por outro lado, nos países subdesenvolvidos, devido à carência de serviços de saúde, este objetivo não é alcançado, pelo que a maioria dos doentes permanecem sem diagnóstico e não sobrevivem devido às complicações da doença. Os dados de 2019 relatam que, na Europa, cerca de 94% das crianças diagnosticadas com AF vivem até à idade adulta e mesmo até à velhice, ao contrário do que se passa na África Subsariana, em que 50-90% das crianças diagnosticadas morrem nos primeiros 5 anos de vida. (35) (36) (39)

Em Portugal, o primeiro estudo epidemiológico realizado a nível nacional sobre hemoglobinopatias teve início na década de 1980. A prevalência global situava-se entre 1% e 2%, sendo mais elevada para a β -talassemia (0,45%) do que para a AF (0,32%). As regiões mais a sul do país eram as mais afetadas. Na sequência dos dados obtidos, foi criado, em 1986, o Programa Nacional de Controlo das Hemoglobinopatias (PNCH). Desde então, têm sido desenvolvidas diversas ações como rastreios populacionais e estudos epidemiológicos, de modo a prevenir e controlar melhor a evolução das hemoglobinopatias. Neste sentido surgiu o rastreio neonatal da drepanocitose. (47)

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) é, em Portugal, a entidade responsável pelo Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN). O objetivo deste rastreio, mais conhecido como teste do pezinho, é a deteção e identificação precoce de diversas doenças genéticas, como a drepanocitose, sem que ainda se verifiquem sintomas. A realização atempada deste rastreio contribui para um melhor prognóstico dos doentes, uma vez que possibilita intervenções médicas mais rápidas e eficazes. Sendo este teste gratuito, é de extrema importância a sua realização uma vez que, de acordo com o estudo piloto realizado em maio de 2021, a drepanocitose, já foi confirmada em 118 casos, um número epidemiologicamente relevante para Portugal. (48)

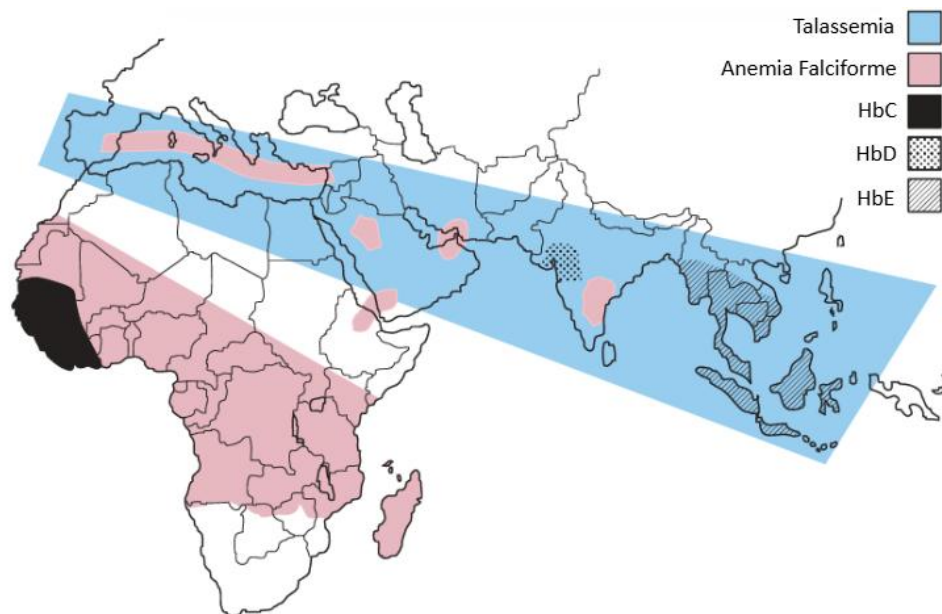


Figura 13 Distribuição geográfica de hemoglobinopatias (Adaptado de (6))

• 6.3 Abordagens terapêuticas convencionais

Embora com fisiopatologias distintas, tanto a AF como a β -talassemia apresentam desafios devido à complexidade do seu tratamento que visa, essencialmente, melhorar a qualidade de vida dos doentes. Para isso, recorre-se a uma combinação de fármacos, medidas de suporte, transfusões regulares e, em alguns casos, ao TCEH.

A compreensão das abordagens terapêuticas convencionais é essencial para valorizar e reconhecer o potencial inovador das terapias emergentes, como é o caso da terapia genética, a qual será abordada mais adiante, e que se antevê que constitua uma mudança de paradigma no tratamento das hemoglobinopatias.

○ 6.3.1 Terapêutica farmacológica

▪ 6.3.1.1 Medidas de suporte

As medidas de suporte, a par com a terapêutica farmacológica, são essenciais para prevenir complicações e melhorar a qualidade de vidas dos doentes com hemoglobinopatias. Permitem gerir e aliviar os sintomas e manifestações características das doenças, pelo que complementam a terapêutica farmacológica.

Em relação à AF, a dor, associada às CVO, é o principal obstáculo uma vez que é debilitante e leva a uma perda significativa da qualidade de vida dos doentes. Os analgésicos são a base do controlo da dor e devem ser selecionados tendo em conta a gravidade e a anterior resposta do doente a diferentes analgésicos. Quando a dor se torna crónica, os opióides são a melhor opção terapêutica. A hidratação adequada também contribui para o alívio eficaz da dor, uma vez que permite manter um bom fluxo sanguíneo. (6) (36) (40)

No caso da β -talassemia, as medidas de suporte centram-se, essencialmente, na gestão das consequências da anemia hemolítica e da sobrecarga de ferro resultante das transfusões sanguíneas regulares. (40)

Tanto na AF como na β -talassemia, as infeções são recorrentes e potencialmente fatais. Devido à gravidade destas manifestações, o tratamento antibiótico deve ser iniciado de forma precoce, logo que surjam os primeiros sinais de infeção, de modo a prevenir a progressão do quadro clínico. Contudo, a profilaxia é essencial para a prevenção de complicações futuras. A imunização e a administração profilática de antibióticos são altamente recomendadas como profilaxia nestes casos. (6) (40)

Para além dos fatores anteriormente referidos, os doentes também beneficiam de suplementação vitamínica e, não menos importante, de apoio psicológico, de modo a garantir tanto o bem-estar físico como o mental. (6)

▪ 6.3.1.2 Hidroxiureia

A HU ou hidroxycarbamida é um antimetabolito de ureia (hidroxycarbamato), que apresenta uma massa molecular de 76.055 g/mol e a fórmula molecular de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$. Atualmente, a HU é um dos poucos medicamentos disponíveis para o tratamento da AF aprovado tanto pela *European Medicines Agency* (EMA) como pela *Food and Drug Administration* (FDA). Nos Estados Unidos, a HU foi aprovada pela FDA em 1998, apenas

para doentes adultos e, só a partir de 2017 é que a sua indicação terapêutica foi expandida aos doentes pediátricos. A EMA aprovou este fármaco em 2007, para o tratamento de adultos com AF. Em 2012, a formulação Siklos foi aprovada para crianças com idade igual ou superior a 2 anos. Em 2019 surgiu uma nova formulação líquida oral (Xromi) que foi autorizada para utilização em crianças com idade igual ou superior a 9 meses. (34) (36) (49) (50) (51)

Entre os agentes modificadores de doença utilizados para as hemoglobinopatias, destaca-se a HU. Este composto inibe a enzima ribonucleotídeo redutase, essencial para a conversão dos ribonucleótidos em desoxirribonucleótidos. Essa inibição provoca a paragem do ciclo celular na fase S originando uma resposta eritropoiética alterada, que culmina na síntese de HbF. Diversos estudos clínicos apontam para o papel fundamental da HbF como moduladora da gravidade das hemoglobinopatias, o que é explicado pelo facto de os recém-nascidos com AF ou β -talassemia permanecerem assintomáticos até aos seis meses de idade. (46)

No caso específico da AF, o aumento da síntese de HbF inibe a polimerização da HbS em condições de hipoxia, o que contribui significativamente para a preservação da morfologia dos eritrócitos e para a diminuição do número de células falciformes irreversíveis, sendo assim atenuados os sintomas associados à deformabilidade dos eritrócitos. Deste modo, a HU é eficaz na redução do número e da gravidade das crises de dor em cerca de 70% dos doentes. Para além de aumentar a produção de HbF, a HU também diminui a expressão de moléculas de adesão dos neutrófilos, eritrócitos e das células do endotélio vascular, melhorando o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, reduzindo os episódios vaso-oclusivos. Este conjunto de fatores contribui para a diminuição da mortalidade associada à doença e para o aumento da esperança média de vida, uma vez que diminui as necessidades de transfusão e a frequência de internamentos hospitalares. (6) (36) (40) (46) (52)

Em relação à β -talassemia, a eficácia da HU na indução da HbF não tem revelado resultados consistentes. Em teoria, a elevação da HbF ($\alpha_2\gamma_2$) traria benefícios. Os doentes com β -talassemia apresentam níveis aumentados de cadeias α livres, devido à insuficiente produção de cadeias β . Por isso, a elevação da HbF seria uma estratégia eficaz, uma vez que a incorporação das cadeias α na HbF reduziria a acumulação de cadeias α livres o que, conseqüentemente, diminuiria as manifestações e complicações características da doença. Contudo, os ensaios clínicos realizados indicam que a eficácia da HU, nesses casos, é relativamente limitada, uma vez que o fármaco não consegue promover um aumento suficiente da produção de HbF para corrigir o desequilíbrio entre as cadeias α e β . (52)

A HU é amplamente utilizada no tratamento da AF e, embora com menos frequência, também tem sido aplicada em alguns casos de β -talassemia. No entanto, apesar dos benefícios terapêuticos reconhecidos, o uso da HU está associado a vários efeitos adversos, pelo que o seu uso deve ser reservado apenas para situações em que esteja estritamente indicado como episódios dolorosos frequentes, historial de AVC ou CVO severas, entre outras. Entre os efeitos adversos mais conhecidos destacam-se a citopenia, a hiperpigmentação e ganho de peso. A azoospermia afeta 80% dos indivíduos do sexo masculino, podendo comprometer a fertilidade. Também são necessárias precauções especiais em mulheres na idade fértil, devido ao efeito teratogénico descrito. O estudo ESCORT-HU realizado na Europa, a mais de 1900 doentes, permitiu demonstrar o bom perfil de segurança a longo prazo da HU. No entanto, apesar de apresentar uma boa relação benefício-risco, a HU não representa uma cura, visto que não atua diretamente nas causas genéticas subjacentes à AF e à β -talassemia. (34) (40) (53)

▪ 6.3.1.3 L-glutamina

A L-glutamina é o L-aminoácido mais abundante no organismo humano. É considerada um aminoácido condicionalmente essencial uma vez que, embora seja classificada como um aminoácido não essencial, em situações de stress metabólico, como é o caso da hemólise característica da AF, ocorre um aumento significativo das necessidades de L-glutamina. (36) (54)

A L-glutamina está envolvida no transporte de nitrogénio e atua como precursora da síntese de outras moléculas biológicas, como é o caso da glutatona (GSH). O seu mecanismo de ação prende-se, essencialmente, com duas vias. Numa das vias, a GSH exerce atividade antioxidante, neutralizando as espécies reativas de oxigénio (ROS). Os eritrócitos falciformes apresentam níveis elevados de ROS, o que causa danos na membrana celular, contribuindo para as manifestações clínicas típicas da AF. A segunda via de ação está relacionada com outras enzimas antioxidantes, como a glutatona redutase, a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a catalase, que utilizam o NADPH como co-fator. A L-glutamina tem aqui um papel essencial visto que, ao ser convertida em glutamato, participa na regeneração de NAD^+ , essencial para manter o equilíbrio antioxidante através de uma razão NAD^+/NADH mais favorável. Esse equilíbrio é crucial para o funcionamento das vias metabólicas que produzem NADPH, co-fator das enzimas antioxidantes mencionadas. Nos eritrócitos falciformes, a capacidade de auto-oxidação está aumentada, em parte devido a um desequilíbrio dessa razão. Desta forma, a L-

glutamina é um aminoácido importante para o controlo da AF uma vez que protege as membranas contra o *stress* oxidativo, reduzindo a falciformização *de novo* e apoiando a atividade enzimática antioxidante, o que reduz significativamente as CVO e as hospitalizações. (34) (36) (54)

Em 2017, a L-glutamina foi aprovada pela FDA para o tratamento da AF em doentes com idade igual ou superior a 5 anos. No entanto, não foi aprovada para a β -talassemia uma vez que o seu mecanismo de ação não interfere na capacidade de produção das cadeias de β -globina. Relativamente à EMA, o pedido da autorização de comercialização do medicamento foi retirado pela empresa requerente após parecer negativo por parte do *Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP). (55)

▪ 6.3.1.4 Voxelotor

O voxelotor, anteriormente conhecido como GBT440, é uma pequena molécula inibidora da polimerização da HbS. É um modelador alostérico da HbS que se liga reversivelmente à valina N-terminal da cadeia de α -globina da Hb, aumentando a sua afinidade para o oxigénio. Esta modificação desloca a curva de dissociação da Hb para a esquerda, reduzindo a concentração de Hb desoxigenada. Ao manter a Hb no estado oxigenado, o voxelotor impede a sua polimerização, prevenindo a falciformação e posterior destruição eritrocitária. Esta ação traduz-se numa atenuação progressiva das complicações clínicas da AF e num aumento da qualidade de vida dos doentes. (34) (36) (56)

Estudos de fase I e II demonstraram que este fármaco é, geralmente, bem tolerado e que é eficaz na redução da inflamação, da dor e das restantes manifestações características da AF. No entanto, o aumento da afinidade para o oxigénio acarreta preocupações quanto aos efeitos a longo prazo, nomeadamente na função cerebral e na lesão orgânica. Como forma de ultrapassar estes possíveis efeitos, está a ser desenvolvido um fármaco de nova geração, similar ao voxelotor, que estabiliza a HbS na forma oxigenada. Estudos pré-clínicos demonstraram um aumento da sobrevivência em modelos murinos e, está previsto um ensaio clínico conclusivo até 2029. (34) (36)

O voxelotor foi aprovado pela FDA, em 2019, para o tratamento de adultos e crianças com mais de 12 anos com AF, sendo essa indicação expandida, em 2021, para a população pediátrica com mais de 4 anos. No entanto, em 2024 a empresa farmacêutica fabricante retirou todos os lotes do mercado devido a ensaios clínicos pós-comercialização que relataram maior

taxa de CVO em doentes que receberam a terapêutica. Na Europa, o voxelotor recebeu autorização de comercialização da EMA em 2022, para doentes com mais de 12 anos. Contudo, em 2024 a CHMP recomendou a suspensão da autorização e os lotes foram retirados do mercado. Ainda assim, o voxelotor representa uma abordagem inovadora por atuar diretamente na causa molecular da falciformação eritrocitária. Esta particularidade bioquímica, direcionada para a HbS, explica também a razão do medicamento não ter sido aprovado para outras hemoglobinopatias como a β -talassemia. (57) (58)

▪ 6.3.1.5 Crizanlizumab

O crizanlizumab é um anticorpo monoclonal humanizado, IgG2 kappa, que reduz a adesão celular ao endotélio vascular, atuando como inibidor seletivo da P-selectina. Este fármaco bloqueia a interação da P-selectina com o seu ligando, a glicoproteína P-selectina 1 (PSGL-1), como é ilustrado na Figura 14. As selectinas são proteínas transmembranares pertencentes à família das moléculas de adesão celular, fundamentais para a migração e posterior adesão dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, durante os processos inflamatórios. (36) (59)

Na AF, a interação entre a P-selectina e o PSGL-1 desempenha um papel importante na ocorrência das CVO, ao facilitar a adesão das células inflamatórias e eritrócitos falciformes ao endotélio vascular. Ao inibir essa interação, o crizanlizumab ajuda a diminuir a frequência das CVO e, conseqüentemente, das crises de dor. (34)

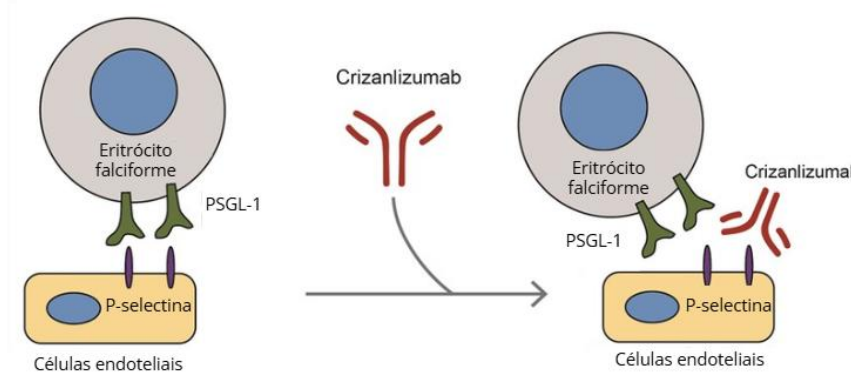


Figura 14 Mecanismo de ação do crizanlizumab (Adaptado de (60))

O ensaio clínico SUSTAIN, realizado em 2016, teve como principal objetivo avaliar a eficácia e segurança do crizanlizumab na prevenção das CVO em doentes com AF. Os

resultados foram promissores, demonstrando a capacidade deste fármaco em reduzir as CVO em cerca de 45%. No entanto, o ensaio STAND, um estudo de fase III realizado posteriormente, suscitou preocupações importantes devido aos efeitos secundários significativos do crizanlizumab, o que compromete a sua viabilidade para muitos doentes. (34)

Com base nos resultados positivos do ensaio SUSTAIN, o crizanlizumab foi aprovado pela FDA, em 2016, para o tratamento de doentes com AF e mais de 16 anos. Em 2020, a EMA emitiu uma autorização condicional de comercialização com as mesmas indicações terapêuticas. No entanto, em 2023, o CHMP recomendou a revogação dessa autorização, após o estudo STAND indicar um aumento da incidência de eventos adversos graves associados ao tratamento. Tal como o voxelotor, também o crizanlizumab não foi aprovado para a β -talassemia, dado que o seu mecanismo de ação não está relacionado com a produção das cadeias de β -globina. (34) (61)

○ 6.3.2 Transfusões sanguíneas

As transfusões sanguíneas representam uma das principais estratégias terapêuticas nas hemoglobinopatias crónicas, especialmente na AF homocigótica e na β -talassemia *major*, sendo utilizadas tanto em situações clínicas agudas quanto como terapia de manutenção a longo prazo.

Na AF, as transfusões visam reduzir a proporção de HbS circulante, idealmente para menos de 50%, e aumentar a concentração de Hb, para cerca de 10 g/dL, na tentativa de melhorar a oxigenação dos tecidos e prevenir complicações. As transfusões podem ser administradas de forma simples, para aumentar os níveis de Hb, ou como transfusões de troca, manuais ou automatizadas, que permitem reduzir mais rapidamente a proporção de HbS, sendo utilizadas em casos de disfunção orgânica e CVO graves. As transfusões pontuais são frequentemente indicadas em situações agudas, como o sequestro esplênico ou a síndrome torácica aguda. Como prevenção secundária do AVC, os doentes são geralmente integrados em programas de transfusão a longo prazo, de forma a reduzir o risco de recorrência. (6) (36) (40)

Na β -talassemia *major*, a necessidade de transfusões regulares começa no primeiro ano de vida do doente, devido à anemia severa que compromete o crescimento e o desenvolvimento normal. O principal objetivo terapêutico é corrigir a anemia crónica, estando o nível alvo de Hb situado entre 9 a 10,5 g/dL. Estas transfusões também visam compensar a eritropoiese ineficaz, característica da doença. As transfusões de concentrados de eritrócitos são realizadas, em

média, a cada três semanas, com um volume aproximado de 12 a 14 mL por quilo de peso corporal, e hematócrito ajustado em torno dos 60%. (40)

Apesar das suas vantagens, as transfusões sanguíneas, também podem apresentar algumas complicações como a aloimunização (formação de anticorpos contra os antígenos eritrocitários), infecções transmitidas por via transfusional e, de forma mais prevalente e prejudicial, a sobrecarga de ferro. Cada unidade de sangue transfundido contém cerca de 200–250 mg de ferro, quantidade que excede a capacidade fisiológica de excreção do organismo. Por esse motivo, os indivíduos que recebem transfusões frequentes devem ser regularmente monitorizados e iniciar, quando indicado, a terapêutica de quelação do ferro, utilizando agentes como a desferroxamina, deferiprona ou deferasirox. Para minimizar os riscos de complicações associadas às transfusões, recomenda-se que sejam realizadas fenotipagens antes do seu início, bem como a vacinação dos doentes contra os vírus da hepatite A e B. (36) (46)

○ 6.3.3 Transplante de células estaminais hematopoiéticas

O TCEH constitui, até à data, uma das principais opções terapêuticas curativas para doentes com AF e β -talassemia *major*. O transplante consiste na substituição da medula óssea do doente por células estaminais hematopoiéticas (CEH) saudáveis, que passam a produzir células sanguíneas normais. A eficácia e segurança de TCEH dependem de vários fatores como a compatibilidade HLA entre dador e recetor, idade do recetor e gravidade da doença. O transplante irá ser tanto mais eficaz quanto mais precocemente for realizado, pelo que são elegíveis crianças e adolescentes com idade inferior a 16/17 anos. (34)

Na AF, as indicações para a realização de transplante incluem AVC, crises de dor severas e frequentes ou a ocorrência frequente de síndromes torácicas agudas. Os melhores resultados são alcançados quando se encontra um dador HLA-idêntico, geralmente um irmão compatível. Nestes casos, a taxa de sobrevivência e a taxa de sobrevivência livre de doença situam-se entre os 80 e os 90%. Contudo, apenas cerca de 20% dos doentes elegíveis para transplante apresentam um dador HLA-idêntico, o que constitui um entrave à realização destes tratamentos. (6) (33) (40)

Na β -talassemia *major*, a dependência crónica de transfusões é, por si só, uma indicação para transplante, desde que exista um dador HLA-idêntico disponível. Tal como na AF, as taxas de sobrevivência rondam os 90% em crianças, no entanto, a eficácia tende a diminuir com o aumento da idade e com o agravamento das complicações associadas à β -talassemia. (46)

Apesar dos seus benefícios, o TCEH está associado a riscos significativos, sendo os mais relevantes as infeções severas durante o período de imunossupressão, a falha do enxerto e a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Esta última resulta da resposta imunológica das células transplantadas contra os tecidos do recetor e pode afetar a pele, o fígado, o trato gastrointestinal e outros órgãos. O risco de desenvolver DECH é significativamente menor quando o dador é um familiar HLA compatível. (33) (34) (36) (46)

De forma a contornar a escassez de dadores compatíveis e complicações imunológicas associadas, surgem as terapias genéticas como abordagens inovadoras e promissoras para o tratamento definitivo tanto da AF como da β -talassemia *major*, oferecendo uma alternativa viável ao TCEH convencional.

7. Terapia genética para hemoglobinopatias

• 7.1 Introdução à terapia genética

A terapia genética representa uma das abordagens mais inovadoras e promissoras da medicina contemporânea. É considerada uma estratégia terapêutica de precisão visto ter como objetivo a cura definitiva de certas doenças monogénicas, atuando diretamente sobre a causa molecular subjacente: a mutação genética. Ao contrário das terapias convencionais, que se focam predominantemente no alívio sintomático, a terapia genética baseia-se na modificação do material genético das células do próprio doente permitindo, em muitos casos, a reversão do fenótipo patológico. (62)

As hemoglobinopatias, entre elas a AF e a β -talassemia *major*, têm recebido particular atenção neste campo, devido ao conhecimento aprofundado dos mecanismos genéticos subjacentes e devido à viabilidade da manipulação das CEH, especialmente aquelas que expressam o *cluster* de diferenciação CD34⁺, as quais podem ser recolhidas, manipuladas geneticamente e posteriormente perfundidas no doente. A utilização de CEH autólogas como alvo terapêutico permite evitar complicações imunológicas associadas ao TCEH, como a DECH, além de contornar as limitações impostas pela escassez de dadores compatíveis. (34) (33) (63)

Nos últimos anos, os avanços em biologia molecular e farmacogenómica permitiram o desenvolvimento de múltiplas estratégias terapêuticas, desde a adição de genes funcionais até

à edição genética, cujo objetivo é corrigir mutações específicas ou modular a expressão de genes reguladores, como o *BCL11A*, para reativar a produção de HbF. Essas abordagens individualizadas podem ser implementadas por meio de diferentes sistemas de entrega genética (*delivery*), tanto virais como não virais, e aplicadas *ex vivo* ou *in vivo*, conforme a estratégia terapêutica adotada. Estes progressos têm possibilitado a transição da terapia genética de uma promessa teórica para uma realidade prática, com vários ensaios clínicos em curso e terapias já aprovadas tanto para a AF como para a β -talassemia *major*. (64) (65)

Nos tópicos seguintes, será aprofundado o panorama atual da terapia genética nas hemoglobinopatias, incluindo as principais abordagens, os sistemas de *delivery* genético, as tecnologias de adição e edição genética, bem como os tratamentos já aprovados ou em estudo.

- **7.2 Terapia *ex vivo* vs *in vivo***

As terapias genéticas podem ser classificadas de acordo com o local onde a modificação genética ocorre: *ex vivo* ou *in vivo*. Na terapia genética *ex vivo*, as CEH são mobilizadas, isoladas e geneticamente modificadas fora do organismo. Essas CEH, que são recolhidas do doente, expressam CD34⁺ e são responsáveis pela produção de todas as linhagens celulares sanguíneas ao longo da vida.

A colheita destas células pode ser realizada a partir da medula óssea ou do sangue periférico. Esta última via é preferível uma vez que não é tão invasiva e permite recolher uma quantidade suficiente de CEH CD34⁺. Contudo, é necessário mobilizar as células da medula óssea para o sangue periférico e, para isso, é recomendada a administração do fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF) e Plerixafor (antagonista do recetor CXCR4 que promove a libertação das CEH para a corrente sanguínea) antes da colheita por aférese. Esta estratégia permite aumentar significativamente o número de CEH disponíveis no sangue periférico. (66) (67) (68)

Após a colheita, o material de aférese é enviado para uma unidade especializada onde ocorre a modificação genética e a criopreservação das CEH. As principais estratégias de modificação genética *ex vivo* incluem a adição de genes globínicos através de vetores lentivirais, a edição genética e a reativação da expressão de HbF. Paralelamente, o doente é submetido a um regime de mieloablação, para permitir que as CEH geneticamente modificadas, após a reinfusão, possam restabelecer uma eritropoiese normal. (66) (67)

Apesar dos resultados promissores, a terapia *ex vivo* envolve estruturas altamente especializadas, uma logística complexa e custos elevados, além de requerer tratamento mieloablativo que apresentam riscos significativos. Por estes motivos, surge a metodologia *in vivo*, uma estratégia menos invasiva na qual as ferramentas de edição genética são administradas diretamente no doente, geralmente por via intravenosa ou intraóssea, visando modificar as CEH no próprio organismo. Esta abordagem é uma opção mais acessível e simples que também contribui para minimizar os riscos associados ao método *ex vivo*. A distinção entre as terapias *ex vivo* e *in vivo* está representada na Figura 15. (62) (69)

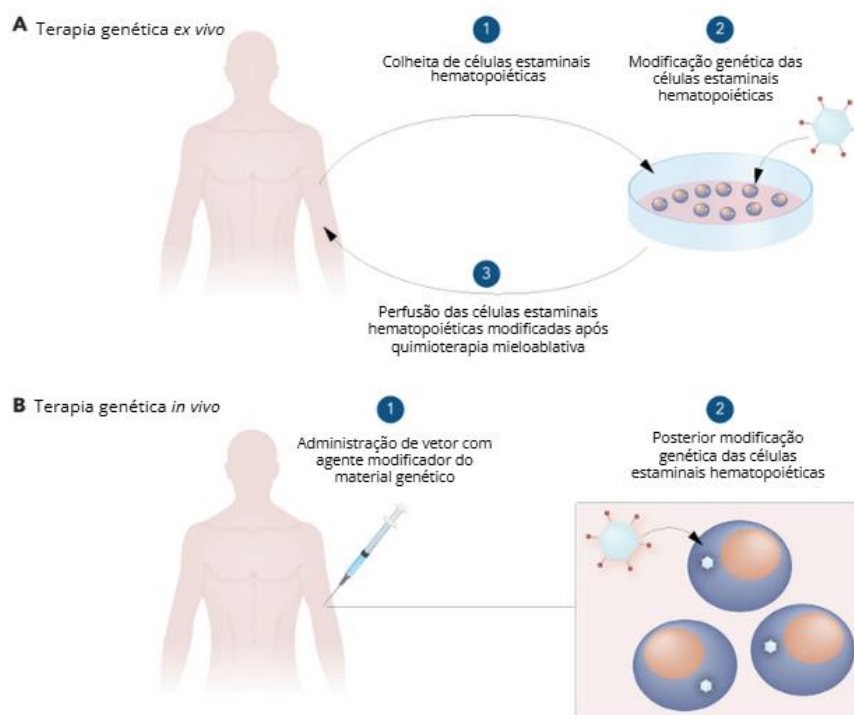


Figura 15 Distinção entre as terapias *ex vivo* e *in vivo* (Adaptado de (62))

• 7.3 Sistemas de *delivery* do material genético

Na terapia genética os sistemas de *delivery* do material genético são cruciais para o sucesso do tratamento. Estes sistemas incluem vetores que transportam no seu interior a informação genética até às células alvo, geralmente as CEH. Uma vez no interior das células, o material genético é integrado no genoma, de modo a corrigir ou compensar a mutação genética responsável pela doença. Estes vetores são desenvolvidos com o objetivo de proteger o material genético das múltiplas barreiras extracelulares e intracelulares que podem comprometer a eficácia da transfeção genética. (70)

Os vetores utilizados na terapia genética podem ser de origem viral ou não viral. Entre os vetores virais mais utilizados, destacam-se os vetores adenovirais, os adeno-associados (AAV), os retrovirais e os lentivirais. Os vetores adenovirais, derivados de várias estirpes do adenovírus, destacam-se pelo facto de não se integrarem no genoma das células hospedeiras, permanecendo como um epissoma no núcleo. Esta característica reduz o risco de mutações genéticas, mas está frequentemente associada a uma resposta imunológica significativa. De forma semelhante, os AAV, derivados do Parvovírus, também não se integram no genoma das células alvo mas, ao invés dos vetores adenovirais, apresentam baixa imunogenicidade, o que os torna uma alternativa mais segura nesse aspeto. (33) (71)

O desenvolvimento dos vetores retrovirais representou um marco importante na evolução da terapia genética uma vez que, ao contrário dos anteriores, estes vetores integram-se diretamente na cromatina das células hospedeiras. Após a remoção das sequências patogénicas do genoma viral, os vetores γ -retrovirais, derivados de γ -retrovírus, tornaram-se fundamentais na transdução de CEH. Os primeiros estudos realizados com este sistema de *delivery*, mostraram que baixos níveis de expressão do gene terapêutico poderiam ser suficientes para a correção do fenótipo. No entanto, apesar das vantagens descritas, estes vetores também apresentam algumas limitações que restringem a sua aplicação nas hemoglobinopatias como o facto de serem incapazes de transduzir células não proliferativas, como as CEH quiescentes, e possuem uma capacidade limitada para transportar genes de grandes dimensões como a LCR do gene da β -globina. Além disso, a inserção aleatória do vetor próximo de proto-oncogenes resultou em efeitos adversos graves, pelo que surgiu a necessidade de desenvolverem alternativas mais seguras e eficazes. (33) (72) (73)

Neste contexto, na década de 1990, surgiram os vetores lentivirais, derivados do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1). Estes vetores para além de terem a capacidade de transduzir células que se dividem, incluindo as CEH, também transportam genes de grandes dimensões, permitindo a inclusão do LCR do gene da β -globina. Ao entrarem na célula hospedeira e libertarem a carga genética viral no citoplasma, o ácido ribonucleico (RNA) do vetor lentiviral é convertido a DNA e integrado no genoma do hospedeiro. Uma das preocupações associadas a estes vetores é a possibilidade de mutagénese insercional, uma vez que tendem a integrar-se em regiões de transcrição ativa. Como forma de colmatar estes riscos, estão a ser desenvolvidos vetores de terceira geração com o *design* auto-inativante (SIN) que reduzem o potencial genotóxico. Ainda assim, os vetores lentivirais continuam a ser os mais utilizados nas abordagens de adição e edição genética para o tratamento de hemoglobinopatias,

devido à sua eficácia e ao seu bom perfil de segurança demonstrado nos 4 a 30 meses de acompanhamento clínico. (5) (33) (66) (73) (74) (75)

Em relação aos sistemas de *delivery* não virais, estes incluem as nanopartículas lipídicas (LNPs), exossomas e polímeros catiónicos e estão a ser estudados como alternativas mais seguras comparativamente aos vetores virais. Têm ganho destaque na terapia genética *in vivo* devido à elevada capacidade de carga genética, alta segurança e praticidade. (69) (70)

- **7.4 Principais estratégias terapêuticas**

- **7.4.1 Adição genética**

Uma das estratégias terapêuticas utilizadas na terapia genética para hemoglobinopatias é a adição genética. Esta consiste na introdução de cópias funcionais dos genes que codificam para a β ou γ -globina em CEH autólogas, recorrendo, normalmente, a vetores lentivirais. Para além dos genes funcionais, estes vetores também transportam os seus elementos reguladores e integram-nos no genoma do doente com a finalidade de compensar a produção deficiente ou a disfunção da β -globina. (66) (76)

A introdução de uma cópia funcional do gene da β -globina permite a produção de HbA normal ($\alpha_2\beta_2$). Na β -talassemia *major*, onde há uma produção insuficiente ou ausente de β -globina, esta adição equilibra a percentagem entre as cadeias α e β , reduzindo a toxicidade causada pelo excesso de cadeias α livres e a necessidade de transfusões. Na anemia falciforme, a mutação subjacente é a substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia β , que resulta na produção de HbS e no aparecimento de eritrócitos falciformes. A adição do gene da β -globina não corrige a mutação, pelo que a HbS continua a ser produzida. No entanto, devido à produção de HbA, a oxigenação é melhorada e a concentração de HbS nos eritrócitos diminui. De modo a colmatar a mutação falciforme, foi estudada a adição de genes modificados da β -globina que codificam variantes da β -globina com propriedades anti-falciformação (*anti-sickling*). A modificação mais utilizada é a globina β A-T87Q, na qual a treonina (T) na posição 87 é substituída por glutamina (Q), o que reduz a interação dessa região com a valina presente na HbS e ajuda a inibir a polimerização da HbS e a consequente formação de células falciformes (efeito *anti-sickling*). Esta abordagem também não inibe a expressão da HbS, que continua a ser produzida, mas introduz a Hb modificada que equilibra a concentração de HbS. Desta forma, os doentes apresentam um quadro clínico menos severo, semelhante ao de portadores de HbS.

Foram também estudadas outras variantes da β -globina como a β AS3 que, para além da mutação T87Q, incorpora as mutações E22A e G16D que reforçam ainda mais as propriedades anti-*sickling*. (52) (69) (73) (77) (74)

O gene da γ -globina também está a ser estudado como uma hipótese eficaz no ramo da adição genética, devido à sua capacidade de induzir a produção de HbF ($\alpha_2\gamma_2$), que possui elevada afinidade para o oxigénio e impede a polimerização da HbS (efeito anti-*sickling*). Tal como na β -globina, também a γ -globina pode ser modificada com uma mutação pontual (G16D) que confere propriedades adicionais de anti-*sickling*. Na β -talassemia, a expressão de γ -globina restaura o equilíbrio entre as cadeias, uma vez que são formados tetrâmeros $\alpha_2\gamma_2$ que diminuem o efeito tóxico das cadeias α livres nos eritrócitos. Assim, a adição do gene da γ -globina representa uma abordagem promissora no tratamento das hemoglobinopatias, com impacto na qualidade de vida dos doentes. A Figura 16 ilustra a estratégia de adição genética. (77) (78)

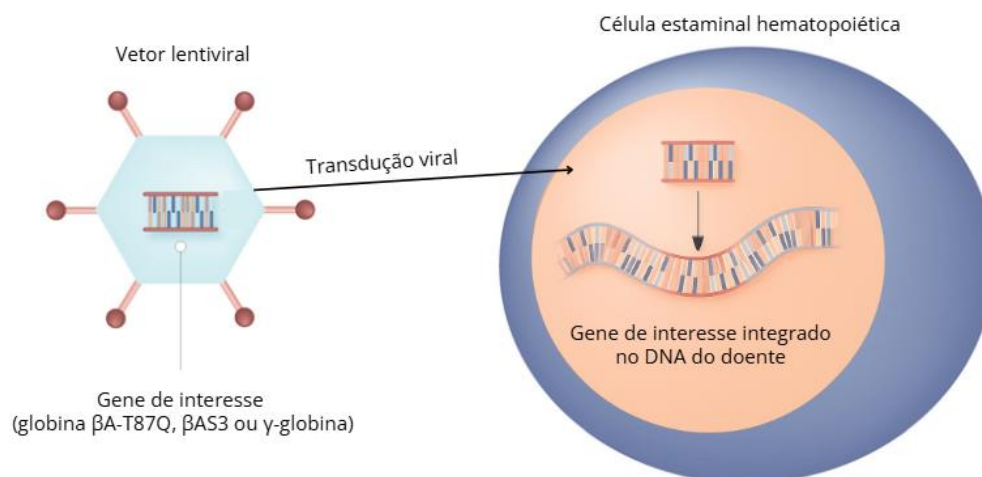


Figura 16 Estratégia de adição genética (Adaptado de (62))

○ 7.4.2 Edição genética

A edição genética é uma das técnicas utilizadas na terapia genética que tem vindo a ganhar um grande destaque no tratamento das hemoglobinopatias. Ao contrário da adição genética, a edição genética permite modificações precisas no genoma, reduzindo o risco de mutagenese por inserção aleatória de material genético e possibilitando uma correção duradoura e potencialmente curativa destas patologias. Diversas técnicas estão a ser exploradas, entre as quais se destacam o sistema de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) combinados com a endonuclease Cas9, as *transcription activator-like effector*

nucleases (TALENs), as *zinc finger nucleases* (ZFNs), assim como as mais recentes tecnologias de *base editing* e *prime editing*. Estas ferramentas têm sido aplicadas para alterar a expressão génica, por exemplo através do silenciamento de genes reguladores como o *BCL11A*, o que vai reativar a produção de HbF, cuja presença tem efeitos terapêuticos relevantes tanto na AF como na β -talassemia. (65) (66) (76) (77)

▪ 7.4.2.1 Ferramentas de edição genética

▪ 7.4.2.1.1 CRISPR-Cas9, ZFN's e TALENS

A tecnologia CRISPR/Cas9 é um dos grandes avanços recentes da terapia genética, pois promete a correção direta do gene da β -globina mutado, sem a necessidade de vetores virais. Esta abordagem tem demonstrado resultados promissores, como o aumento dos níveis de HbF, oferecendo uma possível cura para pacientes com β -talassemia. Como tem um papel importante na reativação da HbF, também constitui uma perspetiva promissora para a cura da AF. (33) (66) (73) (76) (79)

O sistema CRISPR/Cas9 é composto por dois elementos: a endonuclease Cas9 e o RNA guia (sgRNA). A Cas9 é uma endonuclease que induz quebras de dupla hélice (DSB) no DNA, em regiões específicas. O sgRNA, vai direcionar a Cas9 para o alvo específico onde vai ocorrer o corte na cadeia, consistindo numa sequência *scaffold* que se liga à Cas9 (constante) e um espaçador, de cerca de 20 nucleótidos, que corresponde à região do DNA que se pretende editar. O *protospacer adjacent motif* (PAM) é fundamental, pois é o sinal que permite à Cas9 reconhecer o local pretendido para o corte do DNA. (33) (66) (73) (76) (79)

O sistema CRISPR/Cas12a é semelhante ao CRISPR/Cas9, baseia-se também numa endonuclease guiada por um RNA específico. No entanto, é estruturalmente mais simples, pois apresenta apenas um domínio, e tem a capacidade de processar os seus próprios RNA's, o que permite a edição simultânea de vários locais do genoma. (33) (66) (73) (76) (79)

As nucleases ZFNs e TALENs fazem parte das primeiras ferramentas de edição genética que surgiram. Estas nucleases apresentam algumas semelhanças, uma vez que ambas fazem uso de uma endonuclease, a FokI, que ao se fundir com a sequência alvo causa as DSBs. As ZFNs são nucleases quiméricas formadas por regiões capazes de reconhecer o DNA e por domínios de clivagem associados à FokI. Os domínios de ligação ao DNA são compostos por cerca de 30 aminoácidos que, ao se agruparem, permitem elevar a especificidade e precisão da edição.

A DSB só ocorre quando duas ZFN se ligam à sequência alvo de DNA, em sentidos opostos. Apesar de serem eficazes a desempenhar a sua função, são mais complexas e menos flexíveis do que o sistema CRISPR/Cas9. As TALENs são compostas por proteínas TALE que foram geneticamente modificadas para reconhecer sequências específicas de DNA, com domínios de ligação ao DNA que variam entre 33 a 35 aminoácidos e que determinam a especificidade da ligação ao alvo. Tal como ocorre nas ZFNs, também no sistema TALEN são necessárias duas TALENs ligadas em sentidos opostos, para permitir que os domínios FokI se juntem e realizem o DSB no sítio desejado. As TALENs, em comparação com a CRISPR/Cas9, apesar de serem mais complexas, apresentam alta especificidade e são menos suscetíveis a edições fora do alvo. (33) (76)

Em estudos clínicos realizados para as hemoglobinopatias, estes 3 sistemas de edição genética foram utilizados para o silenciamento do gene *BCL11A* e posterior reativação da HbF, como será abordado posteriormente. (33) (76)

A edição genética induz as DSB em locais específicos do genoma, ativando mecanismos celulares de reparação. Existem essencialmente duas vias de reparação: a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e a reparação dirigida por homologia (HDR). O NHEJ é o mecanismo mais eficaz e o mais utilizado nas CEH. Neste processo ocorre a rápida união das extremidades quebradas do DNA sem a necessidade de um molde homólogo, podendo ser utilizado em todas as fases do ciclo celular. No entanto, é um mecanismo propenso a erros, como inserções ou deleções (INDEL) no local de corte, que podem afetar a expressão de determinados genes. A HDR é outro dos mecanismos de reparação, que utiliza uma sequência de DNA homóloga como molde para reparar a quebra com precisão. Geralmente, o molde utilizado é de DNA de um dador, contudo este pode ser tóxico para as CEH. Ao contrário da NHEJ, a HDR está limitada às fases G2 e S do ciclo celular e apresenta baixa eficácia em células que não se encontram em divisão, como as CEH. (66) (67) (69) (77)

Outra tecnologia recentemente estudada envolve o *mismatch repair* (MMR) que aproveita os mecanismos naturais de reparação celular para realizar edições pontuais, sem necessidade de induzir quebras na cadeia dupla de DNA. A Figura 17 ilustra as estratégias de edição genética abordadas neste tópico e os respetivos sistemas de reparação. (66) (67) (69) (77)

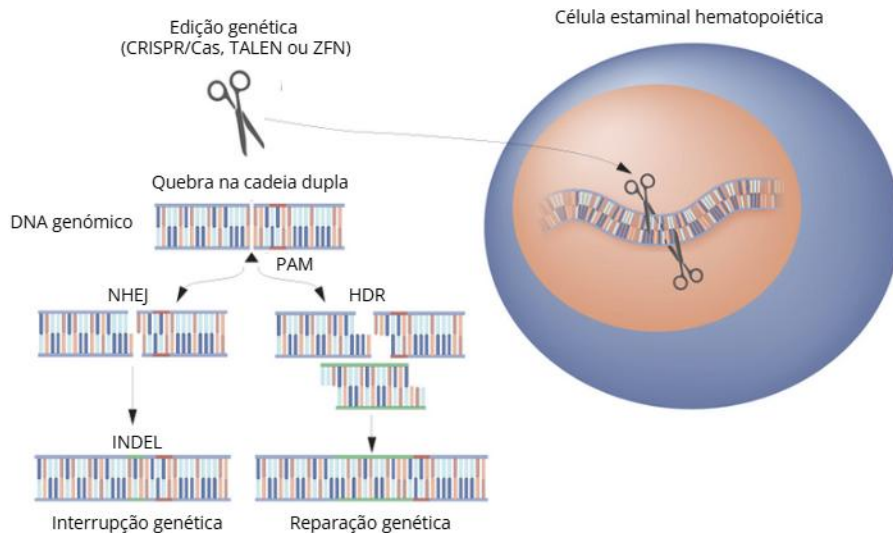


Figura 17 Estratégia de edição genética e posterior reparação (Adaptado de (62))

▪ 7.4.2.1.2 *Base editing vs Prime editing*

As estratégias de edição anteriormente abordadas, baseadas em nucleases, têm demonstrado bons resultados. No entanto, uma das principais desvantagens é a indução de DSB cuja reparação ocorre por NHEJ, propensa a erros, ou por HDR, menos eficaz e potencialmente tóxica. Assim, surgiram técnicas alternativas de edição genética de precisão, capazes de introduzir mutações pontuais sem a necessidade de gerar DSB, oferecendo mais segurança e especificidade. (33) (80)

Uma dessas abordagens, é a *base editing*, uma ferramenta derivada do CRISPR-Cas9 que, tal como o nome sugere, permite a conversão direta de um par de bases de DNA noutra, sem causar quebras na dupla hélice. Foram desenvolvidos dois tipos principais de *base editing*: os editores de bases de citidina (CBE), que permitem a conversão de pares de bases C:G em pares de bases T:A, e os editores de bases de adenina (ABE) que facilitam a conversão de pares de bases A:T em pares de bases G:C. Estes sistemas utilizam uma Cas9 modificada (nCAs9), que induz apenas uma quebra na cadeia simples (SSB) e é acoplada a uma desaminase. A nCas9 associada ao gRNA permite direcionar a desaminase para uma região específica do genoma onde irá ocorrer a mutação pontual. Nos CBE, a enzima utilizada é a citidina desaminase enquanto que nos ABE, a enzima utilizada é a adenina desaminase modificada (TadA). (33) (67) (76) (80)

A *base editing* é uma ferramenta promissora para o tratamento das β -hemoglobinopatias devido à sua elevada eficácia e capacidade de atuação nas CEH, quer na correção da mutação presente no gene da β -globina quer no aumento dos níveis de HbF. Contudo, uma das limitações associadas é a ocorrência de mutações fora do alvo devido à atividade inespecífica da enzima desaminase. (33) (67) (76) (80)

A *prime editing* é também uma abordagem promissora de edição genética baseada no sistema CRISPR-Cas9 que não requer DSB para efetuar as modificações desejadas. Este sistema utiliza uma nCas9 que se funde com uma transcriptase reversa. Ao invés de usar uma desaminase, a *prime editing* conta com um gRNA, neste caso designado de *prime editing guide* (pegRNA), que orienta a transcriptase reversa para o local-alvo no genoma. Uma das grandes vantagens deste tipo de edição é o facto de não necessitar de uma sequência PAM específica, oferecendo maior versatilidade e precisão nas modificações genómicas. Num ensaio clínico, esta abordagem foi utilizada com sucesso para a correção da mutação A-T, característica da AF, em células HEK293T (células embrionárias de rim humano). Os resultados do estudo mostraram uma redução significativa da HbS e o aumento da HbA. Além disso, a *prime editing* apresenta um perfil de segurança mais favorável quando comparado com a *base editing* uma vez que está associada a uma menor probabilidade de mutações fora do alvo. A Figura 18 representa as diferenças entre as estratégias de edição genética por *base editing* e *prime editing*. (33) (76) (80)

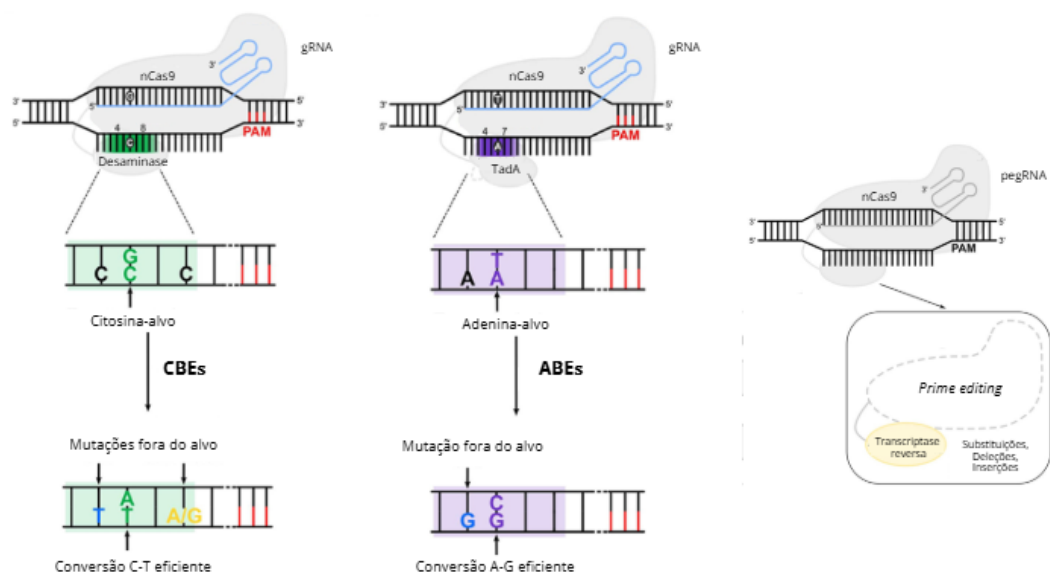


Figura 18 Estratégia de edição genética por *base editing* e *prime editing* (Adaptado de (80))

- **7.4.2.2 Abordagens de edição específicas**
- **7.4.2.2.1 Silenciamento do gene *BCL11A* e reativação da HbF**

O *BCL11A* é um fator de transcrição que tem como principal função a repressão da síntese de HbF, após o nascimento, promovendo o *switch* para a HbA. A produção de HbF influencia diretamente a gravidade e a sintomatologia das hemoglobinopatias, como a AF e a β -talassemia *major*, pelo que o gene *BCL11A* se tornou um alvo terapêutico promissor para o tratamento destas patologias. (69) (76)

A reativação da HbF pode ser alcançada por diversas estratégias: edição dos promotores da γ -globina, disrupção do potenciador eritróide do *BCL11A*, silenciamento pós-transcricional do gene *BCL11A* ou alteração da atividade de outros fatores transcripcionais que colaboram na repressão da HbF, como o SOX6. (5) (64) (66) (77)

A edição dos promotores dos genes da γ -globina (*HBG1* e *HBG2*) tem sido utilizada como uma ferramenta eficaz para aumentar a expressão de HbF, através de sistemas como o CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas12 e *base editing*. Os domínios ZFNs presentes no *BCL11A* interagem com sequências específicas de DNA presentes nos promotores da γ -globina, reprimindo a sua transcrição e, conseqüentemente, reduzindo a produção de HbF. As abordagens utilizadas visam inativar os locais de ligação do *BCL11A* ao *locus* da γ -globina, de modo a reativar a HbF. Esta estratégia de edição tem demonstrado aumento da HbF em cerca de 40%. No entanto, devido às vantagens anteriormente referidas, a *base editing* começou a ser utilizada para induzir mutações pontuais que mimetizam as mutações observadas na persistência hereditária da HbF (HPFH), uma condição benigna em que os níveis elevados de HbF conferem benefícios clínicos. (69) (74) (76) (77) (79)

Outra abordagem utilizada consiste na disrupção do potenciador eritróide do *BCL11A*, em particular do sítio de ligação do fator de transcrição GATA1. Este fator participa na ativação da expressão do *BCL11A* nos eritrócitos. A sua interrupção reduz significativamente os níveis de *BCL11A* nesta linhagem ceular e, conseqüentemente, leva ao aumento da expressão de HbF. Esta estratégia tem-se mostrado segura e eficaz, pois permite manter a expressão do *BCL11A* noutros tecidos, evitando efeitos adversos a nível sistémico. (67)

O silenciamento pós-transcricional do *BCL11A* é outra técnica utilizada para aumentar os níveis de γ -globina e, conseqüentemente, os níveis de HbF. Esta estratégia baseia-se na utilização de pequenos RNAs de interferência (shRNAmir) adaptados a microRNAs, os quais

são incorporados em vetores lentivirais. Um exemplo desta estratégia é o ensaio clínico BCH-BB694 em que foram utilizados *short hairpin RNA* (shRNA), resultando numa indução da HbF entre 20% a 40%, que é o suficiente para proporcionar benefícios terapêuticos. Para além do *BCL11A*, outros fatores de transcrição têm sido identificados como alvos para a reativação da HbF, como o SOX6, que poderá ser uma alternativa viável para compensar o défice das cadeias β na β -talassemia *major*. (5) (66) (77)

- **7.5 Terapias genéticas para as hemoglobinopatias**

- **7.5.1 Adição genética**

- **7.5.1.1 Betibeglogene autotemcel (Zynteglo®)**

O betibeglogene autotemcel (beti-cel), cujo nome comercial é Zynteglo®, é uma terapia genética baseada em CEH autólogas que foi aprovada para o tratamento da β -talassemia *major*. Em 2022, a FDA concedeu a autorização para o uso clínico desta terapia em doentes adultos e pediátricos com β -talassemia que necessitem de transfusões regulares de eritrócitos. Em 2019, a EMA concedeu uma autorização de comercialização condicional ao beti-cel, que foi retirada em 2022 devido a motivos não relacionados com segurança e/ou eficácia mas sim relacionados com questões de acessibilidade da terapêutica. (33) (66) (81)

Esta terapia genética baseia-se na adição de cópias funcionais do gene modificado da β -globina (β A-T87Q) em CEH autólogas CD34⁺. Tal como já foi referido, este gene codifica uma β -globina que apresenta uma substituição do aminoácido treonina pela glutamina, na posição 87, o que lhe confere propriedades anti-*sickling*. O vetor utilizado para a transdução é o vetor lentiviral BB305, auto-inativante e não replicativo. O gene transfetado tem como objetivo corrigir o desequilíbrio das cadeias de Hb e eliminar a necessidade de transfusões sanguíneas frequentes. (82) (83)

A aprovação desta terapêutica baseou-se em estudos clínicos que demonstraram a sua eficácia e segurança no tratamento da β -talassemia *major*. Destaca-se o estudo HGB-212, realizado entre 2017 e 2020, que teve como principal objetivo avaliar a eficácia e segurança da terapia genética beti-cel em doentes com β -talassemia dependente de transfusões (TDT). Apesar da amostra reduzida (18 participantes), este estudo permitiu salientar o potencial desta terapia genética como uma excelente alternativa ao TCEH. Os resultados revelaram que 89% dos participantes alcançaram independência transfusional durante cerca de 38,7 meses. A Hb

total média aumentou para cerca de 10,5 g/dL, sendo a maioria derivada da Hb modificada com o gene β A-T87Q. Para além da eficácia demonstrada, o estudo revelou um perfil de segurança favorável, sem efeitos adversos significativos. A preservação da fertilidade era uma questão particularmente relevante, uma vez que a mieloablação prévia ao tratamento pode comprometer a função reprodutiva. Contudo, os resultados revelaram que, em 83% dos doentes, a fertilidade foi preservada após o tratamento. Portanto, estes resultados sustentam a aprovação do beti-cel como uma alternativa viável e potencialmente curativa para doentes com β -talassemia *major*. (83)

▪ 7.5.1.2 Lovotibeglogene autotemcel (Lyfgenia[®])

O lovo-cel (lovo-cel), comercializado como Lyfgenia[®], consiste numa terapia genética autóloga baseada na colheita de CEH CD34⁺ do próprio doente e posterior perfusão das CEH geneticamente modificadas. Semelhante ao beti-cel, esta terapêutica também recorre à adição genética *ex vivo* através do vetor lentiviral BB305, que é utilizado devido à sua elevada eficácia de transdução. Este vetor introduz uma versão modificada do gene da β -globina designada de β A-T87Q, que codifica para a HbA-T87Q. Esta substituição do aminoácido treonina pela glutamina na posição 87 impede a polimerização da HbS, responsável pela deformação dos eritrócitos na AF, devido às suas propriedades anti-*sickling*. (33) (67)

Em dezembro de 2023, a FDA aprovou esta terapêutica, atualmente indicada para doentes diagnosticados com AF, com idade igual ou superior a 12 anos, e que apresentem histórico de CVO. Pelo contrário, até à data, ainda não existe aprovação por parte da EMA. Apesar de partilhar o mesmo vetor e gene terapêutico com o beti-cel, o lovo-cel foi especificamente desenvolvido para o tratamento da AF. (84)

O estudo HGB-206, que levou à aprovação desta terapia genética pela FDA, teve como objetivo avaliar a sua segurança e eficácia em doentes com AF grave. O *end-point* primário foi a resolução completa de CVO, medida entre os 6 e os 18 meses após a perfusão com lovo-cel. O estudo incluiu 35 doentes com AF, dos quais 25 receberam a perfusão e completaram, no mínimo, 6 meses de acompanhamento. Os resultados demonstraram uma expressão sustentada da Hb modificada, indicando a persistência de CEH positivas para o vetor BB305. A Hb total também aumentou de 8,5 g/dL para 11g/dL, sendo que a HbA-T87Q contribuiu para cerca de 40% da Hb total. Dos 25 doentes estudados, nenhum apresentou CVO, o que comprova a

redução significativa das manifestações clínicas associadas à doença e a eficácia terapêutica, uma vez que o *end-point* primário foi atingido com sucesso. Do ponto de vista da segurança, os efeitos adversos observados foram compatíveis com aqueles habitualmente associados a transplantes autólogos precedidos de quimioterapia mieloablativa. Os dados de eficácia e segurança foram utilizados para a realização de um estudo sobre a relação custo-efetividade desta terapêutica, que demonstrou ser favorável. Os ganhos significativos na sobrevida (aumento médio de 23.84 anos) e na qualidade de vida dos doentes compensam o elevado custo da terapêutica. (34) (85) (86)

○ 7.5.2 Edição genética

▪ 7.5.2.1 Exagamglogene autotemcel (Casgevy®)

O exagamglogene autotemcel (exa-cel), comercializado como Casgevy®, é uma terapia genética autóloga, não viral, baseada na edição de CEH CD34⁺ através do sistema CRISPR/Cas9. O Casgevy® foi concebido para inativar o fator de transcrição *BCL11A*, um regulador negativo da expressão da γ -globina que é um componente essencial da HbF, como explicado anteriormente. A edição genética é mediada por uma endonuclease Cas9 e por um gRNA, neste caso SPY101, que induz DSB no sítio de ligação do fator de transcrição GATA1. A via de reparação utilizada é a NHEJ, uma vez que reduz a expressão de *BCL11A* apenas nos eritrócitos, preservando a sua função noutras linhagens celulares. (33) (34) (87) (88)

Apesar da fisiopatologia distinta, tanto a AF como a β -talassemia *major* beneficiam de mutações que permitam aumentar os níveis de HbF, uma vez que a γ -globina pode substituir a função da β -globina e, no caso da AF, reduzir a polimerização da HbS. Com base neste princípio, o exa-cel foi a primeira terapia de edição genética com CRISPR/Cas9 aprovada para a AF e β -talassemia *major*. Em 2023, a FDA aprovou esta terapêutica para a AF e, em 2024, estendeu essa indicação para a β - talassemia *major*. A EMA aprovou o exa-cel para ambas as doenças em 2024, para doentes com idade igual ou superior a 12 anos. (79) (89) (90)

Dois ensaios clínicos principais sustentaram a aprovação desta terapia genética: o CLIMB SCD-121 para a AF, e o CLIMB THAL-111 para a β - talassemia *major*. No ensaio CLIMB SCD-121, o *end-point* primário foi a ausência de CVO durante, pelo menos, 12 meses consecutivos. Dos 30 doentes avaliados, 97% não apresentaram CVOs durante esse período. O perfil de segurança foi também avaliado e mostrou-se compatível com os efeitos adversos esperados de terapias com mieloablação. Em relação ao ensaio CLIMB THAL-111, os

resultados mostraram-se igualmente promissores. Neste caso, o *end-point* primário foi a independência transfusional com um valor basal de Hb média de 9 g/dL durante, pelo menos, 12 meses consecutivos. Dos 52 doentes com TDT avaliados, 35 apresentaram dados suficientes de seguimento. Destes 35, 95% atingiram independência transfusional, sendo o nível médio de Hb total de 13,1 g/dL e o nível médio de HbF de 11,9 g/dL. O perfil de segurança foi semelhante ao do ensaio anterior. Estes resultados confirmam a eficácia do exa-cel no tratamento das β -hemoglobinopatias demonstrando o elevado potencial da edição genética CRISPR. (33) (87) (91)

▪ 7.5.2.2 BEAM-101

O BEAM-101 é uma terapia genética composta por CEH CD34⁺ editadas *ex vivo*. Esta abordagem, ainda em fase experimental, utiliza a tecnologia *base editing*, recorrendo a ABEs baseados no sistema CRISPR para induzir mutações pontuais (adenina para guanina) nos promotores dos genes *HBG1* e *HBG2*, que codificam para a γ -globina. Essas mutações interrompem os sítios de ligação do *BCL11A* e, conseqüentemente, a produção de HbF aumenta. (34) (92)

O estudo BEACON tem como objetivo a avaliar preliminarmente a segurança e eficácia do BEAM-101 em doentes com AF e CVO graves. Até julho de 2024, 6 doentes receberam esta terapêutica. Todos apresentaram, no primeiro mês de tratamento, um aumento da produção de HbF em cerca de 60%, enquanto os níveis de HbS foram significativamente reduzidos para menos de 36%. A edição genética foi eficaz visto que cerca de 70% das células foram modificadas. O perfil de eficácia e segurança é favorável uma vez que nenhum dos doentes que receberam a perfusão apresentou CVO após o tratamento e, não foram registados eventos adversos relacionados diretamente com a terapêutica. (34) (92)

Estes resultados iniciais reforçam a eficácia da *base editing* nos promotores dos genes *HBG1* e *HBG2* como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da AF. Como reconhecimento do potencial desta terapêutica, em junho de 2025, a FDA anunciou que foi concedida a designação de medicamento órfão no entanto, ainda estão em curso ensaios clínicos para aprofundar o conhecimento sobre o BEAM-101. (93)

▪ 7.5.2.3 EDIT-301

O EDIT-301 é outro exemplo de terapia genética que se encontra em investigação para o tratamento da AF e da TDT. Baseia-se na edição genética de CEH CD34⁺, mais precisamente, numa modificação dos promotores dos genes da γ -globina (*HBG1/HBG2*), que permite reativar a expressão da γ -globina e, por consequência, aumentar a produção de HbF. Esta terapia utiliza uma versão otimizada e patenteada do sistema CRISPR/Cas12, denominada AsCas12a, que confere elevada especificidade à edição genética. (34)

Os estudos pré-clínicos realizados demonstraram uma edição altamente eficaz, superior a 80%, das CEH CD34⁺. Com base nesses resultados promissores, iniciaram-se os ensaios clínicos de fase I e II: o estudo RUBY, para doentes com AF, e o EdiThal, para doentes com TDT. (34) (94) (95)

No estudo RUBY, 4 doentes foram estudados e acompanhados por diferentes períodos de tempo. A taxa de edição foi, como previsto nos estudos pré-clínicos, de cerca de 80%. O primeiro doente, acompanhado durante 8 meses, apresentou uma percentagem de células F de cerca de 96,5%, níveis de HbF superiores a 35% e melhoria ou normalização de todos os marcadores de hemólise. Adicionalmente, não foram reportadas CVO nem efeitos adversos relacionados com o tratamento. (34) (94) (95)

No estudo EdiThal, também se verificou uma elevação significativa dos níveis de HbF, com valores de Hb total superiores a 9 g/dL, compatíveis com independência transfusional. Até à data, não foram reportados efeitos adversos, relacionados diretamente com a terapêutica. Os ensaios clínicos continuam em curso, com o objetivo de confirmar a eficácia a longo prazo e consolidar o perfil de segurança desta nova abordagem terapêutica. (34) (94) (95)

○ 7.5.3 Edição genética *in vivo*

As abordagens de edição genética *ex vivo* têm sido amplamente estudadas no contexto das hemoglobinopatias, contudo, apresentam algumas limitações e, por essa razão, as terapias *in vivo* são consideradas uma alternativa emergente e muito promissora. Apesar do seu potencial, o progresso da edição genética com o sistema CRISPR/Cas *in vivo* tem avançado mais lentamente devido a obstáculos técnicos relacionados com a eficácia e especificidade do *delivery* diretamente nas CEH CD34⁺. Nesse contexto, os vetores AAV têm sido os mais estudados para essa finalidade. Algumas estratégias mais recentes utilizam sistemas

CRISPR/Cas encapsulados em AAV (AAV-CRISPR), formulados para potenciar a eficácia clínica. (74) (96)

Um dos vetores adenovirais mais promissores é o HDAd5/35⁺⁺, que apresenta elevada afinidade para o CD46, um recetor altamente expresso nas CEH humanas. Em modelos murinos de AF, este vetor, que permite o *delivery* de *prime editors*, tem-se mostrado vantajoso. Outro estudo pré-clínico avaliou a capacidade de transdução *in vivo* de CEH com vetores virais que expressam *base editors*. Os resultados revelaram uma eficiência de edição superior a 60% nos promotores dos genes *HBG*, com reativação da expressão da γ -globina em cerca de 70% dos eritrócitos. A estratégia com PE também foi avaliada e permitiu corrigir cerca de 40% dos alelos mutados, com um número mínimo de edições fora do alvo, e promoveu a substituição de cerca de 43% da HbS pela HbA. (67) (69)

Enquanto a terapia genética *ex vivo* é complexa, de difícil acesso e apresenta vários efeitos adversos, que advêm principalmente da quimioterapia de mieloablação, a terapia genética *in vivo* ultrapassa alguns destes desafios e oferece uma opção mais económica para regiões com elevada incidência de hemoglobinopatias. No entanto, ainda há obstáculos importantes a superar, como o *delivery* eficiente apenas nas células-alvo e a imunogenicidade dos vetores utilizados. Para ultrapassar este último problema, sistemas de *delivery* não virais, como as NLPs, estão a ser desenvolvidos e estudados. (67) (69) (74)

• 7.6 Vantagens e limitações da terapia genética

Nos últimos anos, a terapia genética tem-se afirmado como uma das abordagens mais promissoras para o tratamento definitivo das β -hemoglobinopatias. Através da modificação das CEH do próprio doente, é possível corrigir a mutação genética subjacente ou reativar genes essenciais, reduzindo, ou até mesmo eliminando, as manifestações clínicas. A terapia genética representa uma alternativa mais eficaz e segura em comparação com as abordagens terapêuticas convencionais, contudo, também apresenta limitações importantes.

Para uma melhor compreensão das vantagens e limitações da terapia genética no contexto das hemoglobinopatias, foi realizada uma análise *SWOT* (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) que, tal como o nome indica, permite avaliar os pontos fortes e fracos, bem como as oportunidades e ameaças associadas à sua aplicação na prática clínica.

O principal ponto forte desta terapêutica é o facto de ser uma abordagem personalizada e potencialmente curativa, ao atuar diretamente sobre as causas genéticas das hemoglobinopatias. Contrariamente aos tratamentos convencionais que, na maioria dos casos, apenas aliviam os sintomas, a terapia genética elimina a necessidade de intervenções frequentes e invasivas, como as transfusões regulares. Além disso, ao utilizar as CEH do próprio doente, evita-se a dependência de dadores compatíveis, como acontece no TCEH que, até então, era a única opção curativa para estas doenças. Assim, podemos concluir que esta terapêutica tem o potencial de melhorar significativamente a qualidade de vida dos doentes e, a longo prazo, contribuir para uma redução dos custos dos sistemas de saúde. (33) (35)

Contudo, a maior fraqueza desta inovação é o seu custo inicial extremamente elevado, o que torna esta terapia inacessível para muitos doentes, sobretudo em regiões com alta prevalência de hemoglobinopatias. Além disso, os custos associados ao processo terapêutico *ex vivo*, com o internamento, a colheita, a modificação e posterior perfusão das células já modificadas geneticamente no doente, são substanciais. No entanto, a longo prazo, a terapia genética poderá ser economicamente vantajosa, ao substituir tratamentos convencionais contínuos por uma solução potencialmente definitiva. Outros pontos fracos incluem a complexidade do processo de fabrico da terapia, bem como a falta de resultados sobre a segurança a longo prazo, uma vez que ainda não foram totalmente divulgados e muitos ensaios clínicos ainda se encontram em curso. Esta incerteza exige vigilância clínica contínua dos doentes tratados com terapia genética. Outra das fraquezas está relacionada com as limitações nos sistemas de *delivery* do material genético, particularmente nas terapêuticas *ex vivo*. Já as terapêuticas *in vivo*, apesar das vantagens, causam preocupações devido à potencial imunogenicidade dos vetores utilizados. (35) (66) (74) (97)

No que diz respeito às oportunidades de melhoria e crescimento da terapia genética para hemoglobinopatias, o panorama é encorajador. Com os resultados emergentes dos ensaios clínicos que estão ainda a decorrer, é expectável o aumento de novos estudos, especialmente focados nas terapias *in vivo* e nas tecnologias CRISPR/Cas, cada vez mais precisas e seguras. Outra das oportunidades que o progresso clínico poderá impulsionar é o aumento do investimento e financiamento para estas terapias, contribuindo para mitigar o elevado custo destas terapias tanto para os doentes como para as indústrias farmacêuticas que as desenvolvem e produzem. O aparecimento de resultados mais robustos e favoráveis pode levar à expansão da terapia genética para o tratamento de outras doenças monogénicas.

Por outro lado, também existem ameaças que podem dificultar a evolução da terapia genética, nomeadamente questões éticas e sociais relacionadas com a modificação do genoma humano, bem como a desconfiança da população devido à falta de informação. A falta de financiamento adequado representa também um risco real, principalmente para países com recursos limitados, onde a prevalência das hemoglobinopatias é mais significativa. A Figura 19 resume os principais aspetos abordados na análise *SWOT* da terapia genética. (35)

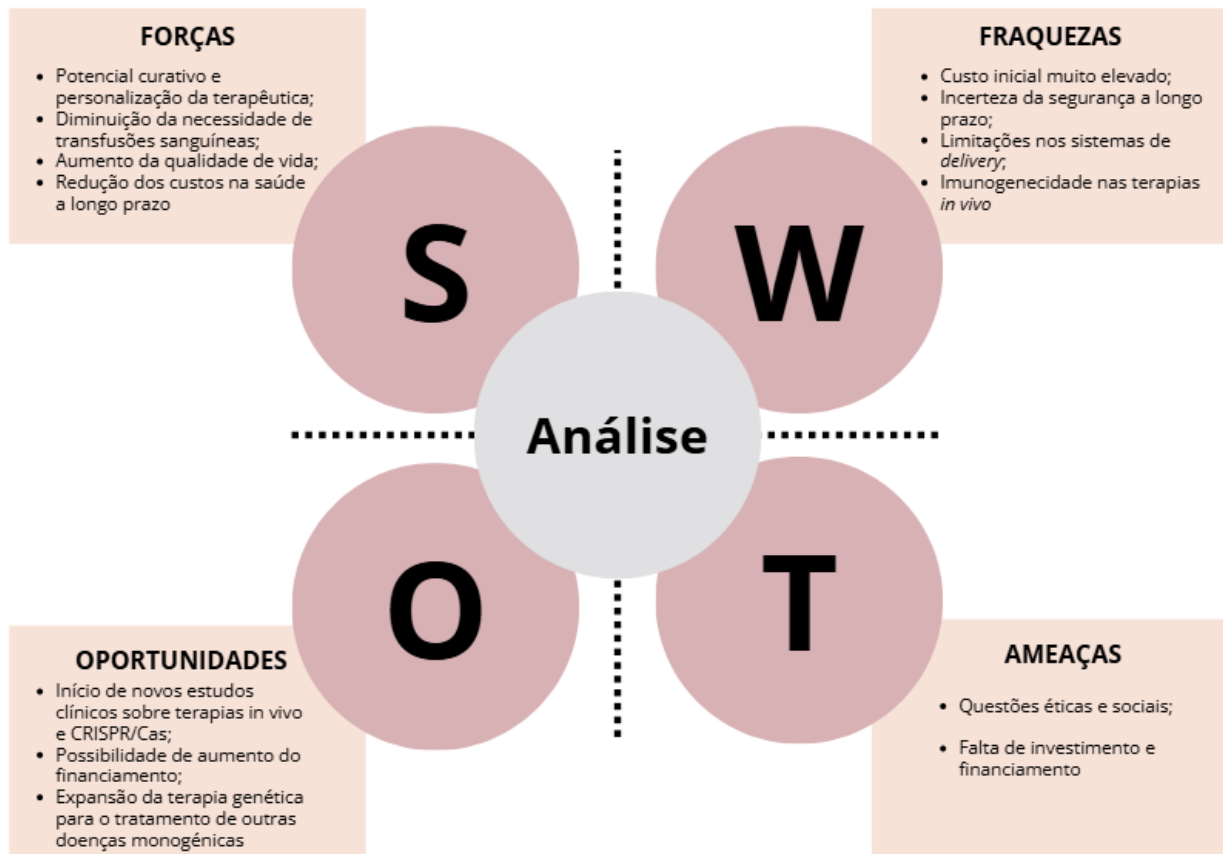


Figura 19 Análise *SWOT* sobre a terapia genética para hemoglobinopatias

8. Conclusões e perspectivas futuras

As hemoglobinopatias continuam a representar um grande desafio na medicina contemporânea, tanto pelo impacto que têm na qualidade de vida dos doentes como pela complexidade do seu tratamento. O estudo destas doenças revelou uma grande diversidade de manifestações clínicas e uma base genética complexa. As abordagens convencionais, apesar de serem essenciais para a melhoria da qualidade de vida dos doentes, apenas permitem reduzir as manifestações clínicas uma vez que não atuam na causa subjacente, a mutação genética, e estão frequentemente associadas a efeitos adversos e limitações a longo prazo.

Neste contexto, a terapia genética surge com uma abordagem inovadora e promissora, com o objetivo de atuar na origem genética das hemoglobinopatias. A terapia genética encontra-se em crescente evolução através de diversas estratégias que foram descritas nesta monografia, nomeadamente a adição de uma cópia funcional do gene da β -globina e a edição genética, utilizando sistemas como CRISPR/Cas. Apesar dos desafios que ainda se colocam, estas estratégias permitem colmatar as limitações das terapêuticas convencionais, por serem mais personalizadas, por atuarem diretamente nos mecanismos genéticos mutados, e por possuírem potencial curativo.

Embora já se encontrem aprovadas algumas terapias genéticas para as β -hemoglobinopatias, é de prever que, num futuro próximo, as limitações de hoje sejam atenuadas, permitindo que estas terapias se tornem mais seguras, acessíveis a um número crescente de doentes e com resultados terapêuticos mais duradouros. A aprovação de novas estratégias, nomeadamente as terapias genéticas *in vivo*, poderá ampliar o leque de opções disponíveis para estes doentes. Neste contexto, o desenvolvimento de centros especializados, o reforço das políticas de financiamento e a formação de profissionais de saúde cada vez mais qualificados serão fatores fundamentais para o sucesso da implementação da terapia genética, tanto no tratamento das hemoglobinopatias como de outras doenças genéticas.

Podemos, assim, concluir que a terapia genética representa muito mais do que uma inovação científica, representa uma mudança de paradigma, ao proporcionar não apenas o aumento da esperança média de vida mas, principalmente, uma melhoria significativa da qualidade de vida dos doentes. Sendo um tratamento com potencial curativo, oferece uma nova perspectiva terapêutica, mais definitiva e transformadora.

9. Referências bibliográficas

1. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. 2nd ed. Cambridge University Press; 2009.
2. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). Vol. 74. 1977.
3. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. Vol. 110. 1949 Nov.
4. Sabath DE. The role of molecular diagnostic testing for hemoglobinopathies and thalassemias. *Int J Lab Hematol*. 2023 Jun 1;45(S2):71–8.
5. Segura EER, Ayoub PG, Hart KL, Kohn DB. Gene Therapy for β -Hemoglobinopathies: From Discovery to Clinical Trials. Vol. 15, *Viruses*. MDPI; 2023.
6. Keohane EM, Smith LJ, Walenga JM. *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. 5th ed. St. Louis; 2016.
7. Hoeger U, Harris RJ, editors. *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins*. Vol. 94. Cham: Springer International Publishing; 2020.
8. Marengo-Rowe AJ. Structure-Function Relations of Human Hemoglobins. *Baylor University Medical Center Proceedings*. 2006 Jul 11;19(3):239–45.
9. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: Biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Mar;3.
10. Yuan Y, Tam MF, Simplaceanu V, Ho C. New look at hemoglobin allostery. *Chem Rev*. 2015;115(4):1702–24.
11. Bringas M, Petruk AA, Estrin DA, Capece L, Martí MA. Tertiary and quaternary structural basis of oxygen affinity in human hemoglobin as revealed by multiscale simulations. *Sci Rep*. 2017;7(1).
12. Wahed A, Dasgupta A. Hemoglobinopathies and Thalassemias. In: *Hematology and Coagulation* [Internet]. Elsevier; 2015. p. 55–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128002414000048>

13. Gell DA. Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells Mol Dis.* 2018;70:13–42.
14. Hoffbrand A V., Moss PAH. *Fundamentos em Hematologia.* 6th ed. 2013. 16–21 p.
15. Kumari A. Heme Synthesis. In: *Sweet Biochemistry.* Elsevier; 2018. p. 33–6.
16. Phillips JD. Heme biosynthesis and the porphyrias. *Mol Genet Metab.* 2019 Nov;128(3):164–77.
17. Balcerek B, Steinach M, Lichti J, Maggioni MA, Becker PN, Labes R, et al. A broad diversity in oxygen affinity to haemoglobin. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1).
18. Higgs DR, Douglas T, Higgs R, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet.* 2012;379:373–83.
19. Benz EJ. Anemias, Red Cells, and the Essential Elements of Red Cell Homeostasis. In: *Anemia: Pathophysiology, Diagnosis, and Management.* Cambridge University Press; 2018. p. 1–13.
20. Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Jan;3(1).
21. Angastiniotis M, Eleftheriou A, Galanello R. Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders. 2nd ed. Old J, editor. Vol. 1. 2013.
22. Giambona A, Passarello C, Renda D, Maggio A. The significance of the hemoglobin A2 value in screening for hemoglobinopathies. Vol. 42, *Clinical Biochemistry.* 2009. p. 1786–96.
23. Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Sofocleous C, Zurlo M, Finotti A, Gambari R. Impact of α -Globin Gene Expression and α -Globin Modifiers on the Phenotype of β -Thalassaemia and Other Hemoglobinopathies: Implications for Patient Management. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
24. Ohls RK. Metabolic Characteristics of Neonatal Erythrocytes. In: *Fetal and Neonatal Physiology.* Elsevier; 2017. p. 1112–34.
25. Weatherall DJ. Globin Genes, Human. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition.* Elsevier Inc.; 2013. p. 337–9.

26. Stamatoyannopoulos G, Navas PA, Li Q. Molecular and cellular basis of hemoglobin switching. In: Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, Second Edition. Cambridge University Press; 2009. p. 86–100.
27. Liu N, Xu S, Yao Q, Zhu Q, Kai Y, Hsu JY, et al. Transcription factor competition at the γ -globin promoters controls hemoglobin switching. *Nat Genet.* 2021 Apr 1;53(4):511–20.
28. Fontana L, Alahouzou Z, Miccio A, Antoniou P. Epigenetic Regulation of β -Globin Genes and the Potential to Treat Hemoglobinopathies through Epigenome Editing. Vol. 14, *Genes.* MDPI; 2023.
29. Rees DC, Bain BJ. Haemoglobinopathy Diagnosis. 4th ed. Wiley-Blackwell; 2024.
30. Rastreio neonatal [Internet]. [cited 2025 May 4]. Available from: <https://www.sns24.gov.pt/tema/saude-da-crianca/rastreio-neonatal/#o-que-e-o-rastreio-neonatal>
31. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012 Mar;13(3):3245–76.
32. Mamas T, Kakourou G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J. Hemoglobinopathies and preimplantation diagnostics. Vol. 44, *International Journal of Laboratory Hematology.* John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 21–7.
33. Locatelli F, Cavazzana M, Frangoul H, Fuente J de la, Algeri M, Meisel R. Autologous gene therapy for hemoglobinopathies: From bench to patient’s bedside. Vol. 32, *Molecular Therapy.* Cell Press; 2024. p. 1202–18.
34. Barak M, Hu C, Matthews A, Fortenberry YM. Current and Future Therapeutics for Treating Patients with Sickle Cell Disease. *Cells.* 2024 May 1;13(10).
35. Christy M, Fisher B. Gene Therapy: A New Hope in Sickle Cell Disease Treatment. *Journal of Pediatric Health Care.* 2025 Jan 1;39(1):122–9.
36. Inusa BPD, Hsu LL, Kohli N, Patel A, Ominu-Evbota K, Anie KA, et al. Sickle cell disease—genetics, pathophysiology, clinical presentation and treatment. Vol. 5, *International Journal of Neonatal Screening.* MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019.

37. Research Highlights. *Molecular Therapy* [Internet]. 2016 Oct [cited 2025 Jun 2];24(10):1709. Available from: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1525-0016%2816%2945399-2>
38. Archer NM, Petersen N, Clark MA, Buckee CO, Childs LM, Duraisingh MT. Resistance to *Plasmodium falciparum* in sickle cell trait erythrocytes is driven by oxygen-dependent growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jul 10;115(28):7350–5.
39. World Health Organization. WHO SICKLE Package of Interventions for Sickle Cell Disease Management - Strategic Guidance Framework Module 1 [Internet]. 2024. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
40. Kohne E. Hemoglobinopathies: Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. Vol. 108, *Deutsches Arzteblatt*. 2011. p. 532–40.
41. Dewitt MA, Magis W, Bray NL, Wang T, Berman JR, Urbinati F, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells [Internet]. Available from: <http://stm.sciencemag.org/>
42. Hoppe C. Defining stroke risk in children with sickle cell anaemia. Vol. 128, *British Journal of Haematology*. 2005. p. 751–66.
43. Sadiq IZ, Abubakar FS, Usman HS, Abdullahi AD, Ibrahim B, Kastayal BS, et al. *Thalassemia: Pathophysiology, Diagnosis, and Advances in Treatment*. *Thalassemia Reports* [Internet]. 2024 Oct 15;14(4):81–102. Available from: <https://www.mdpi.com/2039-4365/14/4/10>
44. Ma Moraleda Jiménez Miguel, Blanquer Valentín, Cabañas Perianes Rafael, Duarte Palomino J. *HEMATOLOGÍA PREGRADO*. 2024.
45. Novartis. Dia Mundial da Anemia de Células Falciformes [Internet]. [cited 2025 Jun 5]. Available from: Dia Mundial da Anemia de Células Falciformes
46. Hoffbrand AV, Higgs DR, Keeling DM, Mehta AB. *Postgraduate Haematology*. 2016.
47. Costa S, Madeira S, Sobral MA, Delgado G. *Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família*. 2016;
48. Programa Nacional de Rastreio Neonatal já identificou 118 casos de drepanocitose - INSA [Internet]. [cited 2025 May 4]. Available from: <https://www.insa.min->

saude.pt/programa-nacional-de-rastreio-neonatal-ja-identificou-118-casos-de-drepanocitose/

49. PubChem - Hidroxiureia [Internet]. [cited 2025 Jun 3]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxyurea>
50. European Medicines Agency - Siklos [Internet]. [cited 2025 Jun 5]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/siklos#overview>
51. European Medicines Agency - Xromi [Internet]. [cited 2025 Jun 5]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xromi>
52. Diamantidis MD, Ikonomidou G, Argyrakouli I, Pantelidou D, Delicou S. Genetic Modifiers of Hemoglobin Expression from a Clinical Perspective in Hemoglobinopathy Patients with Beta Thalassemia and Sickle Cell Disease. Vol. 25, International journal of molecular sciences. 2024.
53. Montalembert M, Voskaridou E, Oevermann L, Cannas G, Habibi A, Loko G, et al. Real-Life experience with hydroxyurea in patients with sickle cell disease: Results from the prospective ESCORT-HU cohort study. *Am J Hematol.* 2021 Oct 1;96(10):1223–31.
54. Sadaf A, Quinn CT. L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn? Vol. 245, *Experimental Biology and Medicine.* SAGE Publications Inc.; 2020. p. 146–54.
55. European Medicines Agency - Xyndari [Internet]. [cited 2025 Jun 7]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xyndari>
56. Herity LB, Vaughan DMM, Rodriguez LR, Lowe DK. Voxelotor: A Novel Treatment for Sickle Cell Disease. Vol. 55, *Annals of Pharmacotherapy.* SAGE Publications Inc.; 2021. p. 240–5.
57. U.S. Food & Drug Administration - Oxbritya [Internet]. [cited 2025 Jun 7]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-alerting-patients-and-health-care-professionals-about-voluntary-withdrawal-oxbritya-market-due>
58. European Medicines Agency - Oxbritya [Internet]. [cited 2025 Jun 7]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/oxbritya>
59. Stevens DL, Hix M, Gildon BL. Crizanlizumab for the Prevention of Vaso-Occlusive Pain Crises in Sickle Cell Disease. Vol. 37, *Journal of Pharmacy Technology.* SAGE Publications Inc.; 2021. p. 209–15.

60. Creative Biolabs Recombinant Antibody - Crizanlizumab [Internet]. [cited 2025 Jun 8]. Available from: <https://www.creativebiolabs.net/crizanlizumab-overview.htm>
61. European Medicines Agency - Adakveo [Internet]. [cited 2025 Jun 7]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/adakveo>
62. Abraham AA, Tisdale JF. Gene therapy for sickle cell disease: moving from the bench to the bedside.
63. Morgan RA, Gray D, Lomova A, Kohn DB. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: Progress and Lessons Learned. *Cell Stem Cell*. 2017 Nov;21(5):574–90.
64. Rós FA, Couto SCF, Milhomens J, Ovider I, Maio KT, Jennifer V, et al. A systematic review of clinical trials for gene therapies for β -hemoglobinopathy around the world. *Cytotherapy*. 2023 Dec 1;25(12):1300–6.
65. Dewitt MA, Magis W, Bray NL, Wang T, Berman JR, Urbinati F, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells [Internet]. 2016. Available from: <http://stm.sciencemag.org/>
66. Malay J, Salama RAA, Alam Qureshi GS, Ammar ARAA, Janardhan G, Safdar M, et al. Gene Therapy: A Revolutionary Step in Treating Thalassemia. Vol. 16, *Hematology Reports*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024. p. 656–68.
67. Hardouin G, Miccio A, Brusson M. Gene therapy for β -thalassemia: current and future options. *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd; 2025.
68. Resumo das características do medicamento - Plerixafor [Internet]. [cited 2025 Jun 9]. Available from: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170918138723/anx_138723_pt.pdf
69. Li L, Mandal PK. Recent advancements in gene therapy for sickle cell disease and β -thalassemia. Vol. 3, *Frontiers in Hematology*. Frontiers Media SA; 2024.
70. Wang C, Pan C, Yong H, Wang F, Bo T, Zhao Y, et al. Emerging non-viral vectors for gene delivery. Vol. 21, *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd; 2023.
71. Flotte TR. Gene Therapy Progress and Prospects: Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther*. 2004 May 1;11(10):805–10.
72. Kunz JB, Kulozik AE. Gene Therapy of the Hemoglobinopathies. Vol. 4, *HemaSphere*. Wolters Kluwer Health; 2020. p. E479.

73. Demirci S, Uchida N, Tisdale JF. Gene therapy for sickle cell disease: An update. Vol. 20, *Cytotherapy*. Elsevier B.V.; 2018. p. 899–910.
74. Cavazzana M, Mavilio F. Gene Therapy for Hemoglobinopathies. *Hum Gene Ther*. 2018 Oct 1;29(10):1106–13.
75. Rai P, Malik P. Gene therapy for hemoglobin disorders - a mini review.
76. Testa U, Leone G, Cappellini MD. Therapeutic Gene Editing for Hemoglobinopathies. Vol. 16, *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. Universita Cattolica del Sacro Cuore; 2024.
77. Ballantine J, Tisdale JF. Gene therapy for sickle cell disease: recent advances, clinical trials and future directions. *Cytotherapy*. Elsevier B.V.; 2025.
78. Rivella S. Assessing the safety of gene therapy vectors expressing an enhanced gamma-globin gene for the cure of sickle cell anemia. Vol. 33, *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*. Cell Press; 2025.
79. Laurent M, Geoffroy M, Pavani G, Guiraud S. CRISPR-Based Gene Therapies: From Preclinical to Clinical Treatments. Vol. 13, *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
80. Antoniou P, Miccio A, Brusson M. Base and Prime Editing Technologies for Blood Disorders. Vol. 3, *Frontiers in Genome Editing*. Frontiers Media S.A.; 2021.
81. European Medicines Agency - Zynteglo [Internet]. [cited 2025 Jun 13]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zynteglo>
82. Locatelli F, Thompson AA, Kwiatkowski JL, Porter JB, Thrasher AJ, Hongeng S, et al. Betibeglogene Autotemcel Gene Therapy for Non- β^0/β^0 Genotype β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*. 2022 Feb 3;386(5):415–27.
83. Kwiatkowski JL, Walters MC, Hongeng S, Yannaki E, Kulozik AE, Kunz JB, et al. Betibeglogene autotemcel gene therapy in patients with transfusion-dependent, severe genotype β -thalassaemia (HGB-212): a non-randomised, multicentre, single-arm, open-label, single-dose, phase 3 trial. *The Lancet*. 2024 Nov 30;
84. U.S. Food & Drug Administration - Lyfgenia [Internet]. [cited 2025 Jun 13]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/lyfgenia>

85. Kanter J, Walters MC, Krishnamurti L, Mapara MY, Kwiatkowski JL, Rifkin-Zenenberg S, et al. Biologic and Clinical Efficacy of LentiGlobin for Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*. 2022 Feb 17;386(7):617–28.
86. Herring WL, Gallagher ME, Shah N, Morse KC, Mladi D, Dong OM, et al. Cost-Effectiveness of Lovotibeglogene Autotemcel (Lovo-Cel) Gene Therapy for Patients with Sickle Cell Disease and Recurrent Vaso-Occlusive Events in the United States. *Pharmacoeconomics*. 2024 Jun 1;42(6):693–714.
87. Frangoul H, Locatelli F, Sharma A, Bhatia M, Mapara M, Molinari L, et al. Exagamglogene Autotemcel for Severe Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*. 2024 May 9;390(18):1649–62.
88. Adashi EY, Gruppuso PA, Cohen IG. CRISPR Therapy of Sickle Cell Disease: The Dawning of the Gene Editing Era. Vol. 137, *American Journal of Medicine*. Elsevier Inc.; 2024. p. 390–2.
89. European Medicines Agency - Casgevy [Internet]. [cited 2025 Jun 15]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/casgevy>
90. U.S. Food & Drug Administration - Casgevy and Lyfgenia [Internet]. [cited 2025 Jun 15]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease>
91. Locatelli F, Lang P, Wall D, Meisel R, Corbacioglu S, Li AM, et al. Exagamglogene Autotemcel for Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*. 2024 May 9;390(18):1663–76.
92. Gupta AO, Sharma A, Frangoul H, Dalal J, Kanter J, Alavi A, et al. Initial Results from the BEACON Clinical Study: A Phase 1/2 Study Evaluating the Safety and Efficacy of a Single Dose of Autologous CD34+ Base Edited Hematopoietic Stem Cells (BEAM-101) in Patients with Sickle Cell Disease with Severe Vaso-Occlusive Crises. *Blood* [Internet]. 2024 Nov 5;144(Supplement 1):513–513. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/144/Supplement%201/513/530865/Initial-Results-from-the-BEACON-Clinical-Study-A>
93. Beam Therapeutics Announces U.S. FDA Orphan Drug Designation Granted to BEAM-101 for the Treatment of Sickle Cell Disease [Internet]. 2025 [cited 2025 Jun 18]. Available from: <https://www.globenewswire.com/news->

release/2025/06/03/3092605/0/en/Beam-Therapeutics-Announces-U-S-FDA-Orphan-Drug-Designation-Granted-to-BEAM-101-for-the-Treatment-of-Sickle-Cell-Disease.html

94. Editas Medicine Announces New EDIT-301 Safety and Efficacy Data in 17 Patients [Internet]. [cited 2025 Jun 18]. Available from: <https://ir.editasmedicine.com/news-releases/news-release-details/editas-medicine-announces-new-edit-301-safety-and-efficacy-data>
95. Hanna R, Frangoul H, Mckinney C, Pineiro L, Mapara M, Chang KH, et al. S264: EDIT-301 Shows Promising Preliminary Safety and Efficacy Results in Phase I/II Clinical Trial (RUBY) Of Patients With Severe Sickle Cell Disease Using Highly Specific And Efficient ASCAS12A Enzyme. *Hemasphere*. 2023 Aug 8;7(S3):e05170e0.
96. Moyo B, Brown LBC, Khondaker II, Bao G. Engineering adeno-associated viral vectors for CRISPR/Cas based in vivo therapeutic genome editing. *Biomaterials*. 2025 Oct;321:123314.
97. Dong A, Rivella S, Breda L. Gene therapy for hemoglobinopathies: progress and challenges. *Translational Research*. 2013 Apr;161(4):293–306.