

Objetivo: Estabelecer um protocolo para obtenção de células eritroides a partir de iPSC derivadas de indivíduos com AF, de modo a obter um modelo experimental *in vitro* para desenvolvimento de novas terapias. **Material e métodos:** Linhagens de iPSC foram previamente geradas e obtidas de doador saudável (CBTCi003) e paciente com AF (CBTCi006). A determinação do haplótipo do gene βS foi realizada pela análise de polimorfismo do fragmento de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase. As duas linhagens foram submetidas ao estabelecimento de um protocolo de diferenciação eritroide em etapas: i. obtenção de células progenitoras hematopoiéticas (HPCs), pela formação de corpos embrioides (EBs); ii. expansão de eritroblastos; e iii. maturação final. Etapas confirmadas por citometro de fluxo para os marcadores CD34, CD43, CD45, CD71, CD36 e CD235a. Foi realizado ensaio de célula formadora de colônia (CFC) utilizando meio específico Methocult. A morfologia das células nas etapas ii e iii foi identificada com coloração giemsa após cito centrifugação. Foi feita uma avaliação da produção de hemoglobina fetal (HbF) e hemoglobina β (HbB), pela reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR), utilizando sonda para o gene HBG2 e HBB, respectivamente. **Resultados:** O haplótipo da linhagem CBTCi006 foi identificado Benin/Benin. HPCs presentes no sobrenadante, obtidas pela agregação com placa de fundo em U não aderente, apresentaram marcação de 40% e 56% de células CD34+ para as linhagens CBTCi003 e CBTCi006, respectivamente. Já a marcação CD34+/CD45+ foi de 15% e 27% enquanto a marcação CD43+/CD45+ foi de 66% e 86%. Pelo ensaio de CFC foram identificadas colônias de diferentes tipos: BFU-E, CFU-E, CFU-GM e CFU-GEMM. Na etapa ii, o rendimento foi de 40x em relação ao número inicial de iPSC plaqueadas para formação de EBs. As células apresentaram marcação para CD36+/CD71+ de 35%. Além da caracterização por imunofenotipagem, foi observada formação de um *pellet* celular vermelho. A análise de HBG2 (HbF) e HBB (HbB) por RT-qPCR demonstrou a produção de HBG2 aumentada nas células derivadas de iPSC quando comparadas a uma amostra obtida de sangue periférico (SP), no entanto, o contrário foi observado para o gene HBB. Foi possível ainda observar marcação de 52% de células CD71+/CD235a+, e a presença de proeritroblastos e eritroblastos ortocromáticos. **Discussão:** A presença das HPCs no sobrenadante indica que essas células emergem dos EBs para a o meio em suspensão. As HPCs apresentam marcação positiva para CD34/CD45 importante para identificação desse tipo celular, assim como o CD43, também expresso, importante para o início da diferenciação eritroide *in vitro*. A capacidade de proliferação e diferenciação das HPCs foi comprovada pela obtenção de diferentes tipos de colônias. Eritroblastos da etapa ii expressavam CD36+/CD71+. Ao final, a visualização do *pellet* vermelho indicou produção de hemoglobina, confirmando a diferenciação em células eritroides também pela expressão de CD71+/CD235a+. Embora sejam observados os marcadores de células maduras, a análise de RT-qPCR identificou expressão com perfil fetal, já que níveis de HBG2 estavam elevados. **Conclusão:** Foi possível estabelecer um protocolo de geração de células eritroides a partir de iPSC de indivíduos com AF que permite a sua utilização para testes farmacológicos e estudos de mecanismos da doença.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.858>

857

EXPECTATIVA DA ENGENHARIA GENÉTICA APLICADA AO TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME

L.F.M. Silva^a, M.J. Malagutti-Ferreira^b, R.A.C. Bittencourt^a, J.A.R. Fracasso^a

^a Instituto Ciências da Saúde, Universidade Paulista (UNIP), Assis, SP, Brasil

^b Departamento de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Assis, SP, Brasil

A anemia falciforme (AF) é uma anomalia genética causada por distúrbios na herança do gene da hemoglobina mutante de origem materna e paterna. Aproximadamente 5% da população mundial são portadoras de genes responsáveis por hemoglobinopatias. Sabe-se que no Brasil, a prevalência da AF é de 4% e os tratamentos disponíveis são; medicamentos, transfusões sanguíneas (TF) e transplante de medula óssea (TMO). Atualmente, busca-se novos tratamentos com menores complicações, em função destes aspectos, a Terapia Genética (TG) visa substituir um gene anormal por um gene normal, por meio de uma técnica da biologia molecular, CRISPR CAS9, um sistema que introduz mudanças em determinados locais do genoma, uma vez que pode corrigir ou silenciar uma mutação genética grave, e apresenta-se como um tratamento alternativo e promissor para o tratamento da AF. A metodologia utilizada para a desenvolver esse resumo, foi baseada em análises de dados de artigos científicos, contando com a amostragem de 32 publicações, desde 2000 á 2020, assim como, dados de domínio do Ministério da Saúde do Brasil e da Organização Mundial da Saúde (OMS). Embora não tenham ensaios clínicos elegíveis, há ensaios pré-clínicos com cultura celular e camundongos que demonstram resultados positivos, porém, muitas questões éticas entram no debate sobre o seu uso em humanos até o presente momento. Deste modo, a TG aplicada a AF, objetiva-se em diminuir a sintomatologia dos portadores, outrossim, uma menor incidência de úlceras crônicas, predisposição a necrose e infecções, concedendo qualidade de vida aos portadores. Destarte, vários obstáculos iniciais à TG da AF tenham sido superados, é prudente reconhecer que ainda existe um longo caminho a percorrer referente á segurança e a eficácia nos padrões éticos, que serão determinados e investigados por meio de ensaios clínicos cuidadosos com pacientes á longo prazo. Em síntese, os métodos de engenharia genética estão em ascensão, dentre os próximos 20 anos, espera-se promover a ampliação de novas técnicas sofisticadas para realização de TG de “segunda geração”, propiciando assim, alta especificidade gênica. Indubitavelmente, tendo em vista que os ensaios pré-clínicos atuais, mostraram-se eficazes a publicação, há uma grande expectativa aos ensaios clínicos em humanos nesta década. Por fim, a utilização da técnica de biologia molecular, CRISPR CAS9, como um possível tratamento alternativo, sendo os ensaios clínicos humanos acompanhados e comprovada a eficácia, poderá ser comercializado aos portadores AF em um futuro próximo, assim, nesse contexto a



Terapia Genética aplicada a Anemia Falciforme surgiu como opção promissora.

Palavras-chave: Anemia falciforme; Genética; Hematologia; Terapia genética; Engenharia genética.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.859>

858

HEMOFILIA B GRAVE COM INIBIDOR: UM RELATO DE CASO



C.M. Ribeiro, I.A.V. Moreira, B. Moreira

Universidade de Rio Verde, Rio Verde, GO, Brasil

Introdução: A hemofilia consiste em um distúrbio hematólogico que afeta os fatores de coagulação, definida como uma doença genética e hereditária ligada ao cromossomo X, que resulta em deficiência de fator VIII (hemofilia A) ou fator IX (hemofilia B). No Brasil, em 2016 eram 24.228, cujos 10.123 (41,78%) correspondiam à hemofilia A e 1.996 (8,24%) à hemofilia B; quanto ao sexo, 98,39% dos portadores da HA e 97,34% da HB são homens e a faixa etária mais prevalente é de 20-29 anos. **Objetivo:** Apresentar o caso clínico de um portador de hemofilia B grave com inibidor e as principais complicações. **Descrição do caso:** Paciente do sexo masculino, 15 anos, com quadro de hemartroses em joelho D e sangramentos gengivais. Foi realizada a radiosinoviotomia no joelho D e no ano seguinte paciente evoluiu com sangramento e formação de hematoma e conseqüente grave lesão estrutural articular sendo necessária sinovectomia. No entanto, ocorreu deiscência de sutura e hemorragias, sendo necessário o uso de curativo a vácuo (VAC) por 15 dias e sessões na câmara de oxigenoterapia hiperbárica (OHB). **Discussão:** Após as 42 sessões de oxigenoterapia hiperbárica e a realização do curativo a vácuo por 14 dias ocorreu a cicatrização da ferida operatória, no entanto, o paciente evoluiu para mobilidade articular diminuída principalmente na flexão. **Conclusão:** Os pacientes portadores da hemofilia B grave apresentam sangramentos espontâneos desde a infância e estão propensos a complicações, como as sinovites, hemartroses e hematomas, apesar do paciente ter apresentado uma grave lesão estrutural articular no joelho D teve boa evolução após o tratamento.

Palavras-chave: Hemofilia B; Deficiência de fator IX; Doença de Christmas.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.860>

859

MANIFESTAÇÕES DOLOROSAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA FALCIFORME



G.A.R. Veras^a, S.S. Lira^a, C.M.I. Lopes^a,
A.C.A.E. Luna^a, K.M.G. Marques^b, V.A.
Menezes^a

^a Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, PE, Brasil

^b Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil

Objetivo: Analisar a prevalência, o perfil da dor e os seus fatores desencadeantes em crianças e adolescentes com a doença falciforme. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo transversal realizado com 80 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de doença falciforme, de ambos os sexos, na faixa etária de 6 a 18 anos, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). Para análise do perfil da dor nos pacientes com a DF foi aplicado um formulário, por uma única pesquisadora, que foi validado com 20% dos pais e/ou responsáveis. As crianças/adolescentes e os pais/responsáveis responderam perguntas relacionadas à presença de dor nos últimos três meses, à localização da dor, à frequência, à duração, aos possíveis fatores desencadeantes, ao tipo e à capacidade da dor em interferir na rotina diária. Para avaliação da intensidade da manifestação dolorosa foi utilizada a escala visual analógica. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do HEMOPE sob o número de parecer 2.934364. **Resultados:** Verificou-se que 68,7% dos pacientes relataram dor; destes 23,6% disseram que essa dor ocorria com muita frequência e 52,7% relataram ser de intensidade forte, apresentando repercussões na sua rotina diária. Em relação aos fatores desencadeantes, os físicos apresentaram maior percentual (78,2%). Os locais mais comuns de relato de dor foram o tronco (80%) e os membros inferiores (54,5%); os tipos de dores mais frequentes foram em forma de aperto (40%) e profunda (40%). **Discussão:** Todos os participantes consideraram que a dor tinha relação direta com a DF e houve diferenças no que se refere ao tipo e à intensidade da dor. A dor profunda e a dor em aperto foram os tipos mais prevalentes. Em relação à intensidade, a dor considerada forte foi de 52,7%. Assim como os resultados encontrados neste estudo, outros observaram que para a maioria das crianças a intensidade da dor é também considerada forte e que na avaliação do tipo da dor as crianças relataram ser em forma de aperto (Yaster et al., 2000; Dias et al., 2013). A presença de dor esteve relacionada a fatores desencadeantes, sendo o fator físico considerado o mais prevalente. Estudos anteriores se referem às crises dolorosas como frequentemente espontâneas, podendo ser precipitadas por infecções, desidratação, acidose, hipóxia, estresse físico, fadiga, mudanças de temperatura e altitudes elevadas (Freire et al., 2015). Com relação à localização da dor, a maioria referiu-se à região do tronco e dos membros inferiores. Um estudo evidenciou que os pré-escolares com DF apresentavam predominantemente dor nos membros, enquanto os escolares e adultos jovens queixavam-se mais de dor no tronco (Shapiro, 1989). **Conclusão:** Crianças e adolescentes com doença falciforme apresentaram percentual elevado de crises dolorosas e os fatores físicos, como frio, trauma e esforço, foram considerados os mais prevalentes pelo seu desencadeamento. Faz-se necessário a criação de estratégias que favoreçam a implementação de políticas públicas para prevenção das crises, a fim de modificar positivamente o curso da doença e melhorar a qualidade de vida dos envolvidos.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.861>