

ASPECTOS PRÉ-CLÍNICOS DE EDIÇÃO GÊNICA PARA O TRATAMENTO DAS DOENÇAS FALCIFORMES NO BRASIL

MA Oliveira, DM Albuquerque, C Lanaro, FF Costa

Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

O uso de células-tronco progenitoras hematopoéticas geneticamente modificadas é uma estratégia potencialmente versátil para a busca de um tratamento eficaz contra as doenças falciformes (DF). O sucesso desta técnica requer a inserção gênica do alvo terapêutico no genoma das células hematopoéticas utilizando retrovirus, adenovirus, vírus adeno-associados (AAV) e vetores lentivirais como ferramenta, garantindo assim a manutenção da correção do gene à medida que as células replicam seu genoma e os transmite às próximas gerações celulares. No entanto, relatos recentes associam a utilização do vetor lentiviral para tratamento da anemia falciforme por terapia gênica às neoplasias mieloides (NCT02140554). Por outro lado, vários grupos de pesquisa exploram abordagens baseadas na edição de genoma para corrigir a mutação da anemia falciforme (AF), fazendo o uso da ferramenta de edição de genoma CRISPR-Cas. Na DF, a utilização desta estratégia visa reativar a expressão da hemoglobina fetal (HbF) nos pacientes. O fator de transcrição BCL11A emergiu como um repressor importante da expressão de HbF após polimorfismos em elementos de DNA reguladores de BCL11A serem associados ao aumento da HbF. Desta forma, duas possibilidades de aumentar os níveis de HbF incluem produzir alterações no gene BCL11A e nos promotores dos genes da globina gama, reproduzindo um tipo de PHHF. Em nosso laboratório procuramos encontrar outras maneiras de elevar a produção de HbF. Resultados preliminares publicados por Sousa IG, et al. (Blood. 134 (S1): 968, 2019) utilizaram a ferramenta CRISPR-Cas 9 em células HUDEP-2 para silenciar a expressão do gene HNF4 α (Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha). Esse fator de transcrição foi selecionado em ensaio de PCR-Array por apresentar expressão aumentada em 26,1 vezes em cultura de células CD34+ de indivíduos controle tratada com Decitabina. A técnica de edição gênica originou 4 clones com diferentes indels, que após avaliação por citometria de fluxo apresentaram níveis de HbF de $8,2 \pm 2,4\%$ vs $0,9 \pm 0,02\%$ comparado às células que não sofreram silenciamento ($p < 0,0258$). Outra estratégia realizada por nosso grupo, cujos resultados iniciais foram promissores, como alternativa de tratamento para AF, é a introdução da mutação -195 C>G na região promotora do gene HBG 1 (PHHF não-delecional do tipo brasileira) que foi capaz de elevar os níveis de HbF em até 30% nas células HUDEP-2 (Martin PKM, et al. Blood. 132 (S1): 3481, 2018). Estudos atuais, do nosso laboratório, buscam expandir nosso conhecimento e gerar sítios artificiais através da CRISPR/Cas 9 de alta fidelidade para produzir a PHHF não-delecional (ndPHHF), com os seguintes alvos na região promotora dos genes HBG1/HBG2: ndPHHF tipo brasileira (-195 C>G), a ndPHHF tipo Black (-175 T>C), a ndPHHF tipo Black (-202 C>G) e a deleção de 6 nucleotídeos. Todas estas alterações são responsáveis pelo aumento expressivo nos níveis de HbF.

Os resultados já obtidos em nosso laboratório bem como os que estão sendo produzidos, indicam que a terapia gênica pode ser desenvolvida no Brasil e poderia representar uma forma viável para o tratamento das hemoglobinopatias.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.071>

TERAPIA COM CRIZANLIZUMABE ESTÁ ASSOCIADA A NÍVEIS DIMINUÍDOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES CIRCULANTES EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME E PODERIA SER ASSOCIADA À MODIFICAÇÃO NA EVOLUÇÃO CLÍNICA

CM Souza^a, C Lanaro^a, IPD Santos^a, O Olatunja^a, STO Saad^a, BD Benites^a, PM Campos^a, KY Fertrin^b, FF Costa^a

^a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b Hematology and Hemotherapy Center, University of Washington, Seattle, Estados Unidos

As vesículas extracelulares (VEs) são pequenas estruturas liberadas na circulação sanguínea por diferentes tipos celulares que desempenham diversas funções biológicas e estão aumentadas na doença falciforme (DF). As VEs mais abundantes em pacientes com DF são derivadas de plaquetas, células endoteliais e hemácias e, recentemente, estão sendo exploradas como possíveis biomarcadores de gravidade. O crizanlizumabe (CRIZ) é um anticorpo monoclonal contra a P-selectina (CD62P), uma molécula de adesão expressa em plaquetas ativadas e células endoteliais. A P-selectina facilita a formação de agregados heterocelulares e contribui para crises vaso-oclusivas (CVOs) associados à fisiopatologia da DF. Estudos clínicos demonstraram que o tratamento com CRIZ reduz a incidência de CVO em 33%. Este estudo teve como objetivo investigar os níveis circulantes de VEs em pacientes com DF em estado estável da doença, em tratamento padrão (hidroxiureia, HU) e, alternativamente, com CRIZ em adição à HU. Participaram do estudo 20 adultos com DF e foram divididos em grupo CRIZ (6 pacientes submetidos ao tratamento com crizanlizumabe em combinação com HU, cujas amostras foram coletadas menos de um mês depois da última dose de CRIZ) e grupo não-CRIZ (7 pacientes em tratamento com HU e 7 em tratamento sintomático). As VEs foram isoladas do plasma, identificadas e quantificadas através da marcação com lactaderina+calceína por citometria de fluxo. As VEs foram marcadas com anticorpos específicos para determinar o imunofenótipo de sua célula-origem (plaquetas, células endoteliais ou hemácias). Os pacientes em terapia com CRIZ apresentaram contagens totais de VEs circulantes significativamente menores do que pacientes não tratados com CRIZ ($13,1 \times 10^6 \pm 3,5 \times 10^6/\text{mL}$ vs $62,6 \times 10^6 \pm 15,6 \times 10^6$, respectivamente, $p = 0,0076$) e níveis significativamente mais baixos de VEs derivadas de plaquetas ($2,4 \times 10^6 \pm 7,4 \times 10^6/\text{mL}$ vs $5,3 \times 10^6 \pm 9 \times 10^6$, respectivamente, $p = 0,0169$). As VEs derivadas de células endoteliais ou de hemácias ($3 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$ vs $2,2 \times 10^5 \pm 6 \times 10^4$, e $2,1 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$ vs $1 \times 10^6 \pm 6 \times 10^5$, respectivamente) não apresentaram diferença