

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 Olatunya^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

significativa entre os grupos estudados. Recentemente, nosso grupo demonstrou que pacientes com DF apresentaram aumento significativo no número de VEs derivadas de plaquetas (CD41+) quando comparado a indivíduos controle. Entre os pacientes com DF que sofreram AVC ao longo da vida, foi observado um aumento significativo no número de VEs de plaqueta ativadas (CD41/CD62+P) quando comparado aos pacientes sem histórico de AVC ($p = 0,048$). As VEs são reconhecidas como possíveis bioefetores envolvidos em CVOs, contribuindo para um estado de hipercoagulabilidade, inflamação crônica e dano endotelial. Nossos achados sugerem uma associação do uso de CRIZ com níveis diminuídos de VEs, principalmente das derivadas de plaquetas. Especulamos que o crizanlizumabe possa diminuir a liberação de VEs pela redução da ativação plaquetária ou pela inibição da produção dessas estruturas por plaquetas já ativadas. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que o tratamento com crizanlizumabe pode ser capaz de modular os níveis de VEs no plasma de pacientes com DF e fornecem, pela primeira vez, dados que suportam a ideia das vesículas extracelulares poderem ser biomarcadores para monitoramento da resposta clínica a esta terapia. Estudos futuros sobre a expressão de P-selectina nas VEs e como o crizanlizumabe interage com as VEs e plaquetas serão necessários para a melhor utilização dessa terapia e desenvolvimento de novos fármacos que atuem nesse aspecto da DF.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.072>

INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO NÃO ATEROSCLERÓTICO EM PACIENTE COM HEMOGLOBINOPATIA SC

GG Lima, FMRA Moreira, AO Lauer, KT Maio,
ACA Cardoso, LMS Otsuka, GHH Fonseca,
FM Nogueira, VG Rocha, SFM Gualandro

Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP,
Brasil

Introdução: A doença falciforme é um distúrbio hereditário marcado por complicações decorrente da polimerização da hemoglobina, levando a hemólise e vaso-oclusão. Ao contrário da população geral, observou-se que o infarto agudo do miocárdio nestes pacientes era decorrente de trombose não associada à doença aterosclerótica epicárdica. **Relato de caso:** Homem de 47 anos, admitido no serviço de pronto atendimento com dor torácica em compressão, sem dispneia ou náusea, de evolução há 2 dias. O paciente estava em seguimento no Ambulatório de Hemoglobinopatias do Serviço de Hematologia do HCFMUSP devido a Hemoglobinopatia SC, em programa de sangria terapêutica por crises vaso-oclusivas de repetição. A avaliação laboratorial inicial evidenciou hemoglobina de 10,3g/dl e troponina T ultrasensível de 3ng/ml. O eletrocardiograma apresentava supra desnivelamento do segmento ST em D2, D3 e aVF, além de onda Q em D2, achados compatíveis com infarto agudo de miocárdio evoluído. O paciente recebeu ácido acetil salicílico e enoxaparina e foi encaminhado à cineangiogramia que mostrou trombo em coronária direita, sem evidência de outras lesões

obstrutivas. O trombo foi aspirado e enviado para análise histopatológica, que mostrou trombo multicelular. Visando evitar progressão do processo de vaso-oclusão, o paciente foi submetido a eritrocitaférese. Eletroforese após procedimento veio com HbS: 22% e HbC 14%. Em investigação complementar, a ressonância miocárdica mostrou infarto transmural nos segmentos inferosseptal basal e inferior médio basal, associados a focos de obstrução microvascular. A Angiotomografia de coronárias não mostrou lesões. O escore de cálcio total veio zero. **Discussão:** O infarto agudo do miocárdio é uma complicação rara das doenças falciformes. Em uma revisão sistemática de 2008, Pannu e colaboradores levantou 14 casos descritos na literatura em 11 artigos. Entre os pacientes com hemoglobinopatia SC essa complicação é ainda mais rara, com apenas seis casos de infarto agudo do miocárdio descritos nessa população [Wang, 2004, Robard, 2015; Khaliq, 2010], sendo nosso relato o quarto com diagnóstico firmado antemortem. Ao contrário do que é observado na população geral, o infarto no paciente com doença falciforme não é associado à presença de placa de ateroma. Nessa população a obstrução costuma ser causada por um trombo multicelular, sem demonstração de lesão vascular prévia. Apesar da falta de estudos que comprovem a eficácia dessa prática, a associação de transfusão de concentrado de hemácias ou eritrocitaférese ao tratamento convencional do infarto é comum em todos os relatos publicados nos últimos trinta anos [Pannu, 2008]. **Conclusão:** O caso exposto vem despertar o reconhecimento do infarto agudo do miocárdio associado à Doença Falciforme. Atualmente a escassez de dados nessa área nos encoraja a descrever e avaliar apropriadamente o seguimento desses pacientes.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.073>

HEMOGLOBINOPATIAS ESTRUTURAIS PREVALENTES EM GESTANTES ASSISTIDAS POR UM PROGRAMA DE TRIAGEM PRÉ-NATAL NAS REGIÕES SUL E SUDOESTE DA BAHIA

DP Nunes^a, JPM Neto^b, RS Leal^a

^a Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador,
BA, Brasil

^b Universidade Federal do Amazonas (UFAM),
Manaus, AM, Brasil

Objetivo: Investigar a prevalência de hemoglobinopatias estruturais em gestantes das Regiões Sul e Sudoeste do estado da Bahia, Brasil. **Materiais e métodos:** A determinação dos genótipos de hemoglobinas foi realizada pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Um total de 73.611 gestantes foram triadas durante os anos de 2018 e 2019 pelo programa de Triagem Pré-natal da Rede Cegonha do Ministério da Saúde através do LABIMUNO (Laboratório de Imunologia e Biologia Celular, do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Este programa utiliza a metodologia, de coletas de amostras de sangue de gestantes através de papel filtro para diagnosticar doenças genéticas e/ou infectocontagiosas que possam comprometer a saúde materno-infantil no período pré-natal. **Resultados:**