REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

APLICAÇÕES DE CRISPR-CAS9 NA CORREÇÃO DA MUTAÇÃO DA TALASSEMIA BETA: AVANÇOS TECNOLÓGICOS, DESAFIOS TRANSLACIONAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

CRISPR-CAS9 APPLICATIONS IN CORRECTING THE BETA THALASSEMIA MUTATION: TECHNOLOGICAL ADVANCES, TRANSLATIONAL CHALLENGES, AND FUTURE PERSPECTIVES

APLICACIONES DE CRISPR-CAS9 EN LA CORRECCIÓN DE LA MUTACIÓN DE LA BETA TALASEMIA: AVANCES TECNOLÓGICOS, DESAFÍOS TRASLACIONALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

André Cavichioli Brito
Docente, Doutorador em Biologia Oral, Centro universitário UNIBRAS- Rio verde, Brasil
E-mail: andre_cavichioli@yahoo.com.br

Brena André Rodrigues da Silva
Discente em Biomedicina, Centro universitário UNIBRAS- Rio verde, Brasil
E-mail: elienemartinsrodriguesdasilva@gmail.com

Resumo

A *β*-talassemia é uma hemoglobinopatia hereditária causada por mutações no gene *HBB*, que comprometem a síntese da cadeia *β* da hemoglobina, resultando em anemia crônica e dependência transfusional. A terapia gênica baseada em CRISPR-Cas9 surge como uma alternativa promissora para corrigir essas mutações, permitindo tanto a restauração direta da expressão da *β-globina* quanto a reativação terapêutica da hemoglobina fetal (*HbF*) por meio da modulação de elementos regulatórios como o *BCL11A*. Esta revisão bibliográfica, de caráter narrativo e analítico, examina os principais avanços tecnológicos e clínicos relacionados ao uso do sistema CRISPR-Cas9 e suas variantes (Cas12a, base editing e prime editing) na *β*-talassemia, com ênfase em segurança genômica, eficiência terapêutica e viabilidade de implementação. São abordados métodos de entrega como RNP, AAV6 e nanopartículas lipídicas, além de estratégias de edição *in vivo* e integração de inteligência artificial no design de gRNAs. Apesar dos progressos, desafios persistem quanto aos efeitos off-target, ativação de p53, estabilidade clonal e custos elevados que limitam a aplicabilidade em sistemas públicos de saúde, especialmente no contexto brasileiro. Conclui-se que, embora ainda em fase translacional, o CRISPR-Cas9 representa uma das ferramentas mais revolucionárias para o tratamento curativo da *β*-talassemia, abrindo caminho para terapias mais seguras, precisas e acessíveis, nas quais o biomédico desempenha papel essencial na validação técnica, monitoramento e biossegurança laboratorial.

Palavras-chave: Gene *HBB*; Hemoglobina Fetal; Edição Gênica; *BCL11A*.

Abstract

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

Beta-thalassemia is a hereditary hemoglobinopathy caused by mutations in the *HBB* gene, which compromise the synthesis of the *β*-globin chain of hemoglobin, resulting in chronic anemia and transfusion dependence. Gene therapy based on CRISPR-Cas9 emerges as a promising alternative to correct these mutations, allowing both the direct restoration of *β*-globin expression and the therapeutic reactivation of fetal hemoglobin (*HbF*) through the modulation of regulatory elements such as *BCL11A*. This narrative and analytical literature review examines the main technological and clinical advances related to the use of the CRISPR-Cas9 system and its variants (Cas12a, base editing, and prime editing) in *β*-thalassemia, with emphasis on genomic safety, therapeutic efficiency, and implementation feasibility. Delivery methods such as RNP, AAV6, and lipid nanoparticles are discussed, in addition to *in vivo* editing strategies and the integration of artificial intelligence into gRNA design. Despite the progress achieved, challenges persist regarding off-target effects, p53 activation, clonal stability, and the high costs that limit applicability in public health systems, particularly in the Brazilian context. It is concluded that, although still in the translational phase, CRISPR-Cas9 represents one of the most revolutionary tools for the curative treatment of *β*-thalassemia, paving the way for safer, more precise, and more accessible therapies, in which the biomedical professional plays an essential role in technical validation, monitoring, and laboratory biosafety.

Keywords: *HBB* Gene; Fetal Hemoglobin; Gene Editing; *BCL11A.*

Resumen

La β-talasemia es una hemoglobinopatía hereditaria causada por mutaciones en el gen HBB, que comprometen la síntesis de la cadena β de la hemoglobina, lo que provoca anemia crónica y dependencia transfusional. La terapia génica basada en CRISPR-Cas9 surge como una alternativa prometedora para corregir estas mutaciones, permitiendo tanto la restauración directa de la expresión de la β-globina como la reactivación terapéutica de la hemoglobina fetal (HbF) mediante la modulación de elementos reguladores como el BCL11A. Esta revisión bibliográfica, de carácter narrativo y analítico, examina los principales avances tecnológicos y clínicos relacionados con el uso del sistema CRISPR-Cas9 y sus variantes (Cas12a, edición de bases y edición primaria) en la β-talasemia, con énfasis en la seguridad genómica, la eficiencia terapéutica y la viabilidad de implementación. Se abordan métodos de administración como RNP, AAV6 y nanopartículas lipídicas, además de estrategias de edición in vivo e integración de inteligencia artificial en el diseño de gRNAs. A pesar de los avances, persisten los retos en cuanto a los efectos fuera del objetivo, la activación de p53, la estabilidad clonal y los altos costes que limitan la aplicabilidad en los sistemas de salud públicos, especialmente en el contexto brasileño. Se concluye que, aunque todavía en fase traslacional, CRISPR-Cas9 representa una de las herramientas más revolucionarias para el tratamiento curativo de la β-talasemia, allanando el camino para terapias más seguras, precisas y accesibles, en las que el biomédico desempeña un papel esencial en la validación, monitoreo y bioseguridad en el laboratorio.

Palabras clave: Gen HBB; Hemoglobina fetal; Edición génica; BCL11A.

1. Introdução

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

A *β*-talassemia constitui um grupo de hemoglobinopatias hereditárias causadas por variantes no gene *HBB* que reduzem ou abolhem a síntese da cadeia *β* da hemoglobina A (HbA), resultando em desequilíbrio globínico, eritropoese ineficaz e anemia crônica com amplo espectro clínico (major, intermedia e minor). O gene *HBB*, localizado no cromossomo 11p15.5, integra o cluster *β*-like e possui elementos regulatórios cuja integridade é essencial para a expressão adequada de HbA pós-natal; mutações pontuais, deleções e alterações de splice, como IVS-II-654, CD41/42 e −28 A→G, figuram entre as causas recorrentes de defeito de produção de *β*-globina. Essas lesões moleculares culminam em excesso relativo de cadeias α não pareadas, precipitação intracelular, hemólise e falência medular compensatória, explicando o fenótipo hematológico e as complicações sistêmicas observadas. Do ponto de vista de saúde pública, a carga global permanece substancial, com altas taxas de portadores em diferentes regiões e evidências de subdiagnóstico em triagens populacionais e neonatais. Embora diretrizes e programas de rastreio avancem, as terapias convencionais como transfusões crônicas e quelação de ferro, impõem morbidade, alto custo e dependência vitalícia; já o transplante alogênico de HSC é limitado por compatibilidade e risco (KATTAMIS; KWIATKOWSKI; AYDINOK, 2022; MAHDIEH; RABBANI, 2016).

Nas últimas duas décadas, a edição gênica emergiu como alternativa causalmente orientada para hemoglobinopatias. O sistema CRISPR-Cas9, derivado de mecanismos de imunidade bacteriana, combina uma endonuclease (Cas9), um RNA-guia (gRNA) e um motivo de reconhecimento PAM para induzir quebras de fita dupla (DSB) em sítios programáveis, reparadas por NHEJ (gerando indels) ou HDR (permitindo correção por molde), com rápida adoção em células humanas. Estratégias de design de gRNA incorporam seleção de sítios com PAM favorável, avaliação in silico e validação experimental de off-targets por métodos como GUIDE-seq, CIRCLE-seq e WGS, buscando maximizar especificidade. Paralelamente, plataformas de edição sem DSB, base editors e prime editing, expandem o repertório para correções de nucleotídeo e edição de splice com menor genotoxicidade, enquanto comparações entre Cas9 e Cas12a ilustram diferenças de PAM, padrões de corte e perfis de off-target relevantes ao planejamento experimental (ZANGANEH et al., 2024; FARD et al., 2025).

No contexto específico da *β*-talassemia, duas abordagens convergentes têm se destacado. A primeira é a correção direta em ex vivo de mutações no *HBB* em células-tronco

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

hematopoéticas (HSPCs), com evidência de edição eficiente e resgate de expressão de *β*-globina em modelos celulares e pré-clínicos. A segunda envolve a reativação terapêutica de hemoglobina fetal (HbF) por edição do enhancer de *BCL11A*, oferecendo substituição funcional da HbA e já sustentando respostas clínicas em programas de terapia gênica/editing. Em estudos translacionais com primatas não humanos, a edição do enhancer +58/+55 de *BCL11A* tem facilitado engraftment de HSPCs e indução robusta de HbF sob condicionamento menos mieloablativo, sinalizando caminhos para protocolos mais seguros. Quanto à logística de entrega, plataformas com RNP por eletroporação, AAV6 como doador para HDR e, mais recentemente, estratégias sem cultura ex vivo, têm sido exploradas para elevar eficiência e preservar a "stemness" das HSCs. Modelos experimentais vão de HSPCs humanas a coelhos com knockout de *HBB* que recapitula a doença, além de sistemas de organoides e camundongos humanizados para avaliação funcional (COSENZA et al., 2021; HARDOUIN; MICCIO; BRUSSON, 2025).

Apesar do avanço, persistem desafios relacionados à segurança, escalabilidade e acesso. A avaliação abrangente de off-targets permanece mandatória, considerando potenciais efeitos adversos como mutações indesejadas, ativações de p53 e mosaicismo pós-transplante, bem como a estabilidade clonal e a durabilidade do enxerto das células editadas. Barreiras éticas e regulatórias para edição em humanos, além de custos e infraestrutura, impactam a viabilidade em sistemas de saúde públicos, exigindo análises de custo-efetividade e estratégias de implementação que reduzam inequidades, inclusive no contexto do SUS. Nesse cenário, inovações como prime editing e base editing voltadas a mutações específicas do *HBB*, a edição de regiões regulatórias para modular HbF e o uso de inteligência artificial para design de gRNAs e predição de off-targets surgem como vias para ampliar precisão e segurança; por sua vez, abordagens *in vivo* buscam simplificar o cuidado e potencialmente dispensar transplante, mas requerem validações extensivas de biodistribuição, imunogenicidade e controle de atividade (FARD et al., 2025; HARDOUIN; MICCIO; BRUSSON, 2025).

Diante desse panorama, este artigo de revisão tem como objetivo analisar criticamente as aplicações de CRISPR-Cas9 na correção de mutações de *β*-talassemia, com ênfase em (i) fundamentos genético-moleculares e espectro mutacional do *HBB*, (ii) princípios, mecanismos e variantes tecnológicas de edição gênica, (iii) evidências pré-clínicas e clínicas em correção direta de *HBB* e reativação de HbF via *BCL11A*, (iv) perfil de segurança, limitações e desafios regulatórios, e (v) perspectivas futuras com editores de

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

base/prime e estratégias *in vivo*, integrando dados de estudos experimentais, diretrizes clínicas e literatura recente. Metodologicamente, conduzimos uma revisão narrativa com foco nas obras indicadas, priorizando artigos originais e de síntese publicados entre 2005 e 2025, além de relatos de prevalência e triagem que contextualizam a carga da doença e a necessidade de soluções curativas (KATTAMIS; KWIATKOWSKI; AYDINOK, 2022; ZANGANEH et al., 2024).

1.1 **Objetivos Gerais**

Analisar criticamente as aplicações do sistema CRISPR-Cas9 (e variantes correlatas) na correção de mutações do gene *HBB* na *β*-talassemia, integrando fundamentos moleculares, evidências pré-clínicas e clínicas, métricas de segurança/eficácia e implicações práticas para a atuação do biomédico no diagnóstico, validação laboratorial, monitoramento e implementação translacional em contextos público e privado.

2. Revisão da Literatura

2.1 ASPECTOS FUNDAMENTAIS DA *B*-TALASSEMIA

A *β*-talassemia é uma hemoglobinopatia hereditária resultante de mutações no gene *HBB*, responsável pela codificação da cadeia *β* da hemoglobina adulta (HbA) (Lechauve et al., 2024). Esse gene, localizado no cromossomo 11, desempenha papel essencial na formação do tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ da hemoglobina, estrutura fundamental para o transporte eficiente de oxigênio aos tecidos. Assim, qualquer disfunção em *HBB* compromete a eritropoiese e a fisiologia eritrocitária como um todo (Freire et al., 2019).

As mutações no gene *HBB* podem ocorrer sob diversas formas, substituições pontuais, pequenas deleções ou inserções, e são responsáveis pela variabilidade fenotípica observada entre os pacientes (Tesio et al., 2023).

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

Entre as principais mutações associadas à *β*-talassemia, destacam-se IVS-II-654, CD41/42 e −28 A→G, frequentemente vinculadas às formas clínicas mais graves da doença (Zhuang et al., 2021). Tais alterações genéticas causam desequilíbrio na síntese das cadeias globínicas, levando ao acúmulo de cadeias α livres, que, por serem instáveis, formam precipitados intracelulares tóxicos, culminando em eritropoiese ineficaz, destruição precoce dos eritrócitos e anemia crônica (MUÑETÓN-GÓMEZ et al., 2023).

O quadro clínico da *β*-talassemia varia conforme o grau de deficiência na produção da cadeia *β*, sendo classificado em três formas principais: major, intermediária e minor (DORDEVIC et al., 2025). Na *β*-talassemia major, o início é precoce e os sintomas são severos, exigindo transfusões sanguíneas crônicas para manutenção da vida. A forma intermediária apresenta manifestações clínicas moderadas, permitindo que alguns pacientes se mantenham sem transfusões regulares. Já na forma minor, geralmente há apenas anemia leve, muitas vezes assintomática e não diagnosticada ao longo da vida (MAKIS et al., 2021).

As terapias convencionais concentram-se em transfusões regulares de sangue, que corrigem a anemia, associadas à administração de quelantes de ferro, essenciais para prevenir complicações decorrentes da sobrecarga férrica resultante das múltiplas transfusões (Lopes et al., 2022). Como alternativa potencialmente curativa, destaca-se o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas; no entanto, sua aplicação é limitada pela necessidade de compatibilidade HLA, pelo risco elevado de morbidade e mortalidade e pelos altos custos do procedimento (RAHMAN et al., 2024).

2.2 CONCEITOS DE EDIÇÃO GÊNICA E SISTEMA CRISPR-CAS9

O sistema CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associado à proteína Cas9) representa uma revolução na edição genômica, permitindo modificações precisas e programáveis do DNA. Este sistema é composto

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

por três elementos principais: o RNA guia (gRNA), a endonuclease Cas9 e o motivo adjacente ao protoespaçador (PAM, do inglês Protospacer Adjacent Motif), uma sequência curta de DNA essencial para o reconhecimento e ligação do complexo Cas9-gRNA ao sítio-alvo (SHI et al., 2024; ALLEMAILEM et al., 2023).

O mecanismo de ação do CRISPR-Cas9 inicia-se quando o gRNA, contendo uma sequência de aproximadamente 20 pares de bases, direciona a nuclease Cas9 ao local específico do genoma que apresenta complementaridade com o gRNA e um PAM adjacente (ASMAMAW et al., 2024).

Após o reconhecimento e ligação ao DNA-alvo, a Cas9 induz uma quebra de fita dupla (DSB, do inglês Double-Strand Break), que é então reparada por um dos dois principais mecanismos celulares: a união de extremidades não-homólogas (NHEJ, Non-Homologous End Joining) ou o reparo direcionado por homologia (HDR, Homology-Directed Repair) (LIAO et al., 2024). Enquanto o NHEJ é um processo propenso a erros que frequentemente resulta em inserções ou deleções (indels), o HDR permite a inserção precisa de sequências desejadas quando um molde de DNA doador é fornecido.

Um dos principais desafios na aplicação clínica do CRISPR-Cas9 é a minimização de efeitos fora do alvo (off-targets), que ocorrem quando o sistema edita sequências genômicas não intencionais com similaridade ao sítio-alvo desejado. Para mitigar esse problema, estratégias sofisticadas de design de gRNA foram desenvolvidas, incluindo a seleção criteriosa de sequências-alvo com alta especificidade e o uso de ferramentas bioinformáticas para predição de potenciais sítios off-target (NAEEM et al., 2023). Além disso, variantes de alta fidelidade da Cas9, como Sniper-Cas9, eSpCas9 e SpCas9-HF1, foram engenhadas para reduzir significativamente a atividade off-target mantendo a eficiência de edição (SKEENS et al., 2024).

A evolução da tecnologia CRISPR resultou no desenvolvimento de ferramentas complementares e alternativas ao sistema Cas9 clássico. A nuclease Cas12a, por exemplo, reconhece sequências PAM diferentes e produz extremidades coesivas após o corte, ao contrário das extremidades cegas geradas pela Cas9

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

(SLAMAN et al., 2024). Mais recentemente, surgiram as tecnologias de edição de bases (base editing) e edição prime (prime editing), que permitem alterações pontuais no DNA sem induzir quebras de fita dupla. Os editores de bases podem converter citosinas em timinas (CBE, Cytosine Base Editors) ou adeninas em guaninas (ABE, Adenine Base Editors), enquanto o prime editing, descrito como uma tecnologia de "buscar e substituir", utiliza um complexo de Cas9 nickase fusionado a uma transcriptase reversa, permitindo inserções, deleções e todas as transições e transversões de bases sem a necessidade de DNA doador exógeno ou DSBs (Petrova et al., 2023; XU et al., 2024).

As aplicações anteriores do CRISPR-Cas9 em doenças monogênicas demonstraram seu potencial terapêutico transformador. Na anemia falciforme, estratégias de edição têm visado a reativação da hemoglobina fetal para compensar a hemoglobina S defeituosa, com resultados promissores em ensaios clínicos (ESPOSITO et al., 2021). Em distrofias musculares, como a distrofia muscular de Duchenne, abordagens de edição gênica têm sido exploradas para restaurar a expressão funcional da distrofina ou para corrigir mutações específicas no gene DMD (CHEMELLO et al., 2023). Esses sucessos estabeleceram a base conceitual e técnica para a aplicação do CRISPR-Cas9 em outras hemoglobinopatias, incluindo a *β*-talassemia.

2.3 CORREÇÃO GÊNICA E REATIVAÇÃO DA HEMOGLOBINA FETAL MEDIADAS POR CRISPR-CAS9

A tecnologia CRISPR-Cas9 tem sido amplamente aplicada na *β*-talassemia por meio de diferentes abordagens terapêuticas, cada uma voltada à restauração da função normal da hemoglobina de forma específica. A estratégia mais direta consiste na correção *in situ* das mutações no gene *HBB* em células-tronco hematopoéticas (HSPCs) *ex vivo*, o que possibilita a produção endógena de hemoglobina A adulta funcional (WILKINSON et al., 2020).

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

Pesquisas recentes demonstraram a reparação eficaz de várias mutações em *HBB*, incluindo a mutação *frameshift* CD41-42 (−TCTT), uma das mais prevalentes mundialmente (YANG et al., 2024). Nessa abordagem, utiliza-se a entrega de complexos ribonucleoproteicos (RNP) formados por Cas9 e RNA guia (sgRNA), combinados a oligodesoxinucleotídeos de fita simples (ssODNs) empregados como moldes doadores, permitindo o reparo direcionado por homologia (HDR) nas HSPCs de indivíduos portadores da doença (LI et al., 2022).

Uma estratégia alternativa e igualmente promissora consiste na reativação da hemoglobina fetal (HbF) por meio da edição do *enhancer* do gene *BCL11A*, que atua como repressor transcricional da expressão da γ-globina (PASCHOUDI et al., 2023).

Essa intervenção mimetiza a persistência hereditária da hemoglobina fetal (HPFH), condição em que os altos níveis de HbF compensam a deficiência de HbA, atenuando as manifestações clínicas da *β*-talassemia (FINOTTI et al., 2023). A modificação seletiva do *enhancer* eritroide de *BCL11A* reativa a produção de HbF especificamente em células eritroides, sem afetar a expressão do gene em outros tecidos, minimizando potenciais efeitos adversos (Jiang, 2023).

Os modelos experimentais empregados na validação dessas abordagens incluem HSPCs primárias humanas obtidas de pacientes com *β*-talassemia, modelos murinos humanizados e, mais recentemente, sistemas de diferenciação eritroide *in vitro*. A diferenciação das HSPCs editadas em eritrócitos maduros permite avaliar a eficácia da correção genética e quantificar os níveis de hemoglobina A e fetal produzidos (PAVANI et al., 2021).

A entrega eficiente dos componentes CRISPR às HSPCs permanece um desafio técnico central. Entre as estratégias disponíveis, destaca-se a eletroporação de complexos RNP, que apresenta alta eficiência de transfecção e baixa toxicidade celular (JENSEN et al., 2021). Para a entrega dos moldes doadores em abordagens baseadas em HDR, os vetores virais adenoassociados do sorotipo 6 (AAV6) demonstram elevada eficiência de transdução em HSPCs (YANG et al., 2020). Mais recentemente, as nanopartículas lipídicas (LNPs) emergiram como alternativa não

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

viral e menos citotóxica, permitindo inclusive a entrega sequencial dos componentes de edição (DORSET et al., 2023).

A eficácia da correção genética varia conforme a metodologia empregada. Nos estudos baseados em HDR para correção direta das mutações em *HBB*, reportaram-se taxas de edição entre 20% e 60% nas HSPCs, suficientes para restaurar níveis de hemoglobina A capazes de eliminar a dependência transfusional em modelos pré-clínicos (Yang et al., 2024). Já nas estratégias voltadas à reativação da HbF por edição de *BCL11A*, observam-se níveis de HbF superiores a 20–30% da hemoglobina total, resultando em melhora clínica significativa (RAHIMMANESH et al., 2022).

Atualmente, vários ensaios clínicos investigam a segurança e eficácia de terapias baseadas em CRISPR-Cas9 para o tratamento da *β*-talassemia. O CTX001 (exagamglogene autotemcel), desenvolvido pela Vertex Pharmaceuticals e CRISPR Therapeutics, utiliza a edição do *enhancer* eritroide de *BCL11A* para reativar a HbF e tem apresentado resultados promissores, com pacientes atingindo independência transfusional sustentada e aumento expressivo dos níveis de hemoglobina total (LOCATELLI et al., 2023).

2.4 DESAFIOS TRANSLACIONAIS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS NA IMPLEMENTAÇÃO CLÍNICA DO CRISPR-CAS9

A implementação clínica da tecnologia CRISPR-Cas9 na *β*-talassemia enfrenta desafios substanciais relacionados à segurança genômica, eficácia terapêutica e viabilidade prática (LOCATELLI et., 2024). A avaliação rigorosa dos efeitos *off-target* — edições não intencionais em regiões genômicas semelhantes à sequência-alvo — constitui uma prioridade central nos estágios pré-clínico e clínico (ABBAS et al., 2024). Diversas metodologias têm sido empregadas para detecção abrangente desses eventos, incluindo GUIDE-seq (*genome-wide unbiased identification of DSBs enabled by sequencing*), capaz de identificar quebras de fita dupla *in vivo*; CIRCLE-seq (*circularization for in vitro reporting of cleavage effects by*

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

sequencing), uma técnica *in vitro* altamente sensível que dispensa o uso de sequência genômica de referência; e o sequenciamento de genoma completo, que permite análise imparcial de mutações pontuais e rearranjos estruturais (PAN et al., 2022).

Estudos recentes indicam que a edição mediada por CRISPR-Cas9 pode induzir respostas celulares adversas, especialmente a ativação da via de p53. As quebras de fita dupla (DSBs) desencadeiam uma resposta de dano ao DNA dependente de p53, resultando em parada do ciclo celular ou apoptose em células com p53 funcional (COLLOT et al., 2023). Esse mecanismo pode criar pressão seletiva indesejada, favorecendo células com disfunção de p53, o que eleva teoricamente o risco de transformação oncogênica a longo prazo (SCOTT et al., 2022). Outro aspecto relevante é o mosaicismo genético, isto é, a coexistência de populações celulares com diferentes genótipos devido à eficiência variável de edição, o que pode reduzir a eficácia terapêutica e dificultar a interpretação de resultados clínicos (Li et al., 2023).

A estabilidade e o potencial de enxertia (engraftment) das células-tronco hematopoéticas editadas são fatores críticos para o sucesso clínico. Evidências indicam que o processo de modificação *ex vivo* — que envolve manipulação celular, eletroporação e cultivo prolongado — pode comprometer a auto-renovação e a capacidade de enxertia das HSPCs (LEE et al., 2021). Estratégias que reduzem o tempo de cultura, otimizam as condições de expansão e utilizam protocolos de condicionamento mieloablativo adequados são essenciais para garantir uma reconstituição hematopoética duradoura (SCALA et al., 2023).

Além dos desafios biológicos, as questões éticas e regulatórias associadas à edição gênica em humanos permanecem sob intenso debate internacional. Embora a edição somática — que não afeta células germinativas — seja amplamente aceita para o tratamento de doenças graves, ainda persistem preocupações quanto ao consentimento informado, à equidade no acesso, à possibilidade de usos não terapêuticos e às consequências de longo prazo ainda pouco compreendidas (ZEPS et al., 2021). A aprovação do CTX001 marcou um marco regulatório histórico, mas

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

também reforçou a necessidade de acompanhamento prolongado dos pacientes, farmacovigilância rigorosa e harmonização internacional de normas regulatórias (PARUMS et al., 2024).

O custo elevado e a complexidade logística das terapias baseadas em CRISPR constituem barreiras significativas à sua ampla adoção clínica, especialmente em países com recursos limitados. A terapia CTX001, por exemplo, envolve múltiplas etapas de alta complexidade: coleta de HSPCs por aférese, edição *ex vivo* em instalações com Boas Práticas de Fabricação (GMP), condicionamento mieloablativo e suporte pós-transplante prolongado. Estimativas iniciais indicam custos de milhões de dólares por paciente, inviabilizando o acesso para a maioria dos portadores da doença, inclusive no Sistema Único de Saúde (SUS) (DEMARTINO et al., 2024). Assim, o desenvolvimento de plataformas mais eficientes, a produção em larga escala e a adaptação de protocolos para realidades de baixo custo tornam-se imperativos para democratizar o acesso a essas terapias transformadoras (WITKOWSKY et al., 2023).

2.5 PERSPECTIVAS FUTURAS E INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS NO USO DO CRISPR-CAS9 PARA A *B*-TALASSEMIA

O futuro das terapias baseadas em CRISPR-Cas9 para a *β*-talassemia é promissor e vem sendo moldado por avanços tecnológicos que buscam superar as limitações atuais e expandir as possibilidades terapêuticas. Entre as inovações mais relevantes, destacam-se as tecnologias de base editing e prime editing, que permitem realizar correções genéticas de forma precisa e previsível, sem induzir quebras de fita dupla (DSBs), reduzindo significativamente os riscos de mutações indesejadas e de ativação de vias de resposta celular, como a p53 (DALIRI et al., 2024).

O base editing tem mostrado elevada eficácia na correção de mutações pontuais no gene *HBB*. Estudos recentes reportaram a correção bem-sucedida da mutação IVS1-110(G>A) uma das mais prevalentes globalmente por meio de

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

editores de adenina (ABEs) com PAMs flexíveis, como SpRY e SpG. Essa abordagem alcançou alta eficiência de correção nos níveis de RNA e proteína, restaurando a produção normal de hemoglobina e a diferenciação eritroide (ABBAS et al., 2024; HU et al., 2024).

De forma complementar, o prime editing (PE) frequentemente descrito como uma tecnologia de *"buscar e substituir"* utiliza uma Cas9 nickase fusionada a uma transcriptase reversa, possibilitando não apenas substituições de bases, mas também inserções e deleções sem necessidade de DNA doador ou quebras duplas (TAO et al., 2022).

Estudos com o prime editor 3 (PE3) demonstraram correção eficiente de diversas mutações associadas à *β*-talassemia em progenitores eritroides humanos, com eficiências variando entre 15% e 80%, dependendo do contexto genômico (ARIF et al., 2023).

Além da correção direta de *HBB*, emergem estratégias que visam editar regiões regulatórias responsáveis pela modulação da hemoglobina fetal (HbF). Técnicas de *base editing* aplicadas à região promotora de *HBG* identificaram combinações de mutações capazes de elevar a HbF para 10–30% da hemoglobina total, níveis suficientes para restaurar a função eritroide em modelos de *β*-talassemia (RAVI et al., 2022). Essa abordagem mimetiza as variantes naturais de persistência hereditária da hemoglobina fetal (HPFH) e apresenta vantagens em relação à edição de *BCL11A*, por evitar interferência em outros tecidos (RAVI et al., 2022).

Uma fronteira particularmente transformadora é o desenvolvimento de terapias de edição *in vivo*, que podem eliminar a necessidade de transplante de células-tronco hematopoéticas, reduzindo os riscos associados ao condicionamento mieloablativo e ao suporte pós-transplante. Sistemas de entrega baseados em nanopartículas lipídicas (LNPs) vêm demonstrando capacidade de transportar mRNA de Cas9, gRNA e moldes de DNA diretamente às células-alvo *in vivo* (VINCHI 2024).

Embora a maioria dos estudos ainda se concentre em tecidos acessíveis, o avanço no desenvolvimento de LNPs com tropismo para medula óssea e HSPCs circulantes representa uma área de intensa investigação (LIAN et al., 2024).

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

Os desafios remanescentes dessa abordagem incluem alcançar eficiência adequada de edição em HSPCs, garantir durabilidade das modificações genéticas e minimizar efeitos *off-target* em tecidos não-alvo. No entanto, os avanços recentes na engenharia de lipídios ionizáveis e na especificidade de vetores indicam que esses obstáculos poderão ser superados na próxima década (MANGHWAR, et al., 2023).

A integração de inteligência artificial (IA) ao design experimental das plataformas CRISPR também vem revolucionando o campo, ampliando a segurança e a eficiência das edições genéticas. Modelos de aprendizado profundo (deep learning), como *DeepCRISPR*, *CRISTA*, *DeepHF* e o recente *CRISPR-GPT*, permitem prever a eficiência de gRNAs e estimar riscos de *off-targets* com alta precisão (XIANG et al., 2021; DIXIT et al., 2024). Essas ferramentas automatizam a seleção de alvos e recomendam metodologias de entrega ideais, enquanto abordagens de IA explicável (XAI) auxiliam na compreensão dos fatores genômicos e estruturais que determinam o desempenho das enzimas Cas (CUI et al., 2025).

Além dos avanços técnicos, é essencial considerar os impactos sociais e bioéticos da aplicação clínica dessas tecnologias. A cura genética da *β*-talassemia representa um marco biomédico capaz de eliminar a dependência de transfusões crônicas, reduzir complicações da sobrecarga de ferro e melhorar significativamente a qualidade de vida de milhões de pacientes. Contudo, os custos elevados — frequentemente superiores a um milhão de dólares por paciente — acentuam desigualdades de acesso, especialmente em países de baixa e média renda, onde a doença é endêmica (ADAIR et al., 2023).

Questões éticas como consentimento informado, gestão de expectativas, vigilância pós-aprovação e a prevenção de usos eugênicos continuam centrais no debate global sobre edição gênica (LEE, 2024). A democratização do acesso a terapias genéticas exige esforços coordenados em múltiplas frentes desde a redução de custos de produção até a criação de políticas públicas equitativas e infraestruturas clínicas robustas.

No contexto brasileiro, a incorporação dessas terapias ao Sistema Único de Saúde (SUS) dependerá de análises de custo-efetividade, negociações de preço

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

justas e parcerias público-privadas capazes de viabilizar o acesso equitativo à cura genética (CORNETTA et al., 2022). A médio prazo, o investimento em pesquisa nacional e produção local de biotecnologias poderá reduzir custos e permitir a adaptação das plataformas CRISPR à realidade socioeconômica do país.

3. Considerações Finais

Esta revisão confirma que a talassemia beta constitui um complexo enigma clínico e científico, em que a variabilidade fenotípica emerge não apenas do repertório mutacional do *HBB*, mas também dos moduladores genéticos e do meio fisiopatológico em que ocorre a eritropoiese. Dentro dessa estrutura, metodologias baseadas na edição de genes progrediram da validação conceitual para uma fase de consolidação translacional, caracterizada por duas trajetórias distintamente definidas: a retificação direta de variantes dentro do *HBB* e a reativação terapêutica da hemoglobina fetal por meio de intervenções direcionadas a elementos regulatórios, como o potenciador *BCL11A*. Ambas as estratégias demonstraram a capacidade de diminuir a dependência transfusional, melhorar os parâmetros hematológicos e transferir o cuidado para soluções focadas na etiologia.

O avanço tecnológico nesse domínio é inconfundível. Protocolos de entrega aprimorados e mais previsíveis, incluindo a eletroporação de complexos de ribonucleoproteínas e a aplicação de vetores de doadores, como o AAV6, aumentaram a eficiência de edição, mantendo a competência de enxerto, enquanto variantes de nuclease de alta fidelidade junto com ferramentas de design computacional mitigaram a variabilidade experimental e o potencial de efeitos fora do alvo. Ao mesmo tempo, a introdução do Cas12a, dos editores básicos e da edição principal ampliou a variedade de correções possíveis, particularmente em cenários que apresentam intolerância a quebras de fita dupla ou mutações pontuais e anomalias de empalme, criando assim um espectro de alternativas em que precisão, segurança e compatibilidade com objetivos clínicos podem ser integradas com maior granularidade.

Não obstante essas conquistas, os desafios persistentes são consideráveis e merecem uma análise séria. A resposta celular ao dano ao DNA, particularmente por meio da via p53, continua a impor restrições pragmáticas ao desempenho e à segurança; a detecção sensível e a validação ortogonal de efeitos fora do alvo permanecem imperativas;

REMUNOM
ISSN 2178-6925
Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

além disso, a estabilidade clonal de longo prazo e a durabilidade do efeito terapêutico requerem séries mais abrangentes e acompanhamento prolongado. Aumentando essa complexidade está a heterogeneidade entre protocolos, metas e testes avaliativos, o que complica as comparações diretas e impede o consenso metodológico, ressaltando a necessidade urgente de padrões mínimos relativos ao relato de eficiência, proporções de HbA e HbF e indicadores funcionais.

À luz do corpo de conhecimento existente, a agenda de curto e médio prazo deve enfatizar a padronização de métricas e avaliações de segurança que facilitem a comparação de plataformas e modalidades de entrega, a exploração prudente de edições programáveis por meio da ativação ou inibição da transcrição quando a modulação da expressão é mais vantajosa do que a correção de sequência, rotas não virais juntamente com estratégias in vivo com governança de risco claramente definida e investigações que incorporam variáveis genéticas modificadoras na estrutura experimental para prever a heterogeneidade da resposta. Simultaneamente, análises de custo-efetividade e modelos de implementação progressivos serão fundamentais para transformar benefícios individuais em impactos coletivos, aliviando assim as barreiras de acesso e garantindo que as inovações sejam disseminadas de forma equitativa aos pacientes.

Por fim, é oportuno salientar o papel do biomédico nesse panorama. No contexto emergente da edição gênica para beta talassemia, o biomédico ocupa posição estratégica na ponte entre bancada e leito, participando do desenho e da validação técnica de protocolos com seleção de alvos e controles, padronização de procedimentos operacionais, garantia de rastreabilidade no fluxo laboratorial, execução e interpretação de ensaios de eficiência e segurança, implementação de rotinas de biossegurança e de qualidade, documentação de conformidade regulatória e ética, além da integração em equipes multiprofissionais para elegibilidade, monitoramento longitudinal e farmacovigilância laboratorial. Ao articular rigor metodológico, comunicação clínica e viabilidade operacional em serviços públicos e privados, o biomédico contribui de modo direto para converter evidência técnica em benefício clínico mensurável, promovendo segurança, reprodutibilidade e equidade no acesso às terapias de edição gênica.

Referências

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

ALLEMAILEM, Khaled S. et al. Recent advances in genome-editing technology with CRISPR/Cas9 variants and stimuli-responsive targeting approaches within tumor cells: a future perspective of cancer management. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7052, 2023

ALOTIBI, Raniah S. et al. The frequency and spectrum of *HBB* gene mutation in *β*-Thalassemia patients in Saudi Arabia. **Journal of Natural Science, Biology and medicine**, v. 10, n. 1, p. 97, 2019.

ANGASTINIOTIS, Michael; LOBITZ, Stephan. Thalassemias: an overview. **International Journal of Neonatal Screening**, v. 5, n. 1, p. 16, 2019. https://doi.org/10.3390/ijns5010016

ARIF, Taqdees et al. Prime editing: A potential treatment option for *β*-thalassemia. **Cell Biology International**, v. 47, n. 4, p. 699-713, 2023.

ASMAMAW MENGSTIE, Misganaw et al. Recent advancements in reducing the off-target effect of CRISPR-Cas9 genome editing. **Biologics: Targets and Therapy**, p. 21-28, 2024.

CAI, Wenqian et al. Prevalence and genetic analysis of thalassemia in neonates in Wuhan area: a national megacity in central China. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 34, n. 14, p. 2240-2247, 2021. https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1662780

CHEMELLO, Francesco; OLSON, Eric N.; BASSEL-DUBY, Rhonda. CRISPR-editing therapy for duchenne muscular dystrophy. **Human gene therapy**, v. 34, n. 9-10, p. 379-387, 2023

COLAH, Roshan; GORAKSHAKAR, Ajit; NADKARNI, Anita. Global burden, distribution and prevention of *β*-thalassemias and hemoglobin E disorders. **Expert Review of Hematology**, v. 3, n. 1, p. 103-117, 2010. https://doi.org/10.1586/ehm.09.74

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

CORNETTA, Kenneth et al. Gene therapy access: Global challenges, opportunities, and views from Brazil, South Africa, and India. **Molecular Therapy**, v. 30, n. 6, p. 2122-2129, 2022.

COSENZA, Lucia Carmela et al. Efficient CRISPR-Cas9-based genome editing of β-globin gene on erythroid cells from homozygous β039-thalassemia patients. **Molecular Therapy Methods & Clinical Development**, v. 21, p. 507-523, 2021. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.03.025

CUI, Jiesheng; ZHANG, Dini; WANG, Guanyu. Combinatorial application of artificial intelligence and CRISPR/Cas9 on the next-generation CAR-T immunotherapy. **AIMS Molecular Science**, v. 12, n. 3, p. 292-317, 2025.

CULLOT, G. et al. Cell cycle arrest and p53 prevent ON-target megabase-scale rearrangements induced by CRISPR-Cas9. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 4072, 2023.

DALIRI, Karim; HESCHELER, Jürgen; PFANNKUCHE, Kurt Paul. Prime Editing and DNA Repair System: Balancing Efficiency with Safety. **Cells**, v. 13, n. 10, p. 858, 2024.

DEMARTINO, Patrick C. et al. A budget impact analysis of gene therapy for sickle cell disease: an updated analysis. **Blood Advances**, v. 8, n. 17, p. 4658-4661, 2024.

DEMIRCI, Selami et al. *BCL11A*+ 58/+ 55 enhancer-editing facilitates HSPC engraftment and HbF induction in rhesus macaques conditioned with a CD45 antibody-drug conjugate. **Cell Stem Cell**, v. 32, n. 2, p. 209-226. e8, 2025. https://doi.org/10.1016/j.stem.2024.10.014

DIXIT, Shriniket et al. Advancing genome editing with artificial intelligence: opportunities, challenges, and future directions. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 11, p. 1335901, 2024.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

DORDEVIC, Ana et al. Beta thalassemia syndromes: New insights. **World Journal of Clinical Cases**, v. 13, n. 10, p. 100223, 2025.

DORSET, Sofie R.; BAK, Rasmus O. The p53 challenge of hematopoietic stem cell gene editing. **Molecular Therapy Methods & Clinical Development**, v. 30, p. 83-89, 2023.

ESPOSITO, Daina B. et al. Periconceptional nonsteroidal anti-inflammatory drug use, folic acid intake, and the risk of Spina Bifida. **Birth defects research**, v. 113, n. 17, p. 1257-1266, 2021.

FARD, Ghazaleh Behrouzian et al. CRISPR-Cas9: a prominent genome editing tool in the management of inherited blood disorders and hematological malignancies. **Current Research in Translational Medicine**, p. 103531, 2025. https://doi.org/10.1016/j.retram.2025.103531

FINOTTI, Alessia; GAMBARI, Roberto. Combined approaches for increasing fetal hemoglobin (HbF) and de novo production of adult hemoglobin (HbA) in erythroid cells from β-thalassemia patients: Treatment with HbF inducers and CRISPR-Cas9 based genome editing. **Frontiers in Genome Editing**, v. 5, p. 1204536, 2023.

FREIRE, Ítalo Aguiar et al. β-Talassemia major: um relato de caso. 2019.

GUO, Congting et al. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 11, p. 1143157, 2023.

HARDOUIN, Giulia; MICCIO, Annarita; BRUSSON, Megane. Gene therapy for β-thalassemia: current and future options. **Trends in Molecular Medicine**, 2025. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2024.12.001

HU, Jing et al. β-Thalassemia gene editing therapy: Advancements and difficulties. **Medicine**, v. 103, n. 18, p. e38036, 2024.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

JENSEN, Trine I. et al. Targeted regulation of transcription in primary cells using CRISPRa and CRISPRi. **Genome research**, v. 31, n. 11, p. 2120-2130, 2021.

JIANG, Haiyan. Genome editing coming of age for hemoglobinopathy. **Molecular Therapy**, v. 31, n. 3, p. 601-602, 2023.

KATTAMIS, Antonis; KWIATKOWSKI, Janet L.; AYDINOK, Yesim. Thalassaemia. **The lancet**, v. 399, n. 10343, p. 2310-2324, 2022.

KOMAL et al. Transformative CRISPR-Cas9 Technologies: A Review of Molecular Mechanisms, Precision Editing Techniques, and Clinical Progress in Sickle Cell Disease. **Current Drug Metabolism**, 2025. https://doi.org/10.2174/0113892002356293250225094826

LECHAUVE, Christophe et al. Ancestral β-globin gene haplotypes modify β-thalassemia severity in a mouse model. **Blood Advances**, v. 8, n. 23, p. 5988-5992, 2024.

LEE, Byung-Chul; LOZANO, Richard J.; DUNBAR, Cynthia E. Understanding and overcoming adverse consequences of genome editing on hematopoietic stem and progenitor cells. **Molecular Therapy**, v. 29, n. 11, p. 3205-3218, 2021.

LEE, Tsung-Ling; SAWAI, Tsutomu. Navigating equity in global access to genome therapy expanding access to potentially transformative therapies and benefiting those in need requires global policy changes. **Frontiers in Genetics**, v. 15, p. 1381172, 2024.

LEONARD, Alexis; TISDALE, John F.; BONNER, Melissa. Gene therapy for hemoglobinopathies: beta-thalassemia, sickle cell disease. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 36, n. 4, p. 769-795, 2022.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

LI, Lingli et al. Genetic correction of concurrent α-and *β*-thalassemia patient-derived pluripotent stem cells by the CRISPR-Cas9 technology. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 1, p. 102, 2022.

LIAN, Xizhen et al. Bone-marrow-homing lipid nanoparticles for genome editing in diseased and malignant haematopoietic stem cells. **Nature nanotechnology**, v. 19, n. 9, p. 1409-1417, 2024.

LIANG, Qiaowei et al. A more universal approach to comprehensive analysis of thalassemia alleles (CATSA). **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 23, n. 9, p. 1195-1204, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.06.008

LIAO, Hongyu et al. CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair for precise gene editing. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 35, n. 4, 2024.

LOCATELLI, Franco et al. Autologous gene therapy for hemoglobinopathies: From bench to patient's bedside. **Molecular Therapy**, v. 32, n. 5, p. 1202-1218, 2024.

LOCATELLI, Franco et al. S270: transfusion independence after EXAGAMGLOGENE AUTOTEMCEL in patients with transfusion-dependent *B*ETA-thalassemia. **HemaSphere**, v. 7, n. S3, p. e8473180, 2023.

LONG, Ju et al. Comprehensive analysis of thalassemia alleles (CATSA) based on third-generation sequencing is a comprehensive and accurate approach for neonatal thalassemia screening. **Clinica Chimica Acta**, v. 560, p. 119749, 2024. https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.119749

LOPES, Andressa; DANTAS, Marina Tejo; LADEIA, Ana Marice Teixeira. Prevalência das complicações cardiovasculares nos indivíduos com anemia falciforme e outras hemoglobinopatias: Uma revisão sistemática. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 119, p. 893-899, 2022.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

MAHDIEH, Nejat; RABBANI, Bahareh. Beta thalassemia in 31,734 cases with *HBB* gene mutations: pathogenic and structural analysis of the common mutations; Iran as the crossroads of the Middle East. **Blood reviews**, v. 30, n. 6, p. 493-508, 2016. https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.07.001

MAKIS, Alexandros et al. Novel therapeutic advances in β-thalassemia. **Biology**, v.10, n. 6, p. 546, 2021.

MUÑETÓN-GÓMEZ, César Alfonso et al. Abordaje de las anemias no autoinmunes: Un reto terapéutico. Delta/ß-talasemia. Acta médica colombiana, v. 48, n. 1, p. 3, 2023.

NAEEM, Muhammad; ALKHNBASHI, Omer S. Current bioinformatics tools to optimize CRISPR/Cas9 experiments to reduce off-target effects. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 7, p. 6261, 2023.

NAISSEH, Basma et al. Context base editing for splice correction of IVSI-110 β-thalassemia. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 35, n. 2, 2024. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2024.102183

PAN, Xiaoguang et al. Massively targeted evaluation of therapeutic CRISPR off-targets in cells. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 4049, 2022

PARUMS, Dinah V. First regulatory approvals for CRISPR-Cas9 therapeutic gene editing for sickle cell disease and transfusion-dependent β-thalassemia. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 30, p. e944204-1, 2024.

PASCHOUDI, Kiriaki; YANNAKI, Evangelia; PSATHA, Nikoletta. Precision editing as a therapeutic approach for β-hemoglobinopathies. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 11, p. 9527, 2023.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

PAVANI, Giulia et al. Correction of β-thalassemia by CRISPR/Cas9 editing of the α-globin locus in human hematopoietic stem cells. **Blood advances**, v. 5, n. 5, p. 1137-1153, 2021.

Petrova IO, Smirnikhina SA. The Development, Optimization and Future of Prime Editing. Int J Mol Sci. 2023 Dec 1;24(23):17045. doi: 10.3390/ijms242317045. PMID: 38069367; PMCID: PMC10707272.

RAHIMMANESH, Ilnaz et al. Gene Editing-Based technologies for Beta-hemoglobinopathies treatment. **Biology**, v. 11, n. 6, p. 862, 2022.

RAHMAN, Khalil Ur et al. Outcome of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant in Patients with Beta Thalassemia Major: Experience from Resource Constrained Centers. **Blood**, v. 144, p. 7296, 2024.

RAVI, Nithin Sam et al. Identification of novel HPFH-like mutations by CRISPR base editing that elevate the expression of fetal hemoglobin. **Elife**, v. 11, p. e65421, 2022.

SCALA, Serena et al. Hematopoietic reconstitution dynamics of mobilized-and bone marrow-derived human hematopoietic stem cells after gene therapy. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 3068, 2023.

SCOTT, Tristan; MORRIS, Kevin V. From amputations to antibiotics: A future beyond “hacksaw” gene editing. **Molecular Therapy**, v. 30, n. 12, p. 3505-3506, 2022.

SHANG, Xuan et al. Diretrizes de prática clínica para beta-talassemia. **Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi= Zhonghua yixue yichuanxue zazhi= Revista Chinesa de Genética Médica,** v. 3, pág. 243-251, 2020. https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2020.03.004

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

SHI, Honglue et al. Rapid two-step target capture ensures efficient CRISPR-Cas9-guided genome editing. **Molecular Cell**, v. 85, n. 9, p. 1730-1742. e9, 2025.

SKEENS, Erin et al. High-fidelity, hyper-accurate, and evolved mutants rewire atomic-level communication in CRISPR-Cas9. **Science advances**, v. 10, n. 10, p. eadl1045, 2024

SLAMAN, Ellen et al. Comparison of Cas12a and Cas9-mediated mutagenesis in tomato cells. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 4508, 2024

STARLARD-DAVENPORT, Athena; GU, Qingqing; PACE, Betty S. Targeting genetic modifiers of HBG gene expression in sickle cell disease: the miRNA option. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 26, n. 5, p. 497-509, 2022. https://doi.org/10.1007/s40291-022-00589-z

STORER, Eliza Eufrazio. Terapia gênica para pacientes transfusionais de ß-Talassemia. 2023. https://doi.org/10.3324/haematol.2020.278238

SU, Yue et al. Screening and treatment of thalassemia. **Clinica Chimica Acta**, p. 120211, 2025. https://doi.org/10.1016/j.cca.2025.120211

TAO, Rui et al. WT-PE: Prime editing with nuclease wild-type Cas9 enables versatile large-scale genome editing. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 7, n. 1, p. 108, 2022.

TESIO, Nicolò; BAUER, Daniel E. Molecular basis and genetic modifiers of thalassemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 37, n. 2, p. 273-299, 2023.

VINCHI, Francesca. Novel frontiers in gene therapy: In vivo gene editing. **HemaSphere**, v. 8, n. 1, p. e25, 2024.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

WANG, Fangfang; LING, Ling; YU, Duonan. MicroRNAs in β-thalassemia. **The American journal of the medical sciences**, v. 362, n. 1, p. 5-12, 2021. https://doi.org/10.1016/j.amjms.2021.02.011

WANG, Ge et al. Characterization of a novel 8.2 kb deletion causing beta-thalassemia. **Clinical Biochemistry**, v. 133, p. 110832, 2024. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2024.110832

WEATHERALL, David J. Discurso de abertura: O desafio da talassemia para os países em desenvolvimento. **Anais da Academia de Ciências de Nova York** , v. 1054, n. 1, p. 11-17, 2005. https://doi.org/10.1196/annals.1345.002

WEI, Bixiao et al. The population incidence of thalassemia gene variants in Baise, Guangxi, PR China, based on random samples. **Hematology**, v. 27, n. 1, p. 1026-1031, 2022. https://doi.org/10.1080/16078454.2022.2119736

WILKINSON, A. C.; DEVER, D. P.; LEE, L.; BAIK, R.; CABRERA, A. M.; PORTEUS, M. H. Cas9-AAV6 gene correction of beta-globin in autologous HSCs improves sickle cell disease erythropoiesis in mice. Nature Communications, v. 11, p. 5399, 2020.

WITKOWSKY, Lea et al. Towards affordable CRISPR genomic therapies: a task force convened by the Innovative Genomics Institute. **Gene therapy**, v. 30, n. 10, p. 747-752, 2023.

XIANG, Xi et al. Enhancing CRISPR-Cas9 gRNA efficiency prediction by data integration and deep learning. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 3238, 2021.

XU, Fang et al. Breaking genetic shackles: The advance of base editing in genetic disorder treatment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, p. 1364135, 2024.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

YANG, Fang et al. Wgcna and Lasso Regression-Based Selection and Validation of Microrna Biomarkers of *B*-Thalassemia. **Available at SSRN 5279136**. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2025.102957

YANG, Hua et al. Enhanced transduction of human hematopoietic stem cells by AAV6 vectors: implications in gene therapy and genome editing. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 20, p. 451-458, 2020.

YANG, Yi et al. CRISPR/Cas9-mediated β-globin gene knockout in rabbits recapitulates human β-thalassemia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100464

YANG, Yinghong et al. In situ correction of various β-thalassemia mutations in human hematopoietic stem cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1276890, 2024.

YU, Xia et al. Genetic investigation of haemoglobinopathies in a large cohort of asymptomatic individuals reveals a higher carrier rate for β-thalassaemia in Sichuan Province (Southwestern China). **Genes & Diseases**, v. 8, n. 2, p. 224-231, 2021. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.11.001

ZANGANEH, Saeed et al. Recent advances and applications of the CRISPR-Cas system in the gene therapy of blood disorders. **Gene**, v. 931, p. 148865, 2024. https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148865

ZENG, Jing et al. Gene editing without ex vivo culture evades genotoxicity in human hematopoietic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 32, n. 2, p. 191-208. e11, 2025. https://doi.org/10.1016/j.stem.2024.11.001

ZEPS, Nikolajs et al. Ethics and regulatory considerations for the clinical translation of somatic cell human epigenetic editing. **Stem Cell Reports**, v. 16, n. 7, p. 1652-1655, 2021.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 20/10/2025 - **Accepted:** 16/11/2025
Vol: 20.02
DOI: 10.61164/xhxkg895
Pages: 1-27

ZHANG, Zhe et al. Analisando os efeitos de mutações missense que ocorrem naturalmente. **Métodos computacionais e matemáticos em medicina** , v. 2012, n. 1, p. 805827, 2012. https://doi.org/10.1155/2012/805827

ZHENG, Biao et al. Efficacy and safety of brl-101, crispr-cas9-mediated gene editing of the *BCL11A* enhancer in transfusion-dependent *β*-thalassemia. 2023.

ZHUANG, Jianlong et al. Molecular characterization analysis of thalassemia and hemoglobinopathy in Quanzhou, Southeast China: A large-scale retrospective study. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 727233, 2021.