

A síntese de hemoglobina fetal via CRISPR/Cas9 para o tratamento da anemia falciforme

Gabriela Pereira dos Santos¹, Regiane Priscila Ratti Sartori¹, Andrea Varsone Carreri¹, Vanessa Zanoni Carvalhaes¹, Amilton Iatecola¹, Marcelo Rodrigues da Cunha^{1,2}, Yggor Biloría e Silva², Vinicius de Barros Hirota³, Carolina Chen Pauris², Victor Augusto Ramos Fernandes^{1,2}

1. Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio (CEUNSP), Itu, Brasil.
2. Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí, Brasil.
3. Universidade Guarulhos (UNG), São Paulo, Brasil; Centro Paula Souza – Etec de Esportes.

Autor correspondente: victor.fernandes@ceunsp.edu.br.

Todos os autores deste artigo declaram que não há conflitos de interesses.

Artigo de revisão de literatura.

Resumo

A anemia falciforme (AF) é uma doença causada por uma mutação que leva à falcização dos eritrócitos, resultando em sintomas graves, como crises vaso-oclusivas. Considerando que os tratamentos disponíveis são limitados e de difícil acesso, é essencial o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a AF. A severidade da AF pode ser diminuída pelo aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF); e CRISPR/Cas9. Ela é uma ferramenta de edição genética que possibilita a expressão da HbF, ao desencadear mecanismos de reparos do DNA. O objetivo da presente revisão é avaliar o uso de CRISPR/Cas9 na síntese de HbF para o tratamento da AF. Os estudos desta revisão consistem em ensaios clínicos identificados pela busca dos descritores em inglês ou português nas bases de dados *Publisher MedLine (PubMed)*, *Scientific Electronic Library Online (SciELO)* e *Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs)*. Foram selecionados nove estudos que realizaram a edição de genes regulatórios da HbF, sendo três deles caracterizados pela edição da região promotora dos genes HBG1 e HBG2. Outros dois tiveram como alvo o gene BCL11A, enquanto um estudo editou o gene da β -globina. Além disso, outros trabalhos editaram os genes NFIA, NFIX, HRI, LRF e RBM12. As intervenções nos genes-alvo utilizando CRISPR/Cas9 desencadearam a síntese terapêutica da HbF, inibindo a fisiopatologia e consequentemente os sintomas clínicos da doença.

Embora sejam promissoras, as estratégias desenvolvidas também precisam ser acessíveis para que sejam implementadas em regiões incidentes da AF. Portanto, o desenvolvimento de novos estudos clínicos, principalmente em humanos, pode fornecer dados científicos relevantes para o aprimoramento dessas intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: Anemia falciforme; Doença falciforme; CRISPR/Cas9; Hemoglobina fetal; γ -globina.

Fetal hemoglobin synthesis via CRISPR/Cas9 for the treatment of sickle cell anemia

Abstract

Background: Sickle cell anemia (SCA) is a disease caused by a mutation that leads to sickling of red blood cells, resulting in severe symptoms such as vaso-occlusive crises. Given that available treatments are limited and difficult to access, the development of new therapeutic strategies for SCA is essential. The severity of SCA can be decreased by increasing fetal hemoglobin (HbF) levels, and CRISPR/Cas9 is a gene editing tool that enables HbF expression by triggering DNA repair mechanisms. The aim of the present review is to evaluate the use of CRISPR/Cas9 in the synthesis of HbF for the treatment of SCA. **Methods:** The studies in this review consist of clinical trials identified by searching the English or Portuguese descriptors in PubMed, SciELO, and LILACS databases. **Results:** Nine studies that performed editing of HbF regulatory genes were selected, three of which were characterized by editing the promoter region of the HBG1 and HBG2 genes. Another two studies targeted the BCL11A gene, while one study edited the β -globin gene. In addition, other studies edited the NFIA, NFIX, HRI, LRF and RBM12 genes. **Conclusions:** The interventions via CRISPR/Cas9 in the target genes triggered the therapeutic synthesis of HbF, inhibiting the pathophysiology and consequently the clinical symptoms of the disease. Although promising, the developed strategies also need to be affordable for implementation in incident regions of HbF. Therefore, the development of new clinical studies, especially in humans, may provide relevant scientific data for the improvement of these therapeutic interventions.

Keywords: Sickle Cell Anemia, Sickle Cell Disease, CRISPR/Cas9, Fetal Hemoglobin, γ -globin

Introdução

A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia homozigótica (HbSS), causada por um erro no pareamento de bases no sexto códon da β -globina. A codificação da hemoglobina S (HbS) confere aos eritrócitos uma estrutura frágil e rígida, resultando em quadros de anemia e na obstrução do fluxo sanguíneo. Como resultado, ocorrem dolorosas crises vaso-oclusivas que comprometem a irrigação adequada dos órgãos^{1,2}.

Além da sintomatologia, o exame mais comum realizado para a confirmação da AF em adultos é a eletroforese da hemoglobina. Entretanto, o hemograma e a observação de drepanócitos na extensão sanguínea também auxiliam no diagnóstico, que é seguido de tratamentos paliativos com eficácia limitada. Embora o transplante de medula seja uma opção curativa, pode resultar em enxerto *versus* hospedeiro para cerca de 80% dos pacientes, tornando-se pertinente o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas^{1,2,3}.

Dessa forma, torna-se promissor para o tratamento da anemia falciforme o uso da ferramenta CRISPR/Cas9, composta por um complexo ribonucleoproteico capaz de localizar e clivar um gene de interesse. A quebra da fita-dupla do DNA desencadeia mecanismos de reparo, possibilitando a cura de doenças genéticas de forma mais acessível e eficaz^{4,5}.

Com o intuito de investigar esse mecanismo, as pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna, em conjunto com um grupo de cientistas, realizaram experimentos utilizando a bactéria *Streptococcus pyogenes* e uma família de endonucleases. Nesse estudo, concluiu-se que CRISPR/Cas9 é um mecanismo de defesa bacteriano que pode ser programável para clivar genes de interesse. Essa descoberta resultou na conquista do prêmio Nobel de Química em 2020⁶.

Após esse marco científico, ao considerar que níveis elevados de hemoglobina fetal amenizam a mortalidade e morbidade de pacientes com anemia falciforme, pesquisadores modificaram células-tronco hematopoiéticas utilizando CRISPR/Cas9 para silenciar o gene BCL11A, cuja principal função é reprimir a expressão da HbF. A intervenção resultou em níveis elevados de HbF, causando a interrupção de crises vaso-oclusivas e da necessidade de transfusões sanguíneas⁴.

Diante disso, o presente estudo tem o objetivo de apresentar e analisar a viabilidade do uso da ferramenta CRISPR/Cas9 para o tratamento da anemia falciforme por meio da síntese da HbF.

Métodos

Estratégia de Busca

A presente revisão foi desenvolvida aplicando-se os descritores “Sickle Cell Anemia”, “Sickle Cell Disease”, “CRISPR/Cas9”, “Fetal Hemoglobin” e “ γ -globin” nos idiomas inglês e português. A busca foi feita nas bases de dados *Publisher MedLine (PubMed)*, *Scientific Electronic Library Online (SciELO)* e Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da

Saúde (Lilacs).

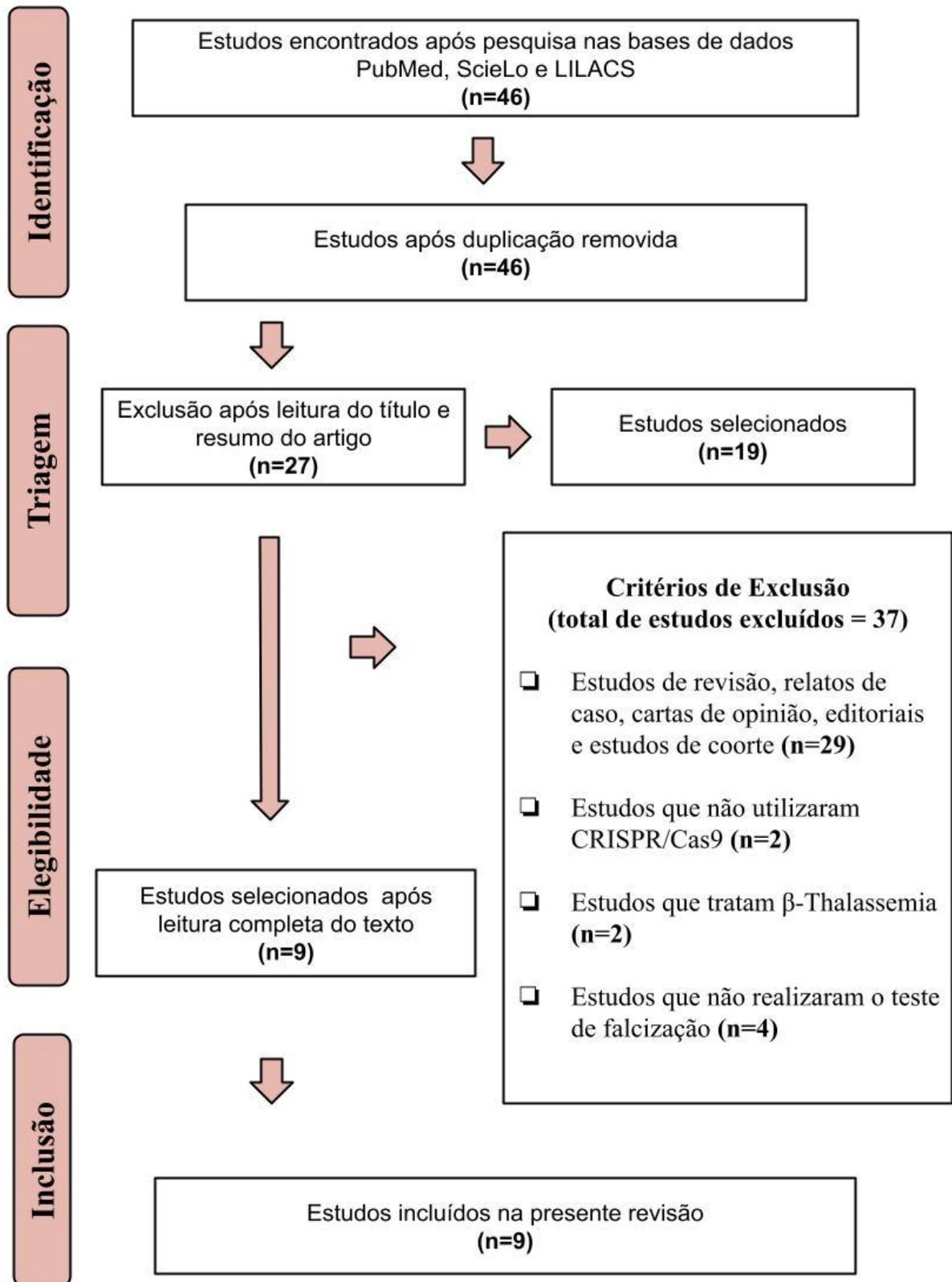
Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão consistem em ensaios clínicos dos últimos 10 anos, sejam eles *in vitro*, em humanos ou em animais, sem restrições de população ou amostra-alvo, devido ao estágio ainda inicial da intervenção terapêutica. Após a identificação dos estudos por estratégia de busca, a seleção foi feita pela leitura do título, do resumo e do *abstract* do artigo. Os estudos selecionados passaram por um processo de triagem após a leitura completa do texto para avaliação da elegibilidade, considerando os critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos.

Critérios de Exclusão

Para uma melhor confiabilidade dos resultados, foram excluídos artigos de revisão da literatura, relatos de caso, editoriais, cartas de opinião e estudos de coorte. Estudos que testaram a eficácia da intervenção em pacientes com β -Thalassemia ou utilizaram ferramentas de edição genética diferentes de CRISPR/Cas9, como nucleases dedo de zinco (ZFNs), nucleases efetoras do tipo ativadoras de transcrição (TALENs) ou editores de base também foram excluídos. É crucial avaliar se os níveis de hemoglobina fetal atingidos na intervenção são suficientes para inibir a causa patofisiológica da anemia falciforme. Portanto, estudos que não realizaram o teste de falcização após a abordagem terapêutica não integraram a síntese qualitativa. A aplicação dos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos resultou em nove estudos elegíveis (**Figura 1**).

Figura 1. Fluxograma do processo de seleção dos estudos. O diagrama de fluxo demonstra as etapas de busca e a aplicação de critérios de elegibilidade para a seleção dos artigos.



Discussão

Para a apresentação dos resultados obtidos neste estudo, foi desenvolvida uma tabela descritiva contemplando os seguintes tópicos: autores e ano do estudo, método, vetor utilizado, intervenção, resultados obtidos, segurança e conclusão (**Tabela 1**).

Tabela 1. Estudos selecionados e contemplados na presente revisão. A tabela demonstra as informações mais relevantes de cada ensaio clínico desenvolvido.

Autores, ano	Método	Vetor	Intervenção	Resultados	Segurança	Conclusão
Franguol H et al (2021)	Ensaio clínico em humanos (1 paciente)	Viral	Supressão da região eritroide-específica do gene BCL11A	Níveis Basais: HbF: 9,1% HbS: 74,1% Após 15 meses: HbF: 43,2% HbS: 52,3%	Efeitos adversos graves: sepse, coletitíase e dor abdominal	Apesar dos riscos, a supressão do gene BCL11A alivia os sintomas da anemia falciforme
Traxler EA et al (2016)	Ensaio clínico in vitro	Viral	Repressão do promotor dos genes HBG1 e HBG2	Células F: ↑ de 65% para 90% HbS: ↓ de 25% para 4%	A intervenção nos genes HBG1/2 não afetou a eritropoiese	A repressão dos promotores HBG1/2 diminuiu os níveis de HbS
Weber L et al (2020)	Ensaio clínico em animais	Plasmídeo	Gerar inserções e deleções (INDELs) nos genes HBG1/2	69% das células editadas mantiveram o formato bicôncavo sob hipóxia	A intervenção não afetou a maturação dos eritrócitos	INDELs nos promotores dos genes HBG1/2 inibem a falcização dos eritrócitos
Métais J et al (2017)	Ensaio clínico em animais	Viral	Gerar INDELs em promotores dos genes HBG1/2	Falcização sob hipóxia Controle: 32% Células editadas: 13,5%	Não foi detectado <i>off-target</i> ou danos nas células hematopoiéticas	Editar promotores dos genes HBG1/2 inibe a falcização dos eritrócitos

Wu Y et al (2019)	Ensaio clínico em animais	Plasmídeo	Supressão da região eritróide-específica do gene BCL11A	Níveis de HbF: ↑ 13,9% para 47,5% Células editadas foram resistentes à falcização	Não foi detectado <i>off-target</i> ou genotoxicidade	Reprimir o gene BCL11A aumenta os níveis de HbF e diminui a falcização
Qin K et al (2022)	Ensaio clínico <i>in vitro</i>	Viral	Supressão dos genes NFIA e NFIX	Expressão de HbF: ↑ 2% para 38% A edição reduziu em 70% a falcização dos eritrócitos	A supressão dos genes NFIA e NFIX não afetou a hematopoiese	Suprimir os genes NFIA e NFIX inibe a falcização dos eritrócitos
Antoniani C et al (2018)	Ensaio clínico <i>in vitro</i>	Plasmídeo	Clivagem da região 13.6kb do gene da β -globina	Amostra controle: HbS → 65% Amostra editada: HbS → 30%	A clivagem não afetou a diferenciação eritróide	A inserção da mutação da PHHF ameniza o fenótipo da anemia falciforme
Grevet JD et al (2018)	Ensaio clínico <i>in vitro</i>	Plasmídeo	Depleção dos genes HRI e LRF	Expressão de HbF: Gene LRF: 43,4% de Gene HRI: 24,0% de Controle: 3,2% de (P < 0.01)	A edição não afetou a maturação dos eritrócitos	A depleção dos genes HRI e LRF aumenta os níveis de HbF
Wakabayashi A et al (2022)	Ensaio clínico em animais	Viral	Depleção do gene RBM12	Os níveis atingidos de HbF reduziram em \cong 50% a falcização dos eritrócitos	A edição não afetou a maturação dos eritrócitos	A depleção do gene RBM12 reduz a falcização dos eritrócitos

Discussão

CRISPR/Cas9 Possibilita a Síntese Terapêutica da HbF

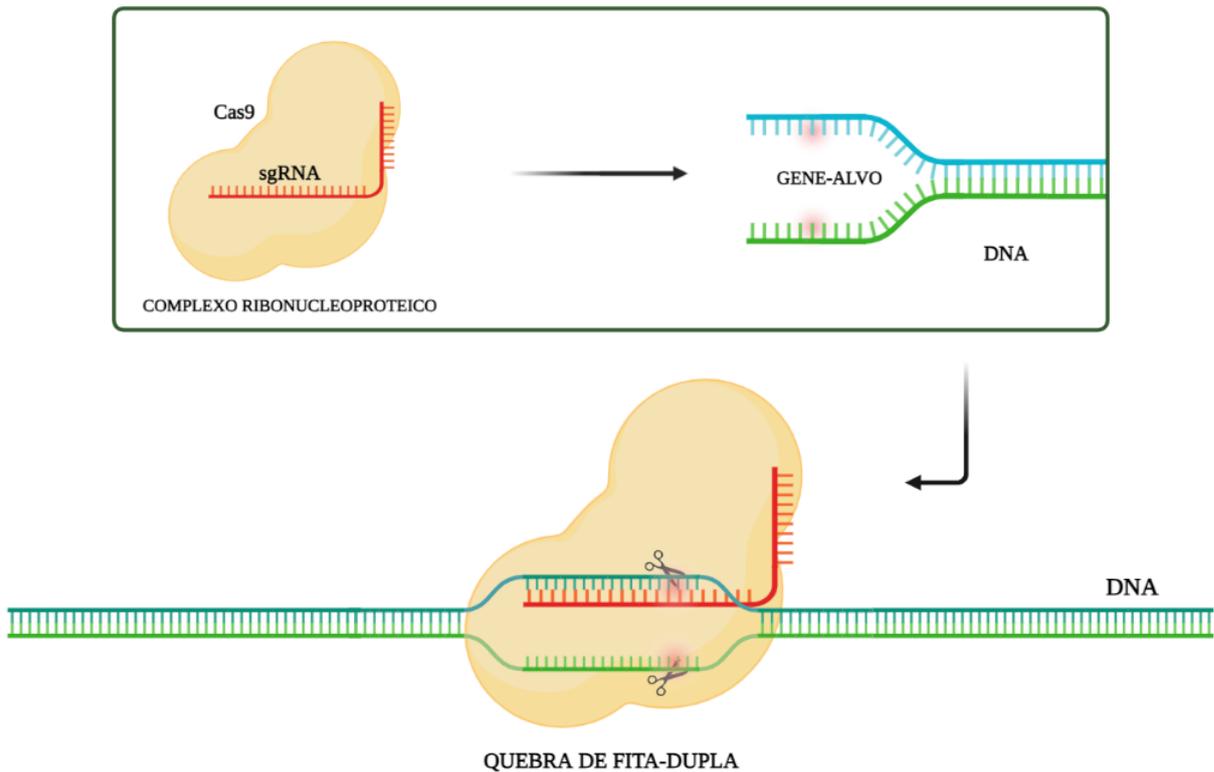
A anemia falciforme é uma doença genética homocigótica causada por uma mutação no gene da β -globina. A codificação do gene mutado resulta na hemoglobina S, que polimeriza em condições de desoxigenação, conferindo aos eritrócitos uma característica rígida, frágil e

distorcida. A polimerização da HbS pode resultar em dolorosas crises vaso-oclusivas, obstruções do fluxo sanguíneo, anemia, icterícia, infecções oportunistas e complicações nos órgãos. O tratamento da anemia falciforme se limita à utilização de medicamentos paliativos e transfusões sanguíneas. Embora o transplante de medula óssea seja uma opção curativa para a doença, sua aplicação é inacessível para a grande maioria dos pacientes^{1,2,4}. A hidroxiureia é um medicamento que age reduzindo a gravidade da anemia falciforme ao estimular a produção de HbF^{1,2}. Entretanto, esse medicamento possui eficácia limitada pela incapacidade de distribuir a HbF de maneira ampla e significativa nos eritrócitos^{1,2,4}.

A hemoglobina fetal possui uma estrutura molecular composta por duas cadeias alfa e duas cadeias gama de globina ($\alpha_2\gamma_2$). Dessa forma, a expressão da HbF depende da síntese da subunidade gama, que é codificada pelos genes HBG1 e HBG2. Após o período fetal, os genes HBG1/2 são reprimidos, resultando na inibição da HbF nos eritrócitos. Entretanto, mutações genéticas podem resultar no fenótipo da Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF), pela continuação da síntese de HbF durante a fase adulta. Recém-nascidos com anemia falciforme ou pacientes falcêmicos que co-herdam PHHF apresentam pouco ou nenhum sintoma devido à capacidade da HbF impedir a polimerização da HbS. Ferramentas de edição genética possibilitam a inserção de mutações semelhantes às presentes na PHHF visando a aumentar os níveis de γ -globina⁷⁻¹¹.

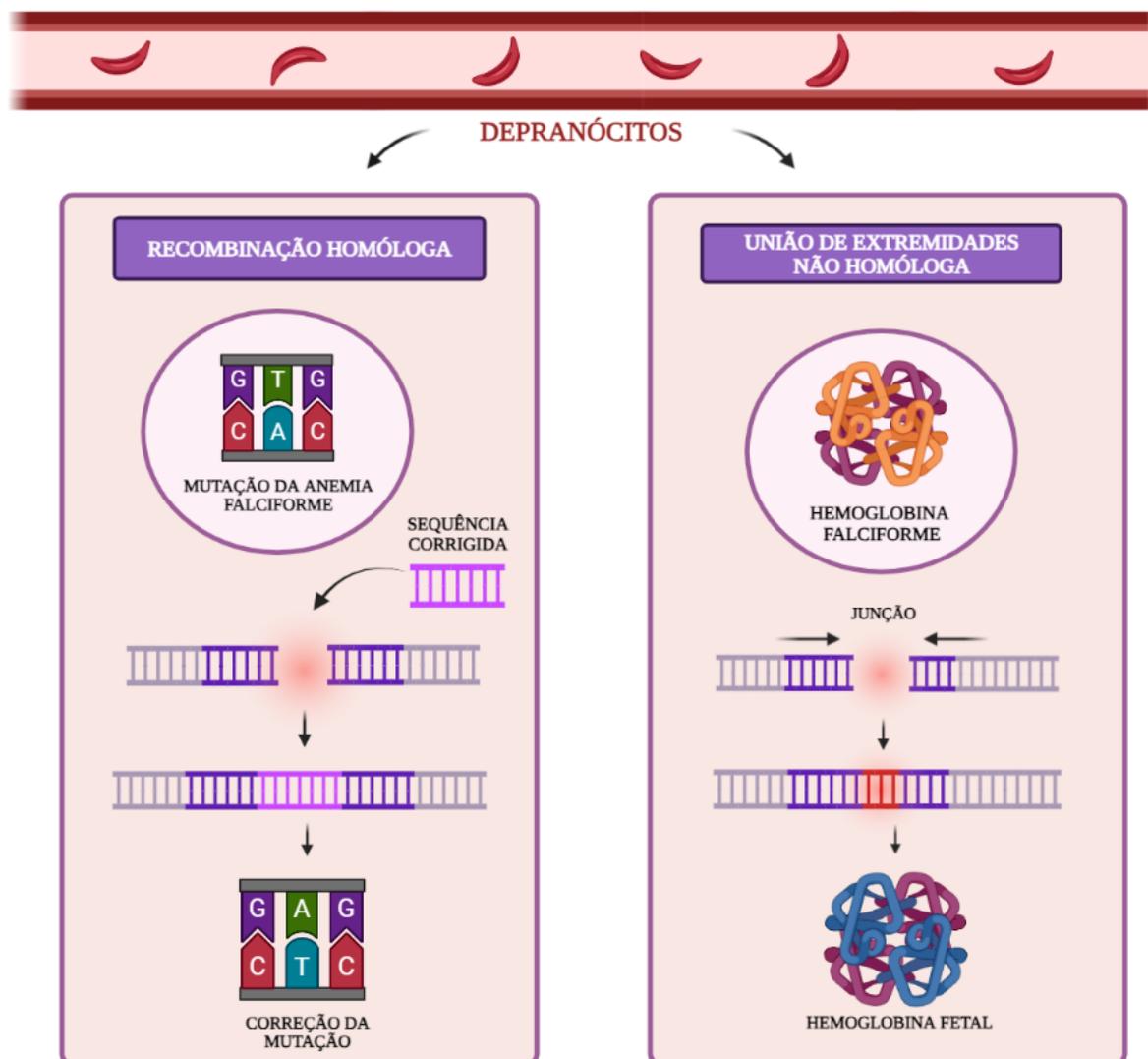
CRISPR/Cas9 é uma ferramenta revolucionária, que edita o genoma de forma mais acessível em comparação com estratégias anteriormente utilizadas. A edição ocorre mediante um complexo ribonucleoproteico composto por uma sgRNA, que serve como guia para a endonuclease Cas9. A complementaridade de bases da sgRNA com o gene-alvo resulta na quebra da fita-dupla do DNA (**Figura 2**). Diversos fatores podem influenciar na eficácia de CRISPR/Cas9, como a estratégia de entrega dos componentes dessa ferramenta nas células-alvo. Além de fatores técnicos, também é fundamental considerar as implicações éticas do uso de CRISPR/Cas9, visando a evitar possíveis efeitos futuros desconhecidos e indesejados. Apesar das variáveis apresentadas, CRISPR/Cas9 é uma ferramenta promissora, que permite o tratamento de doenças genéticas ao desencadear mecanismos de reparo do ciclo celular^{5,13-15}.

Figura 2. Técnica CRISPR/Cas9. O esquema demonstra o complexo ribonucleoproteico sendo guiado para um gene-alvo, resultando na clivagem do DNA.



A recombinação homóloga (*Homology Recombination - HR*) é a via ideal de reparo para a correção de mutações genéticas, visto que possibilita a substituição da sequência mutada por uma corrigida. Entretanto, a HR ocorre com pouca frequência, tornando a sua aplicação mais desafiadora em células com grande capacidade proliferativa. Em contrapartida, o reparo pela união de extremidades não homólogas (*Non-Homology End Joining - NHEJ*) ocorre em todas as fases do ciclo celular e geralmente resulta na inativação do gene. Corrigir a mutação causadora da anemia falciforme é uma abordagem desafiadora em eritroblastos por necessitar do mecanismo por HR, enquanto NHEJ é a via de reparo ideal para controlar genes que regulam a expressão da HbF (**Figura 3**). Além disso, abordagens que resultam em níveis terapêuticos de HbF beneficiariam pacientes afetados por β -hemoglobinopatias de forma geral, não somente aqueles acometidos com a mutação da anemia falciforme^{4,9,15,16}.

Figura 3. Mecanismos HR e NHEJ. O esquema demonstra o modo de ação dos mecanismos de reparo HR e NHEJ em diferentes abordagens terapêuticas da anemia falciforme.



Estudos Demonstram Prova de Conceito

A presente revisão integrativa visa a avaliar a viabilidade da aplicação da HbF no tratamento da anemia falciforme utilizando CRISPR/Cas9. Uma limitação significativa do estudo foi a falta de ensaios clínicos randomizados, dificultando uma avaliação mais fidedigna de potenciais respostas terapêuticas e efeitos adversos. Franguol *et al.* (2021) foi o único estudo de intervenção em seres humanos, embora não seja randomizado. Outra barreira importante foi a impossibilidade de avaliar a eficácia de abordagens utilizadas em estudos que tinham como objetivo tratar a β -Talassemia. Além disso, a eficácia de pesquisas que utilizaram ferramentas de edição genética diferentes de CRISPR/Cas9 não foi avaliada⁴.

Estudos de associação ampla do genoma (GWAS) demonstram que o gene linfoma de células B/leucemia 11A (BCL11A) codifica o principal fator transcricional responsável por impedir a expressão da γ -globina após o período fetal, resultando na troca da HbF pela HbA. Abordagens que regulam o gene BCL11A possibilitam a interrupção da sua ação repressora, permitindo a codificação da γ -globina. Embora o fator BCL11A tenha diversas funcionalidades relevantes, editar regiões que atuam especificamente em eritrócitos não demonstra causar danos em outros processos fisiológicos^{4,7,8,12,17-20}.

Wu Y *et al.* realizaram a supressão da região eritroide-específica do gene BCL11A para impedir sua ação repressora em glóbulos vermelhos. A edição resultou na síntese de eritrócitos resistentes à falcização devido ao aumento da expressão de HbF. Franguol *et al.* testaram essa mesma abordagem em um paciente com anemia falciforme, realizando a infusão de células-tronco hematopoiéticas CD34+ editadas. No *follow up* de 15 meses, os níveis basais de HbF aumentaram, reduzindo a concentração de HbS nos eritrócitos. Esses fatores normalizaram índices de hemólise, além de resultarem na interrupção de crises vaso-oclusivas e da necessidade de transfusões sanguíneas durante todo o tratamento. Efeitos adversos graves foram detectados, embora tenham sido todos controlados com medicamentos^{4,22}.

Métais *et al.* (2017), Traxler *et al.* (2016) e Weber *et al.* (2020) demonstraram que INDELS, na região promotora de genes HBG1/2, impedem a ação repressora do fator BCL11A no sítio de ligação. A intervenção de todos os estudos resultou no aumento dos níveis de γ -globina e inibiu significativamente a falcização dos eritrócitos, sem causar danos na hematopoiese. Já Qin *et al.* (2022) demonstraram que os genes NFIX e NFIA codificam fatores transcricionais responsáveis por reprimir os genes HBG1/2. Portanto, a intervenção se caracterizou pela clivagem dos genes NFIX e NFIA, resultando em níveis terapêuticos de γ -globina e na diminuição de células falciformes^{8,12,22}.

Uma outra abordagem promissora para alcançar níveis terapêuticos de HbF é mimetizando mutações que ocorrem naturalmente na PHHF. Antoniani *et al.* (2018) demonstraram que realizar uma deleção presente em algumas variantes da PHHF atenua o fenótipo da anemia falciforme, aumentando os níveis de HbF e reduzindo os níveis de HbS^{11,12,13,24}.

Grevet *et al.* (2018) demonstraram que a depleção do gene HRI inibe a fosforilação do fator de iniciação eIF2 α , que atua impedindo a codificação da γ -globina. Além disso, o estudo também realizou a depleção do gene LRF (ZBTB7A), repressor da HbF. As intervenções resultaram no aumento dos níveis de HbF e na inibição da falcização. Em seguida, Wakabayashi *et al.* (2022) exploraram uma via inovadora ao identificar o fator transcricional RBM12 como

um regulador negativo da codificação da HbF. A intervenção resultou na expressão da HbF e inibiu a formação de drepanócitos^{25,26}.

Outro fator crucial para a intervenção é o mecanismo de entrega utilizado. Os métodos de entrega *ex vivo* requerem maior infraestrutura laboratorial e técnicas de cultura celular avançadas. Portanto, o método *in vivo* pode oferecer uma aplicação menos desafiadora e economicamente viável. Embora vetores virais sejam eficazes e frequentemente utilizados, é importante considerar os maiores riscos de genotoxicidade e reações imunológicas que essa abordagem oferece. Os estudos de Weber *et al.* (2020), Wu *et al.* (2019), Grevet *et al.* (2018) e Antoniani *et al.* (2018) demonstraram eficiência e segurança na edição das células-alvo utilizando vetores não virais, como plasmídeos^{12,21,24,25,27,28}.

Portanto, os estudos demonstraram que diversos genes regulatórios podem ser alvos de edição. A utilização da técnica CRISPR/Cas9 desencadeou a síntese terapêutica de hemoglobina fetal de forma precisa e segura, inibindo significativamente a fisiopatologia da anemia falciforme e conseqüentemente reduzindo os sintomas clínicos da doença^{4,8,12,21 - 26}.

Conclusões

A edição eritroide-específica do gene BCL11A e dos promotores dos genes HBG1/2, utilizando vetores não-virais demonstram ser as abordagens mais promissoras e seguras. Entretanto, existem diversas vias de intervenção a serem exploradas. É importante ressaltar que, além de seguro e eficaz, o método terapêutico desenvolvido precisa ser financeiramente acessível e de fácil aplicação para que sua implementação seja viável em regiões onde a anemia falciforme é incidente. O desenvolvimento de novos estudos clínicos, principalmente, em humanos permitirá o aprimoramento das intervenções e demonstrará de forma mais fidedigna a viabilidade do tratamento. Esses estudos podem fornecer dados científicos sólidos para a seleção da abordagem terapêutica mais apropriada para a anemia falciforme.

Referências

1. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease [Internet]. N Engl J Med. 2017 [cited 2023 Mar 03]; 376(16):1561–73. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1510865>
2. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease [Internet]. Nat Rev Dis Primers. 2018 Mar 15 [cited 2023 Mar 03]; 4(1): 1–22. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>
3. da Fonseca SF, Amorim T, Purificação A, Gonçalves M, Boa-Sorte N. Hemoglobin A2 values in sickle cell disease patients quantified by high performance liquid

- chromatography and the influence of alpha thalassemia [Internet]. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2015 Sep [cited 2023 Mar 03] 1; 37(5): 296–301. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.05.005>
4. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia [Internet]. *N Engl J Med*; 2021 [cited 2023 Mar 05];384(3):252–60. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
 5. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems [Internet]. *Science*. 2013 Feb 15 [cited 2023 Jun 03];339(6121):819–23. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
 6. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [Internet]. New York, N.Y. *Science*; 2012 [cited 2023 Mar 05]; 337(6096): 816–21. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
 7. Liu N, Hargreaves VV, Zhu Q, Kurland JV, Hong J, Kim W, et al. Direct Promoter Repression by BCL11A Controls the Fetal to Adult Hemoglobin Switch [Internet]. *Cell*. 2018 Apr [cited 2023 Jun 03]; 173(2): 430–442. e17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.016>
 8. Traxler EA, Yao Y, Wang YD, Woodard KJ, Kurita R, Nakamura Y, et al. A genome-editing strategy to treat β -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition [Internet]. *Nat Med*. 2016 Sep [cited 2023 Jun 03]; 22(9): 987–90. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm.4170>
 9. Ye L, Wang J, Tan Y, Beyer AI, Xie F, Muench MO, et al. Genome editing using CRISPR-Cas9 to create the HPFH genotype in HSPCs: An approach for treating sickle cell disease and β -thalassemia [Internet]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Sep 20 [cited 2023 Jun 03];113(38):10661–5. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1612075113>
 10. Martyn GE, Wienert B, Kurita R, Nakamura Y, Quinlan KGR, Crossley M. A natural regulatory mutation in the proximal promoter elevates fetal globin expression by creating a de novo GATA1 site [Internet]. *Blood*. 2019 Feb 21 [cited 2023 Jun 03]; 133(8): 852–6. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-863951>
 11. Doerfler PA, Feng R, Li Y, Palmer LE, Porter SN, Bell HW, et al. Activation of γ -globin gene expression by GATA1 and NF-Y in hereditary persistence of fetal hemoglobin [Internet]. *Nat Genet*. 2021 Aug [cited 2023 Jun 03]; 53(8): 1177–86. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00904-0>
 12. Weber L, Frati G, Felix T, Hardouin G, Casini A, Wollenschlaeger C, et al. Editing a γ -globin repressor binding site restores fetal hemoglobin synthesis and corrects the sickle cell disease phenotype [Internet]. *Sci Adv*. 2020 Feb 12 [cited 2023 Jun 03]; 6(7): eaay9392. Available from: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay9392>
 13. Li L, Song L, Liu X, Yang X, Li X, He T, et al. Artificial Virus Delivers CRISPR-Cas9 System for Genome Editing of Cells in Mice. *ACS Nano* [Internet]. 2017 Jan 24 [cited 2023 Jun 03]; 11(1):95–111. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b04261>
 14. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease [Internet]. *Nature*. 2014 Sep 25 [cited 2023 Jun 03]; 513(7519): 569–73. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature13579>

15. Hoban MD, Cost GJ, Mendel MC, Romero Z, Kaufman ML, Joglekar AV, et al. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells [Internet]. *Blood*. 2015 Apr 23 [cited 2023 Jun 03]; 125(17): 2597–604. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-615948>
16. Chang HHY, Watanabe G, Gerodimos CA, Ochi T, Blundell TL, Jackson SP, et al. Different DNA End Configurations Dictate Which NHEJ Components Are Most Important for Joining Efficiency [Internet]. *J Biol Chem*. 2016 Nov 18 [cited 2023 Jun 03]; 291(47): 24377–89. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.752329>
17. Molecular analysis of the erythroid phenotype of a patient with BCL11A haploinsufficiency [Internet]. *Blood Advances*. 2021 May [cited 2023 Jun 03] 11; 5(9): 2339–49. Available from: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003753>
18. Demirci S, Zeng J, Wu Y, Uchida N, Shen AH, Pellin D, et al. BCL11A enhancer-edited hematopoietic stem cells persist in rhesus monkeys without toxicity [Internet]. *J Clin Invest*. [cited 2023 Jun 03]; 130(12): 6677–87. Available from: [10.1172/JCI140189](https://doi.org/10.1172/JCI140189)
19. Esrick EB, Lehmann LE, Biffi A, Achebe M, Brendel C, Ciuculescu MF, et al. Post-Transcriptional Genetic Silencing of BCL11A to Treat Sickle Cell Disease [Internet]. *N Engl J Med*. 2021 Jan 21 [cited 2023 Jun 03]; 384(3): 205–15. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2029392>
20. Canver MC, Smith EC, Sher F, Pinello L, Sanjana NE, Shalem O, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis [Internet]. *Nature*. 2015 Nov 12 [cited 2023 Jun 03]; 527(7577):192–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature15521>
21. Wu Y, Zeng J, Roscoe BP, Liu P, Yao Q, Lazzarotto CR, et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells [Internet]. *Nat Med*. 2019 May [cited 2023 Jun 05]; 25(5): 776–83. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0401-y>
22. Métais JY, Doerfler PA, Mayuranathan T, Bauer DE, Fowler SC, Hsieh MM, et al. Genome editing of HBG1 and HBG2 to induce fetal hemoglobin [Internet]. *Blood Adv*. 2019 Nov 12 [cited 2023 Jun 05]; 3(21):3379–3392. Available from: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000820>
23. Qin K, Huang P, Feng R, Keller CA, Peslak SA, Khandros E, et al. Dual function NFI factors control fetal hemoglobin silencing in adult erythroid cells [Internet]. *Nat Genet*. 2022 Jun [cited 2023 Jun 05]; 54(6):874–84. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01076-1>
24. Antoniani C, Meneghini V, Lattanzi A, Felix T, Romano O, Magrin E, et al. Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus [Internet]. *Blood*. 2018 Apr 26 [cited 2023 Jun 05]; 131(17):1960–73. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-811505>
25. Grevet JD, Lan X, Hamagami N, Edwards CR, Sankaranarayanan L, Ji X, et al. Domain-focused CRISPR screen identifies HRI as a fetal hemoglobin regulator in human erythroid cells [Internet]. *Science*. 2018 Jul 20 [cited 2023 Jun 05]; 361(6399):285–90. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aao0932>
26. Wakabayashi A, Kihui M, Sharma M, Thrasher AJ, Saari MS, Quesnel-Vallières M, et al. Identification and characterization of RBM12 as a novel regulator of fetal

- hemoglobin expression [Internet]. *Blood Advances*. 2022 Nov 28 [cited 2023 Jun 05]; 6(23): 5956–68. Available from: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007904>
27. Brusson M, Chalumeau A, Martinucci P, Romano O, Felix T, Poletti V, et al. Novel lentiviral vectors for gene therapy of sickle cell disease combining gene addition and gene silencing strategies [Internet]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2023 Jun 13 [cited 2023 Jun 05]; 32:229–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.03.012>
28. Cruz LJ, van Dijk T, Vepris O, Li TMWY, Schomann T, Baldazzi F, et al. PLGA-Nanoparticles for Intracellular Delivery of the CRISPR-Complex to Elevate Fetal Globin Expression in Erythroid Cells [Internet]. *Biomaterials*. 2021 Jan 1 [cited 2023 Jun 03]; 268: 120580. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120580>