



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA
MÉDICA

ISIS CAVALCANTE BAPTISTA

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS
CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA DOENÇA
FALCIFORME E OS PADRÕES DE HAPLÓTIPOS DE
ANCESTRALIDADE AFRICANA.

Rio de Janeiro

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

ISIS CAVALCANTE BAPTISTA

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS
CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA DOENÇA
FALCIFORME E OS PADRÕES DE HAPLÓTIPOS DE
ANCESTRALIDADE AFRICANA.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a. Elaine Sobral da Costa
Dr.^a Fabiana Vieira de Mello
Prof. Dr. Marcelo Gerardin Poirot Land

Rio de Janeiro

2024

CIP - Catalogação na Publicação

81e Baptista, Isis Cavalcante
 Estudo da Associação entre os parâmetros clínicos e laboratoriais da doença falciforme e os padrões de haplótipos de ancestralidade africana. / Isis Cavalcante Baptista. -- Rio de Janeiro, 2024. 156 f.

 Orientadora: Elaine Sobral da Costa.
 Coorientadora: Fabiana Vieira de Mello.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Clínica Médica, 2024.

 1. Doença Falciforme. 2. Anemia Falciforme. 3. Haplótipo. 4. Alelo CAR. 5. Síndrome Torácica Aguda. I. da Costa, Elaine Sobral, orient. II. Mello, Fabiana Vieira de, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Isis Cavalcante Baptista

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA DOENÇA FALCIFORME E OS PADRÕES DE HAPLÓTIPOS DE ANCESTRALIDADE AFRICANA.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em

Prof.^a D^a. Elaine Sobral da Costa

Professora Associada do Departamento de Pediatria
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Presidente da Banca

Prof^a. D^a. Marilda de Souza Gonçalves

Pesquisadora Titular da FIOCRUZ-BA
Professora Titular da Universidade Federal da Bahia
Membro Externo

Prof^a. Dr^a. Monique Morgado Loureiro

Professora Associada da Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Membro Externo

Dr^a. Liliane Rosa Alves Manaças

Chefe da Farmácia Hospitalar do Hospital do Câncer II – INCA
Pesquisadora Colaboradora do Núcleo de Investigação em Saúde da Criança e do Adolescente do IPPMG/UFRJ.
Membro Externo

Prof. Dr. Clemax Couto Sant'Anna

Professor Titular do Departamento de Pediatria
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Membro Interno

Dr^a. Cristiane de Sá Ferreira Facio
Hematologista Pediátrica do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Suplente Externo

Prof^a. Dr^a. Irene de Almeida Biasoli
Professora Associada do Departamento de Clínica Médica
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Suplente Interno

Prof. Dr. Marcelo Gerardin Poirot Land
Professor Titular do Departamento de Pediatria
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Orientador

D^a. Fabiana Vieira de Mello
Tecnóloga da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Orientadora

Dedico essa pesquisa a força ancestral
que permitiu a realização deste trabalho. Sankofa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda força divina e ancestral por me conduzir e me manter forte durante esta trajetória.

Aos meus pais. Minha mãe, pelo suporte que permitiu que eu chegasse até aqui. Meu grande herói e querido pai (*in memoriam*), de quem guardo, além de lembranças maravilhosas, um grande amor.

Aos meus orientadores agradeço imensamente, cada um em sua essência fazendo com que eu pudesse dar cada passo adiante seguindo e chegasse até aqui.

À minha orientadora Fabiana, maior defensora da minha capacidade de concluir este trabalho em todos os momentos em que eu não acreditava que seria possível.

À minha orientadora Elaine, por toda sua generosidade em compartilhar seu conhecimento, pela confiança, incentivo e amizade essenciais, não somente para a execução deste trabalho, mas para minha vida profissional e pessoal.

Ao meu orientador Marcelo Land, obrigada pela oportunidade de contar com sua importante contribuição e por seu carinho.

Às pesquisadoras Robéria Pontes e Patrícia Siqueira pela base de colaboração que viabilizou a realização deste estudo.

A toda equipe e amigos do Laboratório Multidisciplinar do IPPMG – UFRJ.

À minha amiga Elen, obrigada por carinho e auxílio nos momentos de maior incerteza.

A todos os profissionais Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira – UFRJ e Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ que em suas funções profissionais contribuíram para este trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram mesmo de forma indireta para a realização deste trabalho. Obrigada por me permitirem aprender e refletir mais sobre saúde com o olhar para a sociedade mais justa que queremos construir.

“Foi justamente o negro africano que ao padecer de uma enfermidade crônica e dolorosa, como a doença falciforme, contribuiu com sua dor, com seu sangue e com sua morte precoce para o conhecimento científico mais importante sobre a bioquímica, físico-química, genética e biologia molecular das proteínas. Apesar de todo o progresso conseguido até o presente, os negros de todo o mundo, em especial, os negros brasileiros, não puderam se beneficiar das conquistas científicas e tecnológicas obtidas com seu próprio sangue”
PAULO NAOUM

RESUMO

BAPTISTA, Isis Cavalcante. **Estudo da Associação entre os parâmetros clínicos e laboratoriais da doença falciforme e os padrões de haplótipos de ancestralidade africana.** Rio de Janeiro, 2024. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A doença falciforme é a hemoglobinopatia hereditária mais prevalente no mundo, causada por uma mutação de ponto no gene codificante da cadeia β da hemoglobina, que resulta na produção da hemoglobina S (HbS). O curso clínico da doença falciforme tem grande variabilidade entre os pacientes e estudos anteriores mostraram uma interação complexa entre fatores genéticos relacionados aos níveis de hemoglobina fetal e a origem africana. A ancestralidade africana pode ser verificada através de padrões de sítios polimórficos do gene da hemoglobina que receberam o nome de haplótipos, de acordo com os grupos étnicos de regiões africanas. Neste trabalho foram identificados quatro padrões de haplótipos africanos clássicos: República Centro-Africana, Benin, Camarões, Senegal e variantes de haplótipos classificados como Atípicos. Este trabalho busca avaliar a ocorrência de manifestações clínicas e laboratoriais da doença falciforme e sua relação com os haplótipos da hemoglobina, com ênfase no haplótipo de ancestralidade africana mais frequente em nossa coorte, o haplótipo CAR. Trata-se de um estudo descritivo e retrospectivo de dados clínicos e laboratoriais extraídos dos prontuários médicos de pacientes com doença falciforme da cidade do Rio de Janeiro. Analisou-se os padrões de haplótipos a partir de amostras de DNA previamente coletadas de 102 pacientes com Doença Falciforme, 83 pacientes HbSS, 14 pacientes HbSC, 3 pacientes HbSD e 2 pacientes HbSB⁺, com mediana de idade de 21 anos. Realizou-se análises estatísticas para comparação das medianas das variáveis quantitativas e das frequências das variáveis categóricas de acordo com o haplótipo. Valores de p igual ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos e para as análises multivariadas foram selecionadas variáveis com p -valor < 0,2. Observou-se maior frequência do haplótipo CAR e presença relevante de haplótipos atípicos, o que resultou na condução do estudo para a investigação do impacto prognóstico do haplótipo CAR, para o qual estudos anteriores verificaram casos de maior gravidade, porém existem dados conflitantes sobre seu impacto prognóstico. Pacientes CAR homocigotos apresentaram mais alterações sugestivas de eventos hemolíticos como aumento dos níveis de bilirrubina, lactato desidrogenase e aspartato amino

transferase. Pacientes com pelo menos um alelo CAR apresentaram níveis mais baixos de hemoglobina fetal, inclusive após o tratamento com hidroxiuréia, e maior número de eventos de síndrome torácica aguda (STA). Destaca-se a associação entre aumento de casos de STA e o sexo masculino e o haplótipo CAR homocigoto, de forma independente da hemoglobina fetal, e o aumento do risco de STA em pacientes CAR homocigotos. Conclui-se que a análise de haplótipo, principalmente em pacientes do sexo masculino, pode contribuir para adoção de medidas preventivas das complicações clínicas e novas estratégias terapêuticas reduzindo a mortalidade da doença falciforme.

Palavras-chave: doença falciforme; anemia falciforme; hemoglobina; haplótipo; alelo CAR

ABSTRACT

BAPTISTA, Isis Cavalcante. **Estudo da Associação entre os parâmetros clínicos e laboratoriais da doença falciforme e os padrões de haplótipos de ancestralidade africana.** Rio de Janeiro, 2024. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Sickle cell disease is the most prevalent hereditary hemoglobinopathy in the world, caused by point mutation in the gene encoding the hemoglobin β chain, which results in the production of hemoglobin S (HbS). The clinical course of sickle cell disease has great variability between patients and previous studies have offered a complex interaction between genetic factors related to fetal hemoglobin levels and African origin. African ancestry can be verified through patterns of polymorphic sites in the hemoglobin gene, which are called haplotypes, according to the ethnic groups of African regions. In this work, four classic African haplotypes patterns were identified: Central African Republic, Benin, Cameroon, Senegal and variant haplotypes were classified as Atypical. The aim of this work to evaluate the occurrence of clinical and laboratory manifestations of sickle cell disease and its relationship with hemoglobin haplotypes, with emphasis on the most frequent haplotype of African ancestry in our cohort, the CAR haplotype. This is a descriptive and retrospective study of clinical and laboratory data extracted from medical records of patients with sickle cell disease from the city of Rio de Janeiro. Analyze haplotype patterns from DNA samples previously collected from 102 patients with Sickle Cell Disease, 83 HbSS patients, 14 HbSC patients, 3 HbSD patients and 2 HbSB+ patients, 67% adults and median 21 years old. Statistical analyzes were performed to compare the medians of the quantitative variables and the frequencies of the categorical variables according to the haplotype. P values equal to or less than 0.05 were considered statistically significant and variables with a p-value < 0.2 were selected for multivariate analyses. A higher frequency of the CAR haplotype and a relevant presence of atypical haplotypes were observed, which was conducted when conducting the study to investigate the prognostic impact of the CAR haplotype, so that previous studies verified cases of greater severity, but there are conflicting data on its prognostic impact. Homozygous CAR patients presented more changes suggestive of hemolytic events such as increased levels of bilirubin, lactate dehydrogenase and aspartate amino transferase. Patients with at least one CAR allele had lower levels of fetal hemoglobin, including after treatment with hydroxyurea, and a greater number of acute chest syndrome

(ACS) events. We emphasize the association between an increase in ACS cases and the male sex and the CAR haplotype, independently of fetal hemoglobin, and the increased risk of ACS in homozygous CAR patients. We conclude that the haplotype analysis, especially in male patients, can contribute to the adoption of preventive measures against clinical complications and new therapeutic strategies to prevent mortality from sickle cell disease.

Keywords: sickle cell disease; sickle cell anemia; hemoglobin; haplotype; CAR allele

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Variação da Síntese de cadeia globínica.....	21
Figura 2 – Distribuição dos haplótipos do gene <i>HBB</i> de acordo com a diáspora africana no mundo.....	32
Figura 3 – Prevalência global da Doença Falciforme.....	33
Figura 4 – Frequência do gene variante da globina β_s no Brasil.....	34
Figura 5 - Incidência de Doença Falciforme no Brasil.....	35
Figura 6 – Alteração da membrana das hemácias e polimerização de HbS.....	37
Figura 7 – Hemólise e Vaso-oclusão em Doenças Falciformes.....	40
Figura 8 – Complicações clínicas da doença falciforme.....	42
Figura 9 – Fisiopatologia da Síndrome Torácica Aguda.	46
Figura 10 – Efeitos da hidroxúria em doença falciforme.....	52
Figura 11 – Representação dos sítios polimórficos do gene <i>HBB</i> da hemoglobina no cromossomo 11.....	71
Figura 12 – Percentual de haplótipos de ancestralidade africana.....	74
Figura 13 – Percentual de amostras de acordo com a presença do haplótipo CAR.....	74
Figura 14 – Percentual de pacientes com doença falciforme e os eventos clínicos de acordo com o haplótipo CAR em homocigotos.....	75
Figura 15 – Percentual de pacientes com doença falciforme que apresentaram os eventos clínicos de acordo com a presença do alelo do haplótipo CAR.	76
Figura 16 – Parâmetros Laboratoriais: Hemoglobina Fetal, Hemácias, Hematócritos e Hemoglobina Total em pacientes com doença falciforme com haplótipo CAR.	81
Figura 17 – Parâmetros Laboratoriais: Volume Globular Médio, Hemoglobina Globular Média, Concentração de Hemoglobina Globular Média e Reticulócitos em pacientes com doença falciforme com haplótipo CAR.....	82
Figura 18 – Parâmetros Laboratoriais: Ferro, Índice de Saturação de Transferrina, Ferritina e Lactato Desidrogenase em pacientes com doença falciforme com haplótipo CAR.....	83
Figura 19 – Parâmetros Laboratoriais: Bilirrubina Total, Bilirrubina Direta e Bilirrubina Indireta em pacientes com doença falciforme com haplótipo CAR.....	84
Figura 20 - Parâmetros Laboratoriais: Alanina Aminotransferase e Aspartato Aminotransferase em pacientes com doença falciforme com haplótipo CAR.....	85
Figura 21 - Níveis de Hemoglobina Fetal de pacientes com doença falciforme antes e após o tratamento com Hidroxúria.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores identificados na infância potencialmente associados a desfechos em crianças e adultos com DF.....	65
Tabela 2 – Regiões, primers e fragmento obtidos em análise de restrição <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) e a 1: Regiões, <i>primers</i> e fragmento obtidos em análise de restrição <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....	70
Tabela 3 – Perfis de restrição nas regiões polimórficas do cluster β -globina dos haplótipos de ancestralidade africana	71
Tabela 4 – Perfil dos pacientes com doença falciforme.....	73
Tabela 5 – Parâmetros Laboratoriais de Pacientes com Doença Falciforme de acordo com o perfil do haplótipo CAR	79
Tabela 6 – Níveis de hemoglobina fetal dos pacientes com doença falciforme de acordo com o perfil do haplótipo CAR antes e após o tratamento com Hidroxiuréia...86	
Tabela 7 – Análise Multivariada – Regressão Logística Binomial	87
Tabela 8 – Análises univariada e multivariada de fatores prognósticos para Síndrome Torácica Aguda em pacientes com Doença Falciforme.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA – dimetilarginina assimétrica

AF – Anemia Falciforme

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

AI – Árabe indiano

Atp – Atípico

AVE – Acidente vascular encefálico isquêmico

BCAM – Molécula de adesão celular basal

BEN – Benin

BENatp – Benin atípico

BD – Bilirrubina direta

BI – Bilirrubina Indireta

BR – Bilirrubina

BT – Bilirrubina total

BVD – Biliverdina

CAM – Camarões

CAMatp – Camarões atípico

CAR - República Centro-Africana

CARatp – República Centro-Africana atípico

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CID – Classificação Internacional de Doenças

CLFL – Capacidade de ligação de ferro latente

CTFL – Capacidade de ligação de ferro total

DAMPs – Padrões moleculares associados ao dano

DF – Doença Falciforme

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Fe – Ferro

FENAFAL – Federação Nacional das Associações de Pessoas com Doença Falciforme

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

Gran – Granulócitos

Hb – Hemoglobina

HbAS – Heterozigose para HbS
HBB – gene que codifica a globina β
HbC – Hemoglobina C
HbD – Hemoglobina D
HbF – Hemoglobina fetal
HbS – Hemoglobina S
HbSS – Homozigose para HbS
HCM – Hemoglobina corpuscular média
HLA – Antígeno leucocitário humano
Hm – Hemácias
HO-1 – Heme oxigenase 1
HSCs – Células tronco hematopoiéticas multipotentes
Ht – Hematócrito
HU – Hidroxiuréia
IC – Intervalo de confiança
ICAM – Molécula de adesão intercelular 1
ISC – Células falciformes irreversíveis
IST – Índice de saturação de transferrina
LCR – Região de controle do *locus*
LDH – Lactato desidrogenase
Leuc – Leucócitos
MO – monóxido de carbono
NO – óxido nítrico
OR – *odds ratio*
PCDT-DF – Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença Falciforme
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PHHF – Persistência hereditária da hemoglobina fetal
PNAIPDF – Política Nacional de Atenção Integral a Pessoas com Doença Falciforme
PS – Fosfatidilserina
PTTN - Programa de Nacional de Triagem Neonatal
Ret – Reticulócitos
RFLP – Análise de restrição de fragmento de polimorfismo
RNA – Ácido ribonucleico
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro

SEN – Senegal

SENatp – Senegal atípico

sPLA2 – Fosfolipase secretora A2

STA – Síndrome Torácica Aguda

TLR4 – Receptor *Toll-like 4*

TNF – Fator de necrose tumoral

VCAM – Proteína de adesão celular vascular 1

VCM – Volume corpuscular médio

VLA4 – Integrina $\alpha 4\beta 1$

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 A eritropoiese humana, as hemoglobinas e o ferro	20
2.2 Doença falciforme e Anemia Falciforme	24
2.3 Hemoglobina fetal e a doença falciforme.....	25
2.4 Origem da mutação β^s e os haplótipos da globina β	29
2.5 Epidemiologia da doença falciforme	32
2.6 Fisiopatologia da anemia falciforme	35
2.7 Tratamento da Doença Falciforme	49
2.8 Questões sociorraciais e políticas de saúde	56
2.9 Fatores prognósticos em Doença Falciforme	62
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS:.....	66
3.1 Hipótese:.....	66
3.2 Objetivo geral:	66
3.3 Objetivos específicos:	66
4. METODOLOGIA	67
4.1. Local e fases do estudo:.....	67
4.2 Questões éticas:.....	67
4.3 Desenho do estudo:	67
4.4 Pacientes, amostras, critérios de inclusão e exclusão:	67
4.4.1 Pacientes:.....	67
4.4.2 Amostras:	68
4.4.3 Critérios de inclusão e exclusão:	68
4.5 Variáveis do estudo:	68
4.6 Determinação dos haplótipos de ancestralidade africana do gene da globina β (<i>HBB</i>).....	69
4.7 Análises Estatísticas:	71
5 RESULTADOS.....	73
5.1 Perfil dos pacientes.....	73
5.2 Perfil geral de haplótipos:.....	73
5.3 Influência do haplótipo CAR sobre os eventos clínicos da doença falciforme.....	74
5.3.1 Avaliação da homozigose do haplótipo CAR sobre os eventos clínicos da doença falciforme:	74
5.3.2 Avaliação da influência da quantidade de alelos CAR (homozigoto – 2 alelos, heterozigoto – 1 alelo ou ausência de CAR) sobre os eventos clínicos da doença falciforme.	75

5.4	Influência do haplótipo CAR sobre os parâmetros laboratoriais em doença falciforme.	77
5.5	Influência do haplótipo CAR sobre o tratamento com Hidroxiuréia.	85
5.6	Análises Multivariadas.	87
5.6.1	Análise multivariada para verificar quais eventos se associaram de forma independente com a presença do haplótipo CAR em pacientes com doença falciforme ou com anemia falciforme	87
5.6.2	Análise multivariada para determinar fatores prognósticos independentes para a ocorrência de Síndrome Torácica Aguda em pacientes com doença falciforme	88
6	DISCUSSÃO	90
7	CONCLUSÕES	99
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	100
9	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE A – ARTIGO	136
	ANEXO A – DADOS DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS: DOENÇA FALCIFORME.	153
	ANEXO B – DADOS DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS: ANEMIA FALCIFORME.	155

1. INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias consistem em doenças resultantes de alterações genéticas que afetam a síntese das cadeias globínicas da molécula de hemoglobina (Hb), proteína tetramérica com 4 cadeias globínicas e 4 Fe-protoporfirinas, de coloração avermelhada, responsável pelo carreamento de oxigênio (Rieger; Schroeder, 2012). A anemia falciforme, a hemoglobinopatia hereditária mais prevalente, é causada por uma mutação de ponto β^s no gene codificante da cadeia β da Hb em homozigose, ao resultar na produção da Hb variante HbS (Modell; Darliso, 2008; Naoum, 2000; Ramalho; Cassola, 1993; Steinberg; Nagel, 2001; Ashey-Koch; Yang; Olney, 2000). A mutação β^s tem origem na África tropical e subtropical, no leste da Arábia Saudita e na Índia e, posteriormente foi introduzida em outras regiões do mundo. Devido à alta prevalência e gravidade da doença, a anemia falciforme representa um problema de saúde pública global que no Brasil atinge a população afrodescendente (Loureiro *et al.*, 2009; Loureiro; Rozenfeld, 2005; Piel, *et al.*, 2013).

Os aspectos clínicos da anemia falciforme são decorrentes do aumento da hemólise e da vaso-oclusão. Porém, embora seja causada por uma mutação de ponto que desencadeia todos os eventos subsequentes, o curso clínico da anemia falciforme tem grande variabilidade entre os pacientes. Além dos fatores socioambientais que impactam a gravidade, estudos sugerem que uma interação complexa entre fatores genéticos e moleculares relacionados aos níveis de hemoglobina fetal e ao perfil dos haplótipos do gene *HBB* de origem africana poderiam influenciar a expressão fenotípica da doença e a resposta ao tratamento. Ao considerar que ainda há controvérsia sobre a relação dos haplótipos de ancestralidade africana e a previsibilidade de complicações clínicas que novos estudos podem fornecer informações prognósticas importantes, este trabalho se propõe a avaliar o impacto prognóstico dos padrões de haplótipos sobre a evolução clínica de pacientes com doença falciforme, com ênfase no haplótipo CAR, devido à sua alta frequência no Rio de Janeiro e a sua associação com quadros mais graves da doença, o que sugere potencial importância para classificação de risco dos pacientes com doença falciforme (De Mello Auricchio *et al.*, 2007; Fleury, 2007).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A eritropoiese humana, as hemoglobinas e o ferro

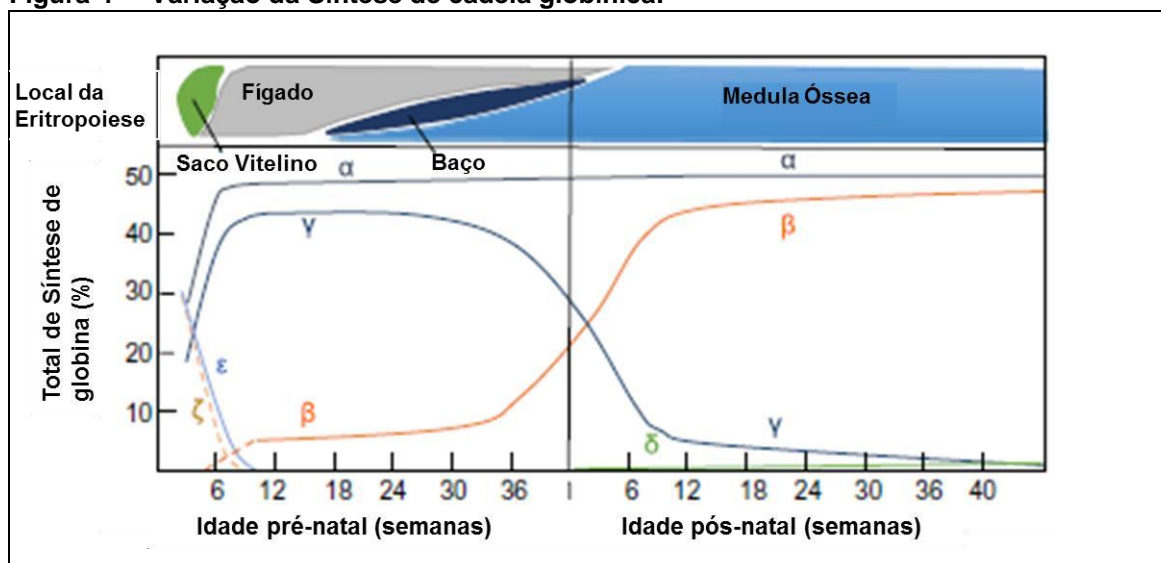
A eritropoiese humana é um processo complexo, onde células tronco hematopoiéticas multipotentes CD34+/CD45+fraco (*HSCs*) se diferenciam em pró-eritroblastos, que são células grandes, com cromatina frouxa e citoplasma escasso. A seguir com a grande produção de mRNA para Hb, o citoplasma se torna um pouco mais abundante e de coloração basofílica, se tornando então eritroblastos basofílicos. Nestas etapas iniciais de maturação, as células do setor eritróide expressam CD36, CD71 (receptor de transferrina), CD105 e CD117, com perda progressiva do CD45. Nas etapas seguintes de maturação, as células do setor eritróide acumulam gradualmente a Hb, e a coloração avermelhada se mistura progressivamente à coloração azul que havia no citoplasma, que por sua vez vai diminuindo devido à degradação de mRNA. Nesta etapa, as células se chamam eritroblastos policromatófilicos, que não expressam mais CD117 e CD105 e aumentam a expressão de CD36 e CD71 e ganham glicoforina A (CD239) e CD235. Posteriormente passam por diminuição progressiva do tamanho, condensação do núcleo, citoplasma já vermelho devido a altas concentrações de hemoglobina (eritroblasto ortocromático). A seguir há perda do núcleo e das mitocôndrias, formando-se o reticulócito (nome cunhado devido à presença de mRNA que com a coloração azul cresil brilhante forma um aspecto de redes) (Mello, *et al.*, 2019). A fase final do desenvolvimento eritróide envolve a maturação dos reticulócitos em eritrócitos/hemácias, estágio em que a célula adquire seu formato bicôncavo, aumentando a superfície de troca gasosa (Gifford *et al.*, 2006; Granick; Levere, 1964; Rieger; Sachroeder, 2012).

A hemoglobina é uma proteína importante do setor eritroide com a função de ligar-se, transportar e distribuir oxigênio (O_2) aos tecidos. Esta proteína é globular, tetramérica, formada por dois pares idênticos de cadeias globínicas, cada uma delas com um núcleo prostético de ferro, a ferro-protoporfirina IX (heme) que tem a capacidade de se ligar ao oxigênio (Bain, 2006; Neto, Pitombeira, 2003). Existem diferentes hemoglobinas que apresentam um par de cadeias dotipo alfa (α) ou zeta (ζ) e o outro par, que podem ser beta (β), delta (δ), gama (γ) ou épsilon (ϵ). As diferentes cadeias globínicas são sintetizadas em diferentes estágios da

vida, e por isto há diferença no tipo de Hb presente nos eritrócitos durante os períodos embrionário, fetal e adulto, de acordo com os locais onde a eritropoese ocorre (Dzierzak; Philipsen, 2013; Jones *et al.*, 1981).

No período embrionário, no saco vitelino, a Hb Gower I ($\zeta\epsilon$) predomina nas quatro primeiras semanas de gestação. A Hb Gower II ($\zeta\gamma$) e Hb Portland ($\alpha\zeta$) estão presentes até a 12^a semana da gestação. No período fetal, a eritropoese é realizada no fígado, e a hemoglobina mais abundante é a hemoglobina fetal (HbF) ($\alpha_2\gamma_2$) que predomina até o sexto mês após o nascimento. A partir da 25^a semana de gestação, se inicia a síntese da HbA2 ($\alpha_2\delta_2$). A HbA ($\alpha_2\beta_2$) é sintetizada a partir da 10^a semana de gestação em níveis baixos e passa a predominar na vida adulta, quando a eritropoese é realizada no baço e na medula óssea (Figura 1) (Bain, 2006; Frenette; Atweh, 2007; Stamatoyannopoulos; Grosveld, 2001).

Figura 1 – Variação da Síntese de cadeia globínica.



Local e tipo de síntese da cadeia globínicas nos períodos pré-natal e pós-natal. Fonte: Adaptado de Jones, *et al.*, 1981.

A função primária da Hb é transportar O_2 do pulmão para os tecidos, ligando-se e liberando O_2 de forma cooperativa. Mecanismos de regulação da afinidade de Hb por O_2 afetam a reação básica e reversível de O_2 com átomos de ferro ferroso da Hb para assegurar o carregamento e liberação adequados de O_2 . O aumento da afinidade de Hb por O_2 (Hb- O_2) melhora a captação de O_2 nos pulmões, enquanto a redução dessa afinidade melhora a liberação de O_2 nos tecidos. Assim, o processo ocorre de acordo com o equilíbrio entre os estados clássicos tenso da Hb (T), que possui baixa afinidade por O_2 , e o estado relaxado (R) que possui alta afinidade por O_2 . O equilíbrio entre os

estados T e R é regulado por moléculas endógenas que participam dos eventos de cooperatividade que afetam a transição HbT para HbR. A cooperatividade é um fenômeno geral, no qual moléculas controlam as propriedades de enzimas ou outras proteínas ligando-se a regiões distintas dos sítios ativos, desempenhando uma regulação alostérica. Os reguladores alostéricos que influenciam a afinidade de Hb-O₂ durante as trocas gasosas são 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BGP), íons hidrogênio (H⁺), dióxido de carbono (CO₂) e cloreto (Cl⁻) (Ahmed; Ghatge, Safo, 2020).

O composto 2,3-difosfoglicerato (2,3DPG), formado como um subproduto da glicólise e presente em concentrações relativamente altas nos eritrócitos é um importante regulador alostérico da Hb. Em condições fisiológicas, 2,3DPG liga e estabiliza a Hb do estado T, reduzindo a afinidade Hb-O₂, que libera 25–40% de O₂ para os tecidos, permitindo uma oxigenação eficiente. Nos pulmões, CO₂ relativamente baixo e pH alto favorecem a ligação do O₂ à Hb no sangue capilar alveolar. Enquanto nos tecidos, onde a concentração de CO₂ é alta, há conversão em carbamato e/ou bicarbonato que libera H⁺ que se liga à Hb para promover a liberação de O₂ em um processo denominado efeito Bohr que favorece a oxigenação dos tecidos. A desoxigenação do sangue periférico favorece a ligação do CO₂ pela Hb e seu transporte para o pulmão. A ligação de Cl⁻ dificulta a reação de Hb com os outros ligantes H⁺, CO₂ e 2,3-DPG. A ligação de CO₂ e Cl⁻ é competitiva, de forma que o aumento da concentração de Cl⁻ reduz o efeito de CO₂ na afinidade Hb-O₂. Além disso, o íon Cl⁻ varia com as alterações no pH e HCO₃ à medida que os eritrócitos se deslocam entre os pulmões e os tecidos periféricos, ligando e liberando continuamente H⁺ e 2,3-DPG (Ahmed; Ghatge, Safo, 2020; Mairbäurl; Weber, 2012).

A hemoglobina dos eritrócitos concentra aproximadamente 80% do ferro (Fe) do organismo, sendo o restante armazenado em macrófagos, hepatócitos ou em outros grupos heme e aglomerados de ferro-enxofre. A capacidade de alternar entre os estados de Fe férrico (Fe³⁺) e ferroso (Fe²⁺), é essencial, podendo também resultar em danos celulares, necessitando de regulação rigorosa de seus níveis (Dutt e outros, 2022). No organismo humano ocorre a produção diária de 200 bilhões de hemácias diariamente, sendo necessário quantidades substanciais de hemoglobina (cerca de 6 g) e Fe (cerca de 20 mg). Isso requer um equilíbrio delicado entre o suprimento de ferro para eritropoiese e o processamento de ferro por macrófagos teciduais, hepatócitos e células epiteliais duodenais para manter a homeostase do ferro. Neste processo é fundamental a reciclagem do Fe por macrófagos do baço, medula óssea

e fígado, juntamente com a absorção de Ferro da dieta para atender às necessidades fisiológicas de Fe, além de reservas hepáticas de ferro (Theurl e outros, 2016; Fortuna, 2024).

O Fe absorvido pelos enterócitos duodenais se liga à transferrina plasmática para seu transporte, minimizando a produção de radicais livres em um processo que envolve uma regulação rigorosa da saturação da transferrina para evitar a sobrecarga de ferro. O Fe é captado por células eritroides em desenvolvimento por meio do receptor de transferrina 1 (TFR1) e é liberado dentro dos endossomos, transportado para o citoplasma pelo transportador de metal divalente SLC11A2 (Dutt *et al.*, 2022). Na hemoglobina, o ferro circula dentro do eritrócito durante 120 dias até que a hemácia seja fagocitada pelo sistema reticuloendotelial e o Fe liberado da hemoglobina retorne ao plasma ligado a transferrina para novamente ser transportado à medula óssea (Verrastro; Lorenzi; Wendel-Neto, 2005; Chifman; Laubenbacher; Torti, 2014). Neste processo, macrófagos do baço e da medula óssea e, em menor extensão, células de Kúpffer no fígado, reconhecem modificações bioquímicas na membrana de hemácias senescentes e, após a interação de receptores específicos nos macrófagos com as hemácias, inicia-se o processo de fagocitose, seguido da degradação dos componentes da hemácia. O catabolismo intracelular do heme envolve várias enzimas, como a NADPH-citocromo C redutase, a HO e a biliverdina redutase e terá como produtos o CO, ferro e bilirrubina (Chifman; Laubenbacher; Torti, 2014). A parte proteica da molécula de Hb, a cadeia globínica, terá seus aminoácidos também reciclados e aproveitados na síntese de novas proteínas. O Fe^{2+} pode ser estocado no próprio macrófago na forma de ferritina ou ser exportado por ferroportina para ser oxidado por ceruloplasmina sintetizada no fígado, e o Fe^{3+} ser transportado pela transferrina até a medula óssea, onde será utilizado na hemoglobina de novos eritrócitos (Chung, Wessling-Resnick, 2003; Knutson; Wessling-Resnick, 2003; Sesti-Costa *et al.*, 2023). A exportação de ferro dos macrófagos é regulada por ferroportina-1, cuja atividade é controlada por hepcidina, o principal regulador sistêmico do ferro nos hepatócitos. A hepcidina gerencia o fluxo de ferro, impactando a atividade da ferroportina e, portanto, influenciando a homeostase sistêmica do ferro (Nemeth *et al.*, 2004). Sua síntese no fígado é regulada pelos níveis intracelulares de ferro e pela disponibilidade de oxigênio. O funcionamento adequado desse sistema regulador é crucial para prevenir condições de sobrecarga de ferro (Li *et al.*, 2023). Em condições de sobrecarga de ferro, a saturação da transferrina resulta em aumento do ferro não

ligado à transferrina (NTBI) no soro e o excesso de ferro pode exceder as capacidades de armazenamento e promover estresse oxidativo e toxicidade (Liu *et al.*, 2022; Kontoghiorghes, 2023; Silva; Rangel, 2022; Silva *et al.*, 2022).

O armazenamento de Fe em hepatócitos e macrófagos ocorre como ferritina e, em menor extensão, como hemossiderina em macrófagos esplênicos. Em excesso, o ferro pode gerar radicais livres tóxicos e o Fe é em parte captado por moléculas de ferritina para limitar o estresse oxidativo. Além desse efeito protetor na homeostase do ferro há aumento da ferritina sérica livre em condições de inflamação contínua. Há evidências de que a ferritina atua na modulação da resposta imune através da indução de citocinas anti-inflamatórias (Kernan; Carcillo, 2017). A ferritina em si é uma proteína globular que armazena Fe em seu núcleo. É composta de 24 subunidades em proporções variáveis de ferritina de cadeia pesada e leve codificadas pelos genes *FTH* e *FTL*, respectivamente. A proporção *FTH/FTL* é regulada *dinamicamente*, com o *FTH* em maior proporção em situações de inflamação onde citocinas e moléculas de sinalização óxido nítrico (NO), aumentam o conteúdo relativo de *FTH* (Kernan; Carcillo, 2017 (Harrison; Arosio, 1996; Fahmy; Young, 1993; Mikhael *et al.*, 2006). Estudos mostram que a endocitose de hemoglobina por macrófagos desencadeia uma resposta antioxidante que aumenta a expressão de ferritina, o que é clinicamente relevante em situações de hemólise. O heme, reciclado pela enzima heme oxigenase 1 (HMOX1), libera biliverdina, monóxido de carbono e Fe lábil. A ferritina então sequestra o Fe livre, prevenindo a geração de radicais livres mediada pela hemoglobina e macrófagos liberam Fe através da ferroportina para eritropoiese. Assim, a indução de *FTH* por citocina inflamatória para aumentar a ferritina pode ter um efeito protetor significativo para os danos oxidativos mediados por ferro. (Korolnek; Hamza, 2015; Delabya *et al.*, 2005; Schaer *et al.* 2006; Tenhunen; Marver; Schmid, 1968; Leimberg *et al.*, 2008; Donovan, *et al.*, 2005)

2.2 Doença falciforme e Anemia Falciforme

As hemoglobinopatias correspondem a um grupo de doenças genéticas, com padrão de herança autossômica recessiva, resultantes de alterações dos genes que codificam a síntese das cadeias globínicas da hemoglobina (Hb). Essas alterações podem resultar em talassemias, onde há ausência ou redução de uma ou mais cadeias globínicas; persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHFH) em

indivíduos adultos ou variantes estruturais da hemoglobina quando há síntese de cadeia globínica estruturalmente anormal (Whetheall, 2001; Steinberg *et al.*, 1997).

A doença falciforme é a hemoglobinopatia hereditária mais prevalente. É causada pela mutação de um nucleotídeo no gene *HBB*, que codifica a cadeia β da hemoglobina, com a substituição da base nitrogenada adenina (A) por timina (T) no códon 6 ($GAG \rightarrow GTG$), o que resulta na inserção do aminoácido valina ao invés de ácido glutâmico na sexta posição da globina β . O gene variante da globina β^S resulta na formação da hemoglobina S variante (HbS) (Modell; Darliso, 2008; Naoum, 2000; Ramalho; Cassorla, 1993; Steinberg; Nagel, 2001).

O gene da HbS pode se combinar com outros tipos de anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD) e beta-talassemia (β^0), resultando em hemoglobinopatias sintomáticas HbSC, HbSD, HbS β^0 . (Ashley-Koch; Yang; Olney, 2000; Clark; Thein, 2004). Assim, doença falciforme corresponde a qualquer genótipo contendo a HbS e a anemia falciforme (AF) ocorre quando os indivíduos herdam um alelo variante β^S de cada um dos pais e possuem homozigose para o alelo β^S (HbSS). A anemia falciforme é a forma mais prevalente da doença falciforme, ao corresponder a 70% dos casos, e também a forma mais grave, com as piores complicações agudas e crônicas da doença falciforme (Rees *et al.*, 2010, Kato *et al.*, 2018). Os indivíduos heterozigotos (HbAS), que possuem somente um dos alelos variantes, chamado traço falciforme, geralmente não apresentam os sintomas característicos da doença, mas podem transmitir o gene aos seus descendentes. (Creary *et al.*, 2007; Schnog *et al.*, 2004). Concentrações maiores de outros tipos de hemoglobina, como HbF nos primeiros meses de vida de indivíduos com anemia falciforme, reduzem as interações entre as hemoglobinas variantes, por isso os sintomas da doença só aparecem quando há o decréscimo dos níveis de HbF após o nascimento (Kauli *et al.*, 1996).

2.3 Hemoglobina fetal e a doença falciforme

A hemoglobina fetal é formada duas subunidades de α -globina e duas subunidades γ ($\alpha_2 \gamma_2$). Há dois genes que codificam cadeia γ , *HBG1* codifica a cadeia do tipo γ^A e *HBG2* codifica a cadeia do tipo γ^G . Estes dois tipos de cadeia que diferem de acordo com o aminoácido alanina ou glicina na posição 136. À medida que o período neonatal se aproxima, começa a troca dos genes *HBG1* e *HBG2* (γ -globina) para o gene *HBB* (β -globina) adulto (Stamatoyannopoulos, 2005). Os níveis de HbF

atingem o pico no meio da gestação e quando um bebê atinge a idade de 6 meses, a HbF representa menos de 1% da hemoglobina total (Piel; Steinberg; Rees, 2017). Dessa forma, adultos continuam a expressar um baixo nível de HbF, que é amplamente concentrado em uma pequena porcentagem de eritrócitos, chamados de células F (Boyer *et al.*, 1975 , Thein, Menzel 2009). Enquanto a proporção de γ^G para γ^A durante o desenvolvimento fetal, é 75% de γ^G e 25% de γ^A , em hemácias adultas a pequena quantidade de HbF é composta de 60% γ^A para 40% de γ^G (Jensen *et al.*, 1982).

Após a troca de globina que ocorre na infância, os níveis de HbF são 6pg/célula em aproximadamente 88% dos indivíduos, mas estudos sugerem que fatores genéticos são responsáveis por 66% da variação dos níveis de HbF na população geral (Garner *et al.*, 2000; Danjou *et al.*, 2015). Os eritrócitos com HbF detectável são chamados de células F. Essas células tem origem de precursores eritroides que podem dar origem a eritrócitos contendo ou não HbF. Porém, as células F não se assemelham aos eritrócitos fetais, exceto pelos níveis de HbF (Khandros *et al.*, 2020)

Em pacientes com doença falciforme o estresse eritropoiético crônico estimula a eritropoiese à produção de células F, resultando no aumento destas células. Porém, em pacientes com doença falciforme os maiores níveis de HbF estão relacionados a maior proporção da cadeia γ^G (Smetanina; Gu; Huisman, 1998). Células F sobrevivem mais que as células que não possuem HbF como resultado da proteção que HbF confere contra os danos induzidos por polímeros de HbS. (Bertles; Milner, 1968; Dover *et al.*, 1978; Horiuchi; Osterhout; Ohene-Frempong, 1995; Franco *et al.*, 2006). Assim, os níveis de HbF em pacientes com AF são mais altos, ao variarem de 3 a 25%, com uma média de cerca de 7%. (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1985; Hoss *et al.*, 2021).

Cada hemácia contém 30pg de hemoglobina. O limiar de detecção aproximadamente é 6pg HbF/células F. Sugere-se que quando HbF/células F é de 9 a 12pg, a polimerização de HbS é evitada proporcionando a proteção quase total contra danos induzidos pelo polímero HbS (Maier-Redelsperger *et al.*, 1994; Horiuchi *et al.*, 1995). Dessa forma, HbF é o principal modulador genético da anemia falciforme e altos níveis de HbF estão associados a um fenótipo de doença com menor gravidade e maior sobrevida (Watson, 1948; Platt *et al.*, 1994; Rees, *et al.*, 2022).

Ao possuir maior afinidade pelo oxigênio, níveis mais elevados de HbF reduzem as concentrações intracelulares de HbS desoxigenada, o que reduz a polimerização, proporcionando um importante efeito protetor contra fenômenos de falcização (Henry

et al., 2021; Steinberg, 2022; Steinberg, Higgs, Weatherall, 2009; Akinsheye *et al.*, 2011). Do ponto de vista clínico, sabe-se que níveis mais altos de HbF estão associados a redução de eventos vaso-oclusivos, dactilite, Síndrome Torácica Aguda, úlceras de perna, osteonecrose e colelitíase (Platt *et al.*, 1991; Platt *et al.*, 1994; Rees *et al.* 2022).

Do ponto de vista laboratorial, a distribuição heterogênea de HbF entre os eritrócitos impacta a interpretação dos níveis de HbF. A vantagem de sobrevivência das hemácias com níveis mais altos de HbF pode aumentar os valores medidos dos níveis de HbF. Além disso, a interpretação dos níveis de HbF pode ser confundida pela seleção de pacientes, uma vez que alguns pacientes com níveis altos de HbF apresentam um curso clínico mais brando e, portanto, serão cada vez mais representados em faixas etárias mais avançadas (Hayes, *et al.*, 1985). Entretanto, em pacientes com doença mais grave e altas taxas de hemólise também pode ocorrer a seleção de células F e níveis totais de HbF estarem mais altos. Desta forma, os níveis de HbF precisam ser interpretados em conjunto com outras informações, como a contagem de reticulócitos e hemoglobina total (Rees *et al.*, 2022). Em geral, níveis elevados de HbF correlacionam-se positivamente com a hemoglobina total e negativamente com o VCM e com a contagem de células falciformes irreversíveis (ISC).

Existe uma condição denominada Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal pancelular (PHHF), onde um gene de PHHF é herdado de um dos pais, os níveis de HbF correspondem a 15–30% e são distribuídos uniformemente em todos os eritrócitos. Neste caso a falcização é diminuída e nos casos de doença falciforme, há um efeito benigno para o curso clínico da doença. Na persistência hereditária da HbF heterocelular, ambos os pais têm o gene para HbS, mas também apresentam um aumento no nível de HbF que em seus descendentes SS pode resultar em níveis mais elevados de HbF e um curso clínico mais leve. Em heterozigotos para HbS e PHHF, onde *HBB* é deletado, a HbF representa aproximadamente 30% da hemoglobina total e é distribuída homogeneamente na população de eritrócitos, com cada célula contendo cerca de 10 pg. Isto é suficiente para que as pessoas com este genótipo tenham níveis de hemoglobina quase normais e sejam na sua maioria assintomáticas. (Ngo *et al.*, 2012; Piel; Steinberg; Rees, 2017; Telen, 2016). A PHHF é mais comum em populações de origem africana e propensa a ser herdada com a HbS, enquanto a persistência heterocelular de HbF caracteriza algumas populações associadas aos

haplótipos asiáticos e homocigotos aos haplótipos do Senegal. (Serjeant, 2017; Franco *et al.*, 2006; Serjeant; Vichinsky, 2018).

O tratamento com Hidroxiuréia (HU) pode induzir o aumento dos níveis de HbF total como ocorre em pacientes com a associação HbS-PHfF. Porém, alguns pacientes podem permanecer sintomáticos com anemia hemolítica mesmo com o uso da HU.

Observou-se pacientes com AF com HbF acima de 8,6% tiveram maior benefício clínico do tratamento com HU, em comparação aos pacientes com níveis mais baixos de HbF (Platt *et al.*, 1994). Simulações posteriores mostraram que poucas células F são protegidas da polimerização quando os níveis de HbF são aproximadamente 5%, e o número de células F protegidas aumenta quando HbF atinge níveis de 10-20%. Porém ainda nestes níveis de HbF os pacientes ainda apresentam anemia hemolítica, pois é possível que apenas 15- 25% das células F tenham níveis de HbF inibidores de polímero. Sugere-se que é necessário 9-12pg de HbF/célula F para inibição da polimerização de HbS. Assim, estudos propõem que a distribuição das concentrações de HbF entre as células F é o elemento mais crítico na fisiopatologia da anemia falciforme, impactando o benefício clínico mesmo quando há aumento nos níveis de HbF ou de células F totais (Steinberg, 2014; Steinberg 2020 Khandros; Blobel, 2021). Dessa forma, os níveis totais de HbF ou de células F não são preditores adequados da gravidade da AF porque não indicam o número de células F que têm níveis de HbF suficientes para proteger contra danos causados por polímeros de HbS. Quando a HbF é aproximadamente 30% a doença pode ser relativamente benigna pois 70% das células podem ser protegidas (Steinberg *et al.*, 2014; Perrine *et al.*, 1978; Perrine *et al.*, 1981).

A compreensão dos processos moleculares normais de troca da globina γ pela globina β tem sido o foco das pesquisas para o desenvolvimento de terapias- alvo específicas. A expressão dos genes da globina é regulada pela interação da região de controle do *locus* (LCR) com os promotores do gene (Tuan *et al.*, 1985). Os fatores de transcrição dos promotores influenciam o recrutamento do LCR para ativar ou silenciar os genes da globina de acordo com as fases específicas do desenvolvimento.

A expressão dos genes de HbF é modulada por três regiões genéticas chamadas *loci* de características quantitativas (QTL), *BCL11A*, *HBS1L-MYB* e *Xmn1-HBF2*. Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nestes QTLs produzem 50% da variação hereditária da fração de células F e dos níveis de HbF em pacientes com

doença falciforme (Menzel *et al.*, 2007; Galarnau *et al.*, 2010); Lettre *et al.*, 2008; Bhatnagar *et al.*, 2011). *Xmn1-HBF2* (rs782144) está localizado no cluster de genes da globina β no cromossomo 11p, e é a principal razão para a variação observada entre os haplótipos da globina β . O polimorfismo intergênico *HBS1L-MYB* (HMIP) no cromossomo 6q23 é representado pela deleção de três pares de bases rs66650371. *BCL11A* no cromossomo 2p16, é um repressor da expressão de HbF que se liga nos promotores *HBG2* e *HBG1* e o SNP sentinela é rs1427407 (Labie *et al.*, 1985; Farrell *et al.*, 2011; Lettre *et al.*, 2008; Rees, Brousse, Brewin, 2022. Liu *et al.*, 2018; Martyn *et al.*, 2018.; Ginete *et al.*, 2024, Sales *et al.*, 2020, Bauer *et al.*, 2013).

2.4 Origem da mutação β^s e os haplótipos da globina β .

Estudos mostram que a mutação β^s teve origem única no centro-oeste da África ou na região do Saara durante a fase úmida do Holoceno entre 3400 e 11.100 anos atrás e há evidências de uma exposição mais antiga às pressões da malária entre populações agrícolas há 22.000 anos atrás. A origem anterior pode ter resultado da destruição da floresta tropical que criou condições favoráveis à malária, o que proporcionou o surgimento do gene que codifica HbS. Na África, existe uma forte correlação geográfica entre a frequência do alelo variante e regiões onde a malária é endêmica (Piel *et al.*, 2010). Os indivíduos heterozigotos possuem maior proteção contra a malária grave enquanto os homozigotos para esta mutação desenvolvem a anemia falciforme (Shriner; Rotimi, 2018; Laval *et al.*, 2019). Posteriormente, o gene da HbS difundiu-se para o norte da África e Mediterrâneo juntamente com as rotas comerciais, e foi introduzido nas Américas e Caribe com a chegada de africanos escravizados, no período do século XV ao XIX, e mais recentemente no norte da Europa pela imigração de caribenhos (Inati *et al.*, 2003; Zago; Figueredo; Ogo, 1992).

Existem polimorfismos a cada 100 pares de base na região flanqueadora do gene *HBB*, que são sítios específicos de clivagem de enzimas endonucleases de restrição. As endonucleases são enzimas capazes de reconhecer e clivar sequências-alvo na fita de DNA, dando origem a fragmentos de tamanhos diferentes. O padrão de combinação dos sítios polimórficos, de acordo com a presença ou ausência dos locais de restrição, recebe o nome de haplótipo (Pagnier *et al.*, 1984).

Acreditava-se na origem multicêntrica dos haplótipos a partir de ocorrências independentes da mutação falciforme. Porém, um estudo mais recente revelou um haplótipo ancestral comum aos haplótipos Bantu ou da República Centro-Africana

(CAR), Camarões (CAM), e a partir destes a origem dos haplótipos Senegal (SEN), Benin (BEN) e Árabe-Indiano (AI), resultando nas cinco designações clássicas de haplótipos, consistentes com os grupos etnolinguísticos ou regiões geográficas de origem dos indivíduos com anemia falciforme. (Chebloune *et al.*, 1988; Lapoumèroulie *et al.*, 1992; Shriner, Rotimi, 2018). CAR é encontrado na África Central (Gabão, República Centro-Africana, Congo, Zaire e Angola); CAM no grupo étnico Eton em Camarões; SEN predominante no litoral atlântico africano (Senegal, Gâmbia, Guiné, Guiné-Bissau, Serra Leoa e Libéria); Benin (BEN), predominante no ocidente centro-africano (Togo, Benin, Burkina Fasso e Nigéria) e Árabe-Indiano (AI), encontrado no território asiático, na Arábia Saudita e em tribos do centro e do sul da Índia (Nagel; Steinberg, 2001, Naoum, 1997; Romero *et al.*, 1998). Outros haplótipos menos comuns são chamados atípicos (Atp) e resultam de mecanismos genéticos como mutações pontuais nos sítios polimórficos, trocas entre dois haplótipos β^S típicos, ou entre um haplótipo β^S típico e um haplótipo β^A diferente presente na população, e conversões gênicas (Zago *et al.*, 2000).

As interações das variantes genéticas específicas que atuam na regulação de HbF entre os haplótipos é complexa e não totalmente compreendida, porém níveis mais altos de HbF caracterizam indivíduos homozigotos para os haplótipos AI e Senegal, (Collins *et al.*, 1984; Akinsheye, 2011; Serjeant; Vichinsky, 2018; Steinberg, 2020).

A primeira variante genética associada ao aumento da HbF na anemia falciforme era um marcador do haplótipo Senegal e portadores deste haplótipo tinham níveis de HbF de cerca de 10%. No haplótipo árabe-indiano a média basal dos níveis de HbF em adultos é 17% (Al-Ali *et al.*, 2020; Steinberg, 2020). Consequentemente, a doença é geralmente mais branda, principalmente na infância, quando os níveis de HbF são cerca de 30% (Alsultan *et al.*, 2014; Perrine, 1981; Perrine *et al.*, 1978). Os altos níveis de HbF nessas pessoas podem estar relacionados a variantes genéticas exclusivas destes respectivos haplótipos (Dean, 2006; Vathipadiekal *et al.*, 2016; Shaikho; Habara; Alsultan *et al.*, 2016; Rees, 2022; Piel, Steinberg, Rees, 2017).

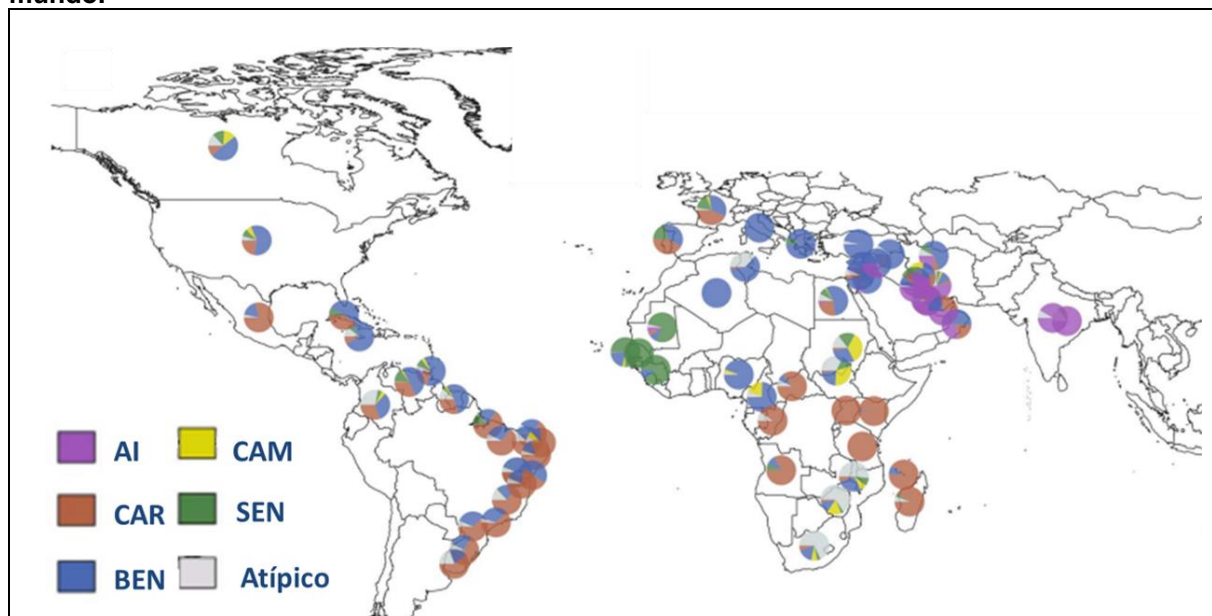
Entre os pacientes com haplótipos do Benin, CAR e Camarões, o nível de HbF difere de acordo com a ascendência africana ou árabe dos indivíduos. Pacientes com haplótipo Benin de ascendência africana têm HbF de aproximadamente 6% enquanto pacientes árabes sauditas com esse mesmo haplótipo têm HbF em torno de 11% (Alsultan A, Solovieff N, Aleem A, *et al.* 2011). Para os haplótipos CAR e Camarões,

os pacientes sauditas tem aproximadamente 8% de HbF em comparação a 5% daqueles de países africanos (Al-Ali AK, Alsulaiman A, Alzahrani AJ, *et al.* 2020). Em uma estimativa da distribuição de HbF/célula F em pacientes com níveis de HbF compatíveis com os haplótipos Benin, CAR, Camarões, Senegal e AI, verificou-se consistência desta relação com a gravidade da doença na maioria dos pacientes (Steinberg *et al.*, 2014). A partir dos estudos que identificaram o papel de *BCL11A* como principal repressor direto de HbF, pode-se compreender como variantes genéticas de moduladores da expressão de HbF estão presentes nos haplótipos africanos, especialmente no haplótipo CAR, geralmente de pior prognóstico (Habara; Elmutaz; Steinberg, 2017; Ware, 2015; Wienert *et al.*, 2018).

De forma geral, pacientes com o haplótipo CAR apresentam os menores níveis de HbF e quadros clínicos mais graves, os haplótipos BEN e CAM estão associados a níveis medianos e cursos clínicos intermediários, e os haplótipos SEN e ARAB apresentam maiores concentrações de HbF e quadros clínicos menos graves (Bortolini; Salzano, 1999; Nagel, 1994; Powars, 1991; Steinberg, 2005; Zago, 1993). Entretanto, apesar de cada haplótipo estar associado a um nível médio distinto de HbF, existe uma dispersão ampla fazendo com que a investigação de haplótipo em indivíduos de tenha pouco valor prognóstico (Steinberg, 2020).

No Brasil, observa-se a presença dos haplótipos típicos da África com uma distribuição territorial compatível com a rota de entrada de africanos escravizados entre os séculos XVI e XIX. Os primeiros escravizados que chegaram ao Brasil vieram do noroeste africano (haplótipo Senegal) e aportaram em São Luís e Recife. Essa rota não durou muito tempo e foi substituída pela rota que saía da Baía de Benin (haplótipo Benin) para o porto de Salvador. Essa segunda rota predominou até a descoberta de ouro em Minas Gerais, quando foi sendo lentamente substituída pela que trazia africanos da região Bantu (haplótipo CAR), originários do Congo, Angola e Moçambique que totalizam 70% dos africanos escravizados no Brasil (Curtin, 1969; Verger, 1987; Ribeiro, 2005). Dessa forma, estudos realizados no Brasil mostram a presença mais frequente do haplótipo CAR, seguido de BEM (Figura 2). Os haplótipos SEN e CAM apresentam frequências menores no Brasil com diferenças entre as regiões de conforme a diáspora africana pela vinda forçada de africanos escravizados mesmo após a abolição da escravatura (Adorno *et al.*, 2008; Cabral, 2010; Costa *et al.*, 1984; Fleury, 2007; Gonçalves *et al.*, 2003; Galiza Neto *et al.*, 2005; Silva; Gonçalves; Rabenhorst, 2009; Zago *et al.*, 1992).

Figura 2 – Distribuição dos haplótipos do gene *HBB* de acordo com a diáspora africana no mundo.

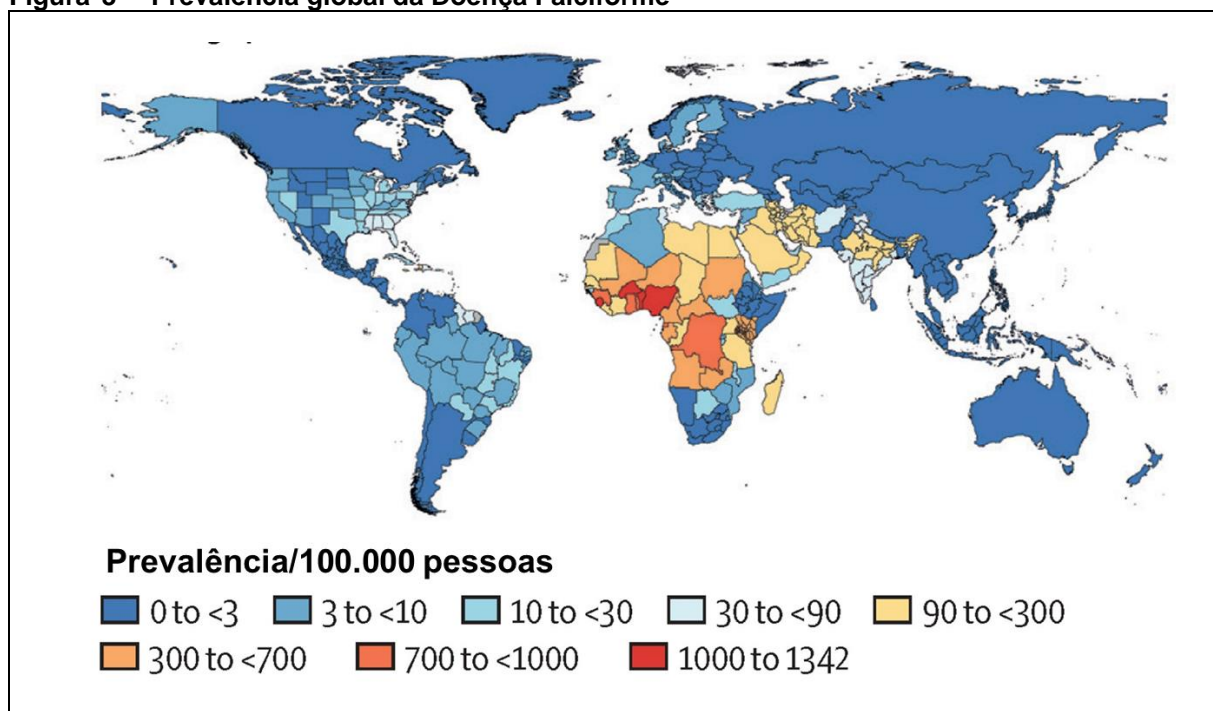


Mapa ilustrando a presença dos haplótipos do gene *HBB* no mundo, apresentando a maior prevalência dos haplótipos CAR e BEN no Brasil. AI: Árabe-Indiano, CAR: República Centro-Africana, BEN: Benin, CAM: Camarões, SEN: Senegal. Fonte: adaptado de Esoh; Wonkam, 2021.

2.5 Epidemiologia da doença falciforme

A doença falciforme é um problema crescente de saúde global com estimativas de mais de 500.000 bebês HbSS e 5,4 milhões de bebês HbAS por ano (Piel *et al.*, 2013, Global Burden of Disease Study, 2023) (Figura 3). Entre 2000 e 2021, estima-se que o número de bebês com doença falciforme aumentou globalmente em 13,7% para 515.000. Neste período o número de pessoas que vivem com anemia falciforme aumentou em 41,4% para 7,74 milhões em 2021. O aumento global de doença falciforme se deve a maior proporção de nascimentos em locais com taxas mais elevadas de doença falciforme e em outros locais por efeitos da migração. Estima-se que a mortalidade global de pacientes com doença falciforme foi 376.000 em 2021, com taxa de mortalidade total por doença falciforme para os mesmos grupos etários de 5,1 mortes por 100 000 habitantes, e maior mortalidade concentrada na África Subsaariana e em crianças com menos de 5 anos, principalmente nos países com altas taxas de mortalidade infantil (GBD 2021 Sickle Cell Disease Collaborators, 2023; Piel *et al.*, 2013). A expectativa de vida de pacientes com anemia falciforme é de 50 anos ou mais em países desenvolvidos. Porém, em países de baixa renda, incluindo muitos países africanos, a anemia falciforme tem alta mortalidade, principalmente em crianças até cinco anos (Weatheall *et al.*, 2006; Gravitz; Pincock, 2014).

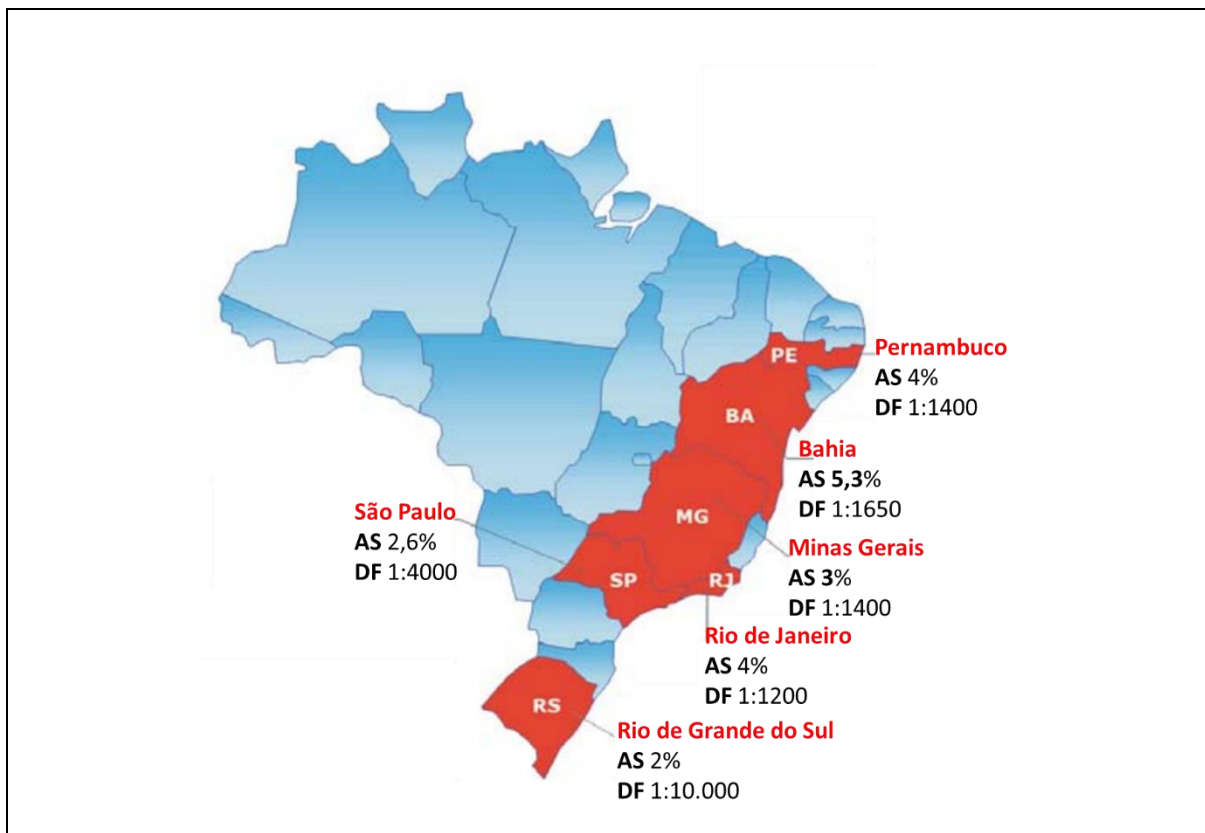
Figura 3 – Prevalência global da Doença Falciforme



Mapa ilustrando a estimativa das taxas de prevalência da Doença Falciforme nos países. As maiores taxas concentram-se em regiões do continente africano e em seguida na América. Fonte: Adaptado de GBD, 2021.

No Brasil, a prevalência do alelo β^S varia de 1,2% a 10,9%, dependendo da região, enquanto a prevalência do alelo β^C entre 0,15%-7,4%. A distribuição do gene variante de HbS é heterogênea inicialmente com maior frequência nas regiões que receberam africanos escravizados, como os estados do nordeste (ciclo das monoculturas), Minas Gerais (ciclo do ouro) e o Rio de Janeiro (Capital do país); e posteriormente naquelas que receberam grandes fluxos migratórios dessas populações (Figura 4) (Cançado; Jesus, 2007; Braga *et al*, 2016, Ministério da Saúde, 2023).

Figura 4 – Frequência do gene variante da globina β^s no Brasil.



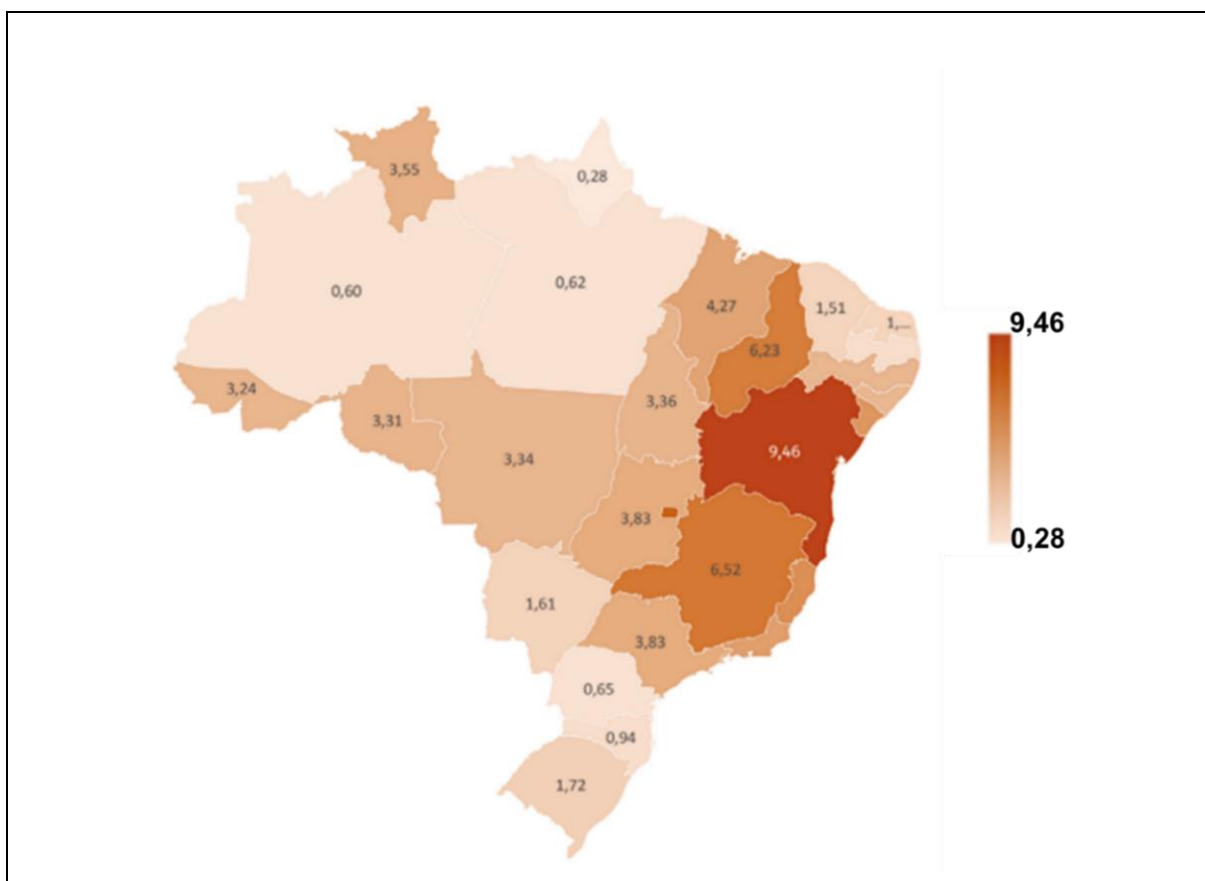
Estimativa da frequência do gene variante de HbS na população dos estados de maior prevalência.
 Fonte: Adaptado de Cançado, R.D; Jesus, J.A., 2007.

Entre os anos de 2014 e 2020, Bahia, Minas Gerais, Piauí e Distrito Federal tornaram-se os estados com maior incidência (Figura 5). Conforme dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal com cobertura média de 82,37%, a incidência de doença falciforme é de um 1/2.500 nascidos vivos (cerca de 1.100 casos/ano) e 2/100 nascidos vivos para o traço falciforme (média de 63 mil casos/ano). Estima-se que há entre 60 mil e 100 mil pessoas com doença falciforme no país, e mesmo com distribuição bastante heterogênea é a doença genética mais comum no Brasil, onde a anemia falciforme corresponde a mais de 60% dos casos e atinge aproximadamente 8% da população negra no Brasil. (Verger, 1987; Ribeiro, 2005; Ministério dos Direitos Humanos e da Cidadania, 2021; Ministério da Saúde, 2023)

A mortalidade geral por doença falciforme no Brasil é de 0,22 a cada 100 mil habitantes/ano, com variações entre os estados e a maior parte dos óbitos na faixa etária de 20 a 29 anos. Dados por região apresentam maior mortalidade na região Sudeste (48,39%), seguida das regiões Nordeste (31,92%), Centro-Oeste (10,3%), Norte (4,96%) e Sul (4,39%), respectivamente. A população masculina apresenta um

quantitativo maior de mortes em relação à população feminina nas regiões Norte (55,9%), Nordeste (51,4%), Sul (51,5%) e Centro-Oeste (51%) (Mota FM, *et al*, 2022, Ministério da Saúde, 2023).

Figura 5 – Incidência de Doença Falciforme no Brasil.



Incidência a cada 10mil nascidos vivos por estado no período de 2014-2020. Fontes: Relatórios Anuais de Dados do Programa Nacional de Triagem neonatal. MS/SVS. /Dasis – Sistemas de informações sobre nascidos vivos (Sinasc). Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2023

2.6 Fisiopatologia da anemia falciforme

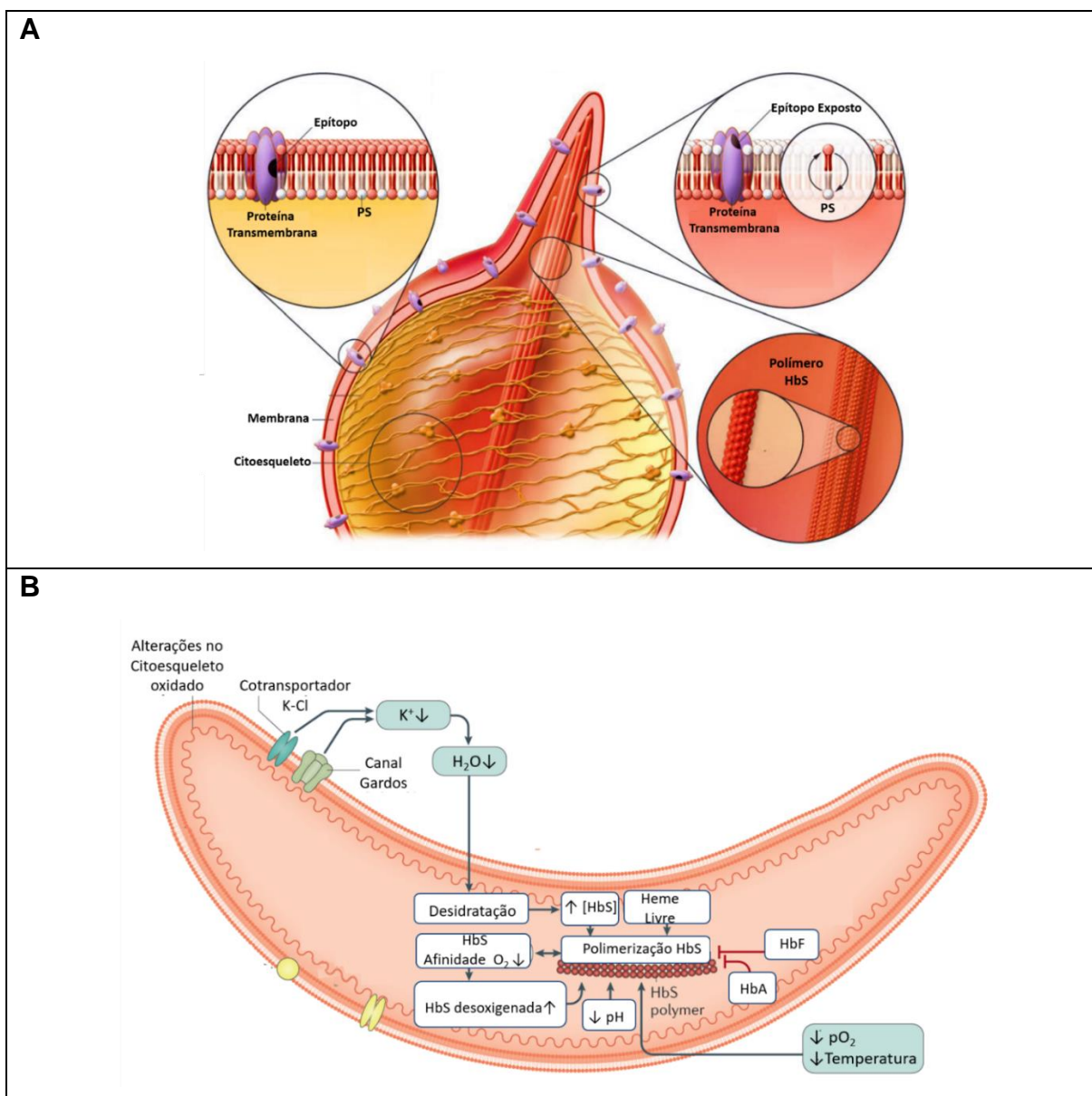
Na anemia falciforme a HbS apresenta alterações físico-químicas responsáveis por desencadear as manifestações clínicas da doença. Em situações de baixa tensão de oxigênio HbS desoxigenada muda sua conformação e uma região hidrofóbica da valina se volta para a parte externa da hemoglobina e interage com os aminoácidos alanina, fenilalanina e leucina de outra molécula de HbS adjacente. A formação de fibras de desoxi-hemoglobinas junto a outras fibras cria um eixo axial (Figura 6A) no interior do eritrócito que alteram o formato da célula para a forma de foice (Figura 6B). HbS tem menor afinidade pelo oxigênio que HbA, o que favorece a sua polimerização, que por sua vez reduz ainda mais sua afinidade pelo oxigênio. Essa baixa afinidade

pelo oxigênio aumenta a fração de HbS desoxigenada, o que promove a formação de eritrócitos falciformes a qualquer pressão parcial de oxigênio (Seakins *et al.*, 1973; Rogers *et al.*, 2013). O polímero de HbS está presente em 70% de saturação de O₂, e a fração de polímero aumenta acentuadamente à medida que a saturação de O₂ cai (Brittenham; Schechter; Noguchi, 1985).

Enquanto as hemácias normais em formato discoide possuem a capacidade de sofrer deformações necessárias para passar por capilares estreitos, a forma em foice assumida pelos eritrócitos desoxigenados com agregados de HbS, provoca a perda da capacidade de deformação, característica fundamental destas células (Stuart; Nagel, 2004; Vekilov, 2007). A formação dos agregados é aumentada pela redução do pH que ativa canais de transporte K⁺Cl⁻, o que causa a perda de íons potássio e água. Repetidos eventos de ativação destes canais causam a desidratação celular e a deformação da membrana resultando na formação de células densas, que são células falciformes irreversíveis (Figura 6B). As células densas menos deformáveis são propensas à hemólise. Além disso, essas células tem a propriedade reológica prejudicada e não conseguem fluir suavemente através dos vasos sanguíneos, o que desencadeia o processo de vaso-oclusão e isquemia tecidual (Hebbel R.P., 2014, Connes, P. *et al.*, 2016). O aumento das taxas de hemólise intravascular e o processo de vaso-oclusão são os principais eventos que dão origem às manifestações clínicas da anemia falciforme (Figura 5C) (Schong *et al.*, 2004; Stuart; Nagel, 2004).

A polimerização da HbS também altera a composição da bicamada lipídica e proteínas da membrana eritrocitária, o que leva a interações anormais com outras células sanguíneas e contribui para a apoptose precoce dos eritrócitos (Kuypers, 2014; Allan; Raval, 1983; Blumenfeld *et al.*, 1991; Fadok *et al.*, 2001).

Figura 6 – Alteração da membrana das hemácias e polimerização de HbS.



A – HbS desoxigenada muda sua conformação e uma região hidrofóbica da cadeia β^s se liga a um sítio hidrofóbico de uma HbS adjacente, formando fibras de desoxi-hemoglobinas que então se alinham em hastes paralelas e criam um eixo axial no interior do eritrócito. Os polímeros de hemoglobina alteram o citoesqueleto e a interrupção da ligação da membrana ao citoesqueleto resulta em exposição de epítopos proteicos e de fosfatidilserina para o exterior da célula. **B** – A perda de potássio através de proteína do canal de Gardos e cotransportador K – Cl levam à desidratação celular e aumento da concentração de HbS. Fatores como a redução da pressão parcial de oxigênio (pO_2) e da temperatura, redução do pH e presença do heme citoplasmático livre aumentam a atração das moléculas de HbS e formação de polímeros e alterações do citoesqueleto resultam em eritrócito em formato de foice. Fonte: adaptado de Frenette; George, 2007; Kato *et al.*, 2018.

O rompimento da membrana celular das hemácias libera arginase, hemoglobina e Lactato desidrogenase (LDH). O heme e Hb no plasma promovem estresse oxidativo severo, especialmente nos vasos sanguíneos e nas células sanguíneas. A ação da heme oxigenase 1 (HO-1) é um dos mecanismos de remoção

do heme livre e desempenha um papel significativo ao proteger as células do estresse oxidativo induzido por ele. A HO-1 catalisa a degradação oxidativa da molécula de heme produzindo quantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e Fe⁺². A hemólise característica em anemia falciforme induz a expressão de HO-1, principalmente em resposta ao aumento do heme livre. (Amersi *et al.* 1999; Fondevila *et al.*, 2003; Tschihashi *et al.*, 2004; Willoughby *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1999). Porém, os níveis de antioxidantes catalíticos são insuficientes para o estresse oxidativo severo e crônico, contribuindo para a intensificação da hemólise.

O estresse oxidativo nos eritrócitos falciformes aumentam a auto oxidação da HbS, que também contribui para o dano da membrana celular, o envelhecimento prematuro dos eritrócitos e a hemólise. A auto oxidação contínua da Hb extracelular produz superóxido, que se dismuta em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os radicais de oxigênio resultam da auto oxidação acelerada da HbS, do heme extracelular e Hb no plasma, além da expressão de oxidases, redução da NADPH oxidase e da isquemia-reperfusão recorrente dos tecidos. As proteínas do citoesqueleto e os lipídios da membrana também se tornam oxidados. (Alayash, 2017; Wood; Granger, 2007; Aslan; Freeman, 2007)

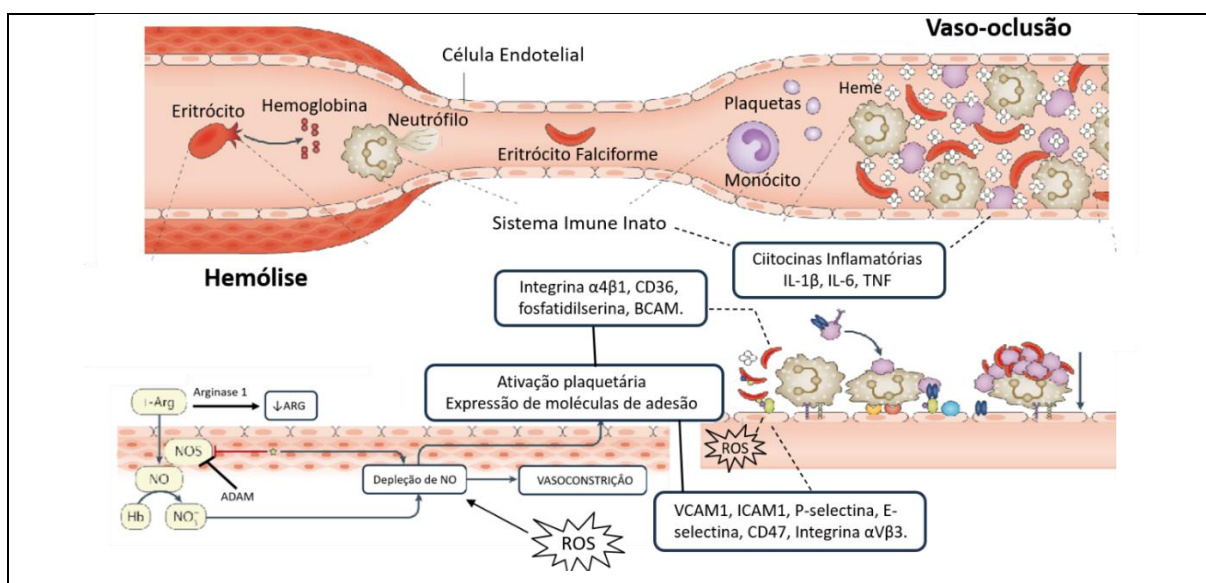
Um dos primeiros efeitos do processo hemolítico é a alteração na homeostase vascular que envolve o óxido nítrico (NO). O NO é um regulador do tônus da musculatura vascular, produzido por células endoteliais, e sua liberação contínua em um endotélio normal promove a vasodilatação pelo relaxamento das células musculares lisas, além de atuar inibindo a ativação e agregação plaquetária e reprimir a transcrição das moléculas e adesão (Kato *et al.*, 2007; Gladwin; Kato, 2005). O rompimento da membrana celular dos eritrócitos libera enzima arginase 1 e dimetilarginina assimétrica (ADMA) que interferem na disponibilidade de NO. A liberação da enzima arginase 1, que converte L-arginina em ornitina, provoca o consumo de arginina, um aminoácido necessário para a produção fisiológica de NO pela enzima NO sintase (Morris *et al.* 2005). ADMA é um inibidor endógeno da NO sintase. Tanto a ADMA quanto a depleção de L-arginina pela arginase 1 contribui para o desacoplamento da NO sintase, que então produz espécies reativas de oxigênio em vez de NO (Antoniades *et al.*, 2009; Landburg *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2014). O processo de hemólise crônica na anemia falciforme supera a capacidade fisiológica de reciclagem da hemoglobina, resultando em uma elevada concentração de hemoglobina livre que, em uma reação de dioxigenação, sequestra o NO formando

como subprodutos a meta-hemoglobina e nitrato (NO_3^-). Dessa forma, Hb extracelular também diminui a biodisponibilidade do NO (Reiter, C. D. *et al.* 2002). O heme e o ferro livres a partir da degradação da hemoglobina catalisam a produção de radicais livres (O_2^-) que sob ação das enzimas NADPH oxidase e xantina oxidase também consomem NO formando peroxinitrito (ONOO^-) (Kato *et al.*, 2007). A biodisponibilidade do NO reduzida também induz a produção de endotelina 1, um potente vasoconstritor produzido por células endoteliais, mediador pró-inflamatório e nociceptivo (Yanagisawa *et al.* 1988; Kowalczyk *et al.*, 2015; Khodorova; Montmayeur; Strichartz, 2009). Além disso, a redução de NO induz o aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais, como proteína de adesão celular vascular 1 (VCAM1), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1), P-selectina, E-selectina, antígeno de superfície leucocitária CD47 e integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ (Kaul *et al.* 2000; Setty; Stuart, 1996; Hines *et al.*, 2003). Adicionalmente, muitas moléculas de adesão que em células normais são restritas a superfície interna, são superexpressas na superfície externa de eritrócitos falciformes, como integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA4), específica de reticulócitos, glicoproteína plaquetária 4 (CD36), fosfatidilserina e molécula de adesão celular basal (BCAM) Dessa forma, eritrócitos falciformes são mais aderentes a células endoteliais do que eritrócitos normais (Hebbel, 1997; Setty; Stuart, 1996; Wagner; Eckman; Wick, 2004; Murphy *et al.*, 2005).

O heme plasmático e a Hb atuam como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e ativam o sistema imunológico inato ao ativar receptores *Toll-like 4* (TLR4) e *Toll-like 2*. TLR2 e TLR4 ativam monócitos e macrófagos para liberar citocinas inflamatórias promovendo o estado inflamatório. Células endoteliais ativadas também produzem citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF). A ativação do TLR4 nas plaquetas promove sua adesão aos neutrófilos, que por sua vez liberam DNA para formar armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) que aumentam a ativação plaquetária (Hebbel, 1997; Gladwin; Ofori-Acquah, 2014; Mendonça, Silveira; Conran, 2016; Kato *et al.*, 2018). Estes processos que favorece a ativação endotelial e a adesão entre eritrócitos, células endoteliais, leucócitos e plaquetas, promovem a formação de agregados celulares que resultam na obstrução da circulação e consequente isquemia tecidual. (Kuypers, 2007; Kuypers; Jong, 2004; Zago; Pinto, 2007; Sonati; Costa, 2008). Assim, a baixa disponibilidade de NO seguida por vasoconstrição, ativação endotelial, proliferação de células endoteliais e células musculares lisas e adesão celular favorecem o processo de vaso-oclusão.

(Figura 7) (Figueredo, 2007; Conran; Franco-Penteado; Costa, 2009; Sypulkowski; Manfredini, 2010). Episódios repetidos de vaso-oclusão seguidos de reperfusão durante a restauração do fluxo sanguíneo, resultam em lesão de isquemia-reperfusão. Este processo também envolve a geração de espécies reativas de oxigênio que causam estresse oxidativo e inflamatório, o que aumenta a expressão de moléculas de adesão, a síntese de citocinas e leucocitose, exacerbando ainda mais a inflamação e o dano tecidual (Rees *et al.*, 2010; Aslan *et al.*, 2007).

Figura 7 – Hemólise e Vaso-oclusão em Doenças Falciformes.



Danos e disfunção da membrana eritrocitária causada pela polimerização de HbS leva à hemólise dos eritrócitos. A liberação de Heme, arginase 1 e ADMA e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) provocam depleção de NO. A deficiência de NO promove a ativação plaquetária e a ativação de proteínas de coagulação sanguínea. As plaquetas ativadas induzem armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que induzem a agregação de plaquetas e eritrócitos. A redução de NO induz o aumento da expressão de moléculas de adesão de células endoteliais, como proteína de adesão celular vascular 1 (VCAM1), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1), P-selectina, E-selectina, antígeno de superfície leucocitária CD47 e integrina $\alpha V \beta 3$. Eritrócitos falciformes expressam moléculas de adesão integrina $\alpha 4 \beta 1$ (VLA4), glicoproteína plaquetária 4 (CD36), fosfatidilserina e molécula de adesão celular basal (BCAM). Heme e outras moléculas ativam o receptor *Toll-like 4* (TLR4) de células do sistema imunológico, ativando monócitos e macrófagos para liberar citocinas inflamatórias, levando a ativação de células endoteliais. As células endoteliais ativadas pelo contato direto de eritrócitos falciformes, heme livre, Hb e ROS produzem citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF). A adesão entre células endoteliais, eritrócitos, leucócitos e plaquetas formam agregados que provocam a vaso-oclusão e dano tecidual. Fonte: adaptado de Kato, 2018.

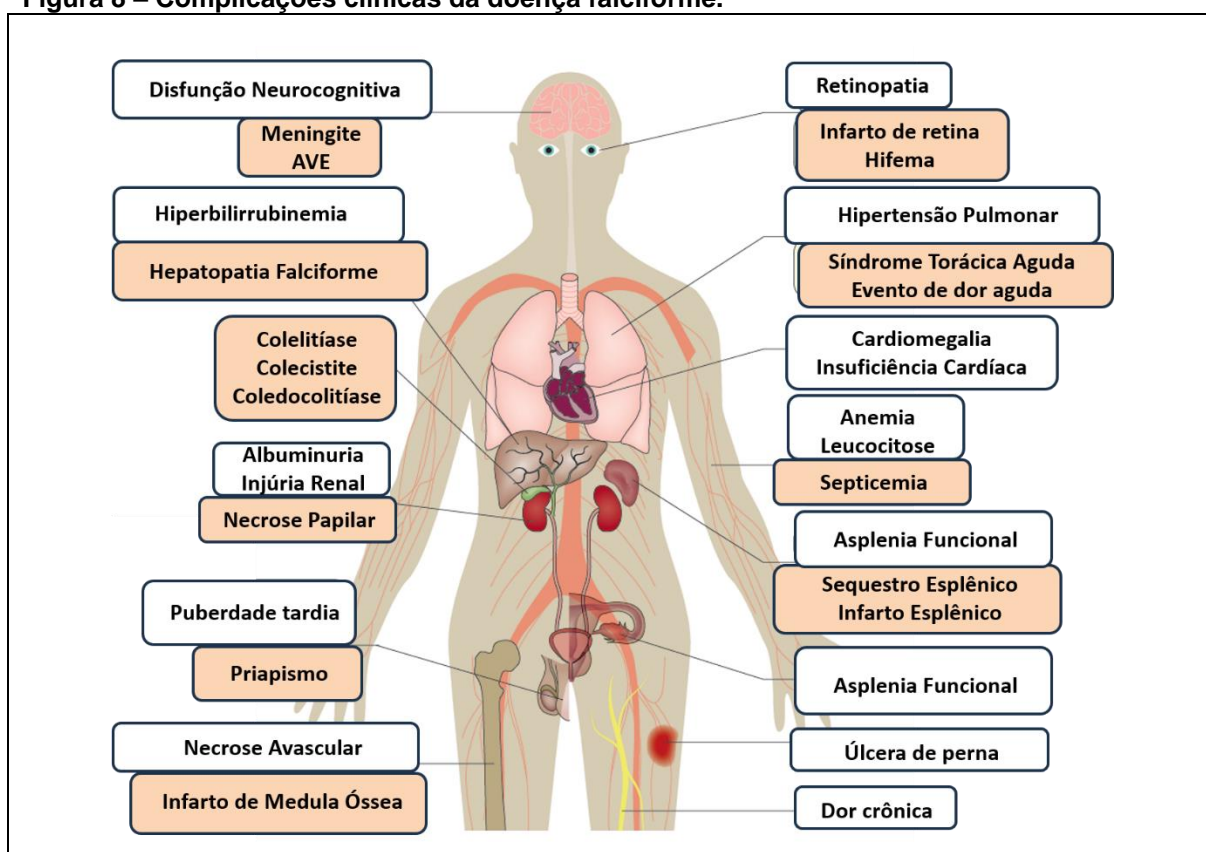
A ferroptose consiste em morte celular oxidativa mediada por ferro que envolve dois fatores principais: peroxidação lipídica e acúmulo de ferro (Chen *et al.*, 2021; Papa e Dixon, 2023; Fortuna, 2024). Na DF, a hemólise causada por polimerização de HbS em condições desoxigenadas e a auto oxidação de HbS resultam em produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), heme livre, ferro ferroso (Fe²⁺), e produtos oxidados da hemoglobina como metemoglobina (MetHb) e

ferrilhemoglobina (HbFe⁴⁺), envolvidos no estresse oxidativo que leva à geração de superóxido (O₂⁻). A enzima superóxido dismutase-1 (SOD-1) converte O₂⁻ em H₂O₂ e O₂. Níveis elevados de Fe²⁺ catalisam a conversão de H₂O₂ em radicais hidroxil (HO·), por meio de reações de Fenton (H₂O₂ + Fe²⁺ → Fe³⁺ + HO· + OH⁻) e Haber–Weiss (O₂⁻ + H₂O₂ → HO· + OH⁻ + O₂), formando essas espécies reativas de oxigênio (ROS) (Reiter *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2017; Jana *et al.*, 2018). Os lipídios da membrana celular são suscetíveis à peroxidação que inicia quando ROS removem um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado, o que induz a extração de hidrogênio de outros lipídios adjacentes, incluindo esfingolipídios e colesterol, promovendo uma reação em cadeia de formação de hidroperóxidos lipídicos. Hidroperóxidos lipídicos também reagem com ferro ferroso (Fe²⁺), formando radicais que perpetuam o processo de peroxidação lipídica. (Stockwell *et al.*, 2017; Forcina e Dixon, 2019; Ursini e Maiorino, 2020). Além disso, o heme livre e os níveis elevados de intermediários de oxidação da hemoglobina também reagem com ácidos graxos poli-insaturados contribuindo para o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos e seus subprodutos (Kassa *et al.*, 2015; Wilson e Reeder, 2022). A peroxidação lipídica compromete a integridade e permeabilidade da membrana, intensificando a hemólise e amplificando os processos oxidativos. Em DF os níveis aumentados de Fe por hemólise ou sobrecarga de ferro, devido a transfusões, aumenta a inflamação e sobrecarrega os mecanismos antioxidantes fisiológicos, contribuindo para o acúmulo de peróxido lipídico e aumentando o estresse oxidativo e a morte celular por ferropoptose (Fujii *et al.*, 2021, Gbotosho *et al.*, 2021, Vinchi *et al.*, 2021). Além dos efeitos oxidativos a ferropoptose também amplifica a agregação plaquetária contribuindo para as complicações vasculares na DF (Conran; De Paula, 2020). Descobertas recentes destacam o papel crítico da ferropoptose para o dano tecidual, através de observações de níveis elevados de peróxidos lipídicos e seus metabólitos em situações de lesão de isquemia-reperfusão e sobrecarga de ferro que acometem principalmente os rins, fígado, cérebro e pulmões (Hebbel *et al.* 2020; Fortuna *et al.*, 2024). Os efeitos da peroxidação lipídica também levam à liberação de moléculas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1β intensificando ainda mais as respostas inflamatórias no endotélio e nos leucócitos de pacientes com DF (Möller *et al.*, 2022; Ansari; Gavins, 2019). Esses processos indicam a interação complexa da ferropoptose com os processos de vaso-oclusão, hemólise, estresse oxidativo, disfunção vascular e mecanismos inflamatórios, resultando no impacto significativo da ferropoptose para

as manifestações clínicas da DF (Scarpellini *et al.*, 2023; Möller *et al.*, 2022; Fortuna *et al.*, 2024).

A complexidade da DF a caracteriza por diversos sintomas e complicações agudas e crônicas relacionadas aos eventos hemolíticos e de vaso-oclusão (Figura 8). O número de reticulócitos, níveis de bilirrubina (BR) e lactato desidrogenase (LDH) são os principais marcadores de hemólise intravascular (Ballas *et al.*, 2006). Os sinais e sintomas presentes na doença falciforme associados aos eventos vaso-oclusivos são artralgias, dactilite, hipertensão pulmonar, ulceração dos membros inferiores, hipostenúria, hematúria, e acidente vascular hemorrágico. (Ballas; Mohandas, 1996; Kaul; Fabry; Nagel, 1996; Serjeant,1997).

Figura 8 – Complicações clínicas da doença falciforme.



As complicações agudas da doença falciforme incluem as crises de dor, osteomielite, priapismo, necrose papilar, colelitíase, hepatopatia falciforme, AVE, meningite, infarto de retina, STA, septicemia, infarto esplênico, sequestro esplênico. As complicações crônicas incluem dor crônica, úlcera de perna, asplenia funcional, anemia crônica, leucocitose, cardiomegalia e falência cardíaca diastólica, hipertensão pulmonar, retinopatia, disfunção cognitiva, hiperbilirrubinemia, albuminúria, lesão renal, puberdade tardia, disfunção erétil, complicações da gravidez e necrose avascular. Fonte: adaptado de Kato *et al.*, 2018.

A obliteração da microvasculatura, principalmente em regiões de medula óssea, provoca o infarto tecidual. Neste processo, mediadores inflamatórios

produzidos no tecido danificado ativam neurônios sensoriais nociceptivos, causando dor (Ballas *et al.*, 1994). Assim, os episódios de dor aguda ou crises vaso-oclusivas são frequentes e o processo inflamatório pode atingir várias partes do corpo como tórax, abdômen, ossos longos, costelas, esterno, coluna vertebral, pelve e articulações. (Platt *et al.*, 1994).

Entre os danos a longo prazo, os órgãos mais comumente afetados são os rins, olhos e ossos, com risco aumentado de necrose avascular de do fêmur (Platt *et al.*, 1994). A nefropatia associada à DF pode resultar em comprometimento da função renal, levando à doença renal crônica e à terapia renal substitutiva (Derebail *et al.*, 2010). Um terço dos pacientes com AF desenvolvem doença renal crônica e até 18% tem necessidade de hemodiálise ou transplante renal (Falk *et al.*, 1992, Kato, 2018).

A DF pode causar retinopatia proliferativa assintomática que não tratada resulta em deficiência visual e cegueira. Exames oftalmológicos regulares são necessários para monitorar alterações na retina (Ashwin; Sivaraj, 2022). Homens com anemia falciforme podem apresentar um quadro chamado priapismo, que consiste em ereção peniana prolongada e dolorosa e requer atenção médica imediata para evitar danos permanentes ao pênis (Idris; Burnett; De Baun, 2022).

A maioria dos pacientes com AF apresenta pelo menos um evento grave de anemia aguda em algum momento de sua vida. Os tipos mais comuns de eventos anêmicos agudos são sequestro esplênico, crise aplástica (ausência temporária de eritropoiese) e crise hiperhemolítica. O sequestro esplênico agudo é caracterizado por rápido inchaço do baço e hipovolemia com queda repentina nos níveis de Hb. Esta uma das principais causas de mortalidade infantil em AF. A detecção precoce é crucial e geralmente é necessária a transfusão de concentrado de hemácias seguida de esplenectomia eletiva. Além disso, é indicado o uso seletivo de terapia imunossupressiva (Brousse *et al.* 2012, Kato, 2018).

As constantes crises hemolíticas, caracterizadas pela destruição dos eritrócitos, levam ao quadro de anemia crônica, icterícia, esplenomegalia, hepatomegalia e alterações ósseas. A anemia hemolítica crônica pode resultar em fadiga, diminuição da tolerância ao exercício, palidez e falta de ar. Para controle da anemia é necessário monitorar regularmente os níveis de hemoglobina e o status do ferro dos pacientes. (Platt *et al.*, 1994; Walters *et al.*, 2016; Zago; Pinto, 2007; Sonati; Costa, 2008).

Devido à hemólise crônica, às alterações funcionais do baço e função

imunológica prejudicada, indivíduos com doença falciforme são mais suscetíveis a infecções graves, particularmente bacterianas, causadas por bactérias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. As infecções podem variar de leves a graves e incluem pneumonia, infecções do trato urinário, meningite, osteomielite e sepse bacteriana. Dessa forma, a vacinação contra patógenos bacterianos comuns é essencial aos pacientes com DF. (Platt *et al.*, 1991; National Heart, Lung, and Blood Institute, 2024)

Crianças com DF apresentam atraso no crescimento e desenvolvimento pois a anemia crônica, deficiências nutricionais e as crises de dor recorrentes durante as atividades diárias impactam seu desenvolvimento normal (Tkach; Haacke, 1988). A obstrução dos vasos sanguíneos no cérebro pode causar acidente vascular encefálico isquêmico (AVE), uma das complicações graves da DF. Este risco é maior em crianças e episódios isquêmicos cerebrais silenciosos podem levar a deficiências cognitivas e problemas de desenvolvimento neurológico. Assim, a história de episódios isquêmicos transitórios anteriores e a detecção de fluxo sanguíneo anormal por ultrassonografia transcraniana Doppler são fatores de risco para AVE em DF (Ohene-Frempong *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1998).

A hemólise crônica na DF pode causar colelitíase (cálculos biliares) devido à precipitação de bilirrubina na vesícula biliar, onde heme é metabolizado em bilirrubina, que na bile forma billirrubinato de cálcio insolúvel que precipita como um pigmento e forma cálculos biliares. (Kato, 2018) Esta condição pode ser assintomática ou sintomática e resultar em complicações como colecistite, pela inflamação da vesícula biliar ou coledocolitíase, pela migração de cálculos para o ducto biliar comum, até pancreatite por cálculos biliares. (Quinn, 2013; Khyati, 2022; Lee; Fishman, 2021). Na idade adulta, 50-85% dos pacientes com doença falciforme têm cálculos biliares e a remoção cirúrgica da vesícula biliar (colecistectomia) laparoscópica é o procedimento de escolha para colelitíase sintomática devido ao menor tempo de internação hospitalar, menor custo e menor risco de complicações. (Zeineddin *et al*, 2024, Zakaria *et al*, 2019; Jawad *et al*, 1998; Schubert, 1986, Leake; Reid; Plummer; 2017)

A doença falciforme pode causar lesões no fígado e diminuição da função hepática na idade adulta. Episódios agudos da doença falciforme podem afetar o fígado causando crise hepática com dor abdominal, náusea, febre, icterícia e

elevação das enzimas hepáticas e hepatomegalia, de modo muitas vezes clinicamente indistinguível da hepatite viral. Além disso, colecistite aguda ou a coledocolitíase podem ter características clínicas e laboratoriais semelhantes às da crise hepática falciforme ou hepatite viral. (Schubert, 1986).

Síndrome Torácica Aguda (STA) foi o termo usado pelo hematologista Sam Charache (1979) para descrever eventos semelhantes à pneumonia observados em DF. Esta complicação é um dos quadros clínicos mais graves da DF, segunda maior causa de internação e uma das principais causas de morbidade e mortalidade (Klings; Steinberg, 2022). Geralmente STA se desenvolve nas primeiras 72 horas de internação por um episódio doloroso (evento vaso-oclusivo) e em crianças pode estar associado a infecções pulmonares (Klingsa; Steinberg, 2022; Vichinsky *et al.*, 2000).

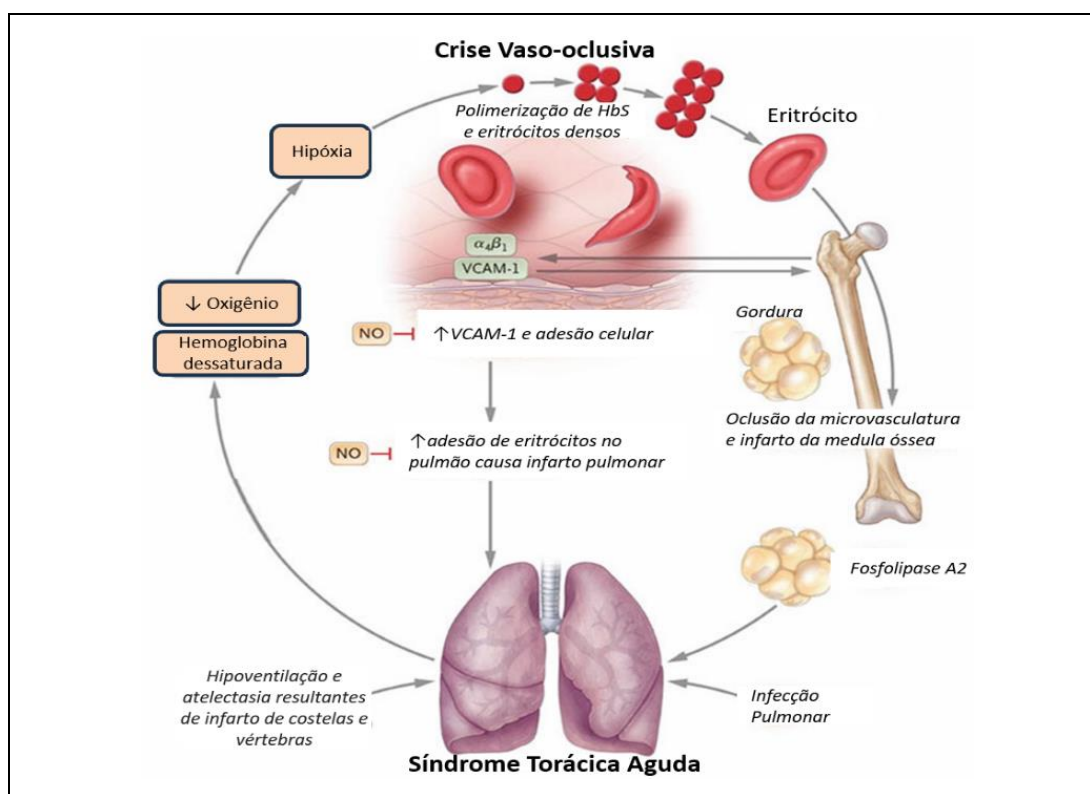
Os casos mais graves e com alta morbidade e mortalidade por STA são desencadeados pela necrose de medula óssea e embolização. A necrose na medula óssea libera partículas de gordura que podem obstruir pequenos vasos, principalmente dos pulmões, causando a embolia gordurosa. Isto provoca a obstrução vascular pulmonar, causando danos ao tecido pulmonar e comprometimento das trocas gasosas (Platt *et al.*, 1994). A medula gordurosa infartada pode atravessar os pulmões e entrar na circulação arterial onde provoca uma resposta inflamatória aguda levando à falência de múltiplos órgãos (Vichinsky *et al.*, 1994) (Figura 9).

O infarto da medula óssea na doença falciforme pode ocorrer de forma irregular e assintomática até que a área infartada se torna grande provocando dor óssea intensa na pélvis e nas costas. O quadro de STA se apresenta com dor torácica, dispneia, tosse, febre, exame pulmonar anormal, particularmente com sibilos, leucocitose, hipóxia e infiltrado pulmonar envolvendo pelo menos um segmento de um lobo na radiografia de tórax. (Vichinsky, *et al.* 2000; Klings; Steinberg, 2022).

De forma geral, os sinais clínicos de STA precedem os achados da radiografia de tórax. Esses sinais podem indicar um processo infeccioso bacteriano ou viral primário e o exame de tórax pode ser normal principalmente em crianças. A incidência de STA é maior em crianças do que em adultos e as características clínicas variam dependendo da idade. (Castro *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 2015). Nas faixas etárias pediátricas os sintomas mais comuns são febres, tosse e chiado. A dor não é frequente e a gravidade mais frequente da STA em crianças varia de leve a autolimitada, principalmente em crianças com idade inferior a 5 anos. Em crianças, STA está frequentemente associada a infecções pulmonares e a asma. A asma pode

ser um importante modulador da STA em crianças e adolescentes, que apresentam mais frequentemente sibilos recorrentes isolados e obstrução das vias aéreas inferiores. Sabe-se que a asma infantil está associada a crises vaso-oclusiva, início precoce de STA, STA recorrente e mortalidade. Além disso, crises agudas de asma podem dificultar o diagnóstico de STA e desencadear ou perpetuar a lesão pulmonar dos pacientes (Vichinsky *et al.*, 2000; DeBaun *et al.*, 2014; Klings; Steinberg, 2022). Em crianças a STA secundária à infecção tem uma variação sazonal, sendo três vezes mais comum no inverno, e ocorre por agentes infecciosos virais, principalmente por vírus sincicial respiratório (VSR). O agente bacteriano mais comum em crianças é *Mycoplasma pneumoniae* (Vichinsky *et al.*, 1997; Vichinsky *et al.*, 2000; Neumayr *et al.*, 2003). Em adultos os sintomas frequentes são dispnéia, calafrios e dor intensa e a rápida progressão para falência de múltiplos órgãos e morte é mais frequente. O agente bacteriano mais comum identificado em adultos é *Chlamydomphila pneumoniae* (Vichinsky *et al.*, 1997; Neumayr *et al.*, 2003).

Figura 9 – Fisiopatologia da Síndrome Torácica Aguda.



A Síndrome Torácica Aguda inicia por três fatores principais: infecção, embolização gordurosa e infarto microvascular pulmonar. A polimerização da hemoglobina S (HbS), depleção de óxido nítrico (NO) e expressão de moléculas de adesão VCAM-1 provocam adesão celular e vaso-oclusão eritrocitária. A necrose na medula óssea libera partículas de gordura causando embolia gordurosa por obstrução de pequenos vasos nos pulmões. A obstrução vascular pulmonar causa infarto e lesão pulmonar que resultam em redução da oferta de oxigênio, hipóxia e desoxigenação de hemoglobina, favorecendo mais polimerização de HbS. Fonte: adaptado de Gladwin; Vichinsky, 2008.

Devido à escassez de ensaios clínicos controlados, o diagnóstico e manejo da STA é orientado pela opinião de especialistas e baseado no risco de insuficiência respiratória, sendo a estratificação da gravidade de acordo com características clínicas e risco de morte (Klings; Steinberg, 2022).

A suspeita de êmbolos gordurosos normalmente ocorre por características clínicas e hematológicas, pois a detecção de laboratorial de macrófagos pulmonares carregados de gordura requer a broncoscopia e lavado broncoalveolar. A enzima fosfolipase secretora A2 (sPLA2) cliva os ácidos graxos livres que podem circular com a embolia gordurosa. O aumento dos níveis de sPLA2 após um evento doloroso foi correlacionado com a ocorrência e gravidade da STA, porém este biomarcador de pesquisa tem pouca utilidade clínica já que sua medição não está disponível na maioria dos laboratórios hospitalares e não há certeza se a mesma tem relação com a fisiopatologia específica de STA ou é apenas um marcador inflamatório (Styles, Aarsman; Vichinsky *et al.* 2000; Klings; Steinberg, 2022).

Além da história, exame físico e sinais vitais usuais, é essencial a avaliação da oxigenação por meio de oximetria de pulso e/ou gasometria arterial. Os pacientes com suspeita clínica de STA também devem realizar hemograma completo, contagem de reticulócitos, testes de função renal e hepática e testes para possível transfusão. Além disso, hemoculturas e outros exames microbiológicos para agentes infecciosos podem ser necessários. A dor intensa no peito, coluna ou pélvica, magnitude da febre e saturação de oxigênio juntamente com contagens de reticulócitos, leucócitos e plaquetas são parâmetros para saber se um paciente com crise vaso-oclusiva aguda tem probabilidade de desenvolver STA (Alkindi *et al.*, 2020; Klings, Steinberg, 2022). A iminência de STA grave é sugerida quando há reticulocitopenia, contagem de leucócitos > 20.000/dL, níveis de LDH > 1.500 UI, hemácias nucleadas no sangue e trombocitopenia < 150 x 10⁹/L. Fatores de risco adicionais para AF grave incluem doença multilobar na radiografia de tórax, história de hipertensão pulmonar ou disfunção cardíaca (Vichinsky *et al.*, 1994; Klings; Steinberg, 2022). Disfunções agudas e crônicas, particularmente do coração, pulmões, cérebro, fígado e rins, comuns na DF, podem aumentar o risco de mortalidade na STA (Klings *et al.*, 2014; Klings; Steinberg, 2022). Em crianças a asma também está associada a crises vaso-oclusivas mais frequentes, STA recorrente e mortalidade (Boyd *et al.*, 2007; Klings; Steinberg, 2022).

A STA ocorre em todos os genótipos de DF com maior incidência em AF e no genótipo HbS/ β^0 . Porém, a menor incidência nos genótipos HbSC e HbS/ β^+ contrasta com a maior gravidade de STA, associada à falência de órgãos e êmbolos gordurosos necróticos, que são comuns nestes genótipos considerados mais leves de DF, comuns. Isto ocorre possivelmente aumento da viscosidade do sangue devido a maior concentração de hemoglobina e volume de hemácias, e pacientes minimamente sintomáticos HbSC podem ter um desfecho fatal de STA na primeira manifestação emergencial da doença (Tsitsikas; Bristowe; Abukar, 2020; Klings; Steinberg, 2022). Em α -talassemia, presente em ~30% dos homozigotos HbS, ocorre redução de concentração de HbS, melhorando a hemólise. Alguns estudos sugerem menor incidência de STA neste genótipo enquanto outros não encontraram associação (Higgs *et al.*, 1982; Klings; Steinberg, 2022).

A incidência de STA também está inversamente relacionada ao nível de HbF e com base nisto alguns estudos sugerem sua relação com os haplótipos do gene *HBB*. Verificou-se que crianças com o haplótipo CAR apresentaram menor HbF e maior taxa de internação por STA, pacientes com haplótipo de Benin foram intermediários e crianças com haplótipo do Senegal apresentaram maior HbF e menor taxa de hospitalização por STA (Steinberg, 2020; Klings; Steinberg, 2022).

Além da regulação por elementos ligados ao haplótipo do gene *HBB*, os níveis de HbF são regulados por *BCL11A* e *MYB* cujos produtos são repressores da produção de HbF, sendo provável que variantes de *BCL11A* e *MYB* também se correlacionem com a incidência de STA (Lettre *et al.*, 2008; Klings; Steinberg, 2022). Estudos de associação genética do fenótipo da STA ainda não resultaram em novas descobertas terapêuticas ou prognósticas. Como é provável que STA seja uma condição multifatorial e poligênica, a contribuição de uma variante genética para este fenótipo é pequena e difícil de analisar, sendo necessários estudos suficientemente grandes que ainda não foram feitos. (Klings; Steinberg, 2022).

Além da ultrassonografia pulmonar no local de atendimento houve poucos avanços recentes no diagnóstico e tratamento de STA. Recomenda-se que todos os pacientes hospitalizados com episódios dolorosos agudos sejam monitorados nas primeiras 72 horas de internação, quando ocorrem a maioria dos episódios de STA após uma crise vaso-oclusiva aguda (Klings; Steinberg, 2022). Alguns estudos mostraram que a hidroxiuréia é eficaz para prevenir STA, principalmente nas doses máximas toleradas (Dong; McGann, 2021). A terapia transfusional para o tratamento

da STA é indicada nos casos moderados a graves e a escolha do protocolo de transfusão depende da experiência clínica e dos parâmetros clínicos e laboratoriais do paciente (Mallouh; Asha, 1988; Klings; Steinberg, 2022). A transfusão crônica pode ser utilizada na prevenção de STA em crianças e adultos que não toleram a hidroxiuréia (Hankins *et al.*, 2005). Como STA é uma complicação pós-operatória comum na DF, a transfusão simples profilática pré-operatória é indicada nos fenótipos HbS de DF para as cirurgias mais comuns (Howard *et al.*, 2013).

A grande variabilidade fenotípica entre indivíduos com DF torna possível o agrupamento de algumas complicações em subfenótipos, observados em determinados grupos de pacientes, que não são mutuamente exclusivos e ocorrem provavelmente por fatores genéticos. O subfenótipo vaso-oclusivo caracteriza-se por hematócrito mais elevado que resulta em maior viscosidade do sangue. Indivíduos com esse fenótipo estão predispostos a frequentes crises de dor vaso-oclusiva, síndrome torácica aguda e osteonecrose (Kato *et al.*, 2018). O subfenótipo de hemólise e vasculopatia é caracterizado por um hematócrito mais baixo acompanhado por níveis mais elevados de LDH sérica e bilirrubina, o que indica anemia hemolítica mais grave. Os indivíduos deste grupo correm risco de acidente vascular cerebral isquêmico, hipertensão pulmonar, ulceração nas pernas, cálculos biliares, priapismo e possivelmente nefropatia. A baixa biodisponibilidade do NO e exposição do heme resultam em vasculopatia e a anemia grave também promove alto débito cardíaco como mecanismo compensatório, o que tem sido relacionado a vasculopatia renal e em outros órgãos (Kato, *et al*, 2018; Kato; Gladwin; Steinberg, 2007). Um subfenótipo com expressão persistente de HbF, na faixa de 10–25% da Hb total, geralmente tem redução da gravidade clínica da AF, mas nem todos os indivíduos tem um fenótipo leve devido a uma distribuição desigual de HbF entre os eritrócitos. Níveis de expressão de 25–50% de HbF em todos os eritrócitos promove uma melhoria quase completa da AF, com sintomas clínicos raros e sem anemia (Lette; Bauer; 2016; Steinberg *et al*, 2014).

2.7 Tratamento da Doença Falciforme

O tratamento de DF se baseia em terapias específicas de base crônica e no controle de complicações agudas. Ao considerar que a gravidade e a frequência dos sintomas podem variar entre indivíduos com DF, o atendimento médico imediato e abrangente, com medidas preventivas e intervenções precoces, são essenciais para

minimizar as complicações da doença. É necessário monitoramento regular, estratégias de tratamento da dor, antibióticos preventivos, vacinações e outros cuidados de suporte. (Elendu, 2023). Entre os cuidados de suporte, o tratamento da dor é feito com medicamentos analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides e principalmente opioides em ambiente hospitalar, outras abordagens não farmacológicas também podem ser utilizadas como terapia térmica, relaxamento e técnicas de distração (Smith; Scherer, 2010). As complicações clínicas da DF exigem tratamentos profiláticos para infecções, com antibióticos como a penicilina, e vacinações (National Heart, Lung, and Blood Institute, 2014). A hidratação adequada é importante para prevenir crises vaso-oclusivas, sobretudo durante infecções ou exposição a temperaturas extremas (Hardouin *et al.* 2023).

As principais medidas terapêuticas da DF são a terapia transfusional, o tratamento com hidroxycarbamida ou hidroxiuréia (HU) e o transplante de células-tronco hematopoiéticas (Kassim; DeBaun, 2014; Hardouin *et al.*, 2023).

A Terapia transfusional de concentrado de hemácias pode melhorar e prevenir acidente vascular cerebral e crises vaso-oclusivas. A transfusão de troca, onde o sangue do paciente é substituído pelo sangue de doador contribui para diminuição da inflamação aguda e pode modificar um quadro grave. Este é o método mais eficaz para reduzir o nível de HbS abaixo de 30% sem aumentar o nível de Hb total acima de 10 g/dL (Howard *et al.* 2015; Kassim, 2015). Em casos de anemia grave, STA ou AVE é indicada a transfusão de concentrado de hemácias para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio do sangue e a reduzir o percentual de células falciformes. Em indivíduos com estas complicações recorrentes são indicadas transfusões sanguíneas regulares. (National Heart, Lung, and Blood Institute, 2014). No entanto, a transfusão de concentrado de hemácias pode causar efeitos adversos como sobrecarga de ferro, resposta imune a antígenos presentes no sangue do doador e reações transfusionais, hemolíticas. As reações transfusionais tardias podem ocorrer como um episódio hiperhemolítico em que as células transfundidas e os eritrócitos do próprio paciente são destruídos (Gardner *et al.*, 2015). O uso de medicamentos orais quelantes de ferro reduz os efeitos adversos da sobrecarga de ferro. Em países com limitações de testagem de amostras sanguíneas, existem riscos substanciais de transmissão de infecções transmitidas pelo sangue, como hepatite B, hepatite C, HIV e outros. Protocolos de transfusão a terapia de quelação de ferro e melhoram a segurança desta terapia (Hyacinth *et al.*, 2014, Hyacinth *et al.*,

2015; Quirolo; Vichinsky, 2016). Em conjunto, a terapia transfusional de concentrado de hemácias, analgésicos parenterais e HU são eficazes no controle da dor, reduzindo a incidência de síndrome torácica aguda e infecções, diminuindo a mortalidade (Claster; Vichinsky, 2003; Luzzatto; Makani, 2019; Tshilolo *et al.*, 2019; Pace; Starlard-Davenport; Kutlar, 2021; Power-Hays; Ware, 2020).

A hidroxiuréia (HU) foi o primeiro medicamento para o tratamento da anemia falciforme ao ser identificada como um potente indutor de HbF (Platt *et al.*, 1984) Em outros estudos HU teve efeito na redução de episódios de dor, STA, transfusões de sangue e hospitalizações (Charache *et al.*, 1995; Ferster *et al.*, 1996). Posteriormente, HU mostrou que reduz a mortalidade e morbidade da anemia falciforme e foi aprovada pela FDA dos EUA em 1998 e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em 2007 para o tratamento de DF. (Kato *et al.*, 1998; Steinberg *et al.*, 2003; Ware *et al.*, 2017; Fathallah; Atweh, 2006; Bakanai; 2005; Flanagan *et al.*, 2012; Steinberg *et al.*, 2003; Voskaridou *et al.*, 2010).

Sobre o mecanismo, observou-se que HU induz um microRNA que inibe MYB e indiretamente estimula a produção de HbF. Porém, seu modo de ação permanece não completamente compreendido. (Pule *et al.*, 2016). O aumento dos níveis de HbF e consequente redução da polimerização da hemoglobina resulta em benefícios aos eritrócitos como redução da desidratação, redução da exposição à fosfatidilserina e redução da expressão de moléculas de adesão. Porém, mesmo em pacientes que não apresentam aumento em HbF, o benefício clínico da terapia com hidroxiuréia na doença falciforme pode ocorrer por outras alterações como aumento do volume de eritrócitos, diminuição da contagem de reticulócitos e leucócitos, o que promove um benefício reológico (Charache *et al.*, 1996; Rees, 2011; Bridges *et al.*, 1996; Styles *et al.*, 1997). HU também age diretamente no endotélio vascular reduzindo a expressão de algumas moléculas de adesão, e este efeito difere entre células endoteliais de vasos sanguíneos grandes ou pequenos (Figura 10) (Laurance *et al.*, 2011; Rees, 2011).

HU tem propriedades antioxidantes e quelantes de ferro, desempenhando potencialmente um papel na prevenção da ferroptose ao reduzir os níveis de ROS e aumentar a síntese de óxido nítrico (Santana *et al.*, 2020). Pacientes com DF em tratamento com HU apresentaram diminuição nos níveis de peroxidação lipídica e reforço nas defesas antioxidantes (de Torres *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). O tratamento de hemácias *in vitro* com 0,8mM de HU por 1 h resultou na diminuição da

peroxidação lipídica e dos níveis de Fe^{3+} (Renó *et al.*, 2021). Além disso, a combinação de HU com quelantes de ferro provou ser eficaz na mitigação da sobrecarga de ferro, levando à diminuição dos níveis de ferritina sérica e à redução do acúmulo de ferro nos tecidos do fígado e do coração (Itália *et al.*, 2013).

Figura 10 – Efeitos da hidroxiuréia em doença falciforme.

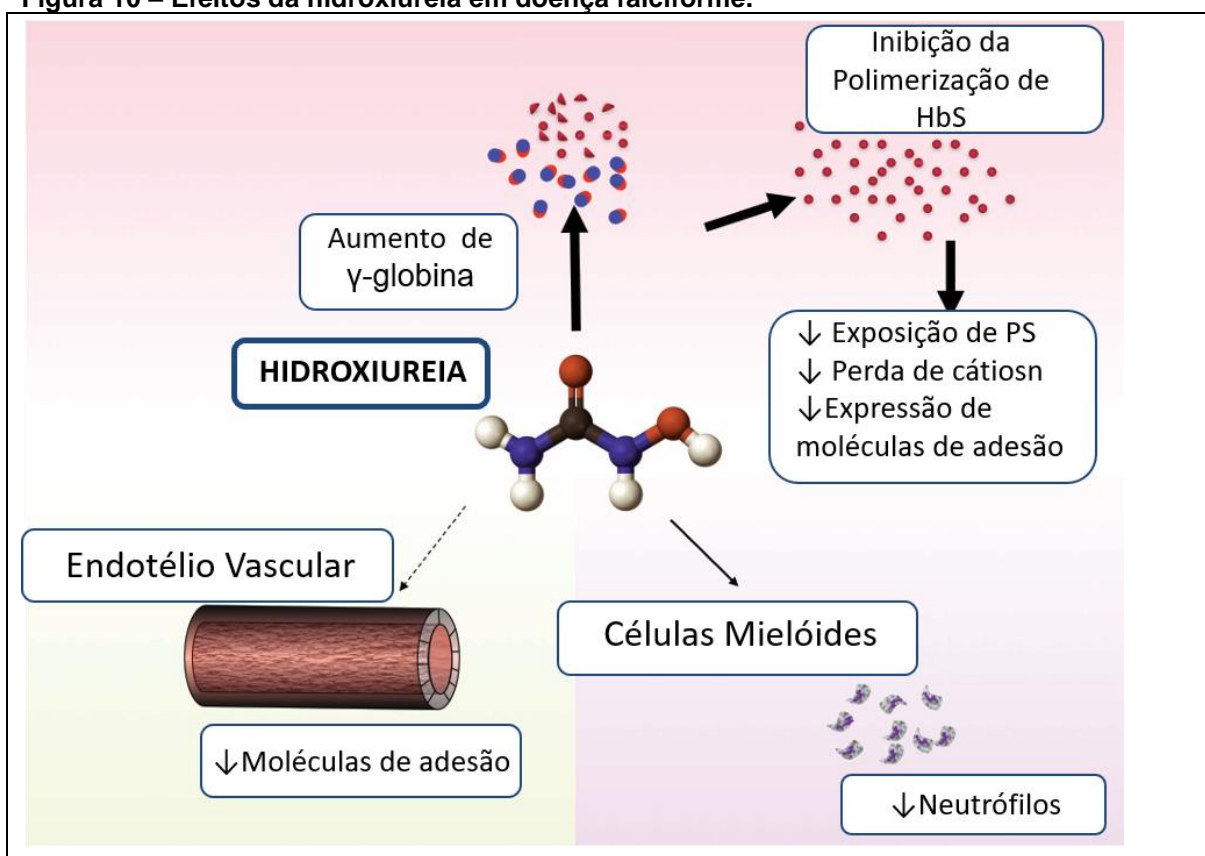


Diagrama com os benefícios terapêuticos promovidos pelo tratamento com HU na prevenção da vaso-oclusão e vasculopatia em pacientes com doença falciforme. Ação da hidroxiuréia nas células eritroides (seta grossa), contagem reduzida de neutrófilos (seta fina) e redução da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular (seta pontilhada) Fonte: adaptado de Rees, 2011.

A terapia com HU reduz a falcização das hemácias e significativamente a ocorrência de crises vaso-oclusivas, hospitalizações, STA e mortalidade, geralmente com boa tolerância, sendo necessária monitorização regular do hemograma e da função hepática (Charache *et al.*, 1995; Charache, 1997; Habara; Elmutaz; Steinberg, 2017; Ware, 2015; Wienert *et al.*, 2018). Porém, a magnitude da resposta varia entre os pacientes tanto por limitações de adesão ao tratamento como por fatores individuais relacionados a farmacogenética ainda não totalmente esclarecidos (Walsh *et al.*, 2014, Husain *et al.*, 2017). Ao considerar que o nível de HbF em cada eritrócito é determinante para o seu efeito, o aumento geral de HbF não melhora todos os

subfenótipos da doença na mesma extensão. Embora a hidroxiuréia aumente os níveis de HbF na maioria dos pacientes, sua distribuição nos eritrócitos falciformes é heterogênea e as células com níveis mais baixos de HbF recebem menos proteção contra a falcização. Ao persistirem os eventos hemolíticos os pacientes permanecem sintomáticos, embora com uma taxa reduzida de complicações e com melhor sobrevida. (Steinberg *et al.*, 2014).

A HU é o único tratamento modificador disponível para DF de custo relativamente baixo e escalonável (McGann, Ware, 2015). Este medicamento está na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais e na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais para Crianças da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2019a, WHO, 2019b) Sua prescrição e o monitoramento devem ser adaptados e simplificados para uso em locais com poucos recursos para pacientes em todos os estágios da vida. Desde 2006 a OMS emitiu diretrizes com recomendações e estratégias prioritárias que envolvem tratamento com hidroxiuréia para melhorar o tratamento da AF, para reduzir a carga da doença (World Health Assembly, 2006; Power-Hays, Ware 2020). Porém, embora com avanços em alguns países, os esforços para controlar a AF são incompletos e é preciso que a comunidade internacional promova o aumento do acesso ao tratamento com HU, sobretudo nos países da África Subsaariana, onde a maioria dos pacientes morre na infância (Grosse *et al.* 2011).

No Brasil, A hidroxiuréia é o tratamento padrão atual recomendado para a prevenção das crises vaso-oclusiva em pacientes com DF com genótipo HbSS, HbSC, HbSD ou HbS β^0 , com idade igual ou maior que 2 anos como descrito no PCDT-DF atual de doença falciforme (Brasil, 2018). O relatório preliminar do PCDT-DF em atualização amplia o uso de HU ao recomendar o tratamento com HU para pacientes com DF HbSS, HbS β^0 , HbS β^+ grave e HbSD Punjab com pelo menos 9 meses de idade; e entre 9 e 24 meses de idade sem sintomas e complicações. Segundo esta atualização do PCDT-DF, devem ser excluídos do tratamento com HU os pacientes que apresentarem, antes do tratamento, contagem de neutrófilos abaixo de 1.500/mm³ para pacientes acima de um ano de idade, ou 1.000/mm³ para pacientes abaixo de um ano de idade; Hb abaixo de 4,5 g/dL; reticulócitos abaixo de 80.000/mm³ (quando Hb menor que 8 g/dL); contagem de plaquetas abaixo de 80.000/mm³; gestantes ou mulheres sexualmente ativas que não estejam em uso de métodos contraceptivos; doença hepática ativa (infecção por HBV ou HCV) (Brasil, 2024). O PCDT-DF em atualização preconiza a dose inicial 15 mg/kg/dia, por via oral, em dose única e o

aumento em 5 mg/kg/dia a cada 4 semanas até atingir a dose máxima de 35 mg/kg/dia ou a interrupção por ocorrência de toxicidade hematológica ou outros eventos adversos graves. O tratamento com HU deve ser mantido por tempo indeterminado enquanto houver resposta clínica e laboratorial. O tratamento anual com HU do paciente adulto custa ao SUS R\$ 1.615,00, sendo R\$ 1,54 por cápsula de HU 500mg, de acordo com o Banco de Preços em Saúde (Brasil, 2024).

HU ainda é subutilizada devido a deficiências na infra-estrutura de saúde de países, principalmente africanos, entretanto seu uso está aumentando e resultados favoráveis de ensaios clínicos em bebês e crianças pequenas tem aumentado a frequência do uso deste medicamento em crianças com AF (McGann *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011). Para melhorar o acesso à hidroxiuréia, as diretrizes de tratamento devem ser adaptadas e simplificadas para localidades com poucos recursos. São necessárias intervenções para aumento da adesão voltadas à capacitação dos prescritores e conscientização de pacientes e familiares quanto importância de utilizar a hidroxiuréia de forma eficaz a todos os indivíduos com DF elegíveis. À medida que novos tratamentos potencialmente curativos para DF estão sendo desenvolvidos, é fundamental que HU seja fornecida como o tratamento primário modificador da doença para servir como base para terapias futuras (Power-Hays; Ware, 2020).

Nos últimos anos, surgiram novos alvos terapêuticos e opções de tratamento com medicamentos. O crizanlizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado contra a P-selectina que atua inibindo a adesão de hemácias e leucócitos às células endoteliais (Gutsaeva *et al.*, 2011). O aminoácido antioxidante A L-glutamina é capaz de penetrar nos eritrócitos e reduzir o estresse oxidativo, reduzindo a frequência de episódios de dor. Tanto a L-glutamina como o crizanlizumabe reduzem a frequência de crises vaso-oclusivas e podem ser combinados com HU para melhorar o benefício clínico (Elenga, 2022, Niihara *et al.*, 2018; Ataga *et al.*, 2017). O Voxelotor é um modulador de afinidade da HB pelo oxigênio e capaz de estabilizar a Hb oxigenada, prevenindo a polimerização (Vichinsky *et al.* 2019).

O Transplante de células-tronco hematopoiéticas é o único tratamento curativo para DF aprovado atualmente. Em pacientes elegíveis, particularmente crianças com doença falciforme grave, o objetivo é a substituição da medula óssea doente por células-tronco saudáveis de um doador compatível. Para isto os pacientes sintomáticos devem ter um doador familiar compatível para o antígeno leucocitário humano (*HLA*). No entanto, a probabilidade de compatibilidade HLA entre irmãos é de

aproximadamente 25% e a maioria dos pacientes não tem um doador HLA compatível, o que limita sua aplicação (Walters *et al.*, 2016; Gluckman *et al.*, 2017). Foram desenvolvidas melhorias consideráveis na eficiência de transplantes de doadores não familiares e compatíveis com HLA, reduzindo o risco de doença do enxerto contra hospedeiro e toxicidade deste tratamento (Hardouin *et al.*, 2023).

A terapia gênica uma opção promissora para tratamento curativo sem o risco de doença do enxerto contra hospedeiro e rejeição. Consiste na coleta de tronco hematopoiético autólogo e de células progenitoras e depois correção genética *in vitro*. As células geneticamente modificadas são então infundidas no paciente após mieloablação e a eficácia clínica é proporcional ao número de células corrigidas que são enxertados no paciente (Lagresle-Peyrou *et al.*, 2018). Duas estratégias de correção genética já foram utilizadas em ensaios clínicos: vetores baseados em lentivírus e técnicas de edição de genoma.

A primeira estratégia de terapia gênica adiciona um gene terapêutico ao genoma de células progenitoras através de um vetor lentiviral. O lentivírus é capaz de transcrever reversamente seu genoma de RNA, transportando para o DNA e integrando-o permanentemente no genoma das células-alvo o gene para expressão de uma Hb terapêutica (Tanhehco, 2021). A adição de genes por um vetor viral tem algumas limitações de eficácia e segurança porque a quantidade de Hb resultante é insuficiente quando o número de cópias do vetor por célula é baixo e pode ser satisfatória apenas se a DF for combinada com outras mutações, como α -talassemia ou polimorfismos genéticos relacionados à HbF. Há também um risco genotóxico da integração de lentivírus (Magrin *et al.*, 2022; Kanter *et al.*, 2022).

A edição do genoma consiste na substituição, exclusão ou inserção de uma sequência de DNA genômico. CRISPR-Cas9 é um sistema de defesa adaptativo usado por procariontes para clivar sequências de ácidos nucleicos e tem sido utilizado para desenvolver ferramentas de edição de genoma. Algumas estratégias de edição de genoma foram projetadas para corrigir as mutações de β -hemoglobinopatias e restaurar a expressão endógena de Hb ou induzir a expressão de γ -globina (Frangoul *et al.*, 2021; Doudna, 2020). Devido à prevalência e mutação única, a DF é um bom alvo para o desenvolvimento de estratégias de correção genética. (Dever *et al.*, 2016; DeWitt *et al.*, 2016; Lattanzi *et al.*, 2021). Embora a correção genética tenha como alvo sequências específicas, podem ocorrer clivagens erradas em sequências semelhantes e gerar efeitos fora do alvo. As mutações indesejadas resultantes podem

modificar a expressão de outros genes e estimular processos de tumorigênese por células editadas. A edição de base é uma tecnologia baseada em CRISPR-Cas9 que pode inserir uma mutação de ponto mais segura e menos complexa em comparação com o sistema CRISPR-Cas9 original, mas ainda persiste a possibilidade de eventos indesejados fora do alvo (Boutin *et al.*, 2022; Gaudelli *et al.*, 2020; Haapaniemi *et al.*, 2018; Kosicki; Tomberg; Bradley, 2018; Schirotti *et al.*, 2019).

Embora o transplante de células-tronco hematopoiéticas e a terapia gênica possam resultar na cura completa da AF, estas são opções de alto custo e indisponíveis em países onde a doença é mais prevalente, e ambos podem ter consequências potencialmente graves para a saúde. O transplante de células-tronco hematopoiéticas está disponível apenas em seis centros em toda a África. Utilizar estratégias de terapia gênica na rotina clínica é um desafio principalmente pelo custo, mas deve ser comparado ao o custo anual de cuidados em saúde que pacientes com DF necessitam durante décadas, além do ganho pós-tratamento na qualidade e expectativa de vida. No futuro os ensaios clínicos em DF devem considerar também as diversas características genéticas dos participantes para o desenvolvimento de terapias genéticas personalizadas com boa eficácia a longo prazo e limitada toxicidade. (Arnold *et al.*, 2016; Tanhehco; Bhatia, 2019; Harif; Weisdorf; Novitzky *et al.*, 2020; National Marrow Donor Program, 2022; Hardouin *et al.*, 2023).

2.8 Questões sociorraciais e políticas de saúde

As doenças falciformes representam um problema de saúde pública presente em todo o mundo e mais frequentes em indivíduos de ascendência africana (Pokhrel, *et al.*, 2023). Porém, mais do que uma doença genética, a DF é um caso que reflete a negligência histórica com a saúde da população negra. No contexto global, à medida que os métodos de triagem são ampliados e os sistemas de registros melhoram, o número de casos de doenças falciformes continuarão a aumentar, ressaltando a importância de ampliar também o acesso aos cuidados de saúde (Mburu; Odame, 2019). Entretanto, a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes dependem do desenvolvimento econômico e social do país onde moram, da existência de cuidados em saúde e das condições de acesso. Nos países desenvolvidos o número de pessoas com a doença aumenta com a melhoria na expectativa de vida devido a melhores intervenções em saúde. Em contextos sociais mais pobres a mortalidade infantil de pacientes com DF prevalece. (Piel; Steinberg; Rees, 2017).

Sabe-se que a maioria dos pacientes com a doença falciforme nascem e vivem em países da África, onde o ônus mundial da doença predomina. No Brasil a DF está relacionada a diáspora africana marcada pela escravização que gerou impactos sociais e econômicos para a população negra, que vive historicamente com menor acesso à informação e serviços de saúde adequados. (Lettre; Bauer, 2016). Neste contexto, o empobrecimento da população negra é um fator crítico adicional para famílias acometidas pela DF, que enfrentam barreiras sociais e clínicas como dificuldades para manter o cuidado adequado durante a infância, insegurança alimentar, evasão escolar e na vida adulta problemas com trabalho e renda devido às crises causadas pela doença (Berghs *et al.*, 2020; Mota., *et al.*, 2024; Khan *et al.*, 2023). A defasagem educacional é outro fator limitante aos resultados do tratamento. alguns estudos apontam a importância da educação contínua de cuidadores de crianças com DF sobre conhecimentos específicos da doença, para que sejam adequadamente informados sobre a procura dos sistemas de saúde e adesão correta ao tratamento, o que tem impacto sobre a qualidade de vida e o número de atendimentos emergenciais. (Khan *et al.*, 2023; Carden *et al.*, 2016; Morrison *et al.*, 2018). A falta de acesso à educação básica, a evasão escolar o baixo nível socioeconômico contribuem para o desemprego e a medida que os pacientes envelhecem estes e suas famílias enfrentam mais dificuldades para conciliar as fontes de renda e a necessidade de cuidados e limitações da doença crônica (Sanger *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2023). A rotina de atendimentos de emergência de pacientes com DF tem alto custo e a qualidade de vida é ainda mais reduzida durante a vida adulta, causando efeitos sociais e psicológicos sobre os pacientes e suas famílias. Além disso, a maior parte dos avanços em tratamento não estão disponíveis nos países mais pobres. Em países de baixa renda a triagem neonatal é rara e não é universal em nenhum país africano (Therrell; Padilla, 2014; Kato, 2018)

Por se tratar de uma condição que afeta populações em situação de vulnerabilidade social, observa-se falta de dados e desigualdades no acesso ao tratamento adequado. (Farooq *et al.*, 2020; Bulgin; Tanabe; Jenerette, 2018; Marsh; Kamuya; Molyneux, 2011; WHO Regional Committee for Africa, 2020). A escassez de diagnósticos adequados, coleta de dados e ações para o monitoramento da doença falciforme dificulta a precisão dos dados epidemiológicos, mesmo em países de alta renda e sistemas de registros bem equipados. (Paulukonis *et al.*, 2016). O contexto

racial da DF produz disparidades no financiamento de pesquisas que resultam em menos recursos para uma doença que tem alta prevalência, mas foi negligenciada e ainda permanece com poucos medicamentos aprovados e acessíveis. Com isso, a expectativa de vida de pacientes com anemia falciforme é de aproximadamente 40 anos, metade da expectativa de vida da população geral. Isto traz a reflexão sobre o racismo associado a DF que, ao atingir populações majoritariamente negras, não é priorizada pelas políticas de saúde apesar de sua relevância mundial, tanto em prevalência como letalidade e o sofrimento que causa aos pacientes (Mota *et al.*, 2024; Power-Hays; McGann, 2020).

A população de pacientes com DF, mesmo em países com mais recursos, sofre não somente as consequências de um problema de saúde grave, mas também o racismo estrutural que impacta o financiamento das pesquisas, o acesso e a qualidade da prestação dos cuidados à saúde. Além disso, muitas vezes o racismo interpessoal resulta em marginalização dos pacientes com anemia falciforme e falta de sensibilidade às suas dores. Isto tem impacto no manejo da doença e tem sido associado à gestão imprópria da dor resultando em tratamento inadequado e mais sofrimento. Estudos mostraram que pacientes afro-americanos negros com doença falciforme enfrentam mais atrasos no atendimento do que pacientes não negros (Haywood *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2018; Stanton *et al.*, 2010). A discriminação nos sistemas de saúde pode ser um fator de risco significativo para doenças crônicas como DF. Além do atendimento inadequado, a experiência negativa na unidade de saúde reduz a confiança entre o paciente e o profissional de saúde reduzindo a adesão às recomendações médicas e aumentando a frequência das crises e complicações. Porém, apesar de ser um determinante social importante na DF, a associação entre o estigma da discriminação racial e seu impacto sobre a saúde geral e a qualidade de vida dos pacientes tem sido pouco estudada (Martin *et al.*, 2018, Khan *et al.*, 2023; Lanzkron *et al.*, 2021; Power-Hays; McGann, 2020, Stanton *et al.*, 2010; Haywood *et al.*, 2014).

No Brasil, os estudos sobre saúde da população negra até a década de 1960 foram conduzidos com base no racismo institucional que propunha o extermínio de uma “raça impura e inferior”. (Oliveira, 2003). Em 1995 associações de pessoas com DF e seus familiares apoiadas pelo Movimento Negro Brasileiro na Marcha Zumbi dos Palmares pela Cidadania e pela Vida, conquistaram a realização do primeiro evento oficial do Ministério da Saúde para definir áreas de

trabalho prioritárias em saúde para a população negra. Em 1996 foi criado o primeiro Programa de Anemia Falciforme do Ministério da Saúde – PAF/MS, como uma diretriz completa para a atenção à anemia falciforme, que previa o diagnóstico, tratamento e o apoio às associações de falcêmicos e às instituições de pesquisa, que foi considerado a conquista política mais importante do Movimento Negro brasileiro na área da saúde. Mas somente em 2001 foi criada Federação Nacional das Associações de Pessoas com Doença Falciforme (FENAFAL) e ocorreu a inclusão da Anemia Falciforme no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) através da Portaria nº 822, de 6 de junho de 2001. Em 2002 o Ministério da Saúde aprovou o uso de hidroxiuréia para pessoas com DF (Brasil, 2002). Em 2005, a Portaria nº 1.391 instituiu a Política Nacional de Atenção Integral a Pessoas com Doença Falciforme (PNAIPDF), que representou pela primeira vez a destinação de recursos no Plano Orçamentário Plurianual 2004-2007 (Brasil, 2005; Mota *et al.* 2024). Apesar de ter sido implementado em 2001, o PNTN se tornou disponível em todos os estados a partir de 2017, embora a cobertura seja altamente variável entres os estados (Kato; Piel, 2018).

As últimas décadas que representaram melhorias nas políticas de saúde em DF não apresentaram avanços constantes e as conquistas oficiais sofreram retrocessos, demandando ações de mobilização dos movimentos sociais (Mota *et al.* 2024). A implementação do acesso amplo a todos os cuidados adequados para os pacientes com doença falciforme ainda é um desafio e o diagnóstico pelo PNTN, no “teste do pezinho”, atinge 84% a 95% com disparidades de um estado para outro. Além disso, a subnotificação é recorrente por ineficiência ou desinteresse no preenchimento de prontuários médicos que frequentemente não apresentam a correspondente Classificação Internacional de Doenças (CID) D-57 como doença de base. É preciso intensificar as informações prestadas aos profissionais de saúde e pacientes para a adoção de medidas de prevenção de complicações e promoção da saúde, considerando os pacientes de forma global e integrada para reduzir a mortalidade e melhorar a sua qualidade de vida (Mota *et al.* 2024; Silva-Pinto *et al.*, 2019).

O tratamento para a DF está preconizado no SUS através do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença Falciforme (PCDT-DF), portarias, orientações e manuais (Brasil, 2023) O PCDT-DF em sua versão vigente de 2018 recomenda o tratamento com hidroxiuréia para indivíduos a partir dos 2 anos de idade e em casos

especiais para a faixa etária entre 9 meses e 2 anos (Brasil, 2018). São também necessários cuidados abrangentes ao longo da vida, a fim de diminuir a ocorrência de manifestações clínicas e aumentar a expectativa e a qualidade de vida do paciente. O conteúdo do PCDT-DF passou por consulta pública recente e encontra-se disponível o Relatório Preliminar do PCDT-DF 2024, em processo de atualização. A nova versão PCDT-DF 2024 recomenda uma assistência mais ampla e multiprofissional, incluindo alimentação, saúde bucal, fisioterapia e assistência oftalmológica, além disso traz como principais alterações a ampliação do tratamento com HU e da indicação de TCTH e a inclusão do uso de alfaepoetina em adultos com DF com declínio da função renal e piora dos níveis de hemoglobina. (Brasil, 2024).

A primeira medida para melhorar os resultados e a qualidade dos dados é o diagnóstico precoce através da triagem neonatal, combinada com o tratamento adequado e preventivo dos riscos de agravamento (Cançado *et al.*, 2021, Global Burden of Disease Study, 2023). Além disso, é importante a universalização de programas de triagem que ajudam a identificar a mutação e indivíduos em risco de ter filhos com doença falciforme e o aconselhamento genético, permitindo decisões informadas de planejamento familiar e fornecendo cuidados de apoio para indivíduos afetados e suas famílias (Elendu C *et al.*, 2023).

A abordagem multiprofissional é de fundamental importância para pessoas com DF. Em unidades próximas a residência, a assistência pode ser integrada a programas de saúde pertinentes às suas faixas etárias, como programas de saúde da criança, do adolescente, da mulher, do homem. É necessário ainda garantir a promoção da saúde bucal, da vigilância nutricional e do autocuidado, considerando a vulnerabilidade do paciente e sua capacidade para o autocuidado, como o objetivo de ampliar a autonomia das pessoas com DF. Além disso, devem ser mantidos os cadastros de todas as pessoas atendidas nas unidades, com busca ativa dos ausentes, e prestar assistência regular e permanente às famílias. Assim, a partir do diagnóstico precoce através do PNTN e acompanhamento desde os primeiros meses de vida, a criança e sua família precisam de assistência multiprofissional e humanizada, em ambiente de fácil acesso e confortável para o atendimento pelos trabalhadores de saúde com uma escuta atenta, com linguagem acessível ao público leigo. (Brasil, 2015).

Além do tratamento da dor e prevenção de complicações clínicas, fatores sociais devem ser considerados na prestação de cuidados. Os fatores biomédicos são

considerados principais para os resultados de saúde, mas em DF fatores de risco sociais aumentam a frequência de hospitalizações, morbidade e mortalidade. (Berghs *et al.*, 2020). Intervenções no estilo de vida e o aconselhamento como estratégias atuais para prevenir complicações da DF não abordam as barreiras sociais e clínicas associadas à doença, como as disparidades na saúde (Andermann; CLEAR Collaboration, 2016). Mesmo quando existe o acesso aos cuidados padronizados no ambiente hospitalar, pacientes em vulnerabilidade social retornam à realidade de pobreza e a insegurança alimentar que contribuíram para a hospitalização, não alcançando totalmente os benefícios do tratamento (Kumar; Chaudhary; Achebe, 2020; Glassberg *et al.*, 2012).

Dessa forma, uma assistência mais ampla aos pacientes com DF com atenção aos determinantes sociais da saúde é essencial para desenvolver intervenções específicas e maximizar os benefícios para esta população vulnerável. (Berghs *et al.*, 2020). As necessidades psicossociais, o contexto familiar e apoio à saúde emocional é fundamental para a relação de confiança entre pacientes e profissionais de saúde e pode contribuir para reduzir a gravidade da doença, necessidade de hospitalizações e propiciar melhor qualidade de vida (Stanton; Jonassaint; Bartholomew *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2022). São necessárias medidas de combate à discriminação no sistema de saúde, melhorias da educação para profissionais de saúde e ações políticas para corrigir as disparidades no tratamento para pessoas negras (Batina *et al.*, 2017; Power-Hays; Ware, 2020; Mezei; Murinson, 2011; Meghani; Byun; Gallagher, 2012).

A DF atinge milhões de pessoas no mundo com maior impacto nas populações negras e de maior vulnerabilidade social, com alta morbidade e mortalidade, mas os padrões recentes de migração conferem à DF um impacto global, acometendo milhões de pessoas de diversas etnias em todo o mundo (The Lancet Haematology, 2022, Khan *et al.*, 2023). Porém, seu diagnóstico é simples e existem opções de tratamento de baixo custo. A colaboração entre instituições de saúde de países ricos e de poucos recursos pode melhorar a universalização do acesso a investigação e conhecimento que poderão resultar em melhor compreensão da doença e distribuição de recursos como terapias modificadoras e curativas. É necessário maior atenção e compromisso das organizações de saúde, pesquisadores e tomadores de decisão, além de incentivo a programas que permitam que indivíduos oriundos de populações acometidas pela doença se tornem parte da força de trabalho de assistência, pesquisas e políticas de saúde. A partir da compreensão mais ampla da DF sob uma

perspectiva de saúde global, através de iniciativas colaborativas é possível reverter o impacto de anos de negligência e trazer a esperança de uma vida plena e saudável para todos os pacientes com doença falciforme. (Mota, 2024; Ware, 2013; Power-Hays, 2020; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; 2020; American Society of Hematology, 2021).

2.9 Fatores prognósticos em Doença Falciforme

A grande variabilidade clínica é uma das características da DF, o que torna difícil explicar ou prever as diferentes manifestações clínicas, a ocorrência de complicações graves, como STA, e também a sobrevida (Rees, 2022). Os haplótipos do gene *HBB* estão entre os primeiros fatores associados a gravidade da AF devido às diferenças observadas nos fenótipos de acordo com as regiões de origem. Porém, apesar de sua associação aos níveis de HbF, não há consenso sobre impacto prognóstico dos haplótipos limitando a aplicação clínica da haplotipagem em pacientes (Rees, 2022).

Os níveis de HbF permanecem como fator prognóstico mais importante para DF. O aumento de HbF geralmente está associado a um fenótipo de doença mais leve e vantagem de sobrevivência, mas seus níveis precisam ser interpretados com cautela, em conjunto com outras informações, como a contagem de reticulócitos e hemoglobina total (Platt, 1994; Rees, 2022).

O prognóstico da doença falciforme também está relacionado ao número de genes da globina α da hemoglobina. Normalmente cada pessoa tem 4 genes da globina α , um par em cada cromossomo 16, representado como $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. A deleção em um dos pares de genes pode ser herdada de um dos pais ($\alpha\alpha/\alpha-$), conhecida como α -talassemia α^+ heterozigótica, ou de ambos os pais ($\alpha-/alpha-$), conhecida como talassemia α^+ homozigótica. Essas formas são comumente encontradas em populações com DF. O tipo de deleção mais prevalente em pessoas de ascendência africana é $-3,7\text{kb}$, que remove parte de ambos os genes da globina α (Serjeant; Vichinsky, 2018). Estima-se que 30-35% dos pacientes com DF sejam heterozigotos ($\alpha\alpha/\alpha-$) com 3-5% homozigotos para a deleção ($\alpha-/alpha-$). Também foi relatada alta prevalência da deleção de $3,7\text{kb}$ no gene da globina α entre pacientes com AF no Brasil (29%) (Steinberg, 1986; Belisário *et al.*, 2010; Rees, Brousse, Brewin, 2022). A α -talassemia reduz a tendência de polimerização de HbS ao reduzir a concentração de hemoglobina em cada eritrócito, reduzindo assim a taxa de hemólise (Ceulaer, *et al.*, 1983). Os efeitos clínicos da α -talassemia são geralmente benéficos, mas

variáveis, incluindo a redução de eventos como vasculopatia cerebral, AVE e infartos cerebrais silenciosos, proteinúria, cálculos biliares, úlceras nas pernas e priapismo (Belisário, 2010; Ceulaer, 1983; Rees, 2022). No entanto, a frequência da dor não é reduzida e pode ser aumentada na α -talassemia homozigótica (Billett; Nagel; Fabry, 1995). Há também aumento da taxa de necrose avascular, do risco de sequestro esplênico na infância e não há vantagem de sobrevida global em pacientes com AF e co-herança de α -talassemia (Platt *et al.* 1994; Gardner *et al.*, 2016). Além, disso acidentes vasculares cerebrais isquêmicos ocorreram em irmãos com mais frequência e a α -talassemia contribuiu para esta herdabilidade (Billett, 1995; Ballas, 1989; Rees, Brousse, Brewin, 2022). Em pacientes com HbSC, a co-herança da α -talassemia também leva a um fenótipo mais brando ao reduzir os episódios dolorosos, risco de sequestro esplênico agudo e o risco de osteonecrose, além de maior taxa de sobrevivência geral (Rezende *et al.*, 2019).

O genótipo heterozigoto HbS/ β -talassemia ainda não é bem compreendido sobre seu papel prognóstico. O efeito na gravidade da doença depende do tipo de variante da talassemia β , e há um equívoco em classificar toda talassemia HbS/ β^+ como doença mais leve. Variantes graves de talassemia β^+ causam doença grave semelhante à talassemia HbS/ β^0 (Oliveira, 2024; Rees, 2022).

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) tem um papel importante na proteção da hemoglobina contra danos por estresse oxidativo, e sua deficiência levaria à diminuição dos níveis de NO, contribuindo para a disfunção vascular. Apesar deste mecanismo plausível, não se demonstrou nenhuma associação consistente com a deficiência de G6PD e o impacto da deficiência de G6PD para o risco de AVE ainda não é claro (Leopold, *et al.*, 2001; Rees, 2022). A deficiência de G6PD mostrou-se associada ao aumento da anemia e contagens mais altas de reticulócitos na primeira infância, mas sem aumento do risco de eventos cerebrovasculares (Benkerrou, *et al.*, 2013).

A nefropatia falciforme, que afeta até um terço dos pacientes com AF e está associada ao aumento da mortalidade, começa na infância, com hiperfiltração glomerular, e progride com proteinúria tipicamente a partir de aproximadamente 10 anos. À medida que eventos de vaso-oclusão se tornam recorrentes e ocorre isquemia crônica, estes causam necrose papilar e fibrose medular. A α -talassemia fornece um forte efeito protetor contra o desenvolvimento de nefropatia falciforme. (Elmariah, *et al.*, 2014; Aygun, *et al.*, 2011; Rees, 2024).

Além de fatores genéticos, os sintomas da AF também são significativamente afetados por fatores ambientais. O espectro de infecções em diferentes contextos geográficos contribui para a variabilidade clínica da AF. Estima-se que apenas 50% dos pacientes com AF sobrevivam à infância em muitos países africanos e a exposição a agentes infecciosos é provavelmente a causa mais importante de morte prematura na África (Makani, *et al.*, 2011). O hipoesplenismo tem um papel fundamental no aumento da suscetibilidade a infecções bacterianas observadas em crianças com anemia falciforme. Por isto, intervenções básicas como a profilaxia com penicilina e vacinações, poderiam levar a uma melhoria substancial na sobrevivência de pacientes com DF em todo o mundo. As infecções virais também estão associadas ao aumento de complicações na doença falciforme, com algumas cepas de influenza causando uma alta incidência STA (Brousse; Buffet; Rees, 2014; Williams, *et al.*, 2009; Inusa *et al.*, 2010).

Sabe-se que o clima frio é mais propício a dor aguda. Isto se deve ao fato de a exposição ao frio causar vasoconstrição periférica, fluxo sanguíneo mais lento e níveis mais elevados de hemoglobina desoxigenada, levando a taxas mais rápidas de polimerização da HbS e a taxas aumentadas de vaso-oclusão e dor (Mekontso Dessap *et al.*, 2014; Rees, 2022). Além disso, poluentes atmosféricos como o aumento dos níveis de ozônio são fortemente associados à exacerbação da asma e sibilos, ambos associados a um risco aumentado de complicações da DF (Barbosa, *et al.*, 2015; Willen, 2019; Rees, 2022). Alguns efeitos ambientais são potencialmente mais fáceis de modificar do que os fatores genéticos, sendo passíveis de mudanças relativamente simples no comportamento e nas medidas de saúde pública. Porém, estes podem se tornar mais significativos no futuro, com as alterações climáticas e a deterioração da qualidade do ar. Apesar disso o impacto das questões ambientais na DF ainda são relativamente pouco estudadas e pouco compreendidos (Rees, 2022).

Além dos fatores prognósticos gerais da gravidade da doença falciforme é importante identificar fatores que possam prever o risco de complicações específicas. À medida que novos tratamentos são desenvolvidos e uma combinação de tratamentos diferentes se torna possível, é cada vez mais importante o conhecimento sobre fatores prognósticos úteis no estágio inicial da vida dos pacientes. Isto permitiria a escolha de tratamentos individualizados e a decisão por terapias curativas disponíveis ao identificar pacientes propensos a ter um curso mais grave da doença (Rees, 2022). Apesar de numerosos estudos, fatores prognósticos precoces, robustos

e validados são escassos na DF (Tabela 1). Complicações precoces potencialmente fatais, como STA, sequestro esplênico agudo, infecção invasiva grave ou acidente vascular cerebral, exigem a identificação de pacientes em risco e um marcador confiável e preciso nos primeiros meses de vida. No geral, níveis baixos de HbF, alta contagem de reticulócitos e baixos valores de Hb medidos em bebês parecem ser os únicos marcadores de um curso grave da doença em crianças. No entanto, para a previsão individual, nenhuma dessas medidas é suficientemente prognóstica para facilitar decisões de manejo específicas. Neste contexto, ainda é desejável a melhor investigação sobre marcadores genéticos de fácil identificação na infância como os haplótipos e sobretudo sua associação com desfechos graves como por exemplo STA.

Tabela 1: Fatores prognósticos identificados na infância potencialmente associados a desfechos em crianças e adultos com DF.

Característica	Origem	Efeitos
α-talassemia	Genética	Redução do risco de cerebrovascular doença, cálculos biliares, úlceras nas pernas, nefropatia, priapismo Possível aumento do risco de dor, necrose avascular articular
Deficiência de G6PD	Genética	Provavelmente aumento do risco de anemia mais grave Possível aumento do risco de doença cerebrovascular
Maior %HbF	Genética	Risco reduzido de dor, STA, úlceras de perna. Melhor sobrevida
Maior nível de Hb	Genética e Ambiental	Menor risco de doença cerebrovascular
Maior % reticulócitos	Genética e Ambiental	Aumento do risco de doença cerebrovascular, morte durante a infância
Maior Contagem de Leucócitos	Genética e Ambiental	Aumento do risco de doença cerebrovascular, STA, dor e morte na infância
Clima Frio	Ambiental	Aumento do risco de dor aguda e infarto esplênico
Baixa condição socioeconômica	Ambiental	Aumento do risco de todos os resultados adversos, incluindo morte na infância

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS:

3.1 Hipótese:

Os desfechos clínicos de maior gravidade (ex: STA, AVE, sequestro esplênico) podem estar relacionadas a variações de fatores genéticos e moleculares entre os pacientes com diagnóstico de doença falciforme de acordo com o padrão de haplótipos ancestrais do gene *HBB*.

3.2 Objetivo geral:

Avaliar o impacto prognóstico dos padrões de haplótipos do gene *HBB* de ancestralidade africana em pacientes com doença falciforme, com ênfase no perfil CAR.

3.3 Objetivos específicos:

- I – Descrever a distribuição dos haplótipos de ancestralidade africana de pacientes com Doença Falciforme;
- II – Analisar a potencial associação entre o haplótipo CAR homocigoto e heterocigoto e as manifestações clínicas da Doença Falciforme, em especial os eventos clínicos mais graves;
- III – Analisar a associação entre o haplótipo CAR homocigoto e heterocigoto e os parâmetros laboratoriais dos pacientes com Doença Falciforme;
- IV – Analisar a associação entre o haplótipo CAR homocigoto e heterocigoto e a resposta ao tratamento com Hidroxiuréia.
- V – Analisar se a presença do genótipo CAR/CAR é fator prognóstico independente para STA

4. METODOLOGIA

4.1. Local e fases do estudo:

Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ): coleta de amostras de sangue e registro dos dados clínicos e laboratoriais de pacientes referentes ao período 2010-2014.

Núcleo Transdisciplinar de Investigação em Saúde da Criança e do Adolescente - IPPMG/ UFRJ: coleta de amostras de sangue, registro dos dados clínicos e laboratoriais de pacientes no período 2018-2019. Análises laboratoriais de haplótipos no período 2018-2019 e análises estatísticas.

4.2 Questões éticas:

Neste trabalho foram utilizadas amostras previamente coletadas na UERJ e no Núcleo Transdisciplinar de Investigação em Saúde da Criança e do Adolescente – IPPMG/UFRJ (NTISCA), através de projetos anteriores aprovados em comitês de ética das instituições. Todos os pacientes e seus respectivos responsáveis legais foram informados sobre os projetos relacionados e concordaram com a doação do material através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. As amostras de sangue periférico foram armazenadas no NTISCA durante a realização do projeto. O trabalho está em consonância com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/2012 e foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do IPPMG/UFRJ (CAAE no. 64913617.7.0000.5264) e do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ (HUPE) (CAAE no. 57862016.5.0000.5259).

4.3 Desenho do estudo:

Estudo retrospectivo, analítico e observacional.

4.4 Pacientes, amostras, critérios de inclusão e exclusão:

4.4.1 Pacientes:

Pacientes da cidade do Rio de Janeiro portadores de doença falciforme com mediana de idade de 21 anos, matriculados no HUPE ou no IPPMG/UFRJ. Os pacientes foram acompanhados por no mínimo 1 ano

e a média geral do tempo de acompanhamento no ambulatório foi 11 anos. Foram analisados os dados de pacientes em acompanhamento entre os anos de 2010 a 2014 no HUPE e de 2018 a 2019 no IPPMG.

4.4.2 Amostras:

As amostras de DNA utilizadas nesse trabalho foram extraídas a partir da coleta de sangue periférico em EDTA dos pacientes selecionados. Foram incluídas no estudo amostras de 83 Pacientes HbSS (anemia falciforme) e 19 Pacientes HbSX (outras doenças falciformes), entre estes 14 pacientes HbSC, 3 pacientes HbSD e 2 pacientes HbSB+, totalizando 102 pacientes com doença falciforme e com dados clínicos e laboratoriais disponíveis em seus prontuários.

4.4.3 Critérios de inclusão e exclusão:

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de doença falciforme com dados clínicos e laboratoriais disponíveis do período de 2010 a 2014. Foram excluídos do estudo os pacientes os quais as amostras de DNA não estavam disponíveis para a análise de haplótipos.

4.5 Variáveis do estudo:

As amostras de pacientes com doença falciforme foram analisadas quanto aos padrões ancestrais de haplótipos do gene *HBB* (CAR, BEN, SEN, CAM). Utilizou-se um banco de dados dos pacientes que foi organizado para análise da evolução clínica e dos parâmetros laboratoriais, que correspondem as seguintes variáveis: sexo, idade, transfusões de concentrado de hemácias, internações hospitalares, episódios dolorosos, infecções bacterianas, infecções virais, crise aplásica, colelitíase, colecistite ou coledocolitíase, úlcera de perna, síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular encefálico (AVE), sequestro esplênico, haplótipo, genótipo da hemoglobina, uso de hidroxiuréia, hemácias (Hm - $\times 10^6/\text{mm}^3$), hematócritos (Ht - %), hemoglobina total (Hb - g/dL), volume globular médio (VGM - fL), hemoglobina globular média (HGM - pg), concentração de hemoglobina globular média (CHGM - g/dL), hemoglobina fetal basal (HbF - %), hemoglobina S (HbS - %), reticulócitos (Ret - %), leucócitos (Leuc - $\times 10^3/\text{mm}^3$), granulócitos absolutos (Gran_{abs} - $\times 10^3/\text{mm}^3$), granulócitos (GranP - %), plaquetas (mm^3), ferro (Fe - mg/dL), ferritina ($\mu\text{g/L}$), capacidade de ligação de ferro latente (CLFL - $\mu\text{g/dL}$), capacidade de ligação de ferro total (CTFL - $\mu\text{g/dL}$), índice de saturação de transferrina (IST - %), uréia (mg/dL), bilirrubina total (BT - mg/dL),

bilirrubina direta (BD - mg/dL), bilirrubina indireta (BI - mg/dL), aspartato aminotransferase (AST - U/L), alanina aminotransferase (ALT - U/L), lactato desidrogenase (LDH - U/L). Para os pacientes que fizeram tratamento com hidroxiuréia também foram analisados os níveis de hemoglobina fetal antes (HbFa) e após (HbFd) o início do tratamento com hidroxiuréia. Sobre a padronização dos dados clínicos e laboratoriais coletados, foram consideradas as informações disponíveis nos prontuários dos pacientes, de acordo com os protocolos utilizados nas instituições participantes HUPE/UERJ e IPPMG/UFRJ.

4.6 Determinação dos haplótipos de ancestralidade africana do gene da globina β (*HBB*).

A determinação dos haplótipos foi realizada após a amplificação por reação em cadeia da polimerase (*PCR*) seguida de análise de restrição *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*. O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico utilizando o kit de extração de DNA Biopur Mini Spin Plus (Mobius Life Science, Pinhais, PR), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -70°C para posterior realização da *PCR*.

As reações de *PCR* foram realizadas com um volume total de 25 μL de amostra contendo 150ng de DNA genômico, 2X Taq Green PCR Master Mix, 25pM de cada um dos *primers forward e reverse* (LGC BiosearchTechnologies, Novato, CA). A amplificação por *PCR* foi realizada no termociclador de DNA (controlador térmico programável PTC; MJ Research, Watertown, MA). As condições de amplificação foram desnaturação inicial a 94°C por 5 min seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento por 45 segundos a $52-60^{\circ}\text{C}$ (de acordo com as instruções do fabricante de cada par de primers) e extensão a 72°C por 1,5 min, com extensão final por 10 min a 72°C (Little *et al.*, 1994). Para confirmação da amplificação, o produto da *PCR* foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta para posterior análise de restrição.

O produto da *PCR* foi submetido a digestão com enzimas endonucleases de restrição específicas de cada sítio polimórfico. Adicionou-se 10 μL do produto amplificado a 1 μL de enzimas de restrição (Thermo Scientific, Waltham, MA). Incubou-se por 30 min a 37°C . Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os fragmentos separados foram identificados de acordo com seu peso molecular,

usando um padrão como marcador de tamanho a cada 50 pares de bases (MBI Fermentas, Vilnius, Lituânia). As regiões do gene *HBB* estudadas, a sequência dos primers utilizados, a posição das enzimas de restrição e os tamanhos dos fragmentos resultantes são mostrados na Tabela 2.

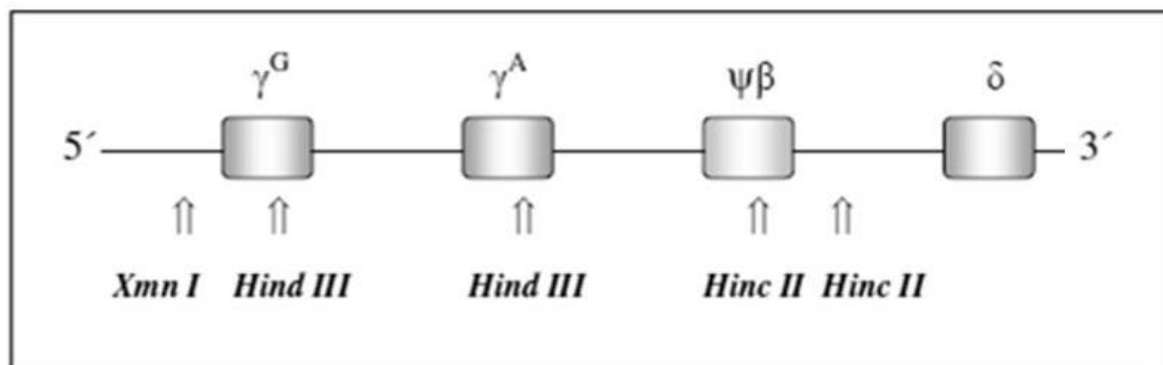
Tabela 2: Regiões, primers e fragmento obtidos em análise de restrição *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

Primer	Sequência do Primer	Sentido	Posição	Região	Tamanho do Fragmento
H0	5' AACTGTTGCTTTATAGGATTTT 3'	→	33862	5'γ ^G	650pb
H1	5' AGGAGCTTATTGATAACCTCAGAC	←	34518		
H2	5'AAGTGTGGAGTGTGCACATGA 3'	←	36203	γ ^G	780pb
H3	5' TGCTGCTAATGCTTCATTACAA 3'	→	35422		
H3	5' TGCTGCTAATGCTTCATTACAA 3'	→	40358	γ ^A	760pb
H4	5' TAAATGAGGAGCATGCACACAC 3'	←	41119		
H5	5' GAACAGAAGTTGAGATAGAGA 3'	→	46426	ψβ	701pb
H6	5' ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT 3'	←	47126		
H7	5' TCTGCATTTGACTCTGTTAGC 3'	→	49476	3'ψβ	590pb
H8	5' GGACCCTAACTGATATAACTA 3'	←	50089		

→: sense (5'→3'); anti-sense (3'→5'). *Localização do nucleotídeo da extremidade 5' do primer no cluster no cromossomo 11 (NCBI – GI: 455025)

Para determinação dos haplótipos africanos típicos foram analisados 4 sítios polimórficos: 5'γGXmn I, γG-HindIII, γA-Hind III, ψβ-Hinc II e 3'ψβ-Hinc II (Figura 11) (Sutton; Bouhassira; Nagel,1989). Cada amostra foi pontuada quanto à presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição nas regiões polimórficas do *cluster* β-globina. Utilizou-se uma amostra de indivíduo heterozigoto para cada sítio polimórfico como controle. De acordo com o perfil de restrição foram identificados os haplótipos República Centro-Africana (CAR), Benin (BEN), Senegal (SEN) e Camarões (CAM), e os haplótipos menos comuns foram classificados como haplótipos atípicos (ATP) (Tabela 3) (Powars, 1991; Rahimi; Karimi; Haghshenass *et al*, 2003).

Figura 11 – Representação dos sítios polimórficos do gene *HBB* da hemoglobina no cromossomo 11.



As setas indicam as regiões dos sítios polimórficos do *cluster* β-globina utilizados para identificação dos haplótipos. Fonte: Adaptado de Galiza Neto, G. C. *et al*, 2005.

Tabela 3: Perfis de restrição nas regiões polimórficas do cluster β-globina dos haplótipos de ancestralidade africana

Haplótipo	Xmn I	Hind III	Hind III	Hinc II	Hinc II
	5'γ ^G	γ ^G	γ ^A	ψβ	3'ψβ
CAR	-	+	-	-	-
Benin	-	-	-	-	+
Senegal	+	+	-	+	+
Camarões	-	+	+	-	+

De acordo com o perfil de ausência (-) ou presença (+) dos fragmentos de restrição específicos foram identificados os haplótipos de ancestralidade africana República Centro-Africana (CAR), Benin (BEN), Senegal (SEN) e Camarões (CAM) Adaptado de Serjeant, Vichinsky, 2018)

4.7 Análises Estatísticas:

Os indivíduos foram classificados para cada alelo do gene da hemoglobina quanto a presença dos seguintes haplótipos: CAR, CAR atípico (CARatp), Benin (BEN), Benin atípico (BENatp), Senegal (SEN), Senegal atípico (SENatp), Camarões (CAM), Camarões atípico (CAMatp) ou somente Atípico quando o haplótipo analisado não correspondeu a nenhum dos padrões de ancestralidade africana. Os indivíduos foram agrupados também de acordo com a homozigose do haplótipo CAR ou heterozigose do haplótipo CAR. Os dados dos pacientes foram analisados em 2 tipos de avaliações do haplótipo CAR:

I – Homozigose do haplótipo CAR: ao classificar os pacientes em homozigotos CAR e não homozigotos CAR

II – Categorização do Haplótipo CAR: ao classificar os pacientes em homozigoto CAR (CAR/CAR), heterozigoto CAR (CAR/outro haplótipo) e não CAR (outro haplótipo/outro haplótipo).

As análises estatísticas foram executadas com o programa SPSS Statistics®14.0 (IBM Corporation, Somers, NY, Estados Unidos). Para a comparação entre medianas das variáveis quantitativas foram utilizados testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Para comparação das frequências das variáveis categóricas entre os pacientes com DF de acordo com o haplótipo foi utilizado o teste Qui-quadrado (χ^2). Valores de p igual ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Foi realizada uma análise multivariada por regressão logística binomial. Devido à alta colinearidade entre as variáveis, optou-se por um modelo progressivo utilizando a razão de verossimilhança para determinação do método parcimonioso. Foi escolhido um modelo regressivo (*backward stepwise*) utilizando a razão de verossimilhança para determinar o método parcimonioso. Variáveis com p -valor $< 0,2$ foram selecionadas para início da análise multivariada. Os resultados foram expressos como *odds ratio* (OR), com seus respectivos intervalos de confiança (IC) e p -valor.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil dos pacientes

A amostra apresentou uma frequência maior do sexo feminino (53%), em sua maioria adultos e portadores de anemia falciforme (HbSS), outras doenças falciformes corresponderam a 18,6% dos pacientes deste estudo. A idade dos pacientes foi 5-79 anos, com mediana da idade de 21 anos. O perfil geral dos pacientes está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Perfil dos pacientes com doença falciforme

Total	Sexo		Faixa Etária		Fenótipo	
	n (%)		n (%)		n (%)	
	F	M	0-17	18-79	HbSS	HbSX*
102	54 (53)	48 (47)	34 (33,3)	68 (66,7)	83 (81,4)	19 (18,6)

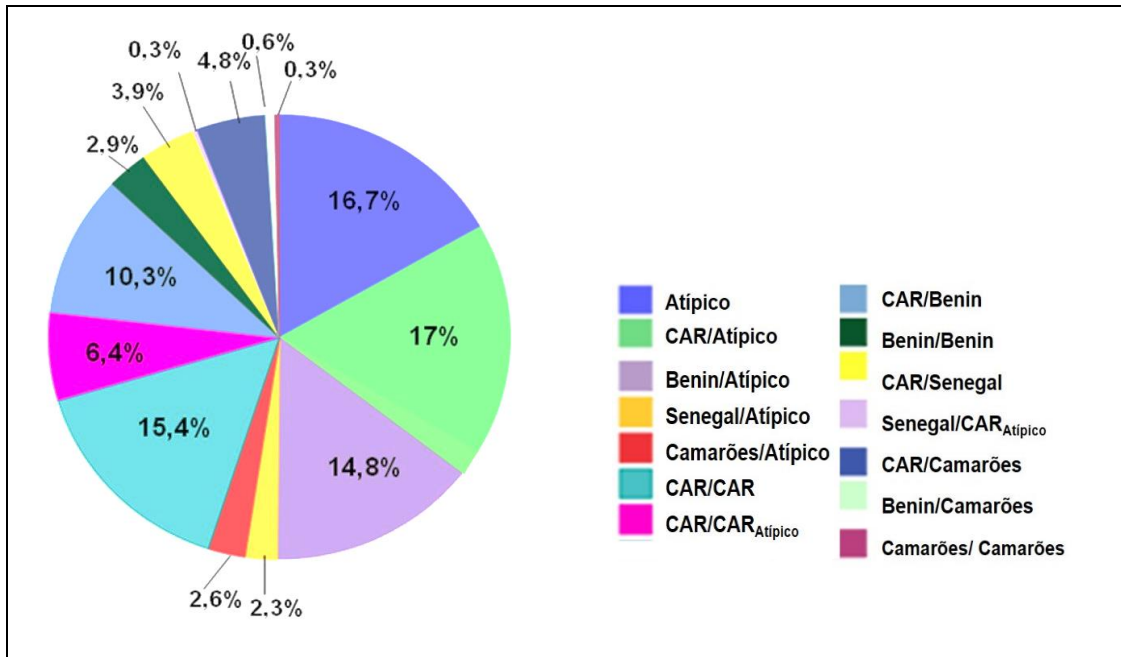
*HbSX: Pacientes com outras doenças falciformes (HbSB⁺, HbSC, HbSD)

5.2 Perfil geral de haplótipos:

Ao analisar os haplótipos, verificou-se a presença dos principais haplótipos típicos africanos (CAR, Benin, Senegal, Camarões). Houve a presença de variações atípicas de haplótipos africanos, assim como a presença de outros haplótipos não africanos que foram classificados como atípico (Figura 12). Observou-se uma distribuição de diferentes padrões de haplótipos entre os casos analisados, onde os padrões mais frequentes foram CAR/Atípico (17%), Atípico (16,7%), CAR homozigoto (15,4) e Benin/Atípico (14,8%). Em seguida o padrão CAR/Benin foi encontrado em 10,3% dos casos e 6,4% dos casos apresentaram padrão CAR/CAR_{atípico}. Os padrões com menor frequência foram CAR/Camarões (4,8%), CAR/Senegal (3,9%), Benin/Benin (2,9%), Benin/Camarões (0,6%), Senegal/Car_{atípico} (0,3%) e Camarões/Camarões (0,3%).

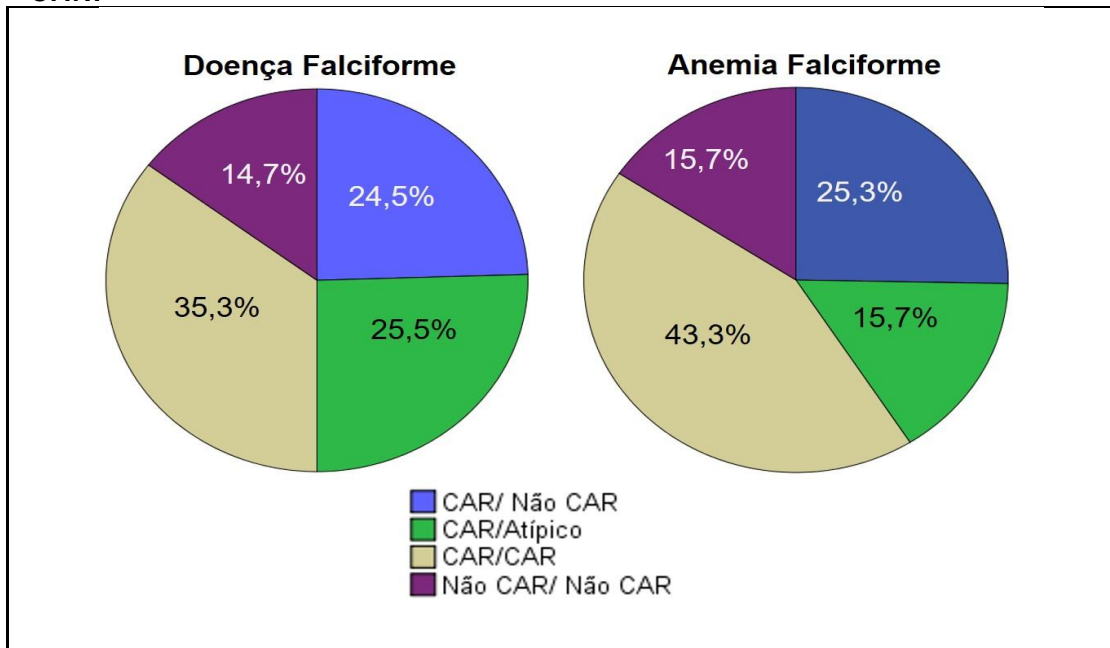
De maneira geral, observou-se que o haplótipo CAR foi o mais frequente, sendo que 21,8% dos casos apresentaram a sua forma homozigota, incluindo CAR/CAR atípico, e corresponde a maior frequência encontrada para um haplótipo em nossa coorte. Para avaliar a influência do alelo do haplótipo CAR, os casos foram classificados quanto a presença deste haplótipo, em homozigose ou heterozigose. Observou-se a presença do haplótipo CAR, em pelo menos um dos alelos, em 85,3% dos casos (Figura 13).

Figura 12 – Percentual de haplótipos de ancestralidade africana.



Perfil das amostras de acordo com a presença dos haplótipos CAR, Benin, Senegal e Camarões. As amostras que não apresentaram os haplótipos típicos de origem africana foram classificadas como Atípico.

Figura 13 – Percentual de amostras de acordo com a presença do haplótipo CAR.



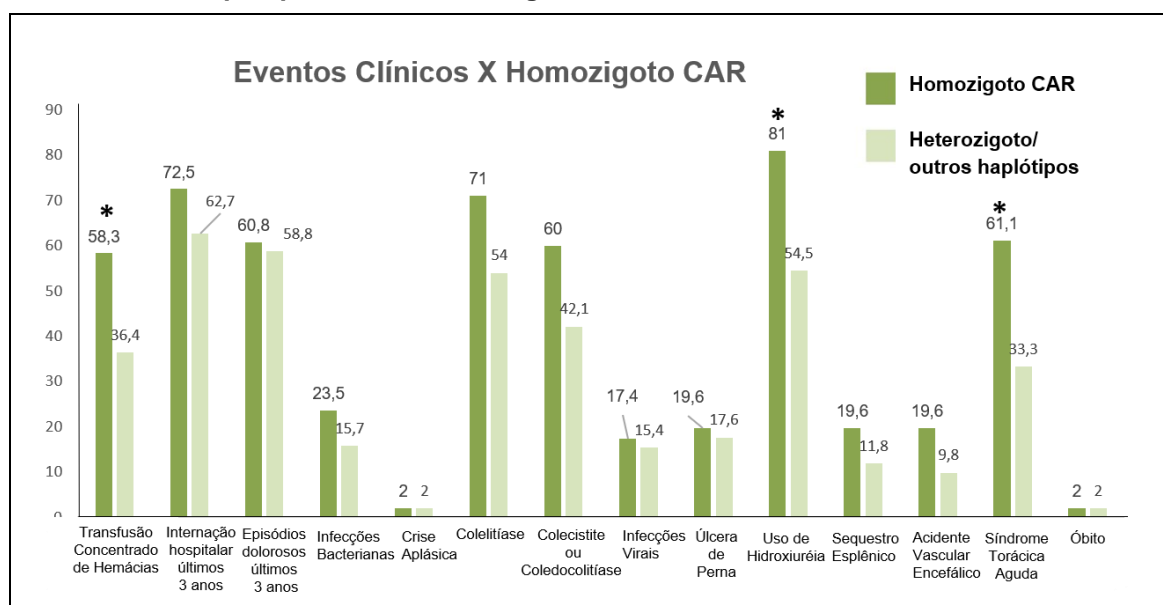
Os casos foram classificados quanto a presença de alelos com haplótipo CAR em homozigose ou heterozigose.

5.3 Influência do haplótipo CAR sobre os eventos clínicos da doença falciforme

5.3.1 Avaliação da homozigose do haplótipo CAR sobre os eventos clínicos da doença falciforme:

Ao comparar os pacientes homocigotos para CAR com os demais pacientes com doença falciforme, foram significativamente mais frequentes nos pacientes homocigotos para CAR: a necessidade de ao menos uma transfusão de concentrado de hemácias CAR/CAR (21/36, 58,3%, $p=0,039$) vs. outros perfis de haplótipos (24/66, 36,4%), tratamento com hidroxiuréia CAR/CAR (29/36, 81%, $p=0,01$) vs. outros perfis de haplótipos (36/66, 54,5%) e STA CAR/CAR (22/36, 61,1%, $p=0,012$) vs. outros perfis de haplótipos (22/66, 33,3%). Para os eventos internações hospitalares, infecções bacterianas, colelitíase e colecistite ou coledocolitíase, sequestro esplênico, AVE, crise aplásica, infecções virais, úlcera de perna e óbito as ocorrências foram similares entre homocigotos CAR ou outros perfis de haplótipos. (Figura 14, Anexo A).

Figura 14 – Percentual de pacientes com doença falciforme e os eventos clínicos de acordo com o haplótipo CAR em homocigose.



Os pacientes foram classificados pela homocigose do haplótipo CAR em Homocigoto CAR ou Heterocigoto/outras haplótipos (inclui os pacientes heterocigotos CAR). Entre os pacientes homocigotos CAR houve maior percentual de transfusão de concentrado de hemácias, uso de hidroxiuréia e síndrome torácica aguda. * $p \leq 0,05$

5.3.2 Avaliação da influência da quantidade de alelos CAR (homocigoto – 2 alelos, heterocigoto – 1 alelo ou ausência de CAR) sobre os eventos clínicos da doença falciforme.

Nesta análise os pacientes com doença falciforme foram classificados em CAR homocigoto (CAR/CAR), CAR heterocigoto (CAR/outra haplótipo) ou Não CAR (outra haplótipo/outra haplótipo).

Sobre o uso de HU, a análise estatística comparativa das frequências

demonstrou que houve significativamente maior percentual do uso de HU entre os pacientes CAR/CAR (29/36, 80,6%, $p=0,013$) vs. CAR heterozigoto (25/50, 50,0%) vs. Não CAR (11/16, 68,8%).

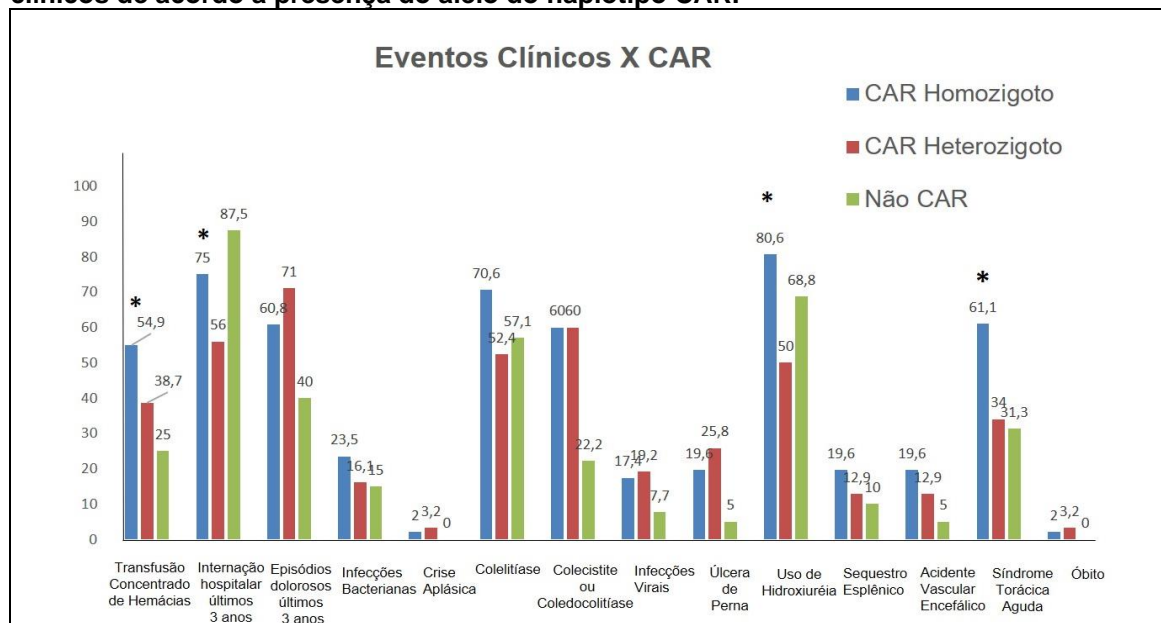
Em relação a transfusões de concentrado de hemácias houve significativamente maior percentual de transfusões entre os pacientes CAR/CAR (28/51, 54,9%, $p=0,05$) vs. CAR heterozigoto (12/31, 38,7%) vs. Não CAR (5/20, 25%).

Para internações hospitalares observou-se significativamente maior percentual de transfusões entre os pacientes Não CAR (14/16, 87,5% $p=0,032$) vs. CAR/CAR (27/36, 75%) vs. CAR heterozigoto (28/51, 56%).

Sobre STA observou-se que o percentual de casos de STA foi crescente a medida em que havia 1 ou 2 alelos do haplótipo CAR, onde o percentual de STA foi significativamente maior entre os pacientes CAR/CAR (14/36, 61,1%, $p=0,025$) vs. CAR heterozigoto (17/50, 34%) vs. Não CAR (5/16, 31,3%) (Figura 15, Apêndice A).

Os dados das análises realizadas ao selecionar apenas os casos de anemia falciforme (HbSS) estão demonstrados no Anexo B.

Figura 15 – Percentual de pacientes com doença falciforme que apresentaram os eventos clínicos de acordo a presença do alelo do haplótipo CAR.



Os pacientes foram classificados pela presença do alelo do haplótipo CAR em ausente (Não CAR), Heterozigoto CAR ou Homozigoto CAR. Entre os pacientes com 2 alelos CAR houve maior percentual de transfusão de concentrado de hemácias, uso de hidroxiuréia e síndrome torácica aguda. * $p \leq 0,05$

5.4 Influência do haplótipo CAR sobre os parâmetros laboratoriais em doença falciforme.

Nesta análise foram comparadas as medianas dos níveis laboratoriais dos pacientes classificados em CAR homozigoto (CAR/CAR), CAR heterozigoto (CAR/outro haplótipo) ou Não CAR (outro haplótipo/outro haplótipo) (Tabela 5). Observou-se nos pacientes CAR/CAR contagens menores em medianas de hemácias ($2,29 \cdot 10^6/\text{mm}^3$, IC= 2,13 - $2,39 \cdot 10^6/\text{mm}^3$, $p = 0,00$) vs. CAR heterozigoto ($2,68 \cdot 10^6/\text{mm}^3$, IC= 2,81 - $3,34 \cdot 10^6/\text{mm}^3$) vs. Não CAR ($2,49 \cdot 10^6/\text{mm}^3$, IC= 2,28 - $3,1 \cdot 10^6/\text{mm}^3$); níveis menores de hematócrito CAR/CAR (21%, IC= 19,9-22,0%, $p = 0,00$) vs. CAR heterozigoto (24%, IC = 23,3-27,3%) vs. Não CAR (21%, IC= 20,1-25,8%) e hemoglobina CAR/CAR (7,0g/dL, IC = 6,9-7,6 g/dL, $p = 0,00$) vs. CAR heterozigoto (8,4 g/dL, IC = 8,2-9,3 g/dL) vs. Não CAR (7,4 g/dL, IC = 7,0-8,9 g/dL) (Figura 16).

Ao comparar os pacientes CAR homozigotos e heterozigotos, observou-se nos pacientes CAR homozigotos níveis mais altos de Volume Globular Médio CAR/CAR (88fL, IC = 86,7-92,9fL, $p=0,006$) vs. CAR heterozigoto (83fL, IC = 82,1-87,1fL) vs. Não CAR (91fL, IC= 81,7-94,8fL), Hemoglobina Globular Média CAR/CAR (35,5pg, IC = 33,2-36,1pg, $p=0,000$), vs. CAR heterozigoto (29pg, IC = 28,5-31,7pg) vs. Não CAR (31,8pg, IC= 30-35pg); concentração de Hemoglobina Globular Média (35g/dL, IC = 34,1-35,5g/dL, $p=0,004$) vs. CAR heterozigoto (33,8g/dL, IC = 33,2-34,3g/dL) vs. Não CAR (34,2g/dL, IC = 33,1-34,8g/dL) e Reticulócitos CAR/CAR (5,3%, IC = 4,6-6,6%, $p=0,039$) vs. CAR heterozigoto (3,8%, IC = 3,6-5,2%) vs. Não CAR (2,9%, IC = 2,3-4,6%) (Figura 17).

Adicionalmente, os indivíduos CAR homozigotos apresentaram níveis mais altos de Ferro CAR/CAR (139mg/dL, IC = 125-164mg/dL, $p=0,001$) vs. CAR heterozigoto (113mg/dL, IC = 102-126mg/dL) vs. Não CAR (86mg/dL, IC = 76-122mg/dL); Índice de Saturação de Transferrina CAR/CAR (50%, IC = 45-59%, $p=0,006$), vs. CAR heterozigoto (39,5%, IC = 36-44%) vs. Não CAR (34,2%, IC = 28-45%); Lactato Desidrogenase CAR/CAR (1249U/L, IC = 1090-1571UI/L, $p=0,047$) vs. CAR heterozigoto (945 UI/L, IC = 869-1251UI/L) vs. Não CAR (855UI/L, IC = 585-1065UI/L) (Figura 18); Bilirrubina Total CAR/CAR (2,8mg/dL, IC = 2,7-4,2mg/dL $p=0,04$) vs. CAR heterozigoto (1,8mg/dL, IC = 2,0-2,9mg/dL) vs. Não CAR (1,6 mg/dL, IC = 1,4-2,4mg/dL); Bilirrubina Direta CAR/CAR (0,52mg/dL, IC = 0,51-0,76mg/dL $p=0,02$) vs. CAR heterozigoto (0,43mg/dL, IC = 0,43-0,54mg/dL) vs. Não CAR (0,46mg/dL, IC = 0,32-0,64mg/dL); Bilirrubina Indireta CAR/CAR (2,26mg/dL, IC = 2,1-3,5mg/dL

$p=0,032$) vs. CAR heterozigoto (1,9g/dL, IC = 1,5-2,3mg/dL) vs. Não CAR (1,0mg/dL, IC = 0,89-1,92mg/dL) (Figura 19); Aspartato Aminotransferase CAR/CAR (46U/L, IC = 45,5-60,5U/L, $p=0,008$) vs. CAR heterozigoto (36U/L, IC = 36,1-47,5U/L) vs. Não CAR (42U/L, IC = 29,5-69,4U/L); Alanina Aminotransferase CAR/CAR (19U/L, IC = 17,4-25,7U/L, $p=0,039$) vs. CAR heterozigoto (13U/L, IC = 14,3-19,5U/L) vs. Não CAR (19,5U/L, IC = 2,0-63,1U/L) (Figura 20).

Observou-se em geral níveis altos de Ferritina, porém os maiores níveis foram observados em pacientes Não CAR (439 $\mu\text{g/L}$, IC = 148-1275 $\mu\text{g/L}$, $p=0,013$) vs. CAR homozigotos (244 $\mu\text{g/L}$, IC = 243,7-492,4 $\mu\text{g/L}$ $p=0,046$) vs. CAR heterozigotos (140 $\mu\text{g/L}$, IC = 173-355 $\mu\text{g/L}$, $p=0,013$) vs. (Figura 18).

Também se observou níveis de Hemoglobina Fetal basal mais baixos nos pacientes CAR/CAR (4%, IC = 3,8-5,8%, $p=0,012$) vs. CAR heterozigotos (3,1%, IC = 3,2-6,2%) vs. Não CAR (6,9%%, IC = 4,97-11,1%) (Figura 16).

Os níveis de leucócitos nos pacientes CAR homozigotos ($12,5 \times 10^3$ células/ mm^3 , IC = 13,1-18,7 $\times 10^3$ células/ mm^3 , $p=0,03$) e CAR heterozigotos ($11,8 \times 10^3$ células/ mm^3 , IC = 11,0-13,0 $\times 10^3$ células/ mm^3 , $p=0,049$) foram maiores quando comparados aos pacientes sem o haplótipo CAR ($10,6 \times 10^3$ células/ mm^3 , IC = 8,8-12,8 $\times 10^3$ células/ mm^3) Para os parâmetros Hemoglobina S, granulócitos, plaquetas, capacidade de ligação de Ferro latente, capacidade de ligação de Ferro total e uréia, não observou-se diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes de acordo com o perfil do haplótipo CAR (Tabela 5).

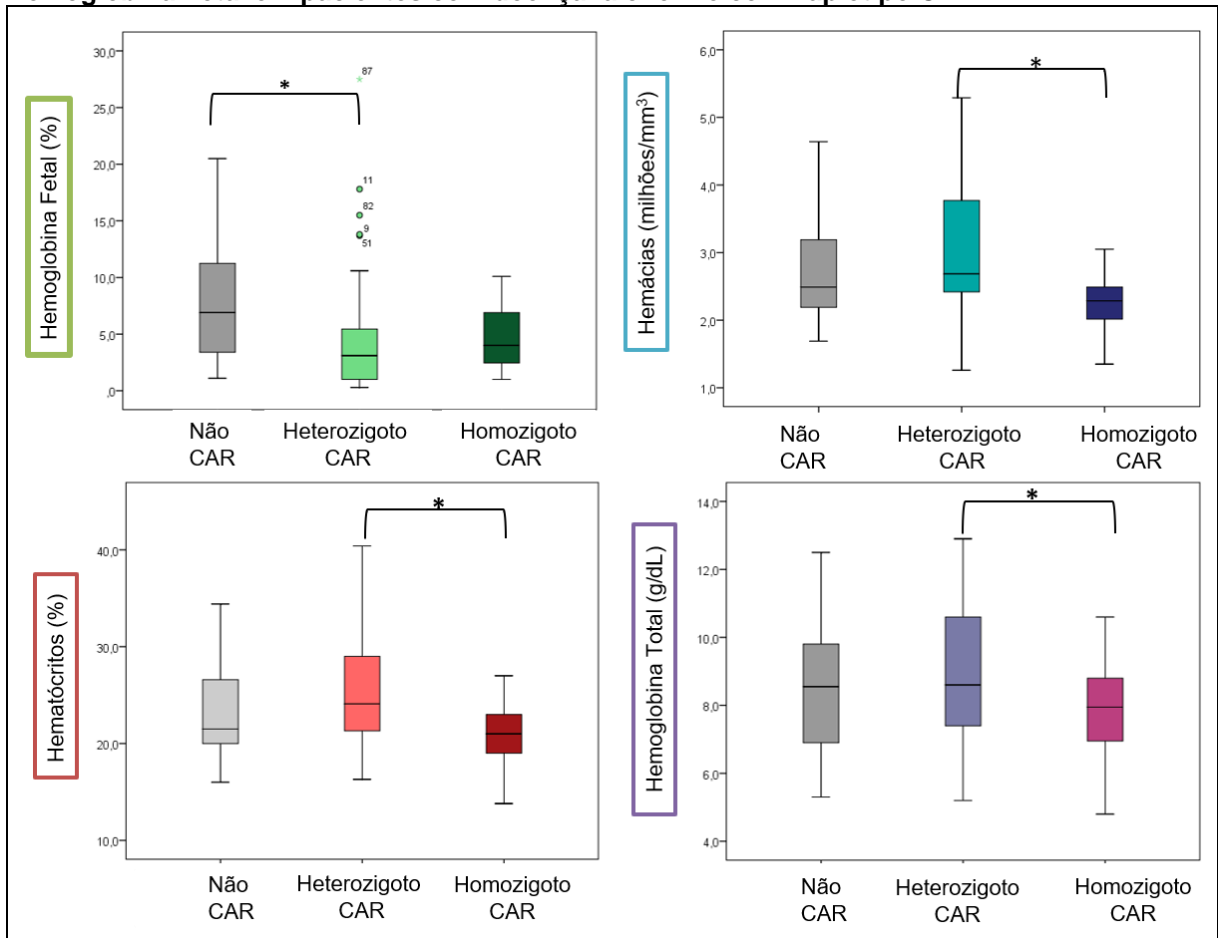
Tabela 5: Parâmetros Laboratoriais de Pacientes com Doença Falciforme de acordo com o perfil do haplótipo CAR

	Não CAR (0)		Heterozigoto CAR (1)		Homozigoto CAR (2)		p-valor Análise Estatística Univariada					
		IC		IC		IC	0 / 1	0/2	1/2			
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	2,49	2,284	3,135	2,685	2,81	3,34	2,285	2,131	2,393	0,101	0,058	0,000
Hematócritos (%)	21,5	20,775	25,813	24,1	23,362	27,377	21	19,981	22,098	0,133	0,124	0,000
Hemoglobina total (g/dL)	7,35	7,006	8,856	8,4	8,255	9,357	7,000	6,941	7,599	0,081	0,3	0,000
Volume Globular Médio (fL)	91	81,74	94,88	83	82,06	87,08	88	86,88	92,93	0,148	0,957	0,006
Hemoglobina Globular Média (pg)	31,8	30,01	35,83	29	28,52	31,71	35,5	33,21	36,11	0,038	0,331	0,000
Concentração de Hemoglobina Globular Média (g/dL)	34,2	33,16	34,79	33,8	33,28	34,29	35	34,09	35,53	0,454	0,059	0,004
Hemoglobina Fetal basal (%)	6,9	4,967	11,073	3,1	3,166	6,296	4	3,819	5,833	0,012	0,071	0,093
Hemoglobina S (%)	85,45	77,433	89,107	90,8	79,852	89,767	86,5	81,838	86,9	0,7	0,803	0,115
Reticulócitos (%)	2,875	2,361	4,699	3,8	3,597	5,219	5,3	4,562	6,633	0,262	0,019	0,039
Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	10,65	8,819	12,826	11,8	11,079	13,008	12,5	13,141	18,744	0,304	0,03	0,049
Granulócitos Absolutos (x10 ³ /mm ³)	4,6	3,76	6,262	5,43	4,788	6,092	4,9	4,896	7,228	0,177	0,374	0,811
Granulócitos (%)	52,5	46,29	57,71	51	48,2	55,25	55,2	50,49	59,19	0,825	0,359	0,173

Tabela 5 – Continuação

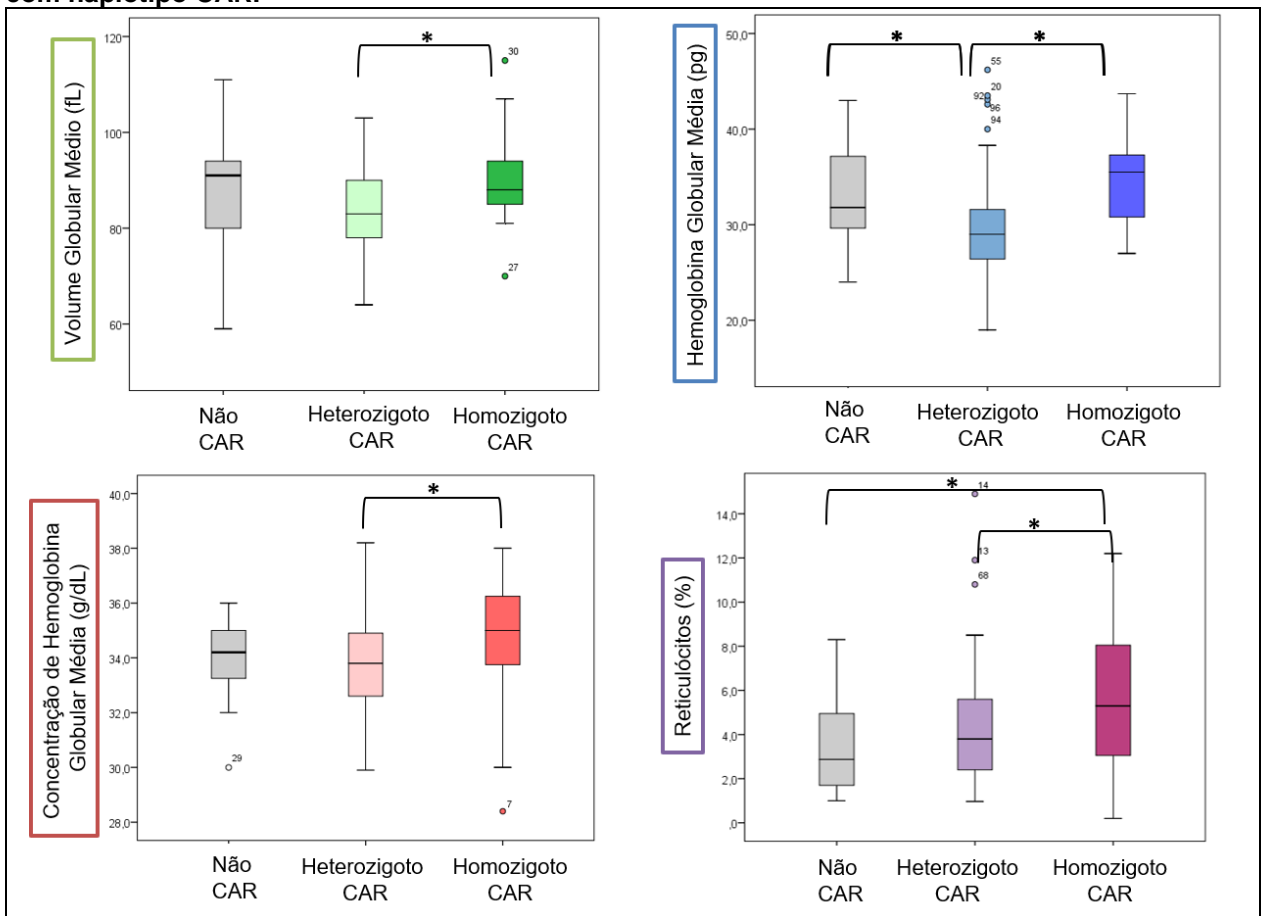
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	354,5	287,37	430,73	408	344,13	458,45	399	365,38	458,96	0,239	0,173	0,791
Ferro (mg/dL)	86	76,27	122,01	113	102,51	126,41	139	125,53	164,18	0,188	0,008	0,010
Ferritina (µg/L)	438,6	147,952	1275,476	140	173,586	355,528	244,2	243,656	492,413	0,013	0,181	0,046
Capacidade de Ligação de Ferro Latente (µg/dL)	182	154,09	222,97	204	168,09	206,23	192	147,2	190,58	0,857	0,411	0,335
Capacidade de Ligação de Ferro Total (µg/dL)	294	255,59	321,25	298	272,49	318,16	298	280,37	324,86	0,842	0,533	0,783
Índice de Saturação de Transferrina (%)	34,29	28,508	45,236	39,5	36,153	44,075	50	45,306	59,054	0,282	0,006	0,006
Ureia (mg/dL)	19	14,733	23,113	19,5	17,854	21,771	17	15,781	20,252	0,791	0,633	0,225
Bilirrubina Total (mg/dL)	1,67	1,369	2,406	1,805	2,047	2,919	2,765	2,659	4,2	0,262	0,007	0,04
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,465	0,323	0,648	0,435	0,433	0,541	0,525	0,514	0,764	0,51	0,054	0,02
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	1,02	0,895	1,92	1,195	1,533	2,346	2,26	2,055	3,522	0,223	0,008	0,032
Aspartato Aminotransferase (U/L)	42	29,57	69,43	36	36,14	47,5	46	45,54	60,58	0,554	0,162	0,008
Alanina Aminotransferase (U/L)	19,5	2,01	63,11	13	14,32	19,48	19	17,48	25,68	0,074	0,713	0,039
Lactato Desidrogenase (U/L)	855,5	585,58	1065,99	945	868,73	1251,89	1248,5	1090,25	1571,68	0,241	0,014	0,047

Figura 16 – Parâmetros Laboratoriais: Hemoglobina Fetal, Hemácias, Hematócritos e Hemoglobina Total em pacientes com doença falciforme com haplótipo CAR.



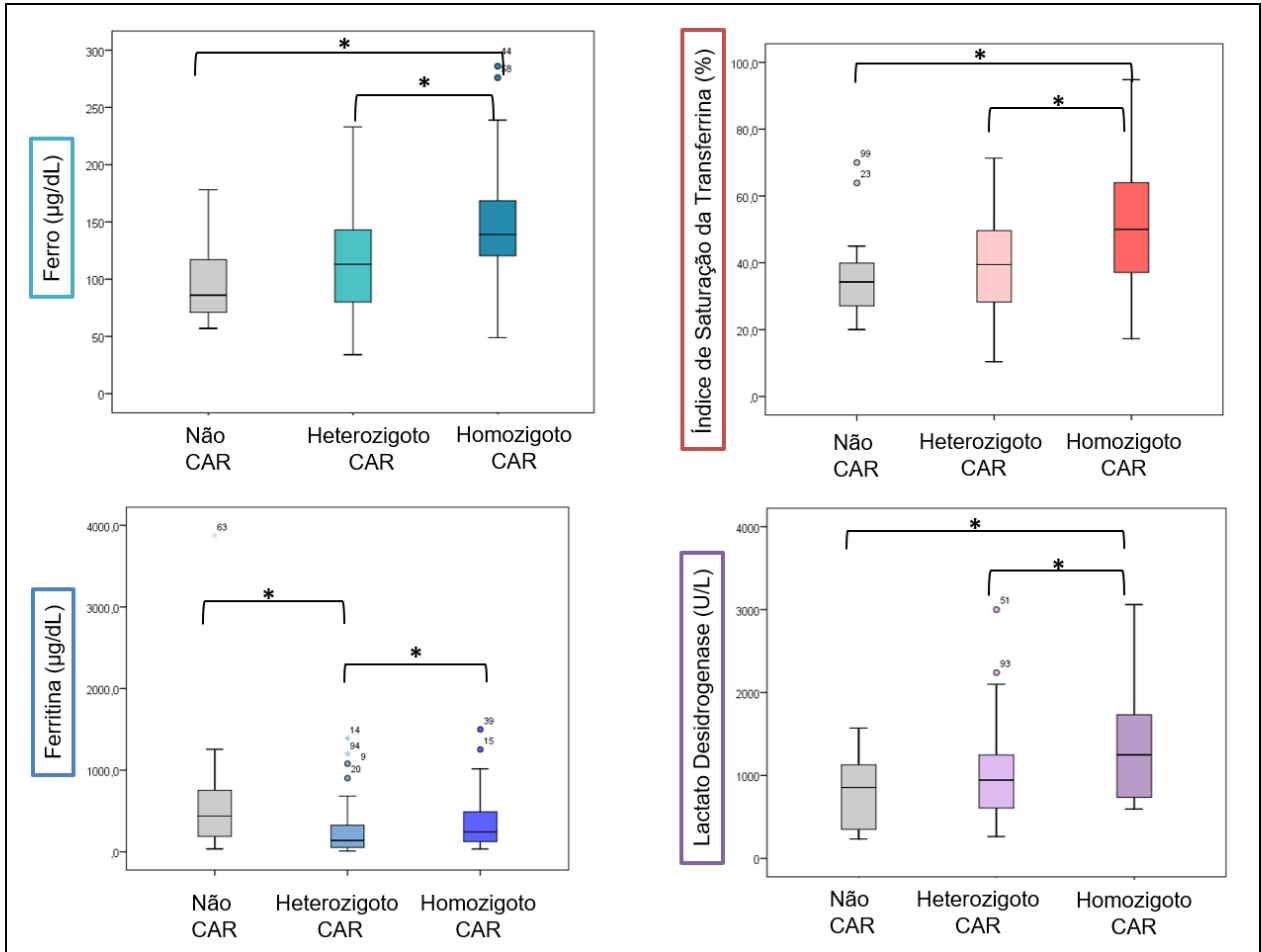
Os pacientes classificados pela presença do haplótipo CAR em ausente (Não CAR), Heterozigoto CAR ou Homozigoto CAR. A análise estatística comparativa das medianas demonstrou níveis maiores desses parâmetros nos pacientes com haplótipo CAR. * $p \leq 0,05$.

Figura 17 – Parâmetros Laboratoriais: Volume Globular Médio, Hemoglobina Globular Média, Concentração de Hemoglobina Globular Média e Reticulócitos em pacientes com doença falciforme com haplótipo CAR.



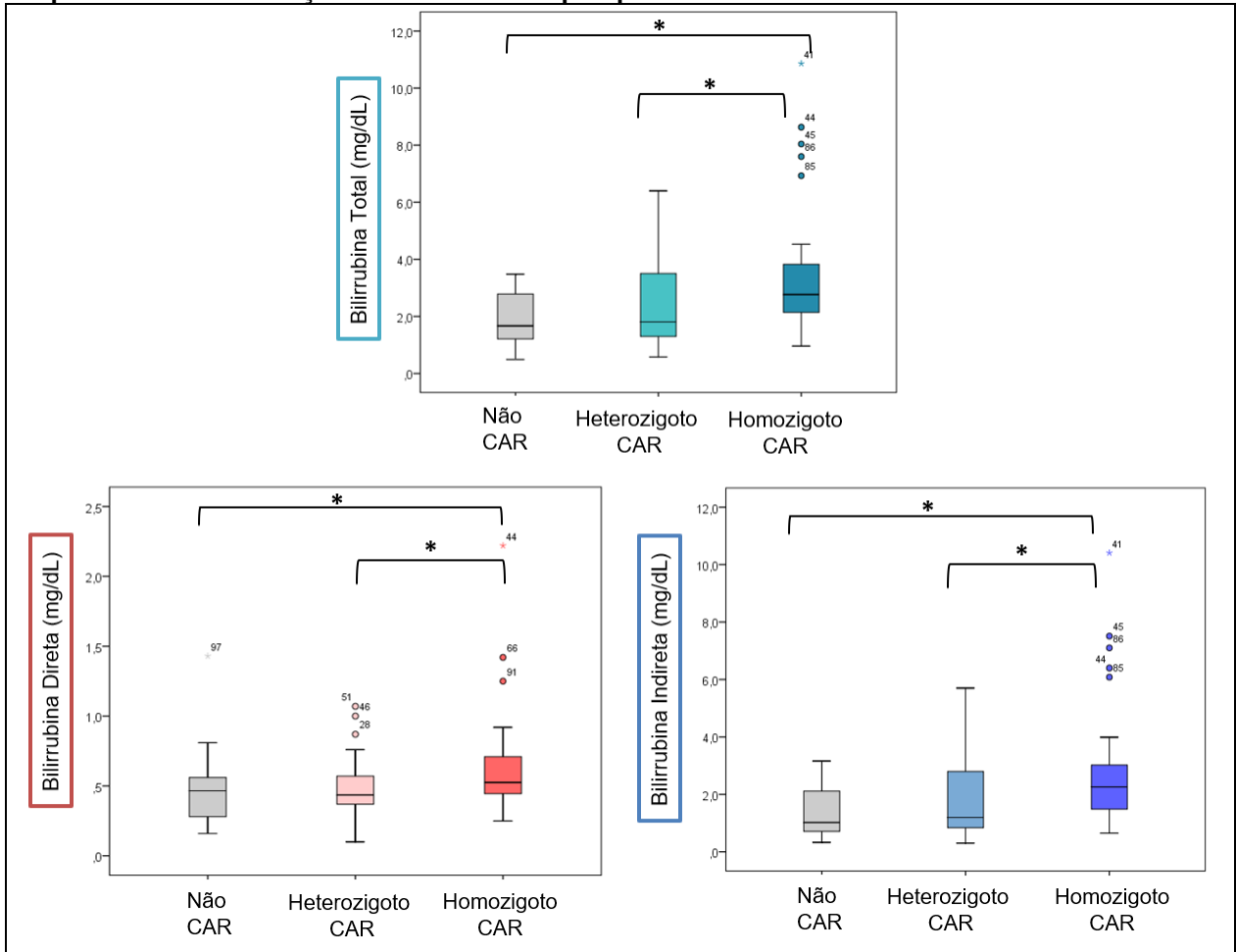
Os pacientes classificados pela presença do haplótipo CAR em ausente (Não CAR), Heterozigoto CAR ou Homozigoto CAR. A análise estatística comparativa das medianas demonstrou níveis maiores desses parâmetros nos homozigotos CAR. $*p \leq 0,05$.

Figura 18 – Parâmetros Laboratoriais: Ferro, Índice de Saturação de Transferrina, Ferritina e Lactato Desidrogenase em pacientes com doença falciforme com haplótipo CAR.



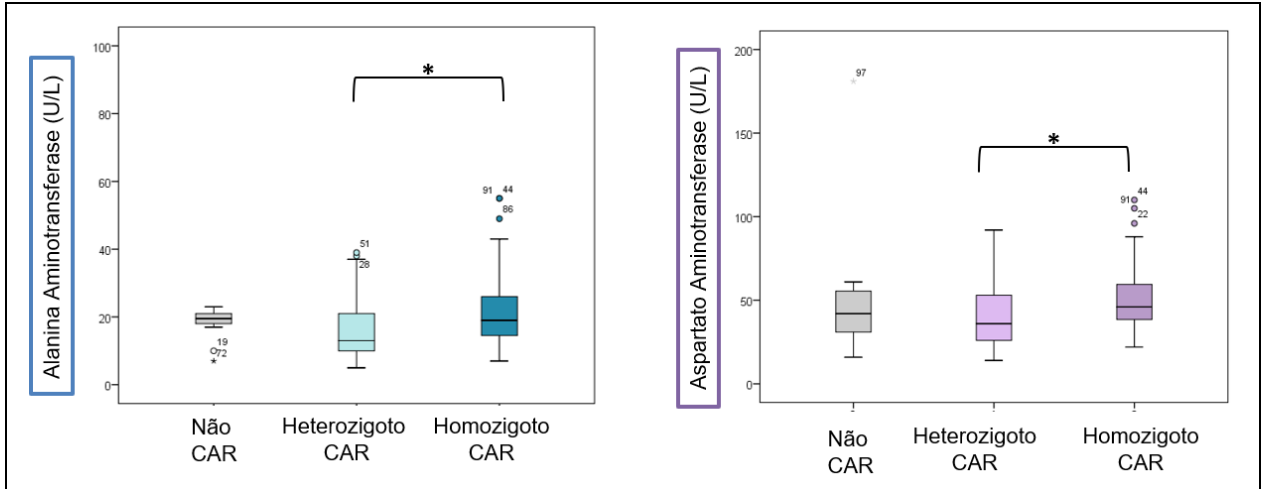
Os pacientes classificados pela presença do haplótipo CAR em ausente (Não CAR), Heterozigoto CAR ou Homozigoto CAR. A análise estatística comparativa das medianas demonstrou níveis maiores dos parâmetros Ferro, Índice de Saturação de Transferrina e Lactato Desidrogenase e níveis menores de Ferritina nos pacientes homozigotos CAR. * $p \leq 0,05$

Figura 19 – Parâmetros Laboratoriais: Bilirrubina Total, Bilirrubina Direta e Bilirrubina Indireta em pacientes com doença falciforme com haplótipo CAR.



Os pacientes foram classificados pela presença do haplótipo CAR em ausente (Não CAR), Heterozigoto CAR ou Homozigoto CAR. A análise estatística comparativa das medianas demonstrou níveis maiores desses parâmetros nos pacientes homozigotos CAR. * $p \leq 0,05$.

Figura 20 – Parâmetros Laboratoriais: Alanina Aminotransferase e Aspartato Aminotransferase em pacientes com doença falciforme com haplótipo CAR.



Os pacientes foram classificados pela presença do haplótipo CAR em ausente (Não CAR), Heterozigoto CAR ou Homozigoto CAR. A análise estatística comparativa das medianas demonstrou níveis maiores desses parâmetros nos pacientes homozigotos CAR. * $p \leq 0,05$.

5.5 Influência do haplótipo CAR sobre o tratamento com Hidroxiuréia.

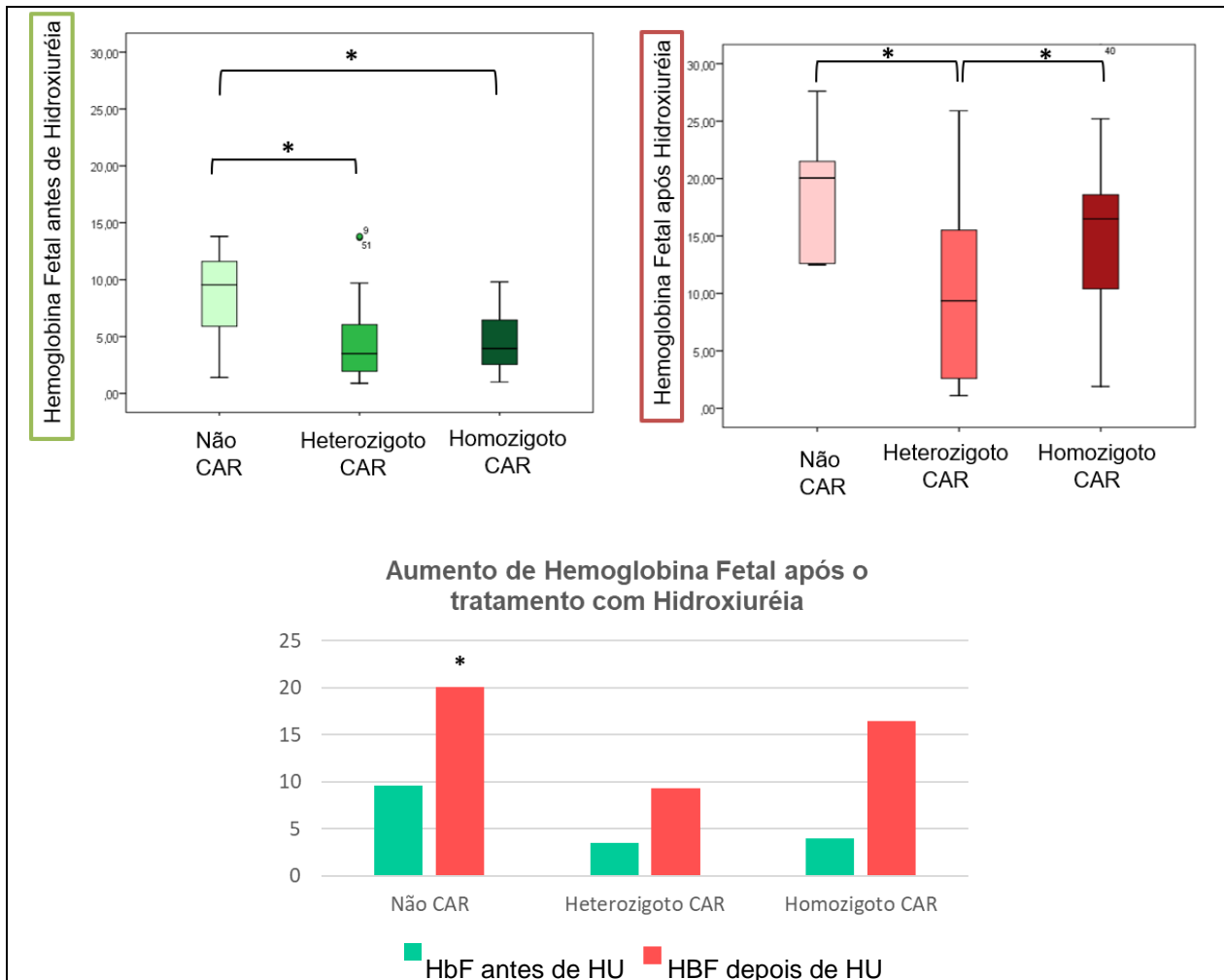
Para avaliar a influência do haplótipo CAR sobre o tratamento com hidroxiuréia os pacientes foram classificados em CAR homozigoto (CAR/CAR), CAR heterozigoto (CAR/outro haplótipo) ou Não CAR (outro haplótipo/outro haplótipo) (Tabela 6) e foram comparadas as medianas dos níveis de hemoglobina fetal antes (HbFa) e após (HbFd) o tratamento com hidroxiuréia. Observou-se que os níveis de HbFa nos pacientes CAR homozigotos (3,9%) e heterozigotos (3,5%) foram mais baixos do que nos pacientes Não CAR (9,5%) ($p=0,024$). Além disso, ao serem tratados, pacientes CAR mantiveram níveis mais baixos, tanto homozigotos (16,5%) quanto os heterozigotos (9,35%) quando comparados aos pacientes Não CAR. Observou-se os níveis máximos de HbF alcançados pelo tratamento com hidroxiuréia foi maior nos pacientes Não CAR (20%) ($p=0,022$) (Figura 21).

Tabela 6: Níveis de hemoglobina fetal dos pacientes com doença falciforme de acordo com o perfil do haplótipo CAR antes e após o tratamento com Hidroxiuréia.

	HbF antes HU (%)			HbF após HU (%)		
Não CAR (IC)	9,55 (5,3-11,7)			20,05 (12,9-25,1)		
Heterozigotos CAR(IC)	3,5 (3,1-6,4)			9,35 (6,4-13,4)		
Homozigotos CAR(IC)	3,95 (3,6-5,8)			16,5 (12,3-18,4)		
Análise Univariada	0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2	0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2
<i>p-valor</i>	0,028*	0,024*	0,58	0,022*	0,194	0,022*

Análise estatísticas: 0 = Não CAR, 1 = CAR heterozigoto, 2= CAR homozigoto. *p-valor** \leq 0,05

Figura 21 - Níveis de Hemoglobina Fetal de pacientes com doença falciforme antes e após o tratamento com Hidroxiuréia.



A análise estatística comparativa das medianas demonstrou níveis menores de Hemoglobina fetal em pacientes que possuem o haplótipo CAR antes e após o tratamento com Hidroxiuréia e que os maiores níveis de HbF alcançados pelo tratamento com hidroxiuréia foi maior nos pacientes Não CAR * $p \leq$ 0,05

5.6 Análises Multivariadas

5.6.1 Análise multivariada para verificar quais eventos se associaram de forma independente com a presença do haplótipo CAR em pacientes com doença falciforme ou com anemia falciforme

Foram incluídas no modelo as variáveis categóricas: transfusão de concentrado de hemácias, uso de hidroxiuréia e síndrome torácica aguda (STA); e os parâmetros laboratoriais: hemoglobina total (Hb), hemoglobina fetal (HbF), hemácias (Hm), hematócrito (HT), volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), percentual de reticulócitos (Ret), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI) e aspartato aminotransferase (AST) (Apêndice A). Após a regressão logística as variáveis estatisticamente significativas foram Hm e STA, onde observou-se aumento do risco de STA em pacientes homozigotos CAR em comparação aos demais pacientes heterozigotos CAR ou com outros haplótipos (Tabela 7).

Tabela 7: Análise Multivariada – Regressão Logística Binomial

ANÁLISE MULTIVARIADA				
		95% C.I		
	OR	Inferior	Superior	p-valor
Doença Falciforme				
Contagem de hemácias	0,169	0,062	0,480	0,001
Síndrome Torácica Aguda	2,996	1,171	7,666	0,02
Constante	29,124			0,007
Anemia Falciforme				
Contagem de hemácias	0,224	0,074	0,677	0,008
Síndrome Torácica Aguda	3,094	1,186	8,068	0,02
Constante	16,337			0,038

Análise multivariada com a associação das variáveis Síndrome Torácica Aguda e contagem de hemácias com o haplótipo CAR. Variáveis com *p-valor* < 0,2 foram selecionadas para início da análise multivariada. Resultados expressos como *odds ratio* (OR), com seus respectivos intervalos de confiança (IC) e *p-valor*.

5.6.2 Análise multivariada para determinar fatores prognósticos independentes para a ocorrência de Síndrome Torácica Aguda em pacientes com doença falciforme

Para investigar o impacto do genótipo CAR homozigótico na ocorrência de STA e a potencial influência de outros fatores prognósticos, realizamos duas análises subsequentes. A análise univariada mostrou que os pacientes com doença falciforme e STA eram em sua maioria do sexo masculino (59,1%) em comparação aos pacientes sem STA (37,9%), $p=0,04$. Como esperado, a maioria dos pacientes com STA utilizou tratamento com hidroxiuréia (84,1%) versus 48,3% dos pacientes sem STA, $p=0,0001$. Além disso, os pacientes com ocorrência de STA apresentaram VGM significativamente maior (94fL, IC: 66-126fL) do que casos sem STA (89fL, IC:64-131fL). Finalmente, a maioria dos pacientes com STA apresentava haplótipo CAR homozigótico (61,1%) em comparação com 38,9% nos sem STA, $p=0,017$ (Tabela 8).

Posteriormente, foi realizada regressão logística binomial (*backward stepwise*), incluindo variáveis com $p<0,2$ na comparação entre STA vs. não-STA: sexo, idade, VGM, leucócitos, contagem de plaquetas, HbF, reticulócitos, α -talassemia e o haplótipo CAR. No modelo final, apenas duas variáveis foram fatores prognósticos independentes para STA em pacientes com doença falciforme: sexo (OR: 2,88, IC: 1,16-7,13, $p=0,02$) e o haplótipo CAR homozigótico (OR: 3,11, IC :1,16 – 8,32, $p=0,02$) (Tabela 8). Ou seja, pacientes com doença falciforme CAR homozigotos tiveram 3 vezes mais chances de apresentar STA.

Tabela 8: Análises univariada e multivariada de fatores prognósticos para Síndrome Torácica Aguda em pacientes com Doença Falciforme (n=102).

	Análise Univariada			Análise Multivariada		
	Não STA (%)	STA (%)	p-valor	OR	95% IC	p-valor
DOENÇA FALCIFORME						
α- Talassemia (%)	20,5	22,4	0,42			
Sexo						
Feminino	62,1	40,9				
Masculino	37,9	59,1	0,045	2,875	1,159-7,128	0,023
Idade (mediana)	29 (5-79)	22 (9-50)	0,10			
HbF (mediana)	3,8 (0,3 – 27,5)	3,5 (1 – 15,5)	0,9			
Uso de Hidroxiuréia	48,3	84,1	0,0001			
Leucócitos	12.10 ³ (4-28. 10 ³)	12,3.10 ³ (16,8-37,5.10 ³)	0,489			
Hb	7,7 (4,8-12,9)	7,76 (5,3-12,4)	0,256			
CHCM	33,8 (28,4-38)	34,5 (30-38)	0,074			
VGM	89 (64-131)	94 (66-126)	0,031			
VGM*						
*Miocitose	20,7%	6,8%				
*Normocitose	55,2%	54,5%	0,082			
*Macrocitose	24,1%	38,6%				
CAR homozigoto	72,9	90,9	0,017	3,109	1,162 – 8,317	0,024

Análise multivariada com a contribuição do sexo masculino e haplótipo CAR homozigoto para o risco de Síndrome Torácica Aguda. Variáveis com *p-valor* < 0,2 foram selecionadas para início da análise multivariada. Os resultados expressos como *odds ratio* (OR), com seus respectivos intervalos de confiança (IC) e *p-valor*

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes com doença falciforme de acordo com os haplótipos do gene *HBB* da hemoglobina, com ênfase no haplótipo de ancestralidade africana frequente em nossa coorte, o haplótipo CAR. Entre as características observadas destacamos o maior risco de síndrome torácica aguda nos pacientes do sexo masculino CAR homocigotos.

Entre os pacientes com DF houve maior frequência do sexo feminino, o que corrobora os dados mais recentes sobre a doença falciforme no Brasil (Mota FM, *et al.* 2022; Ministério da Saúde, 2023). Ao avaliarmos o perfil de haplótipos de hemoglobina em DF, verificamos a presença de todos o haplótipos típicos africanos, o que está de acordo com a origem étnica da população brasileira, com forte presença da diáspora africana no Brasil a partir de diferentes regiões do continente (Oliveira *et al.*, Alves AC, *et al.*, 2020; Adorno EV, *et al.* 2008; Fleury MK, 2007). Porém, a distribuição dos haplótipos encontrados inclui uma presença relevante de haplótipos atípicos, diferentes dos cinco padrões de haplótipos observados mundialmente (Powars DR. 1991; C. Lapoumeroulie, *et al.*, 1992, Nagel RL, Steinberg MH. 2001). Isto provavelmente se deve à miscigenação presente na população e também é consistente com a hipótese de haplótipos gerados por recombinação, conversão ou substituições pontuais em haplótipos comuns pré-existentes (Carneiro-Proietti ABF *et al.*, 2018; Cardoso GL, Guerreiro JF (2006); Okumura JV, Lobo CL de C, Bonini-Domingos CR, 2013; Auricchio MT. Vicente JP. Meyer D. Mingroni-Netto RC, 2007, Zago. M.A. *et al.*, 2000).

Como nossa coorte é proveniente da população do Rio de Janeiro, observou-se maior frequência do haplótipo CAR em detrimento dos outros haplótipos típicos africanos, o que já foi descrito em estudos anteriores (Klein, H.S.1999; Klein, H.S.2002.; Fleury MK, 2007 De Mello Auricchio MT *et al.*, 2007). Devido à baixa frequência de alguns haplótipos em nossa coorte, não foi possível neste trabalho avaliar os impactos específicos de cada um dos cinco haplótipos de origem africana. Entretanto, o predomínio de CAR nos possibilitou conduzir o estudo para a investigação do impacto prognóstico do haplótipo CAR em DF, uma vez que há na literatura dados conflitantes sobre seu papel prognóstico. Os autores Powars D.R. (1991), Steinberg M.H. (1997), Bakanay S.M. (2005), Bean C.J. (2013), Steinberg MH., 2020) mostram a associação do haplótipo CAR com a diminuição

do percentual de hemoglobina fetal, o que favoreceria eventos mais graves nesta subpopulação, entretanto os autores Hatzlhofer B. L. D. (2021), Elizabeth S. Klings E. S, Steinberg M.H. (2022), Rees D.C. (2022) reportam que há controvérsias na associação da frequência de eventos graves neste pacientes com os haplótipos.

No presente estudo, os pacientes com DF CAR homozigotos apresentaram uma anemia mais intensa, que se refletiu em níveis significativamente menores de Hm, Ht e Hb total comparados a pacientes com outros haplótipos, tanto antes quanto durante o tratamento com hidroxiuréia. Outros estudos, ao avaliarem os dados laboratoriais de pacientes com anemia falciforme, identificaram maior frequência do perfil CAR homozigoto entre os pacientes com menores níveis de Hm, Ht e Hb e pior resposta ao tratamento com hidroxiuréia (Bakanay *et al.*, 2005; Santiago RP *et al.*, 2017). Nossos pacientes CAR homozigotos também apresentaram níveis mais altos de VGM e HGM do que outros haplótipos, similarmente aos estudos de Bakanay *et al.* (2005) e Santiago RP *et al.* (2017).

Além destes, Donaldson *et al.* (2001) observaram uma correlação linear positiva dos níveis de HbF com Hb e Ht, assim como os níveis mais baixos de Hb e Ht correspondem a níveis menores de HbF nos pacientes CAR homozigotos em nosso estudo. Porém, contrariamente ao estudo de Donaldson *et al.* (2001) nossos dados mostraram níveis maiores VGM e HGM nos pacientes com níveis de HbF mais baixos.

A tendência de contagens mais baixas de hemácias nos pacientes CAR homozigotos coincide com um percentual maior de reticulócitos. Conforme discutido por Serjeant, G.R. (2017), o aumento do percentual de reticulócitos sinaliza a recuperação da eritropoiese, o que pode ser provocado por uma crise hemolítica anterior. Assim, o aumento de reticulócitos observado nos pacientes com haplótipo CAR é um indicativo de hemólise mais frequente. Isto aconteceu de forma semelhante em um estudo anterior no qual houve baixa contagem de hemácias, com aumento do VGM e dos níveis de reticulócitos em pacientes com anemia falciforme (Maude GH, Hayes RJ, Serjeant GR, 1987).

Os indivíduos CAR homozigotos deste estudo apresentaram níveis mais altos de ferro sérico, assim como aumento do índice de saturação de transferrina, o que era esperado ao considerar o aumento dos episódios hemolíticos (Grotto, HZW, 2008). Isto pode

ocorrer com o aumento da absorção gastrointestinal de ferro devido a hemólise associada à doença falciforme (Erlandson ME *et al.*, 1962; Warade JP *et al* 2013) ou a maior frequência com que os pacientes CAR são submetidos a hemotransfusões. Embora a deficiência de ferro também ocorra na doença falciforme, transfusões de concentrado de hemácias podem gerar sobrecarga de ferro, (O'Brien RT. 1978; Oluboyede AO *et al.*, 1983; Hussein MA *et al*, 1978, Brownell A, Lawson S, Bronzovic M., 1986; O'Brien RT., 1978; Rao KRP *et al.*, 1984; King L, Reid M, Forrester TE.,2005; Akinsegun A Akinbami, 2013). Sabe-se que a maior parte do Ferro no organismo é associada hemoglobina e em caso de intensa degradação de hemácias, como ocorre na hemólise, a reciclagem do Fe representa a principal fonte de ferro para a eritropoiese, aumentando a saturação da transferrina em pacientes com sobrecarga de ferro (J. Chifman, R. Laubenbacher, S.V. Torti, 2014).

Da mesma forma, em nosso estudo observamos maiores níveis de ferritina dos pacientes com doença falciforme em comparação aos valores de referência (Naoum, PC., Naoum, F.A., 2008). Porém, ao avaliarmos os níveis de ferritina de acordo com o haplótipo CAR, observamos os níveis maiores de ferritina entre os pacientes que não apresentavam o haplótipo CAR. A ferritina sérica é considerada uma ferramenta importante para avaliação do ferro em estado estacionário na doença falciforme, devido às alterações nos parâmetros convencionais como VGM, HGM, CHGM e hematócritos na doença falciforme (Brownell A, Lawson S, Bronzovic M.,1986). O aumento na concentração sérica de ferritina também foi observado em crises de pacientes com doença falciforme, em estudo no qual este marcador foi associado a eventos vasculares e dano tecidual, mas não à hemólise. Como principal proteína de armazenamento de ferro nos tecidos, o aumento da ferritina sérica é um indicativo de inflamação tecidual crônica. (Brownell A, Lawson S, Brozović M, 1986). Em outros estudos, em pacientes com haplótipos SEN e AI, que se caracterizam por apresentarem quadros mais leves que o haplótipo CAR, também foram observados níveis mais altos de ferritina (Mohanty P, Jena RK, Sethy S., 2017; Diop S *et al*,1999).

Sobre os parâmetros que avaliam a função hepática, nossos dados de bilirrubina, AST e ALT foram mais altos nos pacientes CAR homocigotos, embora tenham sido próximos aos limites superiores dos valores de referência normais. Batista e colaboradores (2021)

também observaram em pacientes com o haplótipo CAR homozigotos e heterozigotos níveis significativamente mais altos de bilirrubina total, o que pode ser explicado por níveis mais baixos de HbF e alto grau de hemólise, contribuindo para níveis elevados de bilirrubina. A correlação que encontramos com AST maior do que ALT nos pacientes CAR homozigotos é consistente com a maior concentração de AST nas hemácias e sua liberação durante a hemólise intravascular (Sonntag O. 1986; Kato GJ *et al.* 2006).

Nosso estudo revelou níveis bastante elevados de LDH entre os pacientes com doença falciforme, sendo significativamente maior em pacientes CAR homozigotos. Conforme já demonstrado por estudos anteriores, LDH é um importante marcador hemolítico e mesmo no estado estacionário da doença tem associação significativa com a hemólise intravascular crônica na doença falciforme. (Ballas *et al.*, 2006; Kato GJ *et al.* 2006). Adicionalmente, níveis séricos elevados LDH foram associados a baixos níveis de hemoglobina e altos níveis de reticulócitos e bilirrubina, assim como observamos entre os pacientes CAR homozigotos deste estudo (Kato GJ *et al.* 2006).

A contagem de leucócitos foi mais elevada do que os valores de referência para a idade nos pacientes com doença falciforme como um todo, porém foram significativamente maiores nos pacientes CAR homozigotos comparados aos demais. Sabe-se que os leucócitos contribuem para o processo da inflamação na doença falciforme, e a contagem de neutrófilos aumenta de acordo com a gravidade dos eventos clínicos (Okpala I. Blood Rev. 2004). Além disso, a leucocitose foi sugerida como um fator de risco para acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda e está significativamente associada ao desenvolvimento de nefropatia falciforme. (Ohene-Frempong K, *et al.*,1998.; Castro O, *et al.* 1994, Alkindi S *et al.*,2020). No presente estudo, o aumento de leucócitos nos pacientes CAR homozigotos é consistente com estas observações que relacionam contagens elevadas de leucócitos a maior gravidade da doença falciforme.

Neste trabalho, observamos níveis de Hemoglobina Fetal basal mais baixos nos pacientes CAR homozigotos e CAR heterozigotos, quando comparados aos pacientes sem o haplótipo CAR. Esta característica foi investigada em trabalhos anteriores e seus efeitos relacionados a gravidade clínica da doença falciforme tem sido descritos e também questionados ao longo dos anos. (Powars, 1989; Bakanay SM,2005, Steinberg

MH *et al.*, 2014; Chamouine A *et al.*, 2020. Steinberg MH, 2020, Hatzlhofer BLD *et al.* 2021). Apesar do conhecimento de cada haplótipo estar associado a níveis médios diferentes de HbF, a grande dispersão dos dados já apresentados torna a determinação individual do haplótipo uma medida de valor prognóstico discutível. Estudos mostraram que, com exceção dos haplótipos AI e SEM, (Nagel RL *et al.* 1985; Al-Ali AK, *et al.*, 2020; Alsultan A, *et al.* 2011;) os fatores genéticos envolvidos na variância dos níveis de HbF entre os haplótipos permanece indefinida (Steinberg MH, 2020). A depender da população observada, o silenciamento dos genes que codificam HbF pode ser explicado pela atividade de fatores genéticos moduladores da expressão de HbF como *BCL11A*, porém alguns estudos não associam polimorfismos desses fatores à variação dos níveis de HbF entre os haplótipos. (Masuda T, *et al.* 2016; Bae HT, Baldwin CT, Sebastiani P, *et al.*, 2012; Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, *et al.*, 2013; Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, *et al.* 2008, Sebastiani P, Farrell JJ, Alsultan A, *et al.* 2015). Neste trabalho observamos níveis mais baixos de HbF nos pacientes ao apresentarem pelo menos um alelo CAR, inclusive após o tratamento com hidroxiuréia. Este aspecto corrobora com Bakanay SM (2005) que relatou maior frequência do haplótipo CAR entre pacientes tratados com hidroxiuréia que foram a óbito, evidenciando a pior resposta deste grupo ao tratamento. Em nosso estudo também avaliamos o uso de hidroxiuréia que foi significativamente mais frequente nos pacientes CAR homozigotos. Essas observações são consistentes com estudos que relacionam o haplótipo CAR a um mau prognóstico da doença e que os pacientes com este haplótipo necessitam mais frequentemente de tratamento com hidroxiuréia com resultados menos satisfatórios (Steinberg, M.H. *et al.*, 1997; Powars DR., 1991; Bakanay SM *et al.*, 2005). Tais resultados parecem ser devidos não apenas aos níveis totais de HbF, mas também aos níveis heterogêneos de HbF em cada eritrócito, levando a níveis diferenciais eventos hemolíticos (Piel F. B. 2017; Steinberg MH, 2020).

De forma geral, os parâmetros laboratoriais avaliados neste estudo mostraram que pacientes CAR homozigotos apresentaram mais alterações sugestivas de eventos hemolíticos como redução de Hm, Ht e Hb e aumento de bilirrubina, LDH e AST, além de aumento de Fe e IST, compatível com aumento dos processos inflamatórios (Sonntag O. 1986; Kato GJ *et al.* 2006). Sobre os parâmetros laboratoriais Hemoglobina S,

granulócitos, plaquetas, capacidade de ligação de ferro latente, capacidade de ligação de ferro total e ureia, não encontramos associação estatisticamente significativa entre os pacientes de acordo com o perfil do haplótipo CAR. Acreditamos que esses parâmetros poderiam ser melhor avaliados com uma coorte maior de pacientes.

Entre as características clínicas avaliadas verificou-se a associação entre a homozigose para CAR e a necessidade de realização de transfusão de concentrado de hemácias. Ao avaliar estes eventos, o percentual de casos é crescente à medida que o haplótipo CAR está presente em 1 alelo ou 2 alelos, porém não houve significância estatística quando o haplótipo CAR está presente de forma heterozigótica, mas apenas ao compararmos os pacientes CAR homozigotos com os demais perfis de haplótipos. Sabe-se que a transfusão de concentrado de hemácias é a principal estratégia de suporte para os sintomas de anemia aguda, prevenção de acidente vascular encefálico e a base do tratamento agudo da STA na doença falciforme. Assim, a necessidade de terapia transfusional e a modalidade de transfusão dependem da gravidade do quadro, sendo aplicada em casos moderados a graves, onde é necessário aumentar os níveis de Hb e reduzir HbS (Alhashimi D *et al* 2010; Onimoe G, Rotz S., 2020, Farooq S, Abu Omar M, Salzman GA., 2018) Dessa forma, a necessidade maior de transfusões nos pacientes CAR homozigotos é compatível com maior gravidade da doença falciforme nesses pacientes.

Entre as complicações da vesícula biliar, apesar de observarmos um percentual maior de colelitíase, colecistite ou coledocolitíase, entre os pacientes CAR, homozigotos e heterozigotos, não houve associação estatisticamente significativa. Porém, a colelitíase é um evento consistente com a hiperbilirrubinemia que observamos nesses pacientes, sendo isto um fator de risco para colelitíase. Além disso, as alterações de outros parâmetros hemolíticos que observamos, como LDH, reticulócitos e hemoglobina total corroboram com estudos que sugerem a hemólise como fator de risco para colelitíase em pacientes com anemia falciforme (Martins, R A *et al*, 2017; Joly P., 2017; Batista *et al*, 2021). Batista e colaboradores (2021) que, em uma coorte grande com alta prevalência do haplótipo CAR, também não encontraram influência do haplótipo para colelitíase, mas observaram seu impacto para os níveis aumentados de bilirrubina. Alkindi *et al*. (2015) também demonstraram níveis mais baixos de bilirrubina no haplótipo AI em comparação

aos haplótipos africanos BEM e CAR, mas sem associação destes com o desenvolvimento de cálculos biliares. Níveis baixos de HbF, que observamos entre os pacientes CAR homocigotos do nosso estudo, também foram relacionados ao desenvolvimento de colelitíase em estudos anteriores (Webb DK, Dunn DT, Serjeant GR, 1989; Chaar V, Kéclard L, Diara JP *et al.*, 2005). As características laboratoriais dos pacientes CAR homocigotos, encontradas neste estudo, indicam um padrão de subfenótipo hemolítico nestes pacientes, ao apresentarem níveis de hematócritos mais baixos acompanhados por níveis mais elevados de LDH sérica e bilirrubina (Kato, *et al.*, 2018; Kato; Gladwin; Steinberg, 2007).

Algumas manifestações clínicas como episódios dolorosos, infecções bacterianas, sequestro esplênico, AVE, não apresentaram significância estatística neste estudo, apesar de serem observados com maior frequência entre os pacientes com haplótipo CAR. Episódios dolorosos são dados de difícil interpretação pois a dor óssea é influenciada por muitos fatores incluindo idade, sexo, ambiente, estresse e fatores psicológicos (Serjeant, G.R., 2017). O haplótipo CAR foi associado a maior risco de acidente vascular encefálico em crianças com doença falciforme (Santiago RP *et al.*, 2017). Neste estudo, as ocorrências de crise aplástica, infecções virais, úlcera de perna e óbito foram similares entre CAR homocigotos ou outros padrões de haplótipos.

Nosso estudo mostrou uma ocorrência de casos de síndrome torácica aguda significativamente maior em pacientes com haplótipo CAR, com frequência ainda maior dentre os CAR homocigotos. A análise multivariada deste trabalho mostrou que a presença de CAR em homocigose é um fator prognóstico independente para a ocorrência de STA. Esta associação foi verificada tanto ao avaliarmos todos os fenótipos de doença falciforme como nos pacientes com anemia falciforme. Até onde temos conhecimento, nosso trabalho é o primeiro a elucidar o papel prognóstico do haplótipo CAR na ocorrência da STA (Apêndice A). Isto poderia explicar relatos de que a STA pode ocorrer de forma mais grave também em pacientes com doença falciforme que apresentam fenótipos mais leves (ex: HbSC) (R. L. Nagel, 2003), e ainda em pacientes assintomáticos que podem evoluir para um desfecho fatal de STA (Elizabeth S. Klings & Martin H. Steinberg, 2022; Tsitsikas DA, 2020; Lowenthal EA, Wells A, Emanuel PD, *et al.* 1996).

Este estudo apresentou algumas limitações tais como o número relativamente

pequeno de casos e escassez dos diferentes haplótipos na população estudada, o que inviabilizou a comparação específica entre todos os haplótipos de ancestralidade africana. O número de casos também foi insuficiente para a realização de análises por categorias como idade, tempo de uso de HU, níveis de HbF acima ou abaixo de 8,6% e presença da co-herança de α -talassemia dos pacientes. Outra limitação se refere aos parâmetros clínicos analisados, pois não houve conhecimento sobre a ocorrência de atendimento e internação dos pacientes em outras instituições de saúde não participantes do estudo. Além disso, não houve informações sobre os critérios utilizados para definir STA em cada uma das instituições participantes, o que impossibilitou também estadiamento dos casos de acordo com a gravidade da STA. Ao selecionar os casos de AF, observou-se similaridade com as análises que incluíram todos os pacientes com DF, incluindo a associação entre STA e o haplótipo CAR homozigoto (Anexo B). Porém, análises multivariadas somente com casos de AF não foram realizadas neste estudo.

A síndrome torácica aguda (STA) é uma das complicações mais graves da doença falciforme, a causa mais comum de morte e a segunda causa mais comum de hospitalização em pacientes com doença falciforme. (Powars D, Hiti A. 1993; Bakanay SM *et al.*, 2005, Farooq S, Abu Omar M, Salzman GA., 2018). A partir dos nossos dados que associaram o haplótipo CAR ao risco de STA, avaliamos também a associação de STA com outras variáveis deste estudo. Os nossos dados mostraram que o haplótipo CAR está associado níveis mais baixos de HbF e estudos anteriores mostraram que a incidência de STA está relacionada a baixos níveis de HbF (Steinberg MH. 2020; Alsultan A, Alabdulaali MK, Griffin PJ, *et al.* 2014; Day ME, Rodeghier M, DeBaun MR. 2018). Além disso, outros estudos genéticos já relacionaram eventos vaso-oclusivos a genes repressores da expressão do gene de HbF ligados ao haplótipos, porém não avaliaram diretamente a associação dos haplótipos com STA (Steinberg MH. 2020; Alsultan A, Alabdulaali MK, Griffin PJ, *et al.* 2014; Day ME, Rodeghier M, DeBaun MR. 2018 (Bean CJ, Boulet SL, Yang G, *et al.* 2013; Steinberg MH., 2020; Lettre G, Sankaran V, Bezerra MAC, *et al.* 2008). Neste trabalho, a análise univariada de STA mostrou associação com os fatores sexo masculino, uso de hidroxiuréia e o haplótipo CAR, porém nossos dados não demonstraram associação direta entre o risco de STA e hemoglobina fetal. A análise multivariada mostrou que a associação entre STA, sexo masculino e o haplótipo CAR

ocorre de forma independente dos níveis de hemoglobina fetal. Quanto ao sexo masculino, nossos dados corroboram com estudos anteriores que descreveram a sobrevida maior entre as mulheres e mortalidade maior entre os homens, com a síndrome torácica aguda entre as causas de morte mais comuns, entre pacientes com doença falciforme (Mota FM *et al.*, 2022; LOBO, C. L. C. *et al.* 2018). Sabe-se que a análise apenas da hemoglobina fetal nos pacientes com doença falciforme não é suficiente para prever o risco de STA e as características genéticas que predisõem a STA são poligênicas e múltiplos fatores de risco podem coexistir, e o conhecimento destes é ainda insuficiente para previsão do risco (Steinberg MH, Sebastiani P. 2012; Castaldi C, Nolan VG, Baldwin CT, *et al.* 2007; Elizabeth S. Klings & Martin H. Steinberg 2022). A fisiopatologia da STA é possivelmente multifatorial e o haplótipo CAR pode ter um impacto prognóstico importante. Nossos dados sugerem que, independentemente dos mecanismos genéticos inerentes ao haplótipo CAR, que ainda não foram totalmente esclarecidos, identificar este haplótipo pode ser útil, especialmente em homozigose, para pode-se prever a necessidade de melhor acompanhamento clínico dos indivíduos, de forma a evitar complicações mais graves, sobretudo em regiões com alta incidência das doenças falciformes, alta frequência do haplótipo CAR e serviços de saúde de menor infraestrutura, onde o acesso a análises mais específicas de polimorfismos genéticos é mais difícil. Ao considerarmos que o êxito do tratamento da STA depende do reconhecimento precoce, a análise de haplótipo pode contribuir para a previsão do risco de STA, sobretudo em pacientes do sexo masculino CAR homozigotos, e contribuir para adoção de medidas preventivas ou a escolha de terapias curativas mais precocemente e reduzir a mortalidade.

7 CONCLUSÕES

A principal conclusão deste trabalho é que a presença do haplótipo CAR em homozigose é um fator de risco independente para STA. Além disso, concluímos que a presença do haplótipo CAR está relacionada a quadros de maior gravidade ao apresentar associação com mais transfusões e internações hospitalares. Concluímos também que os pacientes CAR homozigotos apresentaram mais alterações sugestivas de eventos hemolíticos como anemia, redução de Hm, Ht e Hb e aumento de bilirrubina, LDH e AST, além de aumento de Fe, IST e ferritina. Os pacientes CAR homozigotos também apresentaram níveis mais elevados de Leucócitos. Sobre a HbF concluímos que os níveis são mais baixos nos pacientes a partir da presença de pelo menos 1 alelo CAR, inclusive após o tratamento com HU que concluímos ser mais utilizada entre os pacientes CAR homozigotos e com piores resultados. Com base nesses resultados confirma-se a hipótese inicial deste trabalho de que um desfecho clínico de maior gravidade como STA está relacionado ao padrão de haplótipos ancestrais do gene *HBB*. De forma surpreendente concluímos que o sexo masculino também foi um fator independente para o risco de STA, sendo ainda maior o risco entre pacientes do sexo masculino e CAR homozigotos. Por fim, concluímos que o Haplótipo CAR pode ter um impacto prognóstico importante.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados encontrados neste estudo, propõe-se a análise de uma coorte maior de pacientes para avaliar o haplótipo CAR homozigoto de acordo com categorias como faixa etária, tempo de uso de HU, níveis de HbF acima ou abaixo de 8,6%, e co-herança de α -talassemia. Além disso, é desejável analisar mais detalhadamente os padrões de haplótipos classificados como atípicos e verificar a existência de subgrupos que possam ter impacto prognóstico. Com base nos resultados propomos a identificação do haplótipo na ocasião do diagnóstico de DF. Sua utilização para classificação dos pacientes quanto ao risco de eventos graves como STA e pior resposta ao tratamento com HU pode contribuir para a escolha de terapias adequadas de forma precoce, para melhor qualidade e expectativa de vida aos pacientes.

9 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. J. *et al.* Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. **N Engl J Med.** 1998; v. 339, n. 1, p. 5–11. Doi:10.1056/NEJM199807023390102. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9647873>. Acesso em: 01 Jun 2024.

ADORNO, E. V. *et al.* Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in northeast of Brazil. **Genet Mol Biol** 2008; v. 31, p. 621–625. Doi:10.1590/S1415-47572008000400003 Disponível em: <https://www.scielo.br/j/gmb/a/jRg5NSPpfWm9p8qvhH5XPPK>. Acesso em: 01 Dez 2018.

AHMED, M. H.; GHATGE, M. S.; SAFO, M. K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. **Subcell Biochem.** 2020, v. 94, p. 345-382. Doi: 10.1007/978-3-030-41769-7_14. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7370311/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

AKINBAMI, A. A. *et al.* Serum ferritin levels in adults with sickle cell disease in Lagos, Nigeria. **J Blood Med.** 2013; v. 22, n.4, p. 59-63. Doi: 10.2147/JBM.S42212. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23723723>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

Al-Ali, A. K. *et al.* Prevalence and Diversity of Haplotypes of Sickle Cell Disease in the Eastern Province of Saudi Arabia. **Hemoglobin.** 2020; v. 44, n. 2, p. 78-81. Doi: 10.1080/03630269.2020.1739068. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32448003>. Acesso em: 01 Jun 2024.

ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells Mol. Dis.** 2017; v. 70, n. 1, p. 70-78. Doi: 10.1016/j.bcmed.2017.05.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28554826>, Acesso em: 01 Jun 2024.

ALHASIMI, D. *et al.* Blood transfusions for treating acute chest syndrome in people with sickle cell disease. **Cochrane Database Syst Rev.** 2010; v. 20; n. 1, p. Doi: 10.1002/14651858.CD007843.pub2. **Cochrane Database Syst Rev.** 2016; v. 30, n. 8, p. Doi: 10.1002/14651858.CD007843. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20091653>. Acesso em: 01 Jun. 2024

ALKINDI, S. *et al.* Predictors of impending acute chest syndrome in patients with sickle cell anaemia. **Sci Rep.** 2020; v. 10, n. 1, p. 2470. Doi: 10.1038/s41598-020-59258-y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32051480>. Acesso em: 15 maio 2024.

ALKINDI, S. Y. *et al.* Serum total bilirubin, not cholelithiasis, is influenced by UGT1A1 polymorphism, alpha thalassemia and β s haplotype: first report on comparison between Arab-Indian and African β s genes. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.** 2015; v. 7, n.1, e2015060. Doi: 10.4084/MJHID.2015.060. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26543529>. Acesso em: 01 Jun, 2024.

ALLAN, D.; RAVAL, P. Some morphological consequences of uncoupling the lipid bilayer

from the plasma membrane skeleton in intact erythrocytes. **Biomed. Biochim. Acta** 1983, v. 42, n. 11-12, p. S11–16. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6675679>. Acesso em 01 Jun 2024.

ALVES, A. C. *et al.* Sickle cell anemia in the state of Maranhão: a haplotype study. **Ann Hematol.** 2020; v. 99, n. 6, p.1225-1230. Doi: 10.1007/s00277-020-04048-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32363415>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

ALSULTAN, A. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Saudi patients from the Southwestern province have similar HBB haplotypes but higher HbF levels than African Americans. **Am J Hematol.** 2011; v. 86, n. 7, p. 612-4. Doi: 10.1002/ajh.22032. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21630302>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

ALSULTAN, A. *et al.* Sickle cell disease in Saudi Arabia: the phenotype in adults with the Arab-Indian haplotype is not benign. **Br J Haematol.** 2014; v.164, n. 4, p. 597–604. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24224700>. Acesso em: 15 maio 2024.

AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY. 2021. **ASH** Statement Addressing Diversity Equity and Inclusion in Hematology Research Practice and Training. Disponível em: <https://www.hematology.org/advocacy/policy-statements/2021/ash-statement-addressing-diversity-equity-and-inclusion-in-hematology-research-practice-and-training>. Acesso em 27 Out. 2021.

ANDERMANN, A. Taking action on the social determinants of health in clinical practice: a framework for health professionals. CLEAR Collaboration. **CMAJ.** 2016; v.188, n. 17–18, p. E474–E483. DOI: 10.1503/cmaj.160177. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27503870> . Acesso em 27 Out. 2021.

ANSARLI J.; GAVINS, F. N. E. Ischemia-Reperfusion Injury in Sickle Cell Disease: From Basics to Therapeutics. **Am J Pathol.** 2019, v. 189, n. 4, p.706-718. Doi: 10.1016/j.ajpath.2018.12.012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944018306229?via%3Dihub> Acesso em: 01 Jun 2024.

ANTONIADES, C. *et al.* Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. **Eur. Heart J.** 2009; v.30, n. 9, p.1142-1150. Doi: 10.1093/eurheartj/ehp061. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19297385>. Acesso em: 01 Jun 2024.

ARNOLD, S. D. *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease - current practice and new approaches. **Br J Haematol.** 2016; v. 174, n. 4, p. 515-25. Doi: 10.1111/bjh.14167. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27255787>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

ASHWIN, P. T.; SIVARAJ, R. Screening for sickle-cell retinopathy. **Eye (Lond).** 2023; v. 37, n. 2, p. 375. Doi: 10.1038/s41433-022-02199-9. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36028761>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

ASLAN, M. *et al.* Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001; 98:15215–20. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11752464>. Acesso em: 01 Jun 2024.

ASLAN, M.; FREEMAN, B. A. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radic. Biol. Med.** 2007, v. 43, n. 11, p. 1469–1483. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17964418>. Acesso em: 01 Jun 2024.

ATAGA, KI, *et al.* Crizanlizumab for the prevention of pain crises in sickle cell disease. **N Engl J Med**. 2017; v. 376, n. 5, p.429–439. Doi: 10.1056/NEJMoa1611770. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27959701> Acesso em: 27 Out. 2021.

AURICCHIO, M. T. D. M, *et al.* Frequency and origins of hemoglobin S mutation in African derived Brazilian populations. **Hum Biol** 2007; v. 79, n. 6, p. 667–677. Doi: 10.1353/hub.2008.0017. Acesso em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18494376>. Acesso em: 01 Jun 2024.

AYGUN, B. *et al.* Glomerular hyperfiltration and albuminuria in children with sickle cell anemia. **Pediatr Nephrol**. 2011, v. 26, n. 8, p. 1285-90. Doi: 10.1007/s00467-011-1857-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21559933>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

BAE; H. T, *et al.* Meta-analysis of 2040 sickle cell anemia patients: BCL11A and HBS1L-MYB are the major modifiers of HbF in African Americans. **Blood**. 2012; v. 120, n. 9, p. 1961-1962. Doi: 10.1182/blood-2012-06-432849. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22936743>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

BAKANAY, S. M.*et al.* Mortality in sickle cell patients on hydroxyurea therapy.**Blood**.; 2005; v. 105, n. 2, p. 545–547. Doi: 10.1182/blood-2004-01-0322. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15454485> Acesso em: 27 Out. 2021.

BALLAS, S. K. *et al.* The prevalence of avascular necrosis in sickle cell anemia: correlation with alpha-thalassemia. **Hemoglobin**. 1989;13(7-8):649-55. doi: 10.3109/03630268908998842. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2634666>

BARBOSA, S. M. *et al.* Air pollution and children's health: sickle cell disease. **Cad Saude Publica**. 2015. v. 31, n2, p. 265-275. Doi: 10.1590/0102-311x00013214. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25760161>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

BATINA, S. A. *et al.* Barriers to healthcare for sickle cell disease patients in the Democratic Republic of Congo. **Afr J Health**. 2017, v. 2, n. 1, p.1-4. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/afr-199845>. Acesso em 01 Jun. 2024.

BATISTA, J. V. G. F. *et al.* Influence of UGT1A1 promoter polymorphism, α -thalassemia and β^s haplotype in bilirubin levels and cholelithiasis in a large sickle cell anemia cohort.

Ann Hematol. 2021; v. 100, n. 4, p. 903-911. Doi: 10.1007/s00277-021-04422-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33523291>. Acesso em: 01 Jun 2024.

BAUER, D. E. *et al.* An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. **Science.** 2013, v. 342, n. 6155, p. 253–257. doi: 10.1126/science.1242088. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24115442>. Acesso em 01 Jun. 2024.

BELCHER, J. D. *et al.* Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. **J Clin Invest.** 2006; v. 116, n. 3, p. 808-816. Doi: 10.1172/JCI26857 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16485041>. Acesso em: 01 Jun 2024.

BELISÁRIO, A. R. *et al.* Coinheritance of α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia **Hemoglobin.**, 2010; v. 34, n. 6, p. 516-529. Doi: 10.3109/03630269.2010.526003.

BEAN, C. J, Acute chest syndrome is associated with single nucleotide polymorphism-defined beta globin cluster haplotype in children with sickle cell anaemia. **Br J Haematol.** 2013; v. 163, n. 2, p. 268-276. Doi: 10.1111/bjh.12507. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23952145>. Acesso em: 01 Jun 2024.

BENKERROU, M. *et al.* Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on sickle cell anaemia expression in infancy and early childhood: a prospective study. **Br J Haematol.** 2013, v. 163, n. 5, p. 646-654. Doi: 10.1111/bjh.12590. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24117340>.

BERGHS, M. *et al.* Time to apply a social determinants of health lens to addressing sickle cell disorders in sub-Saharan Africa. **BMJ Glob Health.** 2020, v. 5, n. 7, p. e002601. Doi: 10.1136/bmjgh-2020-002601 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32723757> Acesso em: 01 Jun 2024.

BIDANI, K. *et al.* Singh R, Chandra G, Rai R, Singh AK. Magnetic Resonance Imaging in Gastrointestinal and Genitourinary Emergencies. **Magn Reson Imaging Clin N Am.** 2022 ; v. 30, n. 3, p. 501-513. Doi: 10.1016/j.mric.2022.03.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35995476>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

BILLET, H. H. *et al.* Paradoxical increase of painful crises in sickle cell patients with alpha-thalassemia. **Blood.** 1995 Dec 1;86(11):4382. PMID: 7492800. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7492800/>

BLUMENFELD, N. *et al.* Transmembrane mobility of phospholipids in sickle erythrocytes: effect of deoxygenation on diffusion and asymmetry. **Blood.** 1991; v. 77, n. 4, p. 849-854. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1993223>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

BOUTIN, J. *et al.* ON-Target Adverse Events of CRISPR-Cas9 Nuclease: More Chaotic than Expected. **CRISPR J.** 2022; v.5, n. 1, p. 9-30. Doi: 10.1089/crispr.2021.0120. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35099280>. Acesso em: 01 Jun 2024.

BOYER, S. H, *et al.* Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. *Science*. 1975; v. 188, n. 4186, p. 361-3. Doi: 10.1126/science.804182. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/science.804182?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 01 Jun 2024.

BRAGA, J. A. *et al.* Guidelines on neonatal 885 screening and painful vaso- cclusive crisis in sickle cell disease: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular: Project guidelines: Associação Médica Brasileira - **Rev Bras Hematol Hemoter** 2016; v. 38, p. 147-157. Doi: 10.1016/j.bjhh.2016.04.001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4877615/>

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Perfil das hemoglobinopatias: doença falciforme: dados 2016. Ministério da Saúde, 2021. 39 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/perfil_hemoglobinopatias_doenca_falciforme_2016.pdf ISBN 978-65-5993-054-8. Acesso em 01 Jun. 2024.

BRASIL **Ministério da Saúde**. Boletim Epidemiológico 2023. Saúde da População Negra. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, v. 1, n. Especial, p. 24-29. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletimepidemiologico-saude-da-populacao-negra-numero-especial-vol-1-out.2023/view> Acesso em: 01 Jun. 2024.

BRASIL **Ministério da Saúde**. Relatório Preliminar - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação e do Complexo Econômico-Industrial da Saúde - SECTICS Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde - DGITS Coordenação-Geral de Gestão de Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas – CGPCDT. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2024/relatorio-preliminar-protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-da-doenca-falciforme/view>. Acesso em: 12 de julho de 2024.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Doença falciforme: diretrizes básicas da linha de cuidado Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 82 p. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_diretrizes_basicas_linha_cuidado.pdf. Acesso em: 24 de junho de 2024.

BRASIL. Portaria Conjunta nº 5, de 19 de fevereiro de 2018, Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 de fevereiro de 2018, Nº 36, Seção 01, p. 75.

BRASIL. Portaria nº 822, de 6 de junho de 2001, complementada pela Portaria nº 223, de 22 de junho de 2001. Inclui códigos relativos a procedimentos da triagem neonatal nas Tabelas de Serviço e Classificação de Serviços de Informações Ambulatoriais do SUS –

SIA/SUS. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de junho de 2001, Seção 01, p. 6.

BRASIL. Portaria nº 872, de 06 de novembro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas /Doença Falciforme/ Hidroxiuréia. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 de novembro de 2002, Seção 1, p. 169.

BRASIL. Portaria nº 1.391, de 16 de agosto de 2005. Institui no âmbito do Sistema Único de Saúde, as diretrizes para a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 de agosto de 2005.

BRASIL. Saúde. Anemia Falciforme atinge cerca de 8% da população negra no Brasil. **Ministério dos Direitos Humanos e da Cidadania**. 19 jun 2021. Atualizado 01 nov /2022. Disponível em: <https://www.gov.br/mdh/pt-br/assuntos/noticias/2021/junho/anemia-falciforme-atinge-cerca-de-8-da-populacao-negra-no-brasil>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

BRITTENHAM, G. M.; SCHECHTER, A. N.; NOGUCHI, C. T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. **Blood**. 1985; v. 65, n. 1, p. 183-189. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3965046>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

BROUSSE V. *et al.* The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. *Br J Haematol*. 2014 Jul;166(2):165-76. doi: 10.1111/bjh.12950. Epub 2014 May 26. PMID: 24862308. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24862308>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

BROWNELL, A.; LOWSON, S.; BRONZOVIC, M. Serum ferritin concentrations in sickle cell crisis. **J Clin Pathol**. 1986; v. 39, n. 3, p. 253–255. Doi: 10.1136/jcp.39.3.253 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3958215>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

BULGIN, D.; TANABE, P.; JENERETTE, C. Stigma of Sickle Cell Disease: A Systematic Review. **Issues Ment Health Nurs**. 2018; v. 39, n. 8, p. 675-686. doi: 10.1080/01612840.2018.1443530. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29652215>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

CANÇADO, R.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemot**. 2007; v. 29, n. 3, p. 203-206. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/NHyThBfzrf3ZSQDwD5M8Zmp>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

CANÇADO, R. D. *et al.* Estimated mortality rates of individuals with sickle cell disease in Brazil: real-world evidence. **Blood Adv**. 2021; v.7, n. 15, p. 3883-3792. Doi: 10.1182/bloodadvances.2022008938. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37104056>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

CARDEN, M. A. *et al.*, Newlin J, Smith W, Sisler I. Health literacy and disease-specific

knowledge of caregivers for children with sickle cell disease. **Pediatr Hematol Oncol.** 2016; v. 33, n. 2, p.121–133. Doi: 10.3109/08880018.2016.1147108 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26934177>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

CARDOSO, G. L.; GUERREIRO, J. F. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. **Am J Hum Biol.** 2006, v. 18, n.1, p. 93-98. Doi: 10.1002/ajhb.20467. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16378338>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

CARDOSO, G. L. *et al.* DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1- HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from Northern Brazil. **Blood Cells Mol Dis.** 2014; v. 53, n. 4, p.176-179. Doi: 10.1016/j.bcmd.2014.07.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25084696>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. *et al.* Clinical and genetic ancestry profile of a large multi-centre sickle cell disease cohort in Brazil. **British Journal of Haematology** 2018; v. 182, n. 6 p. 895-908. Doi: 10.1111/bjh.15462. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bjh.15462>. Acesso em: 01 Jun 2024.

CASTALDI, C. *et al.* Association of genetic polymorphisms in the TGF- β pathway with the acute chest syn drome of sickle cell disease. **Blood.** 2007; v. 110, n. 11, p. 2247. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497119884963>. Acesso em: 01 Jun 2024.

CEULAER K. O-thalassemia reduces the hemolytic rate in homozygous sickle-cell disease **N Engl J Med**, 309 (1983), pp. 189-190

CHAAR, V. *et al.* Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. **Haematologica.** 2005; v. 90, n. 2, p. 188-199. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15710570>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

CHAMOURINE, A *et al.* High fetal hemoglobin level is associated with increased risk of cerebral vasculopathy in children with sickle cell disease in Mayotte. **BMC Pediatr.** 2020, v. 20, n. 1, p. 302. Doi: 10.1186/s12887-020-02187-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32563256>. Acesso em: 01 Jun 2024.

CHARACHE, S.; SCOTT, J. C.; CHARACHE, P. Acute chest syndrome in adults with sickle cell anemia. Microbiology, treatment, and prevention. **Arch Intern Med.** 1979; V. 139, n. 1, p. 67–69. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32855>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

CHARACHE, S. *et al.* Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. **N Engl J Med.** 1995; v. 332, n. 5, p. 1317–1322. Doi: 10.1056/NEJM199505183322001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7715639>. Acesso em: 01 Jun 2024.

CHARACHE, S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. **Semin Hematol.** 1997; v. 34, n. 3, Suppl 3, p. 15-21. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9317197>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

CHEBLOUNE, Y. *et al.* Structural analysis of the 5' flanking region of the β -globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa, **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1998; v. 85, n. 12, p. 4431–4435. Doi: 10.1073/pnas.85.12.4431. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2898142>. Acesso em: 01 Jun 2024.

CHEN, X. *et al.* Organelle-specific regulation of ferroptosis. *Cell Death Differ.* 2021, v. 28, n. 10, p. 2843-2856. Doi: 10.1038/s41418-021-00859-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41418-021-00859-z>. Acesso em: 01 Jun 2024.

CHIFMAN, J.; LABENBACHER, R; TORTI, S. V. A systems biology approach to iron metabolism. **Adv Exp Med Biol.** 2014; v. 844, p. 201-225. Doi: 10.1007/978-1-4939-2095-2_10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25480643>. Acesso em: 01 Jun 2024.

CLASTER, S.; VICHINSKY, E. P. Managing sickle cell disease. **BMJ.** 2003; v. 327, n. 7424, p.:1151-1155. Doi: 10.1136/bmj.327.7424.1151. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC261819/>. Acesso em: 01 Jun 2024

CONRAN, N.; DE PAULA, E.V. Thromboinflammatory mechanisms in sickle cell disease - challenging the hemostatic balance. **Haematologica.** 2020, v. 105, n. 10, 2380-2390. Doi: 10.3324/haematol.2019.239343. Disponível em: <https://haematologica.org/article/view/9759>. Acesso em: 01 Jun 2024

DANJOU, F. *et al.* Genome-wide association analyses based on whole-genome sequencing in Sardinia provide insights into regulation of hemoglobin levels. **Nat Genet.** 2015 Nov;47(11):1264-71. doi: 10.1038/ng.3307. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26366553/> Acesso em: 01 Jun 2024

DAY ME, RODEGHIER, M., DEBAUN, M. R. Children with HbS beta(0) thalassemia have higher hemoglobin levels and lower incidence rate of acute chest syndrome compared to children with HbSS. **Pediatr. Blood Cancer.** 2018;65:e27352. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pbc.27352> Acesso em: 01 Jun 2024

DEAN A. On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. **Trends Genet.** 2006 Jan;22(1):38-45. doi: 10.1016/j.tig.2005.11.001 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16309780/> Acesso em: 01 Jun 2024

DE MELLO AURICCHIO, M. T. *et al.* Frequency and origins of hemoglobin S mutation in African-derived Brazilian populations. **Hum Biol.** 2007, v. 79, n. 6, p. 667-677. Doi: 10.1353/hub.2008.0017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18494376>. Acesso em: 01 Jun. 2024.]

DE MONTALEMBERT, M. *et al.* Real-life experience with hydroxyurea in patients with sickle cell disease: results from the prospective ESCORT-HU cohort study. **Am J Hematol.** 2021; v. 96, n. 10, p. 1223-1231. Doi:10.1002/ajh.26286. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34224583>. Acesso em: 01 Jun 2024.

DEREBAIL, V. K. *et al.* High prevalence of sickle cell trait in African Americans with ESRD. **J Am Soc Nephrol.** 2010 Mar;21(3):413-7. doi: 10.1681/ASN.2009070705. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20056747>. Acesso em: 01 Jun 2024

DEVER, D. P. *et al.* CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. **Nature.** 2016 Nov 17;539(7629):384-389. doi: 10.1038/nature20134. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27820943/>. Acesso em: 01 Jun 2024

DEWITT, M. A. *et al.* Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. **Sci Transl Med.** 2016 Oct 12;8(360):360ra134. Doi: 10.1126/scitranslmed.aaf9336. Acesso em: 01 Jun 2024

DIOP, S. *et al.* New results in clinical severity of homozygous sickle cell anemia, in Dakar, Senegal. **Hematol Cell Ther.** 1999 Nov;41(5):217-21. doi: 10.1007/s00282-999-0217-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10651122/> Acesso em: 01 Jun 2024

DOLATHHAH, R.; DASTGIRI, S. Blood transfusions for treating acute chest syndrome in people with sickle cell disease. **Cochrane Database Syst Rev.** 2020, v. 1, n. 1, p. CD007843. Doi: 10.1002/14651858.CD007843.pub4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31942751>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

DONG, M.; MCGANN, P. T. Changing the clinical paradigm of hydroxyurea treatment for sickle cell anemia through precision medicine. **Clin Pharmacol Ther.** 2021; v. 109, n. 1, p. 73–81. Doi: 10.1002/cpt.2028. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32869281>. Acesso em: 01 Jun 2024.

DOUDNA, J. A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. **Nature.** 2020 Feb;578(7794):229-236. doi: 10.1038/s41586-020-1978-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32051598/>

DUTT, S.; HAMZA, I.; BARTNIKAS, T. B. Molecular Mechanisms of Iron and Heme Metabolism. **Annu Rev Nutr.** 2022, v. 42, p 311-335. Doi: 10.1146/annurev-nutr-062320-112625. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9398995/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

DZIERZAK, E.; PHILIPSEN, S. Erythropoiesis: development and differentiation. **Cold Spring Harb Perspect Med.** 2013; v.3, n. 4, a011601. Doi: 10.1101/cshperspect.a011601. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23545573>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

ELMARIAH, H. *et al.* Factors associated with survival in a contemporary adult sickle cell disease cohort. **Am J Hematol.** 2014 May;89(5):530-5. Doi: 10.1002/ajh.23683.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24478166/>. Acesso em: 01 Jun 2024

ELENDU, C. *et al.* Understanding Sickle cell disease: Causes, symptoms, and treatment options. **Medicine (Baltimore)**. 2023 Sep 22;102(38):e35237. Doi: 10.1097/MD.00000000000035237. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37746969/>. Acesso em: 01 Jun 2024

ELENGA, N. *et al.* Real-world data on efficacy of L-glutamine in preventing sickle cell disease-related complications in pediatric and adult patients. **Front. Med.** 2022; v. 9, p. 931925. doi: 10.3389/fmed.2022.931925. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35979207>. Acesso em: 01 Jun 2024.

ERLANDSON, M. E. *et al.* Studies on congenital hemolytic syndromes, IV. Gastrointestinal absorption of iron. *Blood*. 1962 Mar;19:359-78. PMID: 13890598. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13890598/>

FADOK, V. A *et al.* Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. **J Biol Chem**. 2001 Jan 12;276(2):1071-7. doi: 10.1074/jbc.M003649200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10986279/> Acesso em: 01 Jun 2024

FAROOQ, F. *et al.* Comparison of US Federal and Foundation Funding of Research for Sickle Cell Disease and Cystic Fibrosis and Factors Associated With Research Productivity. **JAMA Netw Open**. 2020 Mar 2;3(3):e201737. Doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.1737. Acesso em: 01 Jun 2024

FATHALLAH, H.; ATWEH, G. F. DNA hypomethylation therapy for hemoglobin disorders: molecular mechanisms and clinical applications. **Blood Rev.** 2006; v. 20, n. 4, p. 227–234. 2006. Doi: 10.1016/j.blre.2006.01.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16513230>. Acesso em: 01 Jun 2024.

FLEURY, M. K. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev. Bras. Anal. Clínicas**. 2007; v. 39, n. 2, p. 89-93. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-477008>. Acesso em: 01 Dez. 2018.

FLANAGAN, J. M. *et al.* Hydroxycarbamide alters erythroid gene expression in children with sickle cell anaemia. **Br J Haematol**. 2012; v. 157, n.2, p. 240–248. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22360576>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

FORCINA, G. C.; DIXON, S. J. GPX4 at the Crossroads of Lipid Homeostasis and Ferroptosis. *Proteomics*. 2019, v. 19, n.18, p.:e1800311. Doi: 10.1002/pmic.201800311. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.201800311>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

FORTUNA, V. *et al.* Ferroptosis as an emerging target in sickle cell disease. **Curr Res Toxicol**. 2024, v.7, n. 100181. Doi: 10.1016/j.crttox.2024.100181. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666027X24000343?via%3Dihub>.

Acesso em: 01 Jun. 2024.

FRANGO, H. *et al.* CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. **N Engl J Med.** 2021; v. 384, n.3, p. 252-260. Doi: 10.1056/NEJMoa2031054. Disponível em:

https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2031054?url_ver=Z39.88-

2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 01 Jun. 2024.

FRENETT, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest.** 2007 Apr;117(4):850-8. doi: 10.1172/JCI30920. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17404610/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

FUJI, J. *et al.* Erythrocytes as a preferential target of oxidative stress in blood. **Free Radic Res.** 2021, v. 55, n. 5, p. 562-580. Doi: 10.1080/10715762.2021.1873318. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10715762.2021.1873318>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

FUNNELL, A. P. W. *et al.* 2p15-p16.1 microdeletions encompassing and proximal to BCL11A are associated with elevated HbF in addition to neurologic impairment. **Blood.** 2015; v. 126, n. 1, p. 89–93. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26019277>. Acesso em 01 Jun. 2024.

GALIZA NETO, G. C. *et al.* Análise dos haplótipos do gene da betaS-globina no Ceará. **J Bras Patol Med Lab.** 2005, v. 41, n. 5, p. 315–321. Doi:10.1590/S1676-24442005000500006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442005000500006>. Acesso em 01 Jun. 2018.

GAMER, C. *et al.* Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. **Blood.** 2000 Jan 1;95(1):342-6. PMID: 10607722. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10607722/>

GARDNER, K. *et al.* How we treat delayed haemolytic transfusion reactions in patients with sickle cell disease. **Br J Haematol.** 2015, v. 170, n. 6, p. 745-56. Doi: 10.1111/bjh.13494. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25967919/>

GAUDELI, N. M. *et al.* Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. **Nat Biotechnol.** 2020 Jul;38(7):892-900. doi: 10.1038/s41587-020-0491-6

GBD 2021 Sickle Cell Disease Collaborators. Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000-2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. **Lancet Haematol.** 2023; v. 10, n. 8, p. e585-e599. Doi: 10.1016/S2352-3026(23)00118-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37331373>. Acesso em: 01 Jun 2024.

GBOTOSHO, O.T.; KAPETANAKI, M. G.; KATO, G. J. The Worst Things in Life are Free: The Role of Free Heme in Sickle Cell Disease. **Front Immunol.** 2021, v. 11, n. 561917. Doi: 10.3389/fimmu.2020.561917. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.561917/full> Acesso em: 01 Jun 2024.

GINETE, C. *et al.* Genetic Modifiers of Sickle Cell Anemia Phenotype in a Cohort of Angolan Children. **Genes** (Basel). 2024; v. 15, n. 4, p. 469. Doi: 10.3390/genes15040469. Disponível em: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih/) Acesso em: 01 Jun. 2024.

GLADWIN, M. T. *et al.* Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. **Blood.** 2014 Jun 12;123(24):3689-90. doi: 10.1182/blood-2014-03-563874. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24926069/> Acesso em: 01 Jun. 2024.

GLADWIN, M. D. Pulmonary Complications of Sickle Cell Disease **N Engl J Med** 2008 359:2254-2265 Doi: 10.1056/NEJMra0804411. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra0804411> Acesso em: 01 Jun. 2024.

GLASSBERG, J. A. *et al.* Risk factors for increased ED utilization in a multinational cohort of children with sickle cell disease. **Acad Emerg Med.** 2012 Jun;19(6):664-72. Doi: 10.1111/j.1553-2712.2012.01364.x. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3375948/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

GLUCKMAN, E. *et al.* Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. **Blood.** 2017 Mar 16;129(11):1548-1556. Doi: 10.1182/blood-2016-10-745711. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/129/11/1548/35938/Sickle-cell-disease-an-international-survey-of>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

GRAVITZ, L.; PINCOCK, S. Sickle-cell disease. **Nature.** 2014; v. 515, p. S1. Doi: 10.1038/515S1a. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/515S1a#citeas>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

GROSSE, S. D. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. **Am J Prev Med.** 2011, v. 41, n. 6, Suppl 4), p. S398-405. Doi: 10.1016/j.amepre.2011.09.013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3708126/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

GUTSAEVA, C. A. *et al.* Inhibition of cell adhesion by anti-P-selectin aptamer: a new potential therapeutic agent for sickle cell disease. **Blood.** 2011 Jan 13;117(2):727-35. doi: 10.1182/blood-2010-05-285718. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20926770/> Acesso em: 01 Jun. 2024.

HAAPANIEMI *et al.* CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. **Nat Med.** 2018 Jul;24(7):927-930. Doi: 10.1038/s41591-018-0049-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29892067/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

HANKIS, J. *et al.* Chronic transfusion therapy for children with sickle cell disease and recurrent acute chest syndrome. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2005 Mar;27(3):158-61. Doi: 10.1097/01.mph.0000157789.73706.53. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15750449/> Acesso em: 01 Jun. 2024.

HARDOUIN, G. *et al.* Sickle Cell Disease: From Genetics to Curative Approaches. **Annu Rev Genomics Hum Genet.** 2023; v. 25, n. 24, p. 255-275. Doi: 10.1146/annurev-genom-120122-081037. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37624668>. Acesso em: 01 Jun 2024.

HARIF, M. *et al.* Special report: Summary of the first meeting of African Blood and Marrow Transplantation (AfBMT) group, Casablanca, Morocco, April 19-21, 2018 held under the auspices of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT). **Hematol Oncol Stem Cell Ther.** 2020, v. 13, n. 4, p. 202-207. Doi: 10.1016/j.hemonc.2019.05.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31181176>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

HATZLHOFER, B.L.D. *et al.* Alpha thalassemia, but not β S-globin haplotypes, influence sickle cell anemia clinical outcome in a large, single-center Brazilian cohort. **Ann Hematol** 100, 921–931 (2021). Doi: 10.1007/s00277-021-04450-x Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-021-04450-x#citeas>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

HAYES, R. J. *et al.* The haematology of steady state homozygous sickle cell disease: frequency distributions, variation with age and sex, longitudinal observations. **Br J Haematol.** 1985 Feb;59(2):369-82. Doi: 10.1111/j.1365-2141.1985.tb03002.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2578806/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

HAYWOOD, C. *et al.* Perceived discrimination in health care is associated with a greater burden of pain in sickle cell disease. **J Pain Symptom Manage.** 2014 Nov;48(5):934-43. Doi: 10.1016/j.jpainsymman.2014.02.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24742787/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

HEBBELI, R. P. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **J Clin Invest.** 1997 Dec 1;100(11 Suppl):S83-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9413407/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

HEBBELI, R. P.; BELCHER, J. D.; VERCELLOTTI, G.M. The multifaceted role of ischemia/reperfusion in sickle cell anemia. **J Clin Invest.** 2020; v. 130, n. 3, p. 1062-1072. Doi: 10.1172/JCI133639. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/133639>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

HENRY, E. R. *et al.* Treatment of sickle cell disease by increasing oxygen affinity of hemoglobin. **Blood.** 2021 Sep 30;138(13):1172-1181. doi: 10.1182/blood.2021012070. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34197597/> Acesso em: 01 Jun. 2024.

HIGGS, B.E. *et al.* The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. **N Engl J Med.** 1982; v. 306, n. 24, p. 1441-1446. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6176865>. Doi: 10.1056/NEJM198206173062402. Acesso em: 01 Jun. 2024.

HINES, P. C. *et al.* Novel epinephrine and cyclic AMP mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. **Blood.** 2003; v. 101, n. 8, p. 3281–3287. Doi: 10.1182/blood-2001-12-0289. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12506027>. Acesso em: 01 Jun 2024.

HOWARD, J. *et al.* The Transfusion Alternatives Preoperatively in Sickle Cell Disease (TAPS) study: a randomised, controlled, multicentre clinical trial. **Lancet.** 2013 Mar 16;381(9870):930-8. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61726-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23352054/>

HOWARD, J. *et al.* Guideline on the management of acute chest syndrome in sickle cell disease. **Br J Haematol.** 2015 May;169(4):492-505. doi: 10.1111/bjh.13348. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25824256/>

HOSS, E. I *et al.* Fetal hemoglobin rescues ineffective erythropoiesis in sickle cell disease. **Haematologica.** 2021 Oct 1;106(10):2707-2719. doi: 10.3324/haematol.2020.265462. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32855279/>

HUSAIN, M. *et al.* Pharmacogenomics of sickle cell disease: steps toward personalized medicine. **Pharmgenomics Pers Med.** 2017 Oct 19;10:261-265. doi: 10.2147/PGPM.S123427. PMID: 29089781; Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29089781/>

HYACINTH, H. I. *et al.* Frequent red cell transfusions reduced vascular endothelial activation and thrombogenicity in children with sickle cell anemia and high stroke risk. **Am J Hematol.** 2014 Jan;89(1):47-51. doi: 10.1002/ajh.23586. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23996496/>

HYACINTH, H. I. *et al.* Effect of Chronic Blood Transfusion on Biomarkers of Coagulation Activation and Thrombin Generation in Sickle Cell Patients at Risk for Stroke. **PLoS One.** 2015 Aug 25;10(8):e0134193. doi: 10.1371/journal.pone.0134193. Disponível: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26305570/>

HUSSAIN, M. A. *et al.* Value of serum ferritin estimation in sickle cell anaemia. **Arch Dis Child.** 1978 Apr;53(4):319-21. doi: 10.1136/adc.53.4.319. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/646443/>

IDRIS, I. M, Epidemiology and treatment of priapism in sickle cell disease. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.** 2022 Dec 9;2022(1):450-458. doi: 10.1182/hematology.2022000380. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36485155/>

INUSA, B. *et al.* Pandemic influenza A (H1N1) virus infections in children with sickle cell disease **Blood**. 2010; v. 115, n. 11, p. 2329-2330. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20299522>. Doi: 10.1182/blood-2009-12-260836. Acesso em: 01 Jun. 2024.

ITALIA, K.; COLAH, R.; GHOSH, K. Hydroxyurea could be a good clinically relevant iron chelator. **PLoS One**. 2013, v. 8, n. 12, e82928. Doi: 10.1371/journal.pone.0082928. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082928>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

JANA, S. *et al.* Hemoglobin oxidation-dependent reactions promote interactions with band 3 and oxidative changes in sickle cell-derived microparticles. **JCI Insight**. 2018, v. 3, n. 21, :e120451. Doi: 10.1172/jci.insight.120451. Disponível em: <https://insight.jci.org/articles/view/120451>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

JAWAD, A. J. *et al.* Laparoscopic cholecystectomy for cholelithiasis during infancy and childhood: cost analysis and review of current indications **World J Surg**. 1998; v. 22, n. 1, p. 69-73. Doi: 10.1007/s002689900351. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9465764>. Acesso em: 01 Jun 2024.

JENSEN, M. *et al.* Attenberger H, Schneider C, Walther JU. The developmental change in the G gamma and A gamma globin. Proportions in hemoglobin F. **Eur J Pediatr**. 1982 v. 138, n. 4, p. 311-314. Doi: 10.1007/BF00442505.

JOLLY, P. *et al.* UGT1A1 (TA)_n genotype is not the major risk factor of cholelithiasis in sickle cell disease children. **Eur J Haematol**. 2017 Mar;98(3):296-301. doi: 10.1111/ejh.12838. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27981643/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

JONES, R. *et al.* Major rearrangement in the human β -globin gene cluster **Nature** 1981; v. 291, n. 5810, p. 39-44. Doi: 10.1038/291039a0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7231523>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

KASSA, T. *et al.* Sickle Cell Hemoglobin in the Ferryl State Promotes β Cys-93 Oxidation and Mitochondrial Dysfunction in Epithelial Lung Cells (E10). **J Biol Chem**. 2015, v. 290, n. 46, p. 27939-27958. Doi: 10.1074/jbc.M115.651257. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4646035/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

KASSIM, A. A; DEBAUN, M. R. The case for and against initiating either hydroxyurea therapy, blood transfusion therapy or hematopoietic stem cell transplant in asymptomatic children with sickle cell disease. **Expert Opin Pharmacother**. 2014; v. 15, n. 3, p. 325-336. Doi: 10.1517/14656566.2014.868435. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24392871>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KASSIM, A. A. *et al.* How I treat and manage strokes in sickle cell disease. **Blood**. 2015 v.125. n. 22, p.3401-3410. Doi: 10.1182/blood-2014-09-551564. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25824688/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KATO, G. J. *et al.* Sickle cell disease. **Nat Rev Dis Primers**. 2018 Mar 15;4:18010. doi: 10.1038/nrdp.2018.10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29542687/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KATO, G. J. *et al.* Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**. 2006; v. 107, n. 6, p. 2279-2285. Doi: 10.1182/blood-2005-06-2373. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/107/6/2279/22076/Lactate-dehydrogenase-as-a-biomarker-of-hemolysis>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev**. 2007; v. 21, n. 1, p. 37-47. Doi: 10.1016/j.blre.2006.07.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17084951/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **J Clin Invest**. 2017, v. 127, n. 3, p.750-760. Doi: 10.1172/JCI89741. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/89741>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KANTER, J. *et al.* Biologic and Clinical Efficacy of LentiGlobin for Sickle Cell Disease. **N Engl J Med**. 2022 Feb 17;386(7):617-628. doi: 10.1056/NEJMoa2117175. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34898139/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KAUL, D. K. *et al.* Monoclonal antibodies to alphaVbeta3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelium interactions induced by platelet-activating factor. **Blood**. 2000; v.95, n. 2, p.368-374. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10627437/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KHAN, H. *et al.* Sickle cell disease and social determinants of health: A scoping review. **Pediatr Blood Cancer**. 2023, v. 70, n. 2, p. e30089. Doi: 10.1002/pbc.30089. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36495544>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KHANDROS, E.; Blobel, G. A. Heterogeneity of fetal hemoglobin production in adult red blood cells. **Curr Opin Hematol**. 2021; v. 28, n. 3, p. 164-170. Doi: 10.1097/MOH.0000000000000640. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33631783>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

KHODOVA, A. *et al.* Endothelin receptors and pain. **J Pain**. 2009; v. 10, n.1, p. 4-28. Doi: 10.1016/j.jpain.2008.09.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19111868/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KIND, L.; REID, M.; FORRESTER, T. E. Iron deficiency anaemia in Jamaican children, aged 1-5 years, with sickle cell disease. **West Indian Med J**. 2005; v. 54, n 5, 292-296. Doi: 10.1590/s0043-31442005000500004. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16459510/> Acesso em: 01 Jun 2024.

KLEIN, H. S. *In: The Atlantic Slave Trade*, 2nd edition (New Approaches to the Americas) 2nd Edition

KLINGS, E. S.; STEINBERG, M. H. Acute chest syndrome of sickle cell disease: genetics. risk factors. prognosis. and management. **Expert Review of Hematology**. 2022 Doi: 10.1080/17474086.2022.2041410. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35143368>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KLINGS, E. S. *et al.* An official American Thoracic Society clinical practice guideline: diagnosis, risk stratification, and management of pulmonary hypertension of sickle cell disease. **Am J Respir Crit Care Med**. 2014; v. 189, n. 6, p. 727–740. Doi: 10.1164/rccm.201401-0065ST. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24628312>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M Iron metabolism in the reticuloendothelial system. **Crit Rev Biochem Mol Biol**. 2003, v. 38, n. 1, p. 61-88. Doi: 10.1080/713609210. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/713609210>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

KONTOGHIORGHES, G. J. Iron Load Toxicity in Medicine: From Molecular and Cellular Aspects to Clinical Implications. **Int J Mol Sci**. 2023, v. 24, n. 16, p. 12928. doi: 10.3390/ijms241612928. Disponível em: <https://www.dpi.com/1422-0067/24/16/12928>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

KOSICKI, M, *et al.* Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. **Nat Biotechnol**. 2018 Sep;36(8):765-771. doi: 10.1038/nbt.4192. Epub 2018 Jul 16. Disponível: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30010673/> Acesso em: 01 Jun 2024.

KOWALCZYK, A. *et al.* The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. 2015; v. 63, n. 1, p. 41-52 Doi: 10.1007/s00005-014-0310-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25288367/> Acesso em: 01 Jun 2024.

KUMAR, V *et al.* Epidemiology and Predictors of all-cause 30-Day readmission in patients with sickle cell crisis. **Sci Rep**. 2020 Feb 7;10(1):2082. doi: 10.1038/s41598-020-58934-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32034210/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

KUYPERS, F. A. *et al.* The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**. 2004 Mar;50(2):147-58. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15095785/> Acesso em: 01 Jun 2024.

KUYPERS, F. A. Membrane lipid alterations in hemoglobinopathies. **Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program** 2007, 68–73

LAGRESLE-PEYROU C *et al.* 2018. Plerixafor enables safe, rapid, efficient mobilization of hematopoietic stem cells in sickle cell disease patients after exchange transfusion. **Haematologica** 103:778–86.

LANDBURG, P. P. *et al.* Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. **Blood Cells Mol Dis.** 2010; v. 44, n. 4, p.229-232. Doi: 10.1016/j.bcmd.2010.02.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20185345/>

LANZKRON, S. *et al.* Treatment of Acute Pain in Adults With Sickle Cell Disease in an Infusion Center Versus the Emergency Department : A Multicenter Prospective Cohort Study. **Ann Intern Med.** 2021; v.174, n. 9, p.1207-1213. Doi: 10.7326/M20-7171. *Erratum in:* Ann Intern Med. 2021; v. 174, n. 9, p.1347. Doi: 10.7326/L21-0522. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34224261/>

LAPOUMÉROULIE, C. *et al.* novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. **Hum Genet.** 1992; v. 89, n. 3, p. 333-337. Doi: 10.1007/BF00220553. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1376298>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

LATTANZI, A. *et al.* Development of β -globin gene correction in human hematopoietic stem cells as a potential durable treatment for sickle cell disease. **Sci. Transl.Med.** 2021; v. 13, n. 598, p. eabf2444 doi: 10.1126/scitranslmed.abf2444. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34135108/>

LEE, F. C. Diseases of the Gallbladder in Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease (Sixth Edition), 2021 ISBN 978-0-323-67293-1 Elsevier Inc.. Doi: <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02744-1>. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/book/9780323672931/pediatric-gastrointestinal-and-liver-disease?via=ihub=Frances C. Lee, Douglas S. Fishman,](https://www.sciencedirect.com/book/9780323672931/pediatric-gastrointestinal-and-liver-disease?via=ihub=Frances C. Lee, Douglas S. Fishman)

LEOPOLD, J. A. *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. **FASEB J.** 2001 Aug;15(10):1771-3. doi: 10.1096/fj.00-0893fje. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11481225/>

LETTRE, G. *et al.* DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta- globin loci associate with fetal hemo-globin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**; 2008, v. 105, n. 33, p. 11869–11874. Doi: 10.1073/pnas.0804799105. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18667698>. Acesso em: 01 Jun 2024.

LETTRE, G. & BAUER, D. E. Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies. **Lancet.** 2016, v. 387, n. 10037, p. 2554-2564. Doi: 10.1016/S0140-6736(15)01341-0. *Erratum for:* Lancet. 2016, v. 388, n. 10052, p.1376. Doi: 10.1016/S0140-6736(16)31539-2. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673615013410?via%3Dihub>. Acesso em: 01 Jun 2024.

LI, H. Dietary iron restriction protects against vaso-occlusion and organ damage in murine sickle cell disease. **Blood**. 2023, v. 141, n. 2, p. 194-199. Doi: 10.1182/blood.2022016218. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/141/2/194/486954/Dietary-iron-restriction-protects-against-vaso>. Acesso em: 01 Jun 2024.

LITTLE, S. Amplification-Refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. **Current protocols in human molecular genetics** 2001; cap. 9, unit. 9.8.1.– 9.8.12. Doi: 10.1002/0471142905.hg0908s07. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18428319>. Acesso em: 01 Jun 2024.

LIU, J. Resveratrol Attenuate Myocardial Injury by Inhibiting Ferroptosis *Via* Inducing KAT5/GPX4 in Myocardial Infarction. **Front Pharmacol**. 2022, v.13, p. 906073. Doi: 10.3389/fphar.2022.906073. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9171715/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

LOBO, C. L. C. *et al.* Mortality in children, adolescents and adults with sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2018, v. 40, n. 1, p. 37-42. Doi: 10.1016/j.bjhh.2017.09.006. Acesso em: 01 Jun. 2024.

LOUREIRO, M. M. *et al.* Factors associated with hospital readmission in sickle cell disease. **BMC Blood Disord**. 2009; v. 9, n. 2. Doi: 10.1186/1471-2326-9-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19250540> Acesso em: 01 Jun 2024.

LOWENTHAL, E. A. *et al.* Sickle cell acute chest syndrome associated with parvovirus B19 infection: case series and review. **Am J Hematol**. 1996; v. 51, n. 3, p. 207–213. Doi: 10.1002/(SICI)1096-8652(199603)51:3<207::AID-AJH5>3.0.CO;2-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8619401>. Acesso em: 01 Jun 2024.

LUO, S. *et al.* Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. **Curr Pharm Des**. 2014; v. 20, n. 22, p. 3548-3553. Doi: 10.2174/13816128113196660746. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24180388>.

LUZZATO, L.; MAKANI, J. Hydroxyurea - An Essential Medicine for Sickle Cell Disease in Africa. **N Engl J Med**. 2019; v. 380, n. 2, p. 187-189. Doi: 10.1056/NEJMe1814706. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30625057>. Acesso em: 10 Jun 2024.

MAGRIN, E. *et al.* Long-term outcomes of lentiviral gene therapy for the β -hemoglobinopathies: the HGB-205 trial. **Nat. Med**. 2022; v. 28, n.:1, p.81-88. Doi: 10.1038/s41591-021-01650-w. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01650-w>. Acesso em: 10 Jun 2024.

MAIER-REDELSPERGER *et al.* Variation in fetal hemoglobin parameters and predicted he moglobin S polymerization in sickle cell children in the first two years of life: Parisian Prospective Study on Sickle Cell Disease. **Blood**. 1994; v. 84, n.9, p. 3182-3188. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120713388?via%3Dihub>. Acesso em: 10 Jun 2024.

MAIRBÄURL, H.; WEBER, R. E. Oxygen Transport by Hemoglobin. **Comprehensive Physiology**. 2012; v.2, n. 2, p. 1463-1489. Doi: 10.1002/cphy.c080113. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c080113>. Acesso em: 10 Jun 2024.

MCGANN, P. T. *et al.* Hydroxyurea therapy for children with sickle cell anemia in sub-Saharan Africa: rationale and design of the REACH Trial. **Pediatr. Blood Cancer** 2016; v. 63, n. 1, p. 98–104. Doi: 10.1002/pbc.25705. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4825070/>. Acesso em: 10 Jun 2024.

MAKANI *et al.* Mortality in sickle cell anemia in Africa: a prospective cohort study in Tanzania. **PLoS One**. 2011 Feb 16;6(2):e14699. doi: 10.1371/journal.pone.0014699.. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21358818/>. Acesso em: 10 Jun 2024.

MALLOUH, A. A. *et al.* Beneficial effect of blood transfusion in children with sickle cell chest syndrome. **Am J Dis Child**. 1988; v. 142, n. 2, p. 178–182. Doi: 10.1001/archpedi.1988.02150020080034. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/article-abstract/513899>. Acesso em: 10 Jun 2024.

MAUDE G. H.; HAYES, R. J.; SERJEANT, G.R. The haematology of steady state homozygous sickle cell disease: interrelationships between haematological indices, **Br. J. Haematol**. 1987. v. 66, n. 4, p. 549–558. Doi: 10.1111/j.1365-2141.1987.tb01343.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2444245>. Acesso em: 10 Jun 2024.

MARSH, V. M. *et al.* ‘All her children are born that way’: gendered experiences of stigma in families affected by sickle cell disorder in rural Kenya. **Ethn Health** 2011; 16: 343–59

MARTIN, S. R. *et al.* Stigma and Pain in Adolescents Hospitalized for Sickle Cell Vasoocclusive Pain Episodes. **Clin J Pain**. 2018;34(5):438–444. doi: 10.1097/AJP.0000000000000553

MARTINS, R. A. *et al.* Cholelithiasis and its complications in sickle cell disease in a university hospital. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 2017; v. 39, n. 1, p. 28-31. Doi:10.1016/j.bjhh.2016.09.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28270342>. Acesso em: 01 Jun 2024.

MASUDA, T. *et al.* Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin. **Science** 2016; v. 15, 351(6270), p. 285-289. Doi: 10.1126/science.aad3312. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/science.aad3312?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 01 Jun 2024.

MBURU, J.; ODAME, I. Sickle cell disease: Reducing the global disease burden. **Int J Lab Hematol** 2019; v. 41, Suppl 1, p. 82–88. Doi: 10.1111/ijlh.13023. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31069977/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opin Drug Saf.** 2015; v. 14, n. 11, p. 1749-1758. Doi: 10.1517/14740338.2015.1088827. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5868345/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

MEGHANI, S. H. *et al.* Time to take stock: a meta-analysis and systematic review of analgesic treatment disparities for pain in the United States. **Pain Med** 2012; v. 13, n. 2, p. 150–74. Doi: 10.1111/j.1526-4637.2011.01310.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22239747/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

MEKONTSO, A. *et al.* Environmental influences on daily emergency admissions in sickle-cell disease patients **Medicine (Baltimore)**. 2014; v. 93, n. 29, p. e280. Doi: 10.1097/MD.0000000000000280. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25546672/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

MELTON, C. W.; HAYNES, J. Sickle acute lung injury: role of prevention and early aggressive intervention strategies on outcome. **Clin Chest Med.** 2006; v. 27, n. 3, p.:487. Doi: 10.1016/j.ccm.2006.04.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0272523106000396?via%3Dihub>. Acesso em: 01 Jun 2024.

MELLO, F.V., *et al.* Maturation-associated gene expression profiles during normal human bone marrow erythropoiesis. **Cell Death Discov.** 2019; v.5, p.69. Doi: 10.1038/s41420-019-0151-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30854228>. Acesso em : 20 Jun. 2024.

MENZEL, S. *et al.* A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. **Nat. Genet.** 2007; v. 39, n. 10, p. 1197–1199. Doi: 10.1038/ng2108. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17767159>. Acesso em: 01 Jun 2024.

MEZEI, L.; MURINSON, B. B. Pain education in North American medical schools. **J Pain** 2011; v.12, p.1199–1208. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21945594>.

MILLER, I. J.; BIEKER, J. J. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. **Mol. Cell. Biol.** 1993; v.13, n. 5, p. 2776–2786. Doi: 10.1128/mcb.13.5.2776-2786. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7682653>. Acesso em: 01 Jun 2024.

MODEL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bull World Health Organ.** 2008; v. 86, n. 6, p. 480-87. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18568278>. doi: 10.2471/blt.06.036673. Acesso em: 01 Jun 2024.

MOHANTY, P.; JENA, R. K.; SETHY, S. Variability of Iron Load in Patients of Sickle Cell

Anaemia (HbSS): A study from Eastern India. **J Clin Diagn Res.** 2017, v. 11, n. 3, p. EC19-EC22. Doi: 10.7860/JCDR/2017/23286.9492. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28511389>.

MÖLLER, M. N. *et al.* Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells. **ACS Omega.** 2022, v. 8, n. 1, p. 147-168. Doi: 10.1021/acsomega.2c06768. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c06768>. Acesso em: 01 Jun 2024.

MORRIS, C. R. *et al.* Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. **JAMA** 2005; 294, 81–90

MORRISON, A. K. *et al.* Parents' pain medication underdosing is associated with more emergency department visits in sickle cell disease. **Pediatr Blood Cancer.** 2018;65(4):10.1002/pbc.26906. doi: 10.1002/pbc.26906

MOTA, F. M. *et al.* Analysis of the temporal trend of mortality from sickle cell anemia in Brazil. **Rev Bras Enferm.** 2022; v. 75, n. 4, p. e20210640. Doi: 10.1590/0034-7167-2021-0640. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/reben/a/9nnBX8ytNm79p4bvtj8ckTr> Acesso em: 01 Jun. 2024.

MOTA, C. S. *et al.* Àgô Sankofa: um olhar sobre a trajetória da doença falciforme no Brasil nos últimos 20 anos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 29(3), e06772023. <https://doi.org/10.1590/1413-81232024293.06772023>

MURPHY, M. M. *et al.* Role of Rap1 in promoting sickle red blood cell adhesion to laminin via BCAM/LU. **Blood** 2005; 105, 3322–3329

NAGEL, R. L. *et al.* Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa — the Senegal type and the Benin type. **N Engl J Med** 1985; 312: 880-4.

NAGEL, R. L. *et al.* The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Rev.** 2003 Sep;17(3):167-78. Doi: 10.1016/s0268-960x(03)00003-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12818227/>

NAGEL, R. L.; STEIMBERG, M. H. **Genetics of the β s gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia.** *In:* Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, Clinical Management, Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2001, p. 711-755.

NAOUM P. C., NAOUM, F. A. **Hematologia Laboratorial** - Eritrócitos São José do Rio Preto: 2ª Edição da Academia de Ciência e Tecnologia, 2008 1ª Edição: 2005 Orientações acadêmicas e profissionais em Hematologia Laboratorial

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Population Health and Public Health Practice; Committee on Addressing Sickle Cell Disease: **A Strategic Plan and Blueprint for Action.** Martinez, R. M.; Osei-Anto, H. A.; McCormick, M. (Eds) 2020. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33411430>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. Evidence-Based Management of Sickle Cell Disease Expert Panel Report, 2014. Available at: https://www.nhlbi.nih.gov/sites/default/files/media/docs/sickle-cell-disease-report%20020816_0.pdf
Acesso em: 06 Jun. 2024

NATIONAL MARROW DONOR PROGRAM registry transplant data: transplant activity report. April 13, 2022. <https://bloodstemcell.hrsa.gov/data/donation-and-transplantationstatistics/transplant-activity-report>. Acesso em: 06 Jun. 2024.

NEMETH, E. *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**. 2004, v. 306, n. 5704, p. 2090-3. Doi: 10.1126/science.1104742. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15514116/>. Acesso em: 06 Jun. 2024.

NGO, D. A. *et al.* Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. **Br J Haematol**. 2012; v.156, n.2, p. 259-264. Doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08916.x Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22017641>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

NIHARA, Y. *et al.* A phase 3 trial of l-glutamine in sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.** 2018; 379:226–35

O'BRIEN, R. T. Iron burden in sickle cell anemia. **J Pediatr**. 1978;92:579–582. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022347678802911>

OHENE-FREMPONG, K. *et al.* Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**. 1998; v. 91, n. 1, p.288-294. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9414296>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder. **Blood Rev**. 2004 Mar;18(1):65-73. doi: 10.1016/s0268-960x(03)00037-7. PMID: 14684149. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14684149/>

OKUMURA, J. V. *et al.* Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(1):71-2. doi: 10.5581/1516-8484.20130019. PMID: 23580889; PMCID: PMC3621640. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23580889/>

OLIVEIRA, É. L. *et al.* Clinical, laboratory, and molecular characteristics of a cohort of children with hemoglobinopathy S/beta-thalassemia. **Hematol Transfus Cell Ther**. 2024; v. 46, n. 2, p. 167-175. Doi: 10.1016/j.htct.2023.11.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38182466>. Acesso em: 01 Jun 2024.

OLIVEIRA, F. Saúde da população negra : Brasil ano 2001. Brasília: Organização Pan-

Americana da Saúde. 2003. ISBN 85-87943-17-0. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/0081_saude_popnegra.pdf. Acesso em: 01 Jun 2024.

OLUBOYEDE, O. A. *et al.* Evaluation of serum ferritin levels and other hematological parameters in a Nigerian population. **J Natl Med Assoc.** 1983 Sep;75(9):885-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6631995/>

PACE, B. S. *et al.* Sickle cell disease: progress towards combination drug therapy. **Br J Haematol.** 2021 Jul;194(2):240-251. doi: 10.1111/bjh.17312 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33471938/>

PAGNIER, J. *et al.* Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; v. 81, n. 6, p. 1771-1773. Doi: 10.1073/pnas.81.6.1771. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6584911/>

PAULUKONIS, S. T. *et al.* Defining Sickle Cell Disease Mortality Using a Population-Based Surveillance System, 2004 through 2008. **Public Health Rep.** 2016 Mar-Apr;131(2):367-75. doi: 10.1177/003335491613100221. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26957672/>

PERRINE, R. P. Sickle cell disease in Saudi Arabs in early childhood. **Arch. Dis. Child.** 1981; v. 56, n. 3, p. 187-192. Doi: 10.1136/adc.56.3.187. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6163399>. Acesso em: 01 Jun 2024.

PERRINE, R. P. *et al.* Natural history of sickle cell anemia in Saudi Arabs: a study of 270 subjects. **Ann. Intern. Med.** 1978; v. 88, n. 1, p. 1-6. Doi: 10.7326/0003-4819-88-1-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/619731>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

PIEL, F. B. *et al.* Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **Lancet** 2013; v. 381, n. 9861, p. 142–151. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61229-X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23103089>. Acesso em: 01 Jun 2024.

PIEL, F. B.; STEINBERG, M. D.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **N. Engl. J. Med.** 2017; v. 376, n. 16, p. 1561-1573. Doi: 10.1056/NEJMra1510865. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28423290>. Acesso em: 01 Jun 2024.

PLATT, O. S. *et al.* Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.** 1994; v. 330, n. 23, p.1639–1644. doi: 10.1056/NEJM199406093302303. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7993409>. Acesso em: 01 Jun 2024.

PLATT, O. S. *et al.* Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. **N. Engl. J. Med.** 1991; v.325, n.1, p. 11-16. Doi: 10.1056/NEJM199107043250103. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1710777>. Acesso em: 01 Jun 2024.

PLATT, O.S. *et al.* Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell

anemia. **J. Clin. Invest.** 1984, v. 74, n. 2, p. 652–656. Doi: 10.1172/JCI111464. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6205021>. Acesso em: 01 Dez. 2018.

POKHREL A *et al.* Racial and ethnic differences in sickle cell disease within the United States: From demographics to outcomes. **Eur J Haematol.** 2023 May;110(5):554-563. doi: 10.1111/ejh.13936. Epub 2023 Feb 12. PMID: 36710488. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36710488/>

POPE, L. E.; DIXON, S. J. Regulation of ferroptosis by lipid metabolism. **Trends Cell Biol.** 2023; v.33, n.12, p. 1077-1087. Doi: 10.1016/j.tcb.2023.05.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892423000867?via%3Dihub>. Acesso em: 01 Dez. 2018.

POWARS, D. R. β S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. **Hematol Oncol Clin North Am.** 1991; v. 5, n. 3, p. 475–493. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1713910>. Acesso em: 01 Dez. 2018.

POWARS, D.; HITI, A. Sickle cell anemia: β s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. **Am. J. Dis. Child.** 1993; v. 147, n. 11, p. 1197–1202. Doi: 10.1001/archpedi. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8237915>. Acesso em: 01 Dez. 2018.

POWER-HAYS, A.; MCGANN, P. T. When Actions Speak Louder Than Words - Racism and Sickle Cell Disease. **N Engl J Med.** 2020 Nov 12;383(20):1902-1903. doi: 10.1056/NEJMp2022125. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32871062/>

POWER-HAYS, A.; WARE, R. E. Effective use of hydroxyurea for sickle cell anemia in low-resource countries. **Curr Opin Hematol.** 2020; v. 27, n. 3, p. 172-180. Doi: 10.1097/MOH.0000000000000582. Disponível em: https://journals.lww.com/co-hematology/abstract/2020/05000/effective_use_of_hydroxyurea_for_sickle_cell.7.aspx. Acesso em: 01 Jun. 2024.

PULE, G.D. *et al.* Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce gamma-globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease. **Clin. Trans. Med.** 2016, v. 5, n. 1, p. 15. Doi: 10.1186/s40169-016-0092-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27056246>. Acesso em: 01 Jun 2024.

QUINN, C. T. Sickle cell disease in childhood: from newborn screening through transition to adult medical care. **Pediatr Clin North Am.** 2013; v. 60, n. 6, p. 1363-1381. Doi: 10.1016/j.pcl.2013.09.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24237976>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

QUIROLO, K.; VICHINSKY, E. *In*: Rossi's Principles of Transfusion Medicine. Snyder, E. L. *et al.* (ed.). ISBN: 978-1-119-01301-3. Wiley-Blackwell, 2016. Disponível em: <https://www.wiley.com/enus/Rossi's+Principles+of+Transfusion+Medicine%2C+5th+Edition-p-9781119013013>. Acesso em: 01 Dez. 2018.

RAHIMI, Z. *et al.* Beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from southwest Iran. **Am. J. Hematol.** 2003; v.74, n.3, p.156–160. Doi: 10.1002/ajh.10422. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14587041>. Acesso em: 01 Dez. 2018.

RAO, K. R. *et al.* Iron stores in adults with sickle cell anemia. **J Lab Clin Med.** 1984 May;103(5):792-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6715957/>

REES, D. C. The rationale for using hydroxycarbamide in the treatment of sickle cell disease. **Haematologica.** 2011; v. 96, n. 4, p. 488-491. Doi: 10.3324/haematol.2011.041988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21454878>. Acesso em: 01 Jun 2024.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet.** 2010; v. 376, n. 9757, p. 2018-2031. Doi: 10.1016/S0140-6736(10)61029-X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21131035>. Acesso em: 01 Junh 2024.

REES, D. C.; BROUSSE, V. A. M.; BREWIN, J. N. Determinants of severity in sickle cell disease. **Blood Rev.** 2022; v. 56, 100983. Doi:10.1016/j.blre.2022.100983. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2022.100983> . Acesso em: 01 Jun 2024.

REITER, C. D. *et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat. Med.** 2022; v. 8, n. 12, p. 1383–1389. Doi: 10.1038/nm1202-799. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12426562>. Acesso em: 01 Jun 2024.

RENÓ, C. O. *et al.* Biochemical Evaluation of the Effects of Hydroxyurea in Vitro on Red Blood Cells. **Antioxidants (Basel).** 202, v. 10, n. 10, p. 1599. doi: 10.3390/antiox10101599. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/10/1599> Acesso em: 01 Jun 2024.

REZENDE, A.R. *et al.* Co-inheritance of α -thalassemia dramatically decreases the risk of acute splenic sequestration in a large cohort of newborns with hemoglobin SC **Haematologica.** 2019; v. 104, n. 7, p. e281-e3. doi: 10.3324/haematol.2018.209221. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30630972>. Acesso em: 01 Jun 2024.

RIBEIRO, A. V. **O tráfico atlântico de escravos e a praça mercantil de Salvador.** 2005. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em História Social Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

ROH, J. S.; SOHN, D. H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. **Immune Netw.** 2018; v. 18, n. 4, p. e27. Doi: 10.4110/in.2018.18.e27. Disponível em: <https://immunenetw.org/DOIx.php?id=10.4110/in.2018.18.e27>. Acesso em: 01 Jun 2024.

ROTHER, R. P. *et al.* The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin. **Journal American Medical Association.** 2005, v. 293, n.13,

p.1653-1662. Doi: 10.1001/jama.293.13.1653. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15811985>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SALES, R. R. *et al.* Functional polymorphisms of BCL11A and HBS1L-MYB genes affect both fetal hemoglobin level and clinical outcomes in a cohort of children with sickle cell anemia. **Ann. Hematol.** 2020; v. 99, n. 7, 1453–1463. Doi: 10.1007/s00277-020-04079-Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32447424>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SANGER, M. *et al.* Cognitive deficits are associated with unemployment in adults with sickle cell anemia. **J Clin Exp Neuropsychol.** 2016; v. 38, n. 6, p. 661–671. Doi: 10.1080/13803395.2016.1149153. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27167865>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SANKARAN, V.G. *et al.* Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. **Nature** 2009; v. 460, n. 7259, p. 1093–1097. Doi: 10.1038/nature08243. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19657335>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SANKARAN, V.G. *et al.* Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. **Science** 2008, v. 322, n. 5909, p. 1839–1842. Doi: 10.1126/science.1165409. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19056937>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SANTANA, S. S. *et al.* Hydroxyurea Scavenges Free Radicals and Induces the Expression of Antioxidant Genes in Human Cell Cultures Treated With Hemin. **Front Immunol.** 2020 Jul 17;11:1488. Doi: 10.3389/fimmu.2020.01488. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7380266/>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SANTANTON, M. V. *et al.* The association of optimism and perceived discrimination with health care utilization in adults with sickle cell disease. **J. Natl. Med. Assoc.** 2010; v.102, n. 11, p. 1056–1063. Doi: 10.1016/s0027-9684(15)30733-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21141295>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SANTIAGO, R. P. *et al.* Laboratory and Genetic Biomarkers Associated with Cerebral Blood Flow Velocity in Hemoglobin SC Disease. **Dis Markers.** 2017; 2017:6359871. Doi: 10.1155/2017/6359871. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28790534>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

SCARPELLINI, C. *et al.* Beyond ferrostatin-1: a comprehensive review of ferroptosis inhibitors. **Trends Pharmacol Sci.** 2023, v. 44, n. 12, p. 902-916. doi: 10.1016/j.tips.2023.08.012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614723001827?via%3Dihub>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

SCHUBERT, T. T. Hepatobiliary system in sickle cell disease. **Gastroenterology.** 1986; v. 90, n. 6, p. 2013-2021. Doi: 10.1016/0016-5085(86)90276-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3516788>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SCHIROLI, G. *et al.* Precise Gene Editing Preserves Hematopoietic Stem Cell Function following Transient p53-Mediated DNA Damage Response. *Cell Stem Cell*. 2019 Apr 4;24(4):551-565.e8. doi: 10.1016/j.stem.2019.02.019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30905619/>

SERJEANT, G. R. Fetal haemoglobin in homozygous sickle cell disease. *Clin. Haematol.* 1975; v. 4, n. 1, p. 109-122. Doi: 10.1016/S0308-2261(21)00626-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308226121006263>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SERJEANT, G. R.; VICHINSKY, E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 2018; v. 70, p. 66-77. Doi: 10.1016/j.bcmd.2017.06.00. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28689691>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SESTI-COSTA, R.; COSTA, F. F.; CONRAN, N. Role of Macrophages in Sickle Cell Disease Erythrophagocytosis and Erythropoiesis. *Int J Mol Sci*. 2023, v. 24, n. 7, p. 6333. Doi: 10.3390/ijms24076333. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/7/6333>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SETTY, B. N.; Stuart, M. J. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood* 1996; v. 88, n. 6, p. 2311–2320. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8822953>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SHRINER, D.; ROTIMI, C. N. Whole-Genome-Sequence-Based Haplotypes Reveal Single Origin of the Sickle Allele during the Holocene Wet Phase. *Am. J. Hum. Genet.* 2018; v. 102, n. 4, p. 547-556. Doi: 10.1016/j.ajhg.2018.02.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29526279>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SILVA, A. M. N; RANGEL, M. The (Bio)Chemistry of Non-Transferrin-Bound Iron. *Molecules*. 2022, v. 27, n. 6, p. 1784. Doi: 10.3390/molecules27061784. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/6/1784>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SILVA, D. G. *et al.* Genetic and biochemical markers of hydroxyurea therapeutic response in sickle cell anemia. *BMC Med Genet*. 2013; v. 14, p.108. Doi: 10.1186/1471-2350-14-108. Disponível em: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-14-108>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SILVA, F. H. *et al.* Treatment with Resveratrol Reverses Priapism in the Sickle Cell Mouse. *Blood* 2022, v. 140, Suppl. 1, n. 5379. Doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2022-169850>. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/140/Supplement%201/5379/488071/Treatment-with-Resveratrol-Reverses-Priapism-in> Acesso em: 01 Jun 2024.

SILVA-PINTO A. C. *et al.* The neonatal screening program in Brazil, focus on sickle cell disease (SCD). *Int J Neonatal Screen*. 2019; v. 5, n. 1, p. 11. Doi: 10.3390/ijns5010011.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33072971>. Acesso em: 01 Jun 2024.
SMETANINA, N. S.; GU, L. H.; HUISMAN, T. H. Comparison of the relative quantities of gamma-mRNAs and fetal hemoglobin in SS patients with different haplotypes. **Acta Haematol.** 1998; v.100, n. 1, p. 4-8. Doi: 10.1159/000040853. Disponível em: <https://karger.com/aha/article/100/1/4/13167/Comparison-of-the-Relative-Quantities-of-mRNAs-and>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SMITH, W. R.; SCHERER, M. Sickle-cell pain: advances in epidemiology and etiology. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.** 2010; p. 409–415. Doi: 10.1182/asheducation-2010.1.409. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21239827>. Acesso em: 01 Jun 2024.

SOLOVEY, A. *et al.* Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. **Blood.** 2004; v.104, n. 3, p. 840–846. Doi: 10.1182/blood-2003-10-3719. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15073034>. Acesso em : 01 Jun 2024.

SONNTAG, O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. **J Clin Chem Clin Biochem.** 1986; v. 24, n. 2, p. 127-139. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3711797>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STAMATOYANNOPOULOS, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. **Exp Hematol.** 2005; v. 33, n. 3, p. 259-71. Doi: 10.1016/j.exphem.2004.11.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301472X04004096?via%3Dihub>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STAMATOYANNOPOULOS, G. Hb F production in stressed erythropoiesis: observations and kinetic models. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1985; v. 445, p188–197. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2409871>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STANTON, M. V. *et al.* The association of optimism and perceived discrimination with health care utilization in adults with sickle cell disease. **J Natl Med Assoc.** 2010 ; v. 102, n. 11, p. 1056-1063. Doi: 10.1016/s0027-9684(15)30733-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21141295>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **Am J Hematol.** 2012; v. 87, n. 8, p. 795–803. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22641398>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood.** 2020; v. 136, n. 21, p. 2392-2400. Doi: 10.1182/blood.2020007645. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32808012>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STEINBERG, M. H. *et al.* (eds) *In: Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, Clinical Management.* 2nd ed. Cambridge University Press. 2000.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; WENDEL-NETO, S. *In: Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica*. 1. ed. São Paulo. Editora Atheneu. 2005. 303p.

STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin in β hemoglobinopathies: Is enough too much? **Am. J. Hematol.** 2022; v. 97, n. 6, p. 676–678. Doi: 10.1002/ajh.26518. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35253929>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STEINBERG, M. H. *et al.* Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. **JAMA.** 2003; v. 289, n. 13, p.1645– 1651. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12672732>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STEINBERG, M. H. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? **Blood.** 2014; v. 123, n. 4, p. 481-485. doi: 10.1182/blood-2013-09-528067. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24222332>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STEINBERG, M.H. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. Multicenter Study of Hydroxyurea. **Blood.** 1997; v. 89, n. 3, p. 1078–1088. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9028341>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STEINBERG, M. H.; EMBURY, S.H. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood** 1986; v. 68, n. 5, p. 985-990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3533181>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STOCKWEL, B. R. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. **Cell.** 2017; v. 171, n. 2, 273-285. Doi: 10.1016/j.cell.2017.09.021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741731070X?via%3Dihub>. Acesso em: 01 Jun 2024.

STYLES, L. A. *et al.* Secretory phospholipase A(2) predicts impending acute chest syndrome in sickle cell disease. **Blood.** 2000; v. 96, n. 9, p. 3276–3278. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11050014> . Acesso em: 01 Jun 2024.

TANG, H. *et al.*, Incidence Trends of Inherited Anemias at the Global, Regional, and National Levels Over Three Decades. **J Epidemiol Glob Health.** 2024; v. 14, n.1, p. 72-85. Doi: 10.1007/s44197-023-00170-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38079097>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

TANHEHCO, Y. C.; BHATIA, M. Hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapy in sickle cell disease: where are we now? **Curr Opin Hematol** 2019; v. 26, p. 448–452. Doi: 10.1097/MOH.0000000000000541. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31483336>. Acesso em: 01 Jun 2024.

TANHEHCO, Y. C. Gene therapy for hemoglobinopathies. **Transfus Apher Sci.** 2021 v. 60, n. 1, p.103061. Doi: 10.1016/j.transci.2021.103061. Epub 2021 Jan 10. PMID:

33461919. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33461919/> Acesso em: 01 Jun 2024

THEIN, S. L; MENZE, S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. **Br J Haematol.** 2009; v. 145, n. 4, p. 455-67. Doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07650.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.2009.07650.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 01 Jun 2024

THE LANCET Sickle cell disease: a year in review Haematology June, Editorial, 2022; v. 9, n. 6, E385, Doi: 10.1016/S2352-3026(22)00144 Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanhae/article/PIIS2352-3026\(22\)00144-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanhae/article/PIIS2352-3026(22)00144-2/fulltext). Acesso em: 01 Jun 2024.

THEURL, I. *et al.* On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. **Nat Med.** 2016; v. 22, p. 945–951. Doi: 10.1038/nm.4146. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.4146>. Acesso em: 01 Jun 2024.

TKACH, J. A; HAACKE, E. M. A comparison of fast spin echo and gradient field echo sequences. **Magn Reson Imaging.** 1988; v. 6, n. 4, p. 373–89. Doi: 10.1016/0730-725x(88)90474-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3185131>. Acesso em: 01 Jun 2024.

TORRES, L. S. *et al.* The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 2012, v. 34, n. 6. Doi: 10.5581/1516-8484.20120106. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/DRFtrdhrwnQ6H6YdH98C3yM/#ModalTutors>. Acesso em: 01 Jun 2024.

TSHILOLO, L. *et al.* Hydroxyurea for children with sickle cell anemia in sub-Saharan Africa. **N Engl J Med** 2019; v. 380, n. 2, p. 121–131. Doi: 10.1056/NEJMoa1813598. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30501550>. Acesso em: 01 Jun 2024.

TELEN, M. J. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. **Blood** 2016; 127: 810-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26758919> Acesso em: 01 Jun 2024.

THERRELLI, B. L.; PADILLA, C. D. Barriers to implementing sustainable national newborn screening in developing health systems. **Int J Pediatr Adolesc Med** 2014; v.1, n.2, p. 49–60. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352646714000179>. Acesso em: 01 Jun 2024.

TSITSIKAS, D. A; BRISTOW, J.; ABUKAR, J. Fat embolism syndrome in sickle cell disease. **J Clin Med.** 2020; v. 9, n. 11, p. 3601. Doi: 10.3390/jcm9113601. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33171683>. Acesso em: 01 Jun 2024.

UDA, M. *et al.* Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 2008; v. 105, n. 5, p. 1620–1625. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18245381>. Acesso em: 01 Jun 2024.

URSINI, F.; MAIORINO, M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. **Free Radic Biol Med.** 2020, v.152, p.175-185. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.027. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584919324372?via%3Dihub>. Acesso em: 01 Jun 2024.

VAN BEERS, E. J. *et al.* Iron, inflammation, and early death in adults with sickle cell disease. **Circ. Res.** 2015; 116, 298–306. Doi: 10.1073/pnas.0711566105. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25378535>. Acesso em: 01 Jun 2024.

VATHIPADIEKAL, *et al.* Homozygosity for a haplotype in the HBG2-OR51B4 region is exclusive to Arab-Indian haplotype sickle cell anemia. **Am J Hematol** 2016; v. 91, n. 6, E308 E311. Doi: 10.1002/ajh.24368. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27185208>. Acesso em: 01 Jun 2024.

VERGER, P. *In: Fluxo e refluxo: do tráfico de escravos entre o Golfo do Benin e a Bahia de Todos os Santos dos séculos XVII a XIX.* São Paulo: Corrupio, 1987.

VICHINSKY, E. P. *et al.* Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. **N Engl J Med.** 2000; Doi: 10.1056/NEJM200006223422502.. v. 342, n. 25, p.1855–1865. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10861320>. Acesso em: 01 Jun 2024.

VICHINSKY, E. *et al.* Pulmonary fat embolism: a distinct cause of severe acute chest syndrome in sickle cell anemia. **Blood.** 1994; v. 83, n.11, p. 3107–3112. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8193347>. Acesso em: 01 Jun 2024.

VICHINSKY, E. *et al.* 2019. A phase 3 randomized trial of voxelotor in sickle cell disease. **N.Engl.J.Med.**v. 381, n. 6, p. 509–519. Doi: 10.1056/NEJMoa1903212. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31199090>. Acesso em: 20 Jun 2024.

VINCHI, F. *et al.* Vasculo-toxic and pro-inflammatory action of unbound haemoglobin, haem and iron in transfusion-dependent patients with haemolytic anaemias. **Br J Haematol.** 2021, v. 193, n. 3, p. 637-658. Doi: 10.1111/bjh.17361. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bjh.17361>. Acesso em: 20 Jun 2024.

VOSKARIDOU, E. *et al.* The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17- year, single-center trial (LaSHS). **Blood.**;2010; v. 115, n. 12, p. 2354–2363. Doi: 10.1182/blood-2009-05-221333. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19903897>. Acesso em: 20 Jun 2024.

WARE, R. E. *et al.* Sickle cell disease. **Lancet.** 2017; v. 390, n. 10091, p. 311–323. Doi: 10.1016/S0140-6736(17)30193-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28159390>. Acesso em: 01 Jun 2024.

WARE, R. E. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. **Blood**. 2010; v., n. 26, p. 5300–5311. 2010. Doi: 10.1182/blood-2009-04-146852. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20223921>. Acesso em: 01 Jun 2024.

WARE, R. E. Is sickle cell anemia a neglected tropical disease? **PLoS Negl Trop Dis** 2013; v. 7, n. 5, p. e2120. Doi: 10.1371/journal.pntd.0002120. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23750287/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WEATHERALL, D. *et al.* **In: Disease Control Priorities in Developing Countries**. 2nd edition. Washington (DC): World Bank; cap. 34. 2006

WILLIAMS, T. N. *et al.* World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.** 2012; v. 2, n. 9, a011692. Doi: 10.1101/cshperspect.a011692. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22951448>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WILSON, M. T.; REEDER, B. J. The peroxidatic activities of Myoglobin and Hemoglobin, their pathological consequences and possible medical interventions. **Molecular Aspects of Medicine**. 2022; v. 84, n. 101045. DOI: 10.1016/j.mam.2021.101045. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299721001059>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WAGNER, M. C. *et al.* Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. **J. Lab Clin. Med.** 2004; v. 144, n. 5, p. 260–268. Doi: 10.1016/j.lab.2004.08.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15570244>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WALSH, K. E. *et al.* Medication adherence among pediatric patients with sickle cell disease: a systematic review. **Pediatrics** 2014; v. 134, n. 6, p. 1175–1183. Doi: 10.1542/peds.2014-0177. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25404717>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WALTERS, M. C. *et al.*, Indications and Results of HLA-Identical Sibling Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2016; v. 22, n. 2, p. 207-211. Doi: 10.1016/j.bbmt.2015.10.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26500093>. Acesso em: 01 Jun 2024.

WANG, W. C. *et al.* Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). **Lancet** 2011; v. 377, n. 9778, p. 1663-1672. Doi: 10.1016/S0140-6736(11)60355-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21571150>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WARADE, J. P. *et al.* Study of iron profile in sickle cell disease patients. **Int J Biol Med Res** 2013; v. 4, n. 3, p. 3271-74. Disponível em: <https://www.biomedscidirect.com/journalfiles/IJBMRF20131226/study-of-iron-profile-in->

sickle-cell-disease-patients.pdf. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WATSON, J. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. **Am J Med Sci** 1948; v. 215, n. 4, p.419–23. Doi: 10.1097/00000441-194804000-00008.

WEBB, D. K; DUNN, D. T.; SERJEANT, G. R Gall stones in Jamaican children with homozygous sickle cell disease. **Arch Dis Child** 1989; v. 64, p.1342. Doi:<https://doi.org/10.1136/adc.64.9.1342>Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1792039/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WILLIAMS, S. *et al.* Bacteraemia in Kenyan children with sickle-cell anaemia: a retrospective cohort and case-control study **Lancet**. 2009; v. 374, p. 1364-1370.Doi: 10.1016/S0140-6736(09)61374-X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2768782/>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WILLEN, M.; RODEGHIER, M.R.; DEBAUN. Asthma in children with sickle cell disease **Curr Opin Pediatr**, 2019; v. 31, p. 349-356. Doi: 10.1097/MOP.0000000000000756.

WHO Model List of Essential Medicines, 21st List. World Health Organization. 2019a, Geneva, Switzerland. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WHO Model List of Essential Medicines for Children, 7th List. World Health Organization 2019b, Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273825/EMLc-6-eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 01 Jun. 2024.

WHO Regional Committee for Africa. Progress in the implementation of the African Region sickle-cell strategy 2010–2020: information document. Geneva: World Health Organization Regional Office for Africa, 2020.

WOOD, K. C. & Granger, D. N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 2007; 34, 926–932.

YANAGISAWA, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**. 1988; 332:411–415. doi: 10.1038/332411a0.

ZAGO, M. A. *et al* R. Atypical bS Haplotypes Are Generated by Diverse Genetic Mechanisms. **American Journal of Hematology**. 2000; 63:79–84. Doi:10.1002/(SICI)1096-8652(200002)63:2<79::AID-AJH4>3.0.CO;2-D

ZAKARIA, M. *et al.* Cholelithiasis in patients with paediatric sickle cell anaemia in a Saudi hospital, **Journal of Taibah University Medical Sciences**, 2019; v.14, n. 2, p. 187-192, <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2019.02.007>.

ZEINEDDIN, A. *et al.* Early Cholecystectomy in Patients with Sickle Cell Disease with

Uncomplicated Cholelithiasis Is Associated with Better Outcomes. **J Am Coll Surg.** 2024
1;238(4):543-550. doi: 10.1097/XCS.0000000000000949.

APÊNDICE A – ARTIGO**CAR homozygotic haplotype is an independent prognostic factor to acute chest syndrome in sickle cell disease**

Isis Cavalcante Baptista ^{1,2}, Fabiana Vieira de Mello³, Ana Beatriz Walter-Nuno⁴, Patrícia F. R. Siqueira³, Robéria Pontes^{3,4}, Gabriela de Oliveira Paiva e Silva ^{5,6}, Pedro L. Oliveira^{5,6}, Andrea Soares⁷, Marcelo Gerardin Poirot Land³, Iqbal Hamza^{8,9}, Elaine Sobral da Costa³

¹Internal Medicine Postgraduate Program, Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 21941-617, Brazil; ²Chemical Engineering Program, COPPE, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 21941-972, Brazil; ³Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 21941-912, Brazil; ⁴Translational Research Laboratory at Children's Hospital José Alencar, Brasília 70684-831, Brazil; ⁵Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil, ⁶National Institute of Science and Technology in Molecular Entomology (INCT-EM), Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil, ⁷Department of Hematology, Faculty of Medicine, University of Rio de Janeiro State (UERJ), Rio de Janeiro, 20950-000, Brazil, ⁸Center for Blood Oxygen Transport and Hemostasis, Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Maryland, Baltimore, MD 21201, USA, ⁹Department of Animal and Avian Sciences, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA

*Corresponding author:

E-mail: isis@peq.coppe.ufrj.br (ICB)

Abstract

Background and aim of work: Sickle cell disease (SCD) is the most prevalent hereditary hemoglobinopathy worldwide. Acute chest syndrome (ACS) is one of the worst outcomes and is quite unpredictable by clinical or laboratory criteria. SCD patients with Central African Republic (CAR) haplotypes have lower levels of fetal hemoglobin (HbF) that can be associated with clinical complications, which were investigated at the present study.

Methods: In 102 SCD patients, laboratory and clinical data (e.g. splenic sequestration, stroke, ACS) were compared with CAR allele. Further, ACS risk factors were studied retrospectively in two steps: i) univariate analysis (Mann–Whitney test for continuous and Chi-square for categorical variables) and ii) multivariate analysis (binomial logistic regression).

Results: The CAR allele was predominant and is present in 84.1% of patients, 34.9% homozygous and 24.3% heterozygous. ACS patients with the presence of at least one CAR allele had lower HbF levels both at baseline and after hydroxyurea (HU) treatment. A progressively higher frequency of ACS was observed in patients with one or two CAR alleles compared to other SCD patients. In a univariate analysis, ACS was associated with males, higher mean corpuscular volumes, more need for HU treatment, and CAR homozygotes. In a multivariate analyses, only male sex and CAR allele were independent factors in predicting the development of ACS in SCD patients - odds ratio (confident interval) of 2.88(1.16-7.13) and 3.11(1.16 – 8.32).

Conclusion: CAR alleles in SCD patients predicts ACS risk and adoption of preventive actions could avoid ACS development.

Keywords: Sickle cell disease, Sickle cell anemia, acute chest syndrome, hemoglobin, haplotype, CAR allele.

Introduction:

Sickle cell disease (SCD) is the most prevalent hereditary hemoglobinopathy in the world, affecting 20 to 25 million people, of which 60% live in Africa. It is estimated that 300,000 children are born annually worldwide with SCD [1,2,3]. SCD is a group of inherited diseases characterized by mutations in the gene encoding the hemoglobin subunit β . The mutation causes replacement of glutamic acid with valine in the β globin resulting in the β^S allele and consequently the formation of the abnormal hemoglobin S (HbS). Sickle cell anemia (SCA) is characterized by the homozygosity for β^S allele and is the most frequent and severe form of SCD [3]. SCD causes hemolytic anemia and acute vasoocclusive events, presenting a broad clinical heterogeneity [3]. Additional complications such as α -thalassemia, fetal hemoglobin synthesis, and genetic variant in the BCL11A [4,5] have been identified, but they cannot fully explain clinical differences observed among SCD patients. The β^S allele was classified based on the presence or absence of restriction sites in five haplotypes named Arabian/Indian (AI), Benin (BEN), Cameroon (CAM), Central African Republic (CAR), and Senegal (SEN) [6]. These haplotypes with distinct ethnic and geographical origins have proven to be valuable markers in anthropological research, aiding in tracing the distribution of the β^S allele among human populations [6]. Some reports suggested the role of β^S haplotypes in different clinical phenotypes of SCD [7]. Regardless of lower levels of HbF in patients with CAR allele [8], association with SCD complications such as acute chest syndrome (ACS) were not demonstrated [5,7,9]. ACS is a severe and frequently associated fatal outcome in patients with SCD, occurring in SCD patients with initially mild clinical manifestations [10,11]. In this context, we retrospectively analyzed the prognostic impact of β^S gene haplotypes for the development of clinical complications, especially ACS, in a cohort of SCD patients from Rio de Janeiro, Brazil, focusing on CAR alleles due to their frequency in our population.

Methods:

The study included 102 SCD patients (48 males; 54 females), varying from 5 to 79 years (median 21 years-old). DNA samples obtained from peripheral blood samples of the

patients were used for haplotype determination, after the individuals or their respondents signed a consent form. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, it was approved by Research Ethics Committee of Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, Federal University of Rio de Janeiro (IPPMG/UFRJ) (CAAE no. 64913617.7.0000.5264) and Research Ethics Committee of Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ) (CAAE no. 57862016.5.0000.5259). Clinical data, obtained from the patient's medical records, included red blood cell transfusions, hospitalizations, painful episodes, ACS, bacterial infections, stroke, splenic sequestration, aplastic crisis, cholelithiasis, cholecystitis, viral infection, leg ulcer and treatment with HU. Laboratorial parameters included blood cell counts, Ferritin (Frt) levels, F and S hemoglobin levels (HbF and HbS), bilirubin (total and fractions), total transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), and lactate dehydrogenase (LDH).

Determination of β S globin gene haplotypes

Genomic DNA was extracted from whole blood samples using the Biopur Mini Spin Plus DNA extraction kit (Mobius Life Science, Pinhais, PR) according to the manufacturer's instructions and stored at -70°C . Five regions around and within the β globin gene cluster were amplified by PCR reactions (total volume: $25\mu\text{L}$, being 150ng genomic DNA, $2\times$ Taq Green PCR Master Mix, 25pM each of forward and reverse primers (LGC Biosearch Technologies, Novato, CA), carried out in a programmable thermal cycler (Appliedbiosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Initial denaturation was obtained at 94°C for 5 min, followed by 35 denaturation cycles at 94°C for 1 min, annealing at $52\text{-}60^{\circ}\text{C}$ for 45 seconds, and extension at 72°C for 1.5 min, with final extension for 10 min at 72°C [12,13]. Amplified products were digested by specific restriction enzymes (Thermo Scientific, Waltham, MA) as follows: $10\mu\text{L}$: $1\mu\text{L}$ mixture was incubated for 30 min at 37°C (Table 1). The products were resolved on a 1.5% agarose gel. The regions analyzed within the β globin gene cluster,

primer sequences, restriction enzymes and the length of the resulting fragments are shown in Table 1. Each sample was scored for the presence (+) or absence (-) of restriction sites. A sample of one heterozygous individual for each polymorphic site was used as control. According to the restriction profile for the known polymorphic regions in the β -globin cluster, the CAR, BEN, SEN or CAM haplotypes were identified. Less common haplotypes were classified as atypical haplotypes (ATP) (Table 2) [14,15,16].

Table 1. Regions within the β globin gene cluster, primer sequences, restriction enzymes, and RFLP product size. ⁽²⁹⁾

Primer	Restriction enzymes used for each region	Studied region within the β globin gene cluster	Primers' sequence 5'3' ⁽²⁴⁾	Fragment size in (bp)
H0	Xmn1	5' G γ	F: AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	650pb
H1			R:AGGAGCTTATTGATAACCTCAGAC	
H2	<i>Hind</i> III	G γ	F:AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	780pb
H3			R:TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	
H3	<i>Hind</i> III	A γ	F:TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	760
H4			R:TAAATGAGGAGCATGCACACAC	
H5	<i>Hinc</i> II	$\psi\beta$	F: GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	701
H6			R: ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	
H7	<i>Hinc</i> II	3' $\psi\beta$	F: TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	590
H8			R: GGACCCTAACTGATATAACTA	

Table 2. Pattern of β^S -hemoglobin digestion by restriction enzymes to determine of the β^S globin haplotype.

Restriction Enzyme	XmnI	Hind III	Hind III	Hinc II	Hinc II
	5' to	G γ	A γ	$\Psi\beta$	3' to
Haplotype	G γ				$\psi\beta$
CAR	-	+	-	-	-
Benin	-	-	-	-	+
Senegal	+	+	-	+	+
Cameroon	-	-	+	-	+

Note: (+): presence of restriction site; (-): absence of restriction site.

Statistical analysis

SPSS Statistics®14.0 (IBM Corporation, Somers, NY, United States) package was used for statistical analysis. Continuous variables were summarized as median, minimum, and maximum. Non-parametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests were used to compare continuous variables. Categorical data were recorded as occurrences (counts) and percentages, using Chi-square (χ^2) for comparisons. p -values less than 0.05 were considered statistically significant. Multivariate analysis was performed by binomial logistic regression. A regressive model (backward stepwise) was chosen using the likelihood ratio to determine the variables of the parsimonious model. Variables with p -value < 0.2 were selected to start the multivariate analysis. Results were expressed as odds ratio (OR), with their respective confidence interval (CI) and p -value.

Results:

CAR β^S haplotype (homozygous or heterozygous) was found in 84.1% (86/102) of patients with SCD. Homozygous CAR β^S (CAR/CAR) haplotype was detected in 34.9% (36/102) patients followed by CAR/Other Haplotypes (CAR/non-CAR) in 24.3% (25/102).

CAR/Atypical β^S haplotype represented 24.3% (25/102) of patients and 16.5% (17/102) had haplotypes other than CAR (non-CAR/non-CAR; Table 3).

Table 3. Frequency of CAR β^S globin gene haplotype in all SCD patients studied and in the subset of SCA patients.

Haplotype	All patients (N = 102)		SCA (N = 83)		SCD (N = 19)	
	Count	%	Count	%	Count	%
CAR/CAR	36	34.9	36	43.4	0	0
CAR/non-CAR	25	24.3	21	25.3	4	21.1
CAR/Atypical	25	24.3	12	14.5	13	68.4
non-CAR/non-CAR*	17	16.5	14	16.8	2	10.5

*non-CAR: Benin/Benin (13/17). Benin/Senegal (3/17) or Benin/Cameroon (1/17) ; SCA: Sickle Cell Anemia; SCD: Sickle Cell Disease

Laboratory tests were analyzed among patients (S/S) with sickle cell anemia (SCA) to avoid the effect of typical differences among distinct SCD types. S hemoglobin was significantly higher in SCA patients with at least one CAR allele (87.9%) compared to non-CAR (79.1%), $p = 0.01$, (Table 5). Next, patients with at least one CAR allele had significantly lower levels of fetal hemoglobin (HbF=3.5%) compared to patients with other haplotypes (HbF=9.5%) before HU treatment ($p=0.001$; Figure 1E). After treatment, HbF increased in patients without CAR allele (HbF from 9.5% to 20.5%) compared to patients presenting at least one CAR allele (HbF from 3.5% to 9.35%) ($p= 0.023$; Figure 1F; Table 5). WBC counts were also significantly higher ($9.2 \times 10^3/uL$) in CAR haplotype SCA patients than in non-CAR ($6.5 \times 10^3/uL$), $p=0.02$.

Patients with SCD did not show significant differences concerning clinical manifestations such as hospitalizations, painful episodes, aplastic crisis, cholecystitis, infections, peritoneal ulcers, splenic sequestration and stroke (Table 4). However, CAR/CAR SCD patients frequently received red blood cell transfusions (54%, 28/51) than CAR

heterozygotes (38%,12/31) or other haplotypes (25%,5/20), $p=0.046$ (Figure 1 and Table 4). In addition, CAR/CAR SCD patients received HU treatment (80.6%, 29/36, $p=0.013$) and presented significantly more gallstones (70.6%, 24/34) than others SCD cases ($p=0.05$). Finally, a higher frequency of acute chest syndrome (61.1%, 22/36) was observed in CAR/CAR SCD patients when compared to CAR heterozygotes (34%, 17/50) or other haplotypes (31%, 5/16) ($p=0.024$) (Figure 1 and Table 4). To investigate the impact of CAR/CAR genotype on the occurrence of ACS and the potential association of other putative prognostic factors, we performed two subsequent analyses. Univariate analysis showed that SCD patients with ACS were mostly males (59.1%) compared to patients without ACS (no-ACS) (37.9%), $p=0.04$. ACS patients used HU treatment more frequently (84.1%) than patients without ACS (48.3%, $p=0.0001$). In addition, they presented significantly higher VCM (median of 94, ranging from 66 to 126) than no-ACS cases (median of 89, ranging from 64 to 131). Finally, most of ACS patients had CAR/CAR alleles (61.1%) compared to 38.9 in no-ACS, $p=0.017$. Subsequently, we performed a binomial logistic regression (backward stepwise), including variables with $p<0.2$ in the comparison between ACS vs. no-ACS for gender, age, VCM, WBC, platelets count, HbF, reticulocyte count, α -thalassemia and CAR/CAR allele. As a result, only two variables were independent prognostic factors for ACS in SCD patients: gender (OR: 2.88, confidence interval - CI: 1.16-7.13, $p=0.02$) and the presence of CAR/CAR allele (OR: 3.11, CI:1.16 – 8.32, $p=0.02$). In other words, CAR/CAR SCD patients had 3 times more chances to present ACS. Furthermore, the presence of these two variables combined, CAR/CAR males had an OR: 3.53 (CI: 1.27-11.08), $p=0.02$ to present ACS, compared with all other patients.

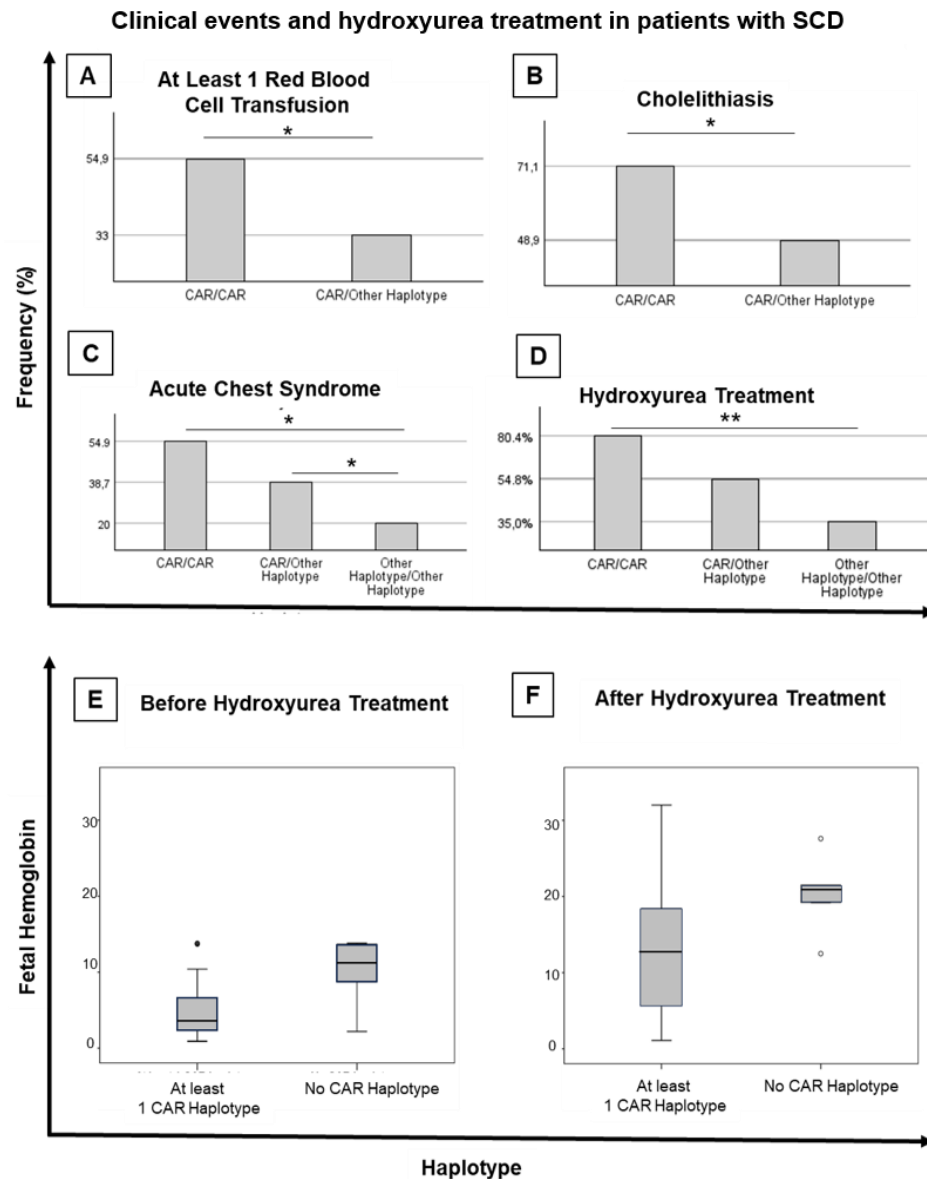


Figure 1: Clinical events and HU treatment in patients with SCD. Panel 1A shows that the percentage of SCD patients who needed at least one blood cell transfusion was significantly higher in the presence of at least 1 CAR allele, compared to patients without CAR allele. In panel 1B, the frequency was also significantly higher in the presence of at least 1 CAR allele. Panels 1C and 1D show that percentages of acute chest syndrome (1C) and HU treatment (1D) needs are highest in SCD patients with CAR homozygosity (CAR/CAR) and decrease progressively in CAR heterozygosity (CAR /Other haplotype) or absence of the CAR allele (other Haplotype/Other Haplotype) SCD patients. Panels E and F show that fetal hemoglobin levels are lower in patients with SCA with at least one CAR allele in both moments, before and after treatment with HU. P-Value ≤ 0.05 was considered as significant (chi-square test). * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$.

Table 4. Frequency of clinical events in SCD patients homozygote vs.. heterozygote vs.. absence of CAR allele.

Clinical Event (%)	% occurrence of clinical events according CAR alleles		
	CAR/CAR	CAR/non-CAR	non-CAR/non-CAR
Hospitalization	72.5	71	50
Painful episode	60.8	71	40
Acute Chest Syndrome	61.1*	34	31.3
Aplastic crisis	2.0	3.2	0
Gallstones	70.6*	52.4	57.1
Cholecystitis	60	60	22.2
Bacterial infection	23.5	16.1	15
Leg ulcer	19.6	25.8	5
Episode of splenic sequestration	19.6	12.9	10
Episode of stroke	19.6	12.9	5

Clinical events written in bold were significantly different according CAR alleles * $p \leq 0,05$

Table 5. Laboratory alterations of patients with SCA according to the presence of the CAR allele

UNIVARIATE ANALYSIS			
LABORATORY PARAMETER (median)	CAR	non-CAR	<i>p</i> -Value
Hemoglobin (g/dL) (Hb)	7.8	8.9	0.12
S Hemoglobin (%) (HbS)	87.9	79.1	0.01
F Hemoglobin (%) (HbF)	3.14	6.9	0.01
Packed cell volume (%) (PCV)	23	25.8	0.13
Mean cellular volume (fL) (MCV)	92.1	93	0.49
Mean cellular hemoglobin concentration (g/dL) (MCHC)	34	34.5	0.69
Iron (mg/dL) (Fe)	127.5	107	0.24
Ferritin (µg/L) (Frt)	240.6	289.7	0.52
WBC (10 ³ /mm ³)	10.95	9.1	0.13
WBC after HU treatment (10³/mm³)	9.2	6.5	0.02
Granulocytes (10 ³ /mm ³)	5.5	4.4	0.10
Platelets (mm ³)	377.5	356	0.60
Reticulocytes (%)	223.7	173.3	0.33
Total bilirubin (mg/dL)	2.71	2.98	0.34
Direct bilirubin (mg/dL)	0.505	0.47	0.09
Indirect bilirubin (mg/dL)	2.015	2.2	0.30
Total transaminase (AST) (U/L)	45.5	42	0.49
Alanine transaminase (ALT) (U/L)	19	19	0.83
Lactate desidrogenase (LDH) (U/L)	973	940	0.78

Median values of quantitative laboratory data. Laboratory data written in bold were significantly different according CAR alleles.

Tabela 6: Univariate and multivariate analysis to identify prognostic factors associated to acute chest syndrome in Sickle Cell Disease (SCD) patients (n=102).

	Univariate Analysis*			Multivariate analysis**		
	No ACS (%)	ACS (%)	p-valor	OR	95% CI	p-valor
Gender						
Female	62.1	40.9				
Male	37.9	59.1	0.045	2.88	1.16-7.13	0.02
Age (median)	29 (5-79)	22 (9-50)	0.10			
%HbF (median)	3.8 (0.3 – 27.5)	3.5 (1 – 15.5)	0.9			
HU treatment	48.3	84.1	0.0001			
WBC (cells/uL)	12 x10 ³ (4-28 x 10 ³)	12.3 x10 ³ (16.8-37x5.10 ³)	0.48			
Platelets (U/uL)	386 x10 ³ (334-416 x 10 ³)	393 x10 ³ (381-478 x 10 ³)	0.13			
Reticulocytes (%)	7,0 (7,0-10,6)	6,9 (6,7-10,5)	0.91			
Hb (g/dL)	7.7 (4,8-12,9)	7.76 (5.3-12,4)	0.26			
CHCM	33.8 (28,4-38)	34.5 (30-38)	0.074			
VCM	89 (64-131)	94 (66-126)	0.03			
α- Talassemia	20.5	22.4	0.42			
CAR/CAR allele	38.9	61.1	0.017	3.11	1.16 – 8.32	0.02

*Statistical significance was accessed by Mann-Whitney for continuous variables and Qui-square for categorized variables.

** Multivariate analysis was performed by binomial logistic regression (backward stepwise), started with following variables: *gender, age, VCM, WBC, platelets count, HbF, reticulocytes count, α -thalassemia and CAR/CAR allele*, being selected in the final model: *gender and CAR/CAR allele*.

Abbreviations: CI: confidence interval; OR: odds ration; Hb: hemoglobin; ACS: Acute Chest Syndrome, HbF: Fetal hemoglobin, WBC: White blood cells, VCM:

Discussion

The highest frequency for the CAR allele found in our study agrees with the results of previous studies on haplotype frequency in Brazilian population [17,18,19]. The presence of other haplotypes reflects miscegenation due to the arrival in Brazil of enslaved Africans from different regions of Africa [20,21,22]. Atypical haplotypes were more frequent in our patients, which differ from the five common haplotype patterns observed worldwide. [16].

In the present study, it was observed that patients with ACS with at least one CAR allele had lower baseline HbF levels and were treated more frequently with HU than other patients. Furthermore, HbF levels after HU treatment remained lower among SCA patients with the CAR allele than the others, suggesting a worse clinical response to HU treatment [23]. Accordingly, WBC counts after HU were also higher in CAR allele SCA patients than non-CAR alleles. Finally, SCD CAR/CAR patients needed more frequent HU treatment. These observations corroborate previous studies that suggest that the CAR allele is associated with poor prognosis, requiring more frequent HU treatment, and may be related to a worse response to HU treatment [23,24,25]. HU treatment response is affected not only by total HbF levels but also by the heterogeneous levels of HbF among erythrocytes leading to differential levels of hemolysis [26,27].

In line with the hypothesis of higher levels of hemolysis being associated with CAR allele [6], in our study more SCD patients needed at least one blood cell transfusion and had gallstones in the CAR/CAR group than other haplotypes.

Among the most severe clinical SCD events in our cases, ACS, one of the worst outcomes of SCD, was associated with the presence of the CAR/CAR genotype; ACS was associated with the CAR/CAR haplotype three times more frequently than CAR/non-CAR or non-CAR/non-CAR. One hypothesis to explain this result is that lower HbF levels in CAR/CAR patients lead to higher incidence of ACS [26,28]. However, our data showed similar HbF levels in patients with or without ACS, suggesting that this effect is independent of HbF levels. The complexity of ACS suggests that it could be due to some polygenic association [11,29,30].

Further, we found only the CAR/CAR allele and males as independent prognostic factors to the occurrence of ACS in SCD patients in a multivariate analysis. While the association between males and ACS has been previously described [31,32], to our knowledge our study is the first association between the CAR/CAR allele and ACS. It is crucial to note that even SCD patients with mild symptoms can develop ACS without any warning, as routine clinical or laboratory exams often fail to predict its onset [11]. Further studies with the routine characterization of CAR alleles in both males and females with SCD can help to identify early the risk of ACS, potentially contributing to the adoption of preventive actions to avoid ACS development.

Acknowledgments:

The authors would like to acknowledge Isaac Lima da Silva Filho for providing DNA control samples of β^S gene haplotypes.

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest. I.H. is the President and Founder of Rakta Therapeutics Inc. (College Park, Maryland), a company involved in the development of heme transporter-related diagnostics. He declares no other competing financial interests. M.P. declares no competing interests.

Funding

This work was supported in part by funding from the National Institutes of Health (DK85035 and DK125740).

References:

1. Rees DC, Brousse VAM, Brewin JN. Determinants of severity in sickle cell disease. *Blood Rev.* 2022 Nov 56:100983. Doi: 10.1016/j.blre.2022.100983. Epub 2022 Jun 9. PMID: 35750558.
2. Piel FB, Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ, Williams TN. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. *PLoS Med.* 2013;10(7):e1001484. doi: 10.1371/journal.pmed.1001484. Epub 2013 Jul 16. PMID: 23874164; PMCID: PMC3712914.

3. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF, Vichinsky EP. Sick cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Mar 15;4:18010. doi: 10.1038/nrdp.2018.10. PMID: 29542687.
4. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araújo AS, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa FF, Hirschhorn JN, Orkin SH. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 19;105(33):11869-74. doi: 10.1073/pnas.0804799105. Epub 2008 Jul 30. PMID: 18667698; PMCID: PMC2491485.
5. Rees DC, Brousse VAM, Brewin JN. Determinants of severity in sickle cell disease. *Blood Rev*. 2022 Nov;56:100983. doi: 10.1016/j.blre.2022.100983. Epub 2022 Jun 9. PMID: 35750558.
6. Shriner D, Rotimi CN. Whole-Genome-Sequence-Based Haplotypes Reveal Single Origin of the Sick Cell Allele during the Holocene Wet Phase. *Am J Hum Genet*. 2018 Apr 5;102(4):547-556. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.02.003. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29526279; PMCID: PMC5985360.
7. Rieder RF, Safaya S, Gillette P, Fryd S, Hsu H, Adams JG 3rd, Steinberg MH. Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 1991 Mar;36(3):184-9. doi: 10.1002/ajh.2830360305. PMID: 1996558.
8. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sick Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017 Apr 20;376(16):1561-1573. doi: 10.1056/NEJMra1510865. PMID: 28423290.
9. Serjeant GR, Vichinsky E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. *Blood Cells Mol Dis*. 2018 May;70:66-77. doi: 10.1016/j.bcmed.2017.06.004. Epub 2017 Jun 21. PMID: 28689691.
10. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994 Jun 9;330(23):1639-44. doi: 10.1056/NEJM199406093302303. PMID: 7993409.
11. Klings ES, Steinberg MH. Acute chest syndrome of sickle cell disease: genetics, risk factors, prognosis, and management. *Expert Rev Hematol*. 2022 Feb;15(2):117-125. doi: 10.1080/17474086.2022.2041410. Epub 2022 Feb 16. PMID: 35143368.
12. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet*. 2001 May;Chapter 9:Unit 9.8. doi: 10.1002/0471142905.hg0908s07. PMID: 18428319.
13. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol*. 1989 Sep;32(1):66-9. doi: 10.1002/ajh.2830320113. PMID: 2757004.

14. Powars DR. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1991 Jun;5(3):475-93. PMID: 1713910.
15. Lapoumériou C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lobé M, Bodo JM, Carnevale P, Labie D, Elion J, Krishnamoorthy R. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet.* 1992 May;89(3):333-7. doi: 10.1007/BF00220553. PMID: 1376298.
16. Zago MA, Silva WA Jr, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C, Tavella MH, Araujo AG, Krieger JE, Elion J, Krishnamoorthy R. Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am J Hematol.* 2000 Feb;63(2):79-84. doi: 10.1002/(sici)1096-8652(200002)63:2<79::aid-ajh4>3.0.co;2-d. PMID: 10629573.
17. Zago MA, Silva WA Jr, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C, Tavella MH, Araujo AG, Krieger JE, Elion J, Krishnamoorthy R. Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am J Hematol.* 2000 Feb;63(2):79-84. doi: 10.1002/(sici)1096-8652(200002)63:2<79::aid-ajh4>3.0.co;2-d. PMID: 10629573.
18. Alves AC, da Silva VAL, Dos Santos A, Serra MB, Marques FA, Cruz SMP, Barroso WA, de Oliveira RAG. Sickle cell anemia in the state of Maranhão: a haplotype study. *Ann Hematol.* 2020 Jun;99(6):1225-1230. doi: 10.1007/s00277-020-04048-9. Epub 2020 May 4. PMID: 32363415.
19. Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Souza CC, Santos LF, Menezes JF, Dupuit MF, Almeida MN, Reis MG, Gonçalves MS. The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. *Hemoglobin.* 2004 Aug;28(3):267-71. doi: 10.1081/hem-120040310. PMID: 15481897.
20. Cardoso GL, Guerreiro JF. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. *Am J Hum Biol.* 2006 Jan;18(1):93-8. doi: 10.1002/ajhb.20467. PMID: 16378338.
21. Okumura JV, Lobo CL, Bonini-Domingos CR. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;35(1):71-2. doi: 10.5581/1516-8484.20130019. PMID: 23580889; PMCID: PMC3621640.
22. De Mello Auricchio MT, Vicente JP, Meyer D, Mingroni-Netto RC. Frequency and origins of hemoglobin S mutation in African-derived Brazilian populations. *Hum Biol.* 2007 Dec;79(6):667-77. doi: 10.1353/hub.2008.0017. PMID: 18494376.
23. Steinberg MH, Lu ZH, Barton FB, Terrin ML, Charache S, Dover GJ. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. Multicenter Study of Hydroxyurea. *Blood.* 1997 Feb 1;89(3):1078-88. PMID: 9028341.

24. Powars DR. Sickle cell anemia: beta s-gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. *Semin Hematol.* 1991 Jul;28(3):202-8. PMID: 1887245.
25. Bakanay SM, Dainer E, Clair B, Adekile A, Daitch L, Wells L, Holley L, Smith D, Kutlar A. Mortality in sickle cell patients on hydroxyurea therapy. *Blood.* 2005 Jan 15;105(2):545-7. doi: 10.1182/blood-2004-01-0322. Epub 2004 Sep 28. PMID: 15454485.
26. Steinberg MH. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood.* 2020 Nov 19;136(21):2392-2400. doi: 10.1182/blood.2020007645. PMID: 32808012; PMCID: PMC7685210.
27. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2017 Apr 20;376(16):1561-1573. doi: 10.1056/NEJMra1510865. PMID: 28423290.
28. Bean CJ, Boulet SL, Yang G, Payne AB, Ghaji N, Pyle ME, Hooper WC *et al.* Acute chest syndrome is associated with single nucleotide polymorphism-defined beta globin cluster haplotype in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2013 Oct;163(2):268-76. doi: 10.1111/bjh.12507. Epub 2013 Aug 16. PMID: 23952145; PMCID: PMC4026174.
29. Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2012 Aug;87(8):795-803. doi: 10.1002/ajh.23232. Epub 2012 May 28. PMID: 22641398; PMCID: PMC4562292.
30. Castaldi C, Nolan VG, Baldwin CT, Farrer LA, Steinberg MH, Klings ES. Association of genetic polymorphisms in the TGF- β pathway with the acute chest syndrome of sickle cell disease. *Blood.* 2007;110(11):2247. doi: 10.1182/blood.V110.11.2247.2247
31. Ikuta T, Ausenda S, Cappellini MD. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 13;98(4):1847-52. doi: 10.1073/pnas.98.4.1847. Epub 2001 Feb 6. PMID: 11172039; PMCID: PMC29345.
32. Alkindi S, Al-Busaidi I, Al-Salami B, Raniga S, Pathare A, Ballas SK. Predictors of impending acute chest syndrome in patients with sickle cell anaemia. *Sci Rep.* 2020 Feb 12;10(1):2470. doi: 10.1038/s41598-020-59258-y. PMID: 32051480; PMCID: PMC7015921.

**ANEXO A – DADOS DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS: DOENÇA
FALCIFORME**

Dados de frequências e significância estatística das manifestações clínicas dos pacientes com Doença Falciforme CAR homocigotos e Outros perfis de haplótipos							
Evento Clínico		CAR/CAR (n)	Outros perfis de haplótipos (n)	CAR/CAR (%)	Outros perfis de haplótipos (%)	OR(IC)	<i>p</i> -valor
Realização de Transfusões de concentrado de hemácias	S	21	24	58,3%	36,4%	2,450 (1,067-5,624)	0,039
	N	15	42	42%	63,6%		
Internação Hospitalar	S	37	32	72,5%	62,7%	1,569 (0,680-3,624)	0,397
	N	14	19	27,5%	37,3%		
Crise Vaso-oclusiva	S	31	30	60,8%	58,8%	1,085 (0,492-2,395)	1
	N	20	21	39,2	41,2%		
STA	S	22	22	61,1%	33,3%	3,143(1,353-7,303)	0,012
	N	14	44	38,9%	66,7%		
Infecções Bacterianas	S	12	8	23,5	15,7%	1,654(0,612-4,469)	0,455
	N	39	43	76,5	84,3		
AVE	S	10	5	19,6	9,8	2,44(0,708-7,109)	0,263
	N	41	46	80,4	90,2%		
Sequestro Esplênico	S	10	6	19,6	11,8%	1,829(0,611-5,479)	0,415
	N	41	45	80,4	88,2%		
Crise Aplástica	S	1	1	2%	2%	1(0,061-16,435)	1
	N	50	50	98%	98%		
Coletíase	S	24	30	71%	54%	2,080(0,841-5,144)	0,126
	N	10	26	29%	46%		
Colecistite	S	15	8	60%	42,1%	2,063(0,614-6,932)	0,361
	N	10	11	40%	57,9%		
Infecções Virais	S	8	6	17,4	15,4%	1,158(0,364-3,681)1	1
	N	38	33	82,6	84,6%		
Úlcera de Perna	S	10	9	19,6	17,6	1,138(0,420-3,088)	1
	N	41	42	80,4%	82,4%		
Hidroxiuréia	S	29	36	81%	54,50%	4,613(1,907-11,157)	0,01
	N	7	30	19%	45,5%		
Óbito	S	1	1	2%	2%	1(0,061-16,435)	1
	N	50	50	98%	98%		

Dados de frequências e significância estatística das manifestações clínicas dos pacientes com Doença Falciforme CAR homozigotos; CAR heterozigotos e Não CAR								
Evento Clínico		Número de alelos CAR			Frequências (%)			p-valor
		0	1	2	0	1	2	
Realização de Transfusões de concentrado de hemácias	S	5	12	28	25,0	38,7	54,9	0,057
	N	15	19	23	75,0	61,3	45,1	
Internação Hospitalar	S	14	28	27	87,5	56,0	75,0	0,032
	N	2	22	9	12,5	44,0	25,0	
Crise Vaso-oclusiva	S	8	22	31	40	71	60,8	0,087
	N	12	9	20	60	29	39,2	
STA	S	5	17	14	31,3	34	61,1	0,025
	N	11	33	22	68,8	66	38,9	
Infecções Bacterianas	S	3	5	12	15	16,1	23,5	0,605
	N	17	26	39	85	83,9	76,5	
AVE	S	1	4	10	5	12,9	19,6	0,278
	N	19	27	41	95	87,1	80,4	
Sequestro Esplênico	S	2	4	10	10	12,9	19,6	0,532
	N	18	27	41	90	87,1	80,4	
Crise Aplástica	S	0	1	1	0	3,2	2	0,72
	N	20	30	50	100	96,8	98	
Colelitíase	S	8	22	24	57,1	52,4	70,6	0,266
	N	6	20	10	42,9	47,6	29,4	
Colecistite	S	2	6	15	22,2	60	60	0,129
	N	7	4	10	77,8	40	40	
Infecções Virais	S	1	5	8	7,7	19,2	17,4	0,637
	N	12	21	38	92,3	80,8	82,6	
Úlcera de Perna	S	1	8	10	5	25,8	19,6	0,171
	N	19	23	41	95	74,2	80,4	
Hidroxiuréia	S	11	25	29	68,8	50,00	80,60	0,013
	N	5	25	7	31,3%	50,00	19,40	
Óbito	S	0	1	1	0	3,2	2	0,72
	N	20	30	50	100	96,8	98	

**ANEXO B – DADOS DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS: ANEMIA
FALCIFORME**

Dados de frequências e significância estatística das manifestações clínicas dos pacientes com Anemia Falciforme CAR homocigotos e Outros perfis de haplótipos							
Evento Clínico		CAR/CAR (n)	Outros perfis de haplótipos (n)	CAR/CAR (%)	Outros perfis de haplótipos (%)	OR(IC)	<i>p</i> -valor
Realização de Transfusões de concentrado de hemácias	S	28	15	59.6%	41.7%	2,063(0,854-4,985)	0,125
	N	19	21	40.4%	58.3%		
Internação Hospitalar	S	34	24	72.3	66.7	1,308(0,509-3,357)	0,634
	N	13	12	27.7	33.3		
Crise Vaso-oclusiva	S	27	22	57.4	61.1	0,859(0,355-2,082)	0,823
	N	20	14	42.6	38.9		
STA	S	22	17	61,10%	36,20%	2,773(1,132-6,794)	0,028
	N	14	30	38,90%	63,80%		
Infecções Bacterianas	S	10	6	21.3	16.7	1,351(0,441-4,145)	0,78
	N	37	30	78.7	83.3		
AVE	S	9	5	19.1	13.9	1,468(0,446-4,835)	0,57
	N	38	31	80.9	86.1		
Sequestro Esplênico	S	9	6	19.1	16.7	1,184(0,379-3,697)	1
	N	38	30	80.9	83.3		
Crise Aplástica	S	0	1	0	2.8	0,427(0,332-0,549)	0,434
	N	47	35	100	97.2		
Colelitíase	S	31	16	70.5	48.5	2,534(0,989-6,493)	0,062
	N	13	17	29.5	51.5		
Colecistite	S	15	6	62.5	42.9	2,222(0,580-8,511)	0,318
	N	9	8	37.5	57.1		
Infecções Virais	S	8	6	19	18.8	1,020(0,315-3,302)	1
	N	34	26	81	81.3		
Úlcera de Perna	S	10	9	21.3	25	0,811(0,290-2,267)	0,794
	N	37	27	78.7	75		
Hidroxiuréia	S	37	24	78.7%	66.7%	1,850(0,692-4,949)	0,316
	N	10	12	21.3%	33.3%		
Óbito	S	0	1	0	2.8	0,427(0,332-0,549)	0,434
	N	47	35	100	97.2		

Dados de frequências e significância estatística das manifestações clínicas dos pacientes com Anemia Falciforme CAR homozigotos; CAR heterozigotos e Não CAR								
Evento Clínico		Número de alelos CAR			Frequências			p-valor
		0	1	2	0	1	2	
Realização de Transfusões de concentrado de hemácias	S	5	10	28	38.5%	43.5%	59.6%	0,259
	N	8	13	19	61.5%	56.5%	40.4%	
Internação Hospitalar	S	8	16	34	61.5	69.6	72.3	0,754
	N	5	7	13	38.5	30.4	27.7	
Crise Vaso-oclusiva	S	6	16	27	46.2	69.6	57.4	0,369
	N	7	7	20	53.8	30.4	42.6	
STA	S	3	10	26	23.1%	43.5	55.3	0,11
	N	10	13	21	76.9%	56.5	44.7	
Infecções Bacterianas	S	2	4	10	15.4	17.4	21.3	0,861
	N	11	19	37	84.6	82.6	78.7	
AVE	S	1	4	9	7.7	17.4	19.1	0,619
	N	12	19	38	92.3	82.6	80.9	
Sequestro Esplênico	S	2	4	9	15.4	17.4	19.1	0,948
	N	11	19	38	84.6	82.6	80.9	
Crise Aplástica	S	0	1	0	0	4.3	0	0,267
	N	13	22	47	100	95.7	100	
Colelitíase	S	5	11	31	45.5	50	70.5	0,143
	N	6	11	13	54.5	50	29.5	
Colecistite	S	1	5	15	20	55.6	62.5	0,221
	N	4	4	9	80	44.4	37.5	
Infecções Virais	S	1	5	8	10	22.7	19	0,695
	N	9	17	34	90	77.3	81	
Úlcera de Perna	S	1	8	10	7.7	34.8	21.3	0,164
	N	12	15	37	92.3	65.2	78.7	
Hidroxiuréia	S	7	17	37	53.8%	73.9%	78.7%	0.198
	N	6	6	10	46.2%	26.1%	21.3%	
Obito	S	0	1	0	0	4.3	0	0,267
	N	13	22	47	100	95.7	100	