

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Avaliação de variantes polimórficas em genes envolvidos em apoptose e seus papéis na suscetibilidade e progressão clínica da doença falciforme

CREPIN AZIZ JOSE OLUWAFOUMI AGANI

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Avaliação de variantes polimórficas em genes envolvidos em apoptose
e seus papéis na suscetibilidade e progressão clínica da doença
falciforme**

CREPIN AZIZ JOSE OLUWAFOUMI AGANI

Orientador: Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha
Silla

Coorientador: Prof. José Artur Bogo Chies

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, Programa de Pós- Graduação em
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

AGANI, CREPIN AZIZ JOSE OLUWAFUOMI

Avaliação de variantes polimórficas em genes envolvidos em apoptose e seus papéis na suscetibilidade e progressão clínica da doença falciforme / CREPIN AZIZ JOSE OLUWAFUOMI AGANI. -- 2021.

86 f.

Orientadora: Lucia Mariano da Rocha Silla.

Coorientador: José Artur Bogo Chies.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Doença falciforme. 2. Anemia Falciforme . 3. Apoptose. 4. Polimorfismo. 5. variante polimórfica . I. da Rocha Silla, Lucia Mariano, orient. II. Chies, José Artur Bogo, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jonas Alex Morales Saute	(PPGCM – UFRGS)
Prof. Dr. Ida Vanessa Doederlein Schwartz	(PPGCM – UFRGS)
Prof. Dr. Eliane Bandinelli	(PPGBM – UFRGS)
Prof. Dr. João Ricardo Friedrich	(HCPA – UFRGS)

O Senhor é o meu pastor e nada me faltará... [Salmo 23]

Agradecimentos

A realização de um projeto requer pessoas com conhecimentos teóricos como práticos, e foi uma oportunidade interessante de aprender a gerenciar um trabalho com essas pessoas. A organização revela-se um fator determinante para o bom andamento do projeto e para as conquistas das várias fases que o constituem.

Gostaria de agradecer
a Deus por tudo que tem feito por min,

Expresso meus sinceros agradecimentos á Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla e ao Prof. José Artur Bogo Chies, por ter me dado essa oportunidade e pelas paciências nas orientações, incentivos que tornaram possível a conclusão deste trabalho,

Ao Joel Henrique Ellwanger e a Ianaê Indiara Wilke por seus conselhos, e suas ajudas que têm dados à realização deste trabalho, estou muito honrado pelo interesse demonstrado neste trabalho, obrigado!

Expresso minha profunda gratidão a todos aos professores que foram tão importantes na minha vida acadêmica, e que participaram na minha formação ao longo dessa trajetória universitária.

Finalmente, estendo meus sinceros agradecimentos a todos, amigos e familiares que contribuíram, perto ou longe, na realização desse trabalho.

RESUMO

Base teórica: A anemia falciforme (AF) é uma doença monogênica e hereditária, caracterizada pelas crises dolorosas e inflamação crônica. O estado inflamatório da AF resulta em uma elevação crônica de leucócitos (neutrófilos), macrófagos (monócitos), devido ao aumento das hemácias falciformes com a apresentação da fosfatidilserina na circulação sanguínea. A apoptose ou morte celular programada é um mecanismo celular conhecido por manter o equilíbrio homeostático durante a inflamação. Algum defeito nesse mecanismo, pode contribuir para o progresso clínico da doença inflamatória, como AF.

Objetivo: Desta forma, o presente estudo tem como principal objetivo, investigar o perfil genético de pacientes com AF através da análise da presença e frequência de variantes polimórficas em genes associados a apoptose, comparando estes dados com indivíduos controles.

Métodos: Foram extraídas 138 Amostras de DNA a partir de sangue periférico de pacientes com AF. As amostras foram amplificadas e genotipadas para os SNPs associados a apoptose (*FAS-1337G / A*, *FAS-670A / G*, *BCL-2 -938C / A*, *BAX-248G / A*) usando PCR e enzima de restrições específicas. Calculamos as frequências alélicas e genotípicas para cada SNP e comparamos com o grupo controle.

Resultados: Diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,001$) foram observadas entre as frequências genotípica e alélica dos outros três polimorfismos (*FAS -670G / A*, *BCL-2 -938C / A* e *BAX-248G / A*) em comparação com o grupo de controle. Por outro lado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as frequências genotípicas e alélicas em relação ao polimorfismo *FAS -1377 G / A*.

Conclusão: Nosso estudo mostrou, que existem associações entre as variantes *FAS-670G*, *BCL2 -938C* e *BAX -248A* e a AF, e que a expressão destes genes potencialmente pode ser correlacionada a fatores modificadores da doença.

Palavras chave: Anemia falciforme, apoptose, polimorfismo.

ABSTRACT

Background: Sickle cell anemia (SCA) is a monogenic and hereditary disease characterized by painful crises and chronic inflammation. The inflammatory state of SCA results in a chronic elevation of leukocytes (neutrophils), macrophages (monocytes), associated to an increase in sickle red cells with the presentation of phosphatidylserine in the bloodstream. Apoptosis or programmed cell death is a cellular mechanism known to maintain homeostatic balance during inflammation. Any defect in this mechanism may contribute to the clinical progress of inflammatory disease, such as SCA.

Objective: This study has as main objective to investigate the genetic profile of patients with SCA through the analysis of the presence and frequency of polymorphic variants in genes associated with apoptosis, comparing these data with control individuals

Methods: DNA samples were extracted from peripheral blood of 138 patients with SCA. The samples were amplified and genotyped for SNPs in apoptosis related genes (*FAS-1337G/A*, *FAS-670A/G*, *BCL 2 -938C/A*, *BAX-248G/A*) using PCR and specific restriction enzymes. We calculated the allelic and genotypic frequencies for each SNP and compared with the control group.

Results: Statistically significant differences ($p > 0.001$) were observed between the genotypic and allelic frequencies of the other three polymorphisms (*FAS -670G/A*, *BCL-2 -938C/A* e *BAX-248G/A*) compared with control group. On the other hand, no statistically significant differences ($p > 0.05$) between genotypic and allelic frequencies concerning the *FAS -1377 G/A* polymorphism were observed.

Conclusion: Our study showed for the first time some associations between the *FAS-670G*, *BCL-2 -938C* and *BAX -248A* variants and SCA, suggesting that the expression of such genes can constitute disease modifying factors.

Key Words: Sickle cell anemia, apoptosis, polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da estratégia de busca na literatura

Figura 2 – Polímero deoxyHbS (processos homogêneos e heterogêneos de nucleação)

Figura 3 – Fisiopatologia da Anemia Falciforme

Figura 4 – As principais vias para apoptose (intrínseca e extrínseca)

Figura 5 – Eritose e principais fatores indutores da morte precoce do eritrócito

Figura 6 – Estrutura do promotor do gene *BCL-2*

Figura 7 – Marco conceitual caracterizando estudo de apoptose em anemia falciforme

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências de primers das variantes polimórficas dos genes *FAS*, *BCL-2* E *BAX*

LISTA DE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
ADP	Difosfato de adenosina
AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente cardiovascular
CD40L	Ligante CD40
CSSCD	Cooperativo da doença de células falciformes
DED	Domínios efetores de morte
DF	Doença Falciforme
eONS	Óxido nítrico sintase endotelial desacoplada
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GWA	Associação de todo o Genoma
HbA	Hemoglobina normal
HbG	Gama-globina
HbS	Hemoglobina falciforme
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MPO	Enzima mieloperoxidase
NLRP3	NLR family pyrin domain–containing 3
ON	Óxido nítrico
PAF	Fator de ativação plaquetária
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
PMN	Célula polimorfonuclear
QTLs	Regiões de característica quantitativa
RDW	Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TFI	Técnica de focalização isoelétrica
TLR4	Receptores toll-like 4
TNF-R	Receptor do fator de necrose tumoral
TNFSF14	Membro 14 da superfamília do ligante do TNF
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
Val	Valina
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VPM	Volume plaquetário médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 <i>Estratégias para localizar e selecionar as informações</i>	17
2.2 <i>Breve história da anemia falciforme: descobertas e estudos em anemia falciforme nos séculos 20 e 21</i>	19
2.2.1 <i>Estudos relacionados à fisiopatologia da Anemia Falciforme</i>	19
2.2.2 <i>Estudos relacionados ao diagnóstico da Anemia Falciforme</i>	22
2.2.3 <i>Estudos envolvendo tratamento da Anemia Falciforme</i>	23
2.2.4 <i>Estudos genéticos em Anemia Falciforme</i>	24
2.3 <i>Anemia falciforme: fisiopatologia e manifestações clínicas</i>	27
2.3.1 <i>Polimerização da HbS</i>	27
2.3.2 <i>Vaso-oclusão</i>	28
2.3.3 <i>Manifestação clínica da AF</i>	31
2.3.4 <i>Apoptose</i>	32
2.3.4.1 <i>Apoptose de células anucleadas</i>	34
2.3.4.2 <i>Variantes polimórficas associadas à apoptose</i>	37
3. JUSTIFICATIVA	40
4. MARCO CONCEITUAL	41
5. OBJETIVOS	43
5.1 <i>Objetivo geral</i>	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7. ARTIGO	61
8. ANEXOS	62
ANEXO A	63
ANEXO B	65

1. INTRODUÇÃO

O controle e tratamento das doenças genéticas representa um dos maiores desafios na comunidade da saúde. A Doença Falciforme (DF) e a Anemia Falciforme (AF), a forma mais grave (HbSS) da doença, constituem uma grande preocupação de saúde pública global no campo da genética médica (MACHARIA et al., 2017). Conhecida como a doença monogênica mais frequente no mundo, a AF é caracterizada por uma mutação de substituição do aminoácido valina pelo ácido glutâmico na sexta posição da cadeia beta-globina, resultado da troca de um único nucleotídeo adenina pela timina nesse gene, e que caracteriza a hemoglobina falciforme (HbS) (CONNES et al., 2018).

A HbS é uma variante estrutural da hemoglobina normal adulta (HbA) e é herdada como um traço mendeliano autossômico recessivo. Enquanto os indivíduos heterozigóticos são geralmente assintomáticos, os indivíduos homozigotos sofrem de complicações agudas e crônicas ao longo da vida (PIEL et al., 2013). De acordo com o relatório “Doença falciforme: atenção e cuidado: a experiência brasileira” do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASILEIRO, 2014), além da HbS, é preciso destacar a existência de outras hemoglobinas mutantes, classificadas como C, D, E, entre outras. Quando essas hemoglobinas mutantes fazem par com a HbS, está-se diante de hemoglobinopatias genericamente denominadas de DF. As mais conhecidas, portanto, são anemia falciforme (HbSS), a S/Beta Talassemia (S/ β Tal.), as doenças SC (hemoglobina S com a hemoglobina mutante C), SD (hemoglobina S com a hemoglobina mutante D), SE (hemoglobina S com a hemoglobina mutante E), entre outras mais raras. Apesar das particularidades que distinguem cada modalidade de DF, e dos variados graus de gravidade que apresentam, todas elas têm manifestações clínicas e hematológicas semelhantes, sendo tratadas com as mesmas condutas médicas.

Frequente em populações de origem Africana, a AF é a doença hereditária mais prevalente do mundo. Por ano, cerca de 300.000 crianças nascem com a doença em todo o mundo, sendo que mais de 75% dos nascidos com AF estão na África Subsaariana (MCGANN; HERNANDEZ; WARE, 2017). Mais de dois terços dos bebês com HbSS nascem na região oeste e central da África, Nigéria, República Democrática do Congo, e também na Índia, onde a mortalidade infantil permanece alta, de acordo com Kapoor, Little e Pecker (2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 20 milhões de pessoas no mundo são portadoras de DF e mais de 66% vivem no continente Africano, especificamente em países como Camarões, República Democrática do Congo, Gabão, Gana e Nigéria, onde a prevalência da DF varia entre 20% e 30%, enquanto em algumas partes de

Uganda chega a 45%.

A AF afeta cerca de 30.000 pacientes no Brasil. Especificamente na população Afro-descendente, a frequência de homozigotos portadores de AF (HbSS) varia entre 0,1 e 0,3% (SOARES et al., 2017). A incidência é estimada em um portador da DF para cada 1000 nascidos vivos no Brasil. Porém, a incidência em recém-nascidos varia entre os estados brasileiros (LOBO et al., 2013). O estado da Bahia é um dos mais afetados, com um paciente diagnosticado como portador da DF a cada 650, seguido pelo Rio de Janeiro, com um paciente diagnosticado como portador da DF a cada 1200 (CASTILHO; DINARDO, 2018; LERVOLINO et al., 2011). Já no sul do país, a incidência é relativamente baixa, onde um a cada 13.000 pacientes é diagnosticado com a DF no estado do Rio Grande do Sul (LOBO et al., 2013). Um estudo piloto realizado por Daudt et al (2002) na cidade de Porto Alegre (RS) estimou a 1,2 % a frequência do gene HbS em recém-nascidos.

A DF tem um amplo espectro de manifestações clínicas que variam de uma condição quase assintomática a uma doença grave (CHIES; NARDI, 2001). Uma condição fundamental que interpõe as múltiplas manifestações clínicas é a polimerização da HbS em condições de baixa tensão de oxigênio (WILLIAMS; THEIN, 2018). Esse processo condiciona a alteração da morfologia dos eritrócitos, aumentando a adesão ao endotélio vascular, seguida pela formação de agregados de células com a conformação alterada. Esses eventos que fisicamente causam oclusão de pequenos vasos resultam em hipóxia local e desencadeiam um ciclo vicioso de aumento da formação de HbS, além de aumento da liberação de mediadores inflamatórios e radicais livres que contribuem para a lesão de reperfusão (SEDRAK; KONDAMUDI, 2021). De acordo com Vanderhave et al. (2018), a anemia hemolítica crônica também é um problema característico que ocorre na DF e leva à destruição das células falciformes por processos inflamatórios, desidratação celular e dano direto à membrana causado por polímeros rígidos de hemoglobina. Complicações musculoesqueléticas, danos em diferentes órgãos e sistemas, além de infecções recorrentes são frequentes, podendo causar a morte do paciente (BENDER, 2003).

As múltiplas características fenotípicas da doença representam um “quebra-cabeça” a ser resolvido. Mesmo tendo a mesma variante genética, os indivíduos portadores da AF apresentam grande variabilidade na frequência e gravidade clínica das crises vaso-oclusivas (BANDEIRA et al., 2014). Além de eventos como a anemia hemolítica crônica, a oclusão dos pequenos vasos, fatores ambientais e genéticos também contribuem para a variabilidade clínica da DF (WILLIAMS; THEIN, 2018). A identificação dos moduladores genéticos e biológicos potenciais seria útil para melhorar o manejo clínico dos pacientes (Renoux et al.,

2017). Segundo Silla et al. (2013), a AF é uma questão de preocupação global e representa um desafio contínuo no mundo.

Vários estudos de polimorfismos e análises multigênicas têm demonstrado associações com diversas manifestações clínicas da doença (FERTRIN et al., 2010). Porém, muito trabalho precisa ainda ser feito para conter as crises inflamatórias dolorosas dos pacientes. A coexistência e interferência de outras doenças, como lúpus eritematoso sistêmico (LES), tem sido relatada e descrita em paciente com DF, salientando a importância e a necessidade de investigar amplamente a AF. O LES apresenta características clínicas e laboratoriais semelhantes a DF, dificultando o diagnóstico e a abordagem terapêutica correta (ELEONORE et al., 2020; ROBAZZI et al., 2015).

O estado inflamatório da AF é causado por uma elevação crônica no número de leucócitos (neutrófilos), ativações anormais de monócitos e células endoteliais circulantes. Os monócitos parecem ser ativados pelos eritrócitos falciformes ou senescentes ao apresentarem anormalmente a fosfatidilserina na superfície membranar. Um dos mecanismos que medeia o equilíbrio homeostático entre o aumento da ativação das células durante a inflamação em AF, poderia ser a apoptose (WINN et al., 2005). Porém, o fenômeno de apoptose em DF é um assunto sobre o qual há controvérsia na literatura. Os neutrófilos, bem como as células endoteliais circulantes, parecem sofrer pouca apoptose por exemplo, devido ao aumento dos níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BELCHER et al., 2000; HEBBEL* et al., 2004). Por outro lado, o aumento do número de células endoteliais circulantes na AF, pode ser justificado pela apoptose devido ao aumento dos níveis de fator de necrose tumoral no sangue de pacientes com DF, que por sua vez induz a expressão de moléculas de adesão e apoptose em células endoteliais (ADLY et al., 2016).

A associação à apoptose, ou morte celular programada, é um evento recorrente em doenças inflamatórias crônicas. Defeitos no mecanismo apoptótico celular podem contribuir para o estabelecimento e progressão de uma série de doenças inflamatórias crônicas humanas, doenças infecciosas, doenças sistêmicas, doenças neurodegenerativas e câncer (FAVALORO et al., 2012; SZONDY et al., 2014). Embora seja um assunto pouco discutido, plaquetas e células anucleadas como as hemácias também são suscetíveis à morte por apoptose, especialmente denominada como eriptose no caso das hemácias.

A apoptose dos eritrócitos é similar a condição da morte por apoptose das células nucleadas levando, portanto, ao encolhimento celular, formação de bolhas nas membranas celulares, translocação de fosfatidilserina para a superfície dos eritrócitos e recolhimento pelos macrófagos. O mecanismo da morte precoce dos eritrócitos é geralmente aumentado em

distúrbios clínicos, como AF, beta-talassemia, deficiência de Hb-C e G6PD, deficiência de ferro, entre outras doenças. Em AF, esse aumento levaria à formação de novos eritrócitos pela eritropoiese, ativação das plaquetas desencadeando trombose e comprometendo a microcirculação (JEMAÀ et al., 2017). A apoptose desempenha importante papel na depuração fisiológica das células imunológicas, eritrócitos senescentes, eritrócitos danificados ou estressados, e pode estar também implicada nas anemias de diferentes fontes etiológicas (TOTINO et al., 2016; BUCKLAND; WILTON, 2000).

Vários genes como *FAS*, *FAS-L*, *BCL-2* e *BAX* estão implicados na indução ou na regulação de apoptose, além de doenças crônicas, doenças infecciosas e câncer (MICHITA et al., 2019). Estudos de polimorfismos envolvendo esses genes (*BCL-2*, *BAX* e *FAS*) têm demonstrado forte associação com a progressão clínica de vários distúrbios hematológicos mieloide e linfóide crônicos, como doenças mieloproliferativas crônicas (ANNUAR et al., 2021; OZDEMIRKIRAN et al., 2017), leucemia linfóide crônica (SKOGSBERG et al., 2005), e doenças autoimunes como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, entre outras (GLESSE et al., 2016; MICHITA et al., 2019; MOHAMMADZADEH et al., 2011). Especificamente na DF, expressão elevada da proteína *FAS* solúvel e de seu ligante *FAS-L*, foi fortemente associada à inflamação e considerada como marcador da vasculopatia em crianças e adolescentes.

Portanto, a investigação de genes relacionados a apoptose pode ser uma alternativa de pesquisa com AF, uma doença inflamatória crônica que tem fenótipo muito variado entre os pacientes. A avaliação do perfil apoptótico em AF pode contribuir para o conhecimento da doença, além de abrir horizontes para uma abordagem diferenciada na terapia contra as condições clínicas que estão envolvidas à suscetibilidade ou progressão das crises da AF e, portanto, melhorar as condições de vida dos pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

O presente estudo tem como base de elaboração a revisão bibliográfica de artigos científicos publicados em revistas, periódicos e jornais nacionais e internacionais. Tendo como objetivo levantar dados referentes à relação entre apoptose e as manifestações clínicas em paciente com DF. Bases de dados como PubMed, LILACS, e SciELO, foram usadas na estratégia de busca, e por meio eletrônico (Figura 1).

Palavras e expressões chaves (isoladamente ou não) como Sickle cell disease, Apoptosis, polymorphism, foram usadas para investigações publicadas entre 1980 e 2021.

	PUBMED	LILCAS	SciELO
	↓	↓	↓
A	32541	850	763
	82	8	3
<hr/>			
B	495422	2398	1720
	49	6	0
<hr/>			
A+B	123	0	1
	3	0	0
<hr/>			
C	414510	3896	3471
	17	2	0
<hr/>			
A+C	1066	29	31
	12	0	0
<hr/>			
A+B+C	4	0	0
	0	0	0

Palavras Chaves: Sickle cell disease (**A**), Apoptois (**B**), Polymorphism (**C**)

Figura 1: Esquema da estratégia de busca na literatura. Nos quadros (em cinza), estão os números de artigos escolhidos segundo critérios de inclusão específicos (Assunto, Revista, fator de impacto etc..)

2.2 Breve história da anemia falciforme: descobertas e estudos em anemia falciforme nos séculos 20 e 21

A Doença Falciforme (DF) é uma hemoglobinopatia genética com alta morbimortalidade e que afeta parte substancial da população mundial (MURAD et al., 2019). A história da DF na comunidade científica começou no início do século passado. O *Dr. James B. Herrick* foi o primeiro pesquisador que descreveu, em 1910, a morfologia dos glóbulos vermelhos e os parâmetros hematimétricos observados em exame de sangue de um paciente negro (HERRICK, 2015). Estudante de odontologia, o paciente *Walter Clement Noel*, de 21 anos, com anemia e síndrome torácica aguda se apresentou ao Hospital Presbiteriano de Chicago em 1904, onde foi examinado pelo *Dr. Ernest Irons* (na época estagiário do *Dr. Herrick*). Naquela época, os diagnósticos mais comuns estavam relacionados às doenças infecciosas mais prevalentes de acordo com *Wailoo et al.* (2017). Portanto, doenças genéticas eram pouco conhecidas e estudadas na comunidade científica mundial. Importantes trabalhos científicos “sinérgicos” levaram ao atual conhecimento dessa doença, envolvendo a fisiopatologia, diagnóstico e abordagens terapêuticas.

2.2.1 Estudos relacionados à fisiopatologia da Anemia Falciforme

Trabalhos consideráveis até os anos 1940 foram importantes, do ponto vista fisiopatológico, e abriram caminho para vários estudos sobre a doença. Visto o professor *James* e seu estagiário *Dr. Ernest Edward Irons* haviam caracterizado a forma de “foice” dos glóbulos vermelhos, *Verne Rheem Mason* nomeou a doença como “Doença Falciforme” em 1922 (AL-SALEM, 2015). Em seguida, as características morfológicas das hemácias foram amplamente descritas por *Diggs e Bibb* (1939).

Entre 1920 e 1940, grande parte das características fisiopatológicas observadas em pacientes com DF foram estudadas. *Hahn, Gillespie, Landon e Lyman* no início da década de 1920-1930 descreveram para o conhecimento público algumas manifestações fisiopatológicas, tais como esplenomegalia e a atrofia do baço (SERJEANT, 2001; KOLLIPOULOU et al., 2017). Posteriormente, *Anderson e Ware* (1932) relataram inúmeros episódios clínicos observados nos pacientes, como úlceras na perna, dor abdominal, adenopatia, entre outros. Em 1934, eventos clínicos como vaso-oclusão e dores foram também atribuídos como manifestações clínicas da doença pelo *Dr. Lemuel Diggs*. Logo *Campbell* (1935) sugeriu que

sintomas como náuseas, vômitos, icterícia obstrutiva, febre, espasmo muscular e leucocitose encontrados em pacientes poderiam ser consequências diretas relacionadas aos eventos patológicos causados pela hemoglobinopatia (CUMMER, 1940).

O formato “foice” que caracteriza a DF interessou os cientistas *Sherman e Bauer*, os quais, em 1940, relacionaram a desoxigenação ao processo de falcização (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASILEIRO, 2014; PRABHAKAR et al., 2010). Eles constataram pela primeira vez que as HbS não oxigenadas (desoxihemoglobina) se agrupam de forma estruturada, onde as birrefringências podem ser observadas nas hemácias falcizadas (CHRISTOPH et al., 2005; EATON; HOFRICHTER, 1990). *Hahn, Gillespie (1927)* haviam sugerido que além de formato “foice” os glóbulos vermelhos perderiam o oxigênio. *Bookchin. e Nagel (1974)* descreveram, mais tarde, que a falcização das HbS é decorrente da baixa taxa de saturação em oxigênio (inferior a 65%) na circulação sanguínea.

Em 1949 *Linus Pauling* (prêmio Nobel de química) associou a falcização da hemoglobina à troca de aminoácido. O químico mostrou junto com seu colega *Dr. Harvey Itano*, como um defeito na estrutura molecular da hemoglobina estaria diretamente associado à doença. *Perutz (1950- 1951)* confirmou o relato do *Sherman (1940)* e apurou que as hemácias falcizadas apresentam estruturas alinhadas em feixes originando cristais líquidos (PERUTZ; MITCHISON, 1950; PERUTZ et al., 1951).

Em 1948, a hematologista pediátrica *Janet Watson*, sugeriu pela primeira vez que o aumento de hemoglobina fetal poderia estar associado à ausência de sintomas clínicos em recém-nascidos (DAMPIER, 2015; SARAF et al., 2014). Em consequência, os cientistas *Singer e Fisher (1952)* demonstraram que a alta taxa (>5%) de hemoglobina fetal na circulação sanguínea prolonga a vida dos eritrócitos nos pacientes com a DF. *Dr Harvey Itano (1953)* caracterizou a HbS como pouco solúvel em solução hipermolar em comparação a HbA (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASILEIRA, 2014). Em 1956, *Dr. Vernon Ingram* investigou e esclareceu com precisão, que a mutação única de substituição de aminoácido, “ácido glutâmico” pela “valina”, na posição 6 da cadeia beta globina da HbS está diretamente ligada a DF (AL-SALEM, 2015).

Os cientistas *Emery C, Herman Jr. e Lockard Conley* deram seguimento ao trabalho de *Singer e Fisher*, investigando melhor o papel protetor do nível da hemoglobina fetal nas manifestações clínicas em pacientes com DF. Eles observaram que alguns pacientes apresentaram condição de produção contínua da HbF. Essa anomalia, caracterizada como persistência hereditária da hemoglobina fetal e resultando na produção de hemoglobina Fetal HbF, foi descrita pelos cientistas *Herman e Conley (1960)* em uma família Afro-descendente

com história de hemoglobinopatia. Em 1963, em um estudo realizado em pacientes com HbS e persistentes hereditários da hemoglobina fetal (CONLEY ET AL, 1963), a equipe de *Conley* associou o efeito protetor da hemoglobina Fetal à ausência de manifestações clínicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASILEIRO, 2014).

Em 1968, *Reinhold Benesch, Ruth Benesch e Chi Ing Yu*, descobriram o importante papel da molécula 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) na regulação do oxigênio no sangue, pela perda de afinidade de oxigênio pelas hemácias em condição de hipóxia. *Johanna Dobler e John Bertles*, (1968) caracterizaram na ocasião, as hemácias falcizadas de irreversíveis, pois elas não retornam as suas formas naturais (discóides) (PRABHAKAR et al., 2010).

Wishner et al. (1975) descreveram as características químico-físicas dos cristais de desoxihemoglobina falciforme (hemoglobina desoxigenada). Segundo os autores, os cristais são formados por pares de fios entrelaçados e interligados por val6B e outros resíduos. Dois anos depois, *Benesch et al.* (1977) estudaram a polimerização da HbS e descreveram, além da natureza química, as prováveis mutações na cadeia alfa que poderiam diretamente influenciar a solubilidade da desoxihemoglobina (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASILEIRA, 2014).

Nas últimas décadas, diversas pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de entender os mecanismos moleculares de sinalização bioquímica e fisiológica que envolvem os eventos de crises dolorosas em anemia falciforme. O mecanismo regulador do óxido nítrico (ON) é um alvo de estudo em anemia falciforme até hoje. As propriedades fisiológicas desta molécula, associada à regulação cardiovascular, foram descritas em 1980 pelos pesquisadores *Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad* (prêmio Nobel em 1998) (IGNARRO, 2018). Desse modo, *Rees et al.* (1995) mediram a biodisponibilidade dos metabólitos do óxido nítrico (ON) na doença falciforme, que poderia estar associada ao evento inflamatório nos pacientes. Segundo *Kato, Steinberg e Gladwin* (2017), um baixo nível de ON altera o equilíbrio redox promovendo a vaso constrição.

2.2.2 Estudos relacionados ao diagnóstico da Anemia Falciforme

Em 1917, o primeiro teste de diagnóstico laboratorial dos portadores da hemoglobina falcizada foi realizado pelo pesquisador *Victor Emmel (1878-1928)*. Ao colocar o sangue fresco dos pacientes em uma lâmina com câmara, privando-o de contato com o oxigênio externo, foi possível observar o formato de “foice” das hemácias (SERJEANT, 2001; EMMEL, 1917). *Dalan e Castle (1948)* melhoraram o teste de falcização do seu predecessor *Victor Emmel* pelo uso de agente redutor (metabissulfito de sódio) para desoxigenar as hemácias (ADDAI-MENSAH et al., 2019).

Na metade desse século, o desenvolvimento de teste diagnóstico da DF foi decisivo. Novos testes de diagnóstico laboratorial baseados no estudo das características de solubilidade das hemácias e de seus componentes foram estabelecidos por *Huntsman et al. (1970)*, e permitiram diferenciar a anemia falciforme do traço falciforme. Em 1974, *Pearson et al. (1974)* sugeriram o uso da técnica de eletroforese em gel de ágar, pela sua capacidade em distinguir eficientemente as formas de hemoglobinas (HbA, HbF, HbS e HbC), melhorando o diagnóstico laboratorial da anemia falciforme. A técnica de focalização isoelétrica (TFI) é uma técnica de precisão, adaptada a partir da eletroforese descrita pelo biofísico *Alexander Kolin* em 1954, e baseia-se no princípio de ponto isoelétrico molecular estabelecido pelos cientistas *Williams e Waterman* entre 1929-1930 (GREENE et al., 2015; RILBE, 1973).

A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) também é um teste laboratorial seguro e adequado para a separação e quantificação das variantes de hemoglobina (JOUTOVSKY et al., 2004; GREENE et al., 2015). A história desta técnica remonta a período 1899- 1903, e deve-se ao pesquisador russo *Mikhail Semenovitch Tswett*. Desde então, vários pesquisadores contribuíram para o progresso e o desenvolvimento desta técnica (ETTRE; SAKODYNSKII, 1993; ZANATTA; MANFREDINI, 2009; ALI; ABOUL-ENEIN; CAZES, 2010). Outro método de diagnóstico é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que foi desenvolvida pela primeira vez em 1984 pelo bioquímico *Kary Mullis* (prêmio Nobel em 1993). A PCR é um método da biologia molecular muito eficiente, que amplifica determinada região do DNA originando múltiplas cópias (JAIN et al., 2020).

O diagnóstico precoce de hemoglobinopatias genéticas é um passo importante na melhoria da sobrevivência dos pacientes. No Brasil, assim como no resto do mundo, programas de triagem neonatal foram implementados para investigar nos primeiros dias de vida variantes de hemoglobina em recém-nascido. O teste Guthrie, conhecido como teste do pezinho, foi

incluído em 2001 como teste obrigatório de hemoglobinopatia em recém-nascidos pelo Ministério da Saúde Brasileiro. Este teste usa o método cromatográfico (HPLC) para triagem neonatal (ARDUINI et al., 2017; NNODU et al., 2020; FERRAZ; MURAO, 2007).

O exame das células sanguíneas ou hemograma completo também se tornou essencial tanto para diagnóstico quanto para o acompanhamento clínico dos pacientes portadores de hemoglobinopatias. Novos parâmetros hematimétricos como RDW (Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos), VPM (volume plaquetário médio) e VCM (volume corpuscular médio) foram somados ao hemograma nas últimas duas décadas e utilizados como indicadores precoces da AF (NOGUEIRA et al., 2013; ROSENFELD, 2012; de ALMEIDA; BERETTA, 2017).

2.2.3 Estudos envolvendo tratamento da Anemia Falciforme

A hidroxiureia foi o primeiro fármaco aprovado na terapia da anemia falciforme pela FDA (KAPOOR et al., 2018). O primeiro estudo farmacológico neste sentido, apontou um aumento na produção da HbF e reticulócitos em dois pacientes portadores da doença (PLATT et al., 1984). No final deste mesmo ano, foi feito o primeiro transplante de medula óssea em paciente com AF, uma menina de oito anos (JOHNSON et al., 1984), evidenciando a intervenção como provável possibilidade de tratamento (KODISH et al., 1991). Essas duas abordagens terapêuticas parecem ser eficazes no tratamento da hemoglobinopatia (SANTOS et al., 2012).

Charache et al. (1995) testaram a eficácia da hidroxiureia na redução da frequência das crises de dor em pacientes com anemia falciforme. Efeitos benéficos da hidroxiureia, como aumento dos níveis de hemoglobina fetal e inibição da falcização (FERTRIN; COSTA, 2010), foram demonstrados, confirmando a hipótese de *Johnson (1984)*. *Blouin et al. (2000)* investigaram os limites do efeito terapêutico da hidroxiureia em camundongos transgênicos com AF induzida, evidenciando-o como melhor modelo animal para avaliar o efeito modulador da HbF na diminuição da concentração de HbS (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASILEIRA, 2014).

Na primeira década do século 21, com o avanço das técnicas de biologia molecular, as terapias celulares e gênicas foram investigadas como possíveis abordagens terapêuticas no tratamento da DF. Um estudo clínico com terapia celular imune revelou-se promissor devido à diminuição das células iNKT, as quais haviam anteriormente sido associadas a manutenção

da inflamação durante a crise de dor nos pacientes (FIELD et al., 2013; MAJERUS et al., 2014). Experimento realizado em modelo animal com DF (camundongos NY1DD) havia mostrado o papel das células iNKT na sustentabilidade da resposta inflamatória (WALLACE et al., 2009; SCHEUPLEIN et al., 2013).

No que diz respeito à terapia gênica, *Cavazzana-Calvo et al. (2010)* realizaram o tratamento de paciente beta-talassêmico usando células-tronco hematopoiéticas autólogas com alteração via uso de vetor lentiviral. Após o sucesso desse tratamento, o mesmo foi aplicado em paciente com AF pela primeira vez em 2015. Um resultado satisfatório com aumento da produção da globina anti-falciforme foi observado meses após o tratamento, justificando a realização de novos estudos (CAVAZZANA et al., 2015).

Hoban et al. (2015) sugeriram que o uso de nucleases “dedo de zinco” (ZFNs), junto com vetor lentiviral livre da integrase, pode efetuar de forma eficiente a correção do gene mutante específico no locus β -globina, favorecendo o tratamento gênico da anemia falciforme (HOBAN et al., 2015).

Os eventos de crises dolorosas frequentemente observados em pacientes com DF ainda constituem um problema de difícil compreensão. *Rees et al. (2003)* elaboraram uma diretriz que sugere padrão de assistência especializada ao paciente com eventos de crises de dor aguda decorrente da AF. Vários estudos farmacológicos estão sendo desenvolvidos para tratar a crise inflamatória. Desse modo, *Ataga et al. (2017)* mostraram em estudo clínico de fase 2 a eficácia de crizanlizumab (um anticorpo monoclonal inibidor da P-selectina) na redução da frequência de crises de dor em portadores de AF. Além disso, o tratamento com o anti-oxidante L-glutamina, foi também testado em um ensaio clínico de fase 3 durante 48 semanas em paciente com AF. Essa terapia reduziu de forma significativa as crises de dor nos pacientes independente do uso concomitante de hidroxiureia, e levou a FDA a recomendar o uso suplementar da droga no tratamento das crises de dor em pacientes com a hemoglobinopatia (NIIHARA et al., 2018).

2.2.4 Estudos genéticos em Anemia Falciforme

Os primeiros estudos genéticos da DF tiveram início entre 1915 e 1923, quando os pesquisadores *Taliaferro, Huck e Sydenstricker* identificaram a herança do “traço falciforme” da doença através de estudos de pedigrees detalhados, considerada erradamente como forma “latente” da doença (PRABHAKAR et al., 2010). Décadas depois, os médicos *Neel e Beet*,

(1949) comprovaram o caráter homozigoto da DF ao perceber que a doença é herdada de pessoas (pais) heterozigotos (WAILOO et al., 2017; SARAF et al., 2014; AL-SALEM et al., 2015).

Em 1952, Mackey e Vivarelli contribuíram na história da doença ao vincular com uma doença parasitária prevalente no continente africano. Indivíduos com traço falciforme tinham maior resistência à malária, o que lhes atribuía certa vantagem em relação a indivíduos não portadores da variante. Efetivamente, em 1947 o *cientista Beet (1947)* já havia constatado que os parasitas da malária eram menos frequentes na circulação sanguínea dos pacientes com traço falciforme. *Alisson (1954-1956), Beutler, Dern e Flanagan (1955)*, através de estudos de distribuição gênica de HbS e a malária, confirmaram a teoria de seus antecessores. Posteriormente, vários trabalhos demonstraram a proteção da anemia falciforme sobre a malária em todas as faixas etárias [*Raper (1955), Colbourne e Edington (1956), Edington e Laing (1957)*]. *Gilles et al. (1967)* relataram anos depois, que a deficiência da Glucose -6-fosfato desidrogenase em indivíduos portadores do alelo HbS, seria diretamente ligada ao efeito protetor seletivo contra a malária (AL-SALEM et al., 2015).

O avanço da biotecnologia impulsionou os estudos genéticos do *século 20* até hoje. Os pesquisadores *Kan e Dozy (1978)* realizaram estudo de variantes polimórficas e descobriram duas variantes do gene da beta globina que poderiam estar associadas à anemia falciforme. As variantes foram inicialmente detectadas com o uso de enzimas de restrição (SHRINER et al., 2018; FERTRIN; COSTA, 2010), o que abriu caminho para vários outros estudos. Por exemplo, *Antonarakis et al. (1984)* e *Pagnier et al. (1984)* investigaram a origem da anemia falciforme (STUART; NAGEL, 2004). Estudos prévios já haviam demonstrado a alta prevalência das DF na África (Benin, Senegal, Gana, Camarões, Gabão, Congo) e fora do continente, notadamente na Ásia (Índia, Arábia Saudita e Paquistão) (CRUZ et al., 2019). Um trabalho conduzido por *Rieder et al. (1991)* em pacientes afrodescendentes nos Estados Unidos também comprovou a origem dos haplótipos encontrados, respectivamente no Benim, República Centro-Africana e Senegal (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASILEIRA, 2014).

Entre outros achados associados às características fenotípicas que marcaram a história genética da DF, *Gilman e Huisman (1985)* observaram uma variação de um único nucleotídeo na sequência de DNA (*Single nucleotide polymorphism - SNP*) na posição 158 do promotor do gene HbG gama-globina que estaria amplamente associada ao aumento da produção da HbF.

Fatores de risco e eventos clínicos relacionados a doenças falciformes foram foco de alguns cientistas. *Platt et al. (1991)* e *Milner et al. (1991)*, através de estudos prospectivos

investigaram os fatores de risco associados aos eventos de crises de dor em grande número de pacientes desde o nascimento até a vida adulta. Já no início do *século 21*, *Styles et al. (2000)* descreveram a associação entre os alelos HLA e AVC em crianças com DF. Posteriormente a equipe de *Hoppe et al. (2003)* investigou os alelos que modulam a suscetibilidade e risco de AVC em crianças com DF. Polimorfismos específicos nos genes *HLA*, *IL4R*, *TNF* e *ADRB2* foram associados à suscetibilidade a AVC (HOPPE et al., 2004).

A infecção bacteriana é muito recorrente na anemia falciforme, sobretudo em crianças (DATTA et al, 2019). *Costa et al. (2005)* avaliaram o polimorfismo G-463A MPO do gene que codifica a enzima mieloperoxidase (MPO) e verificaram que esta variante pode aumentar a suscetibilidade à infecção em pacientes com anemia falciforme.

Entre 2006 e 2007, em estudos distintos, foram mapeados loci de características quantitativas (*Quantitative trait loci* - QTLs) que interferem na produção de HbF. Foram identificadas e associadas a produção de HbF, as variantes intergênicas de HBS1L-MYB no cromossomo 6q23 (THEIN et al., 2007).

Grandes estudos foram desenvolvidos na história da DF para servir de base de dados e facilitar as investigações genéticas. Um dos projetos iniciado em 1979 foi denominado *Cooperativo da Doença de Células Falciformes (CSSCD)* e conciliou as características fenotípicas e fatores socioeconômicos de cerca de 3530 pacientes com DF (FARBER et al., 1985). Além deste, o projeto *Consortium International HapMap* foi iniciado em 2003 em uma cooperação entre vários países para elaborar e mapear as variantes de sequências de DNA nas doenças mais comuns no mundo inteiro. Esse projeto serviu de base para determinar não somente as variantes polimórficas causadores das doenças frequentes como também as possíveis variantes associadas a manifestações clínicas dos distúrbios, como no caso da anemia falciforme (THORISSON et al., 2005). Também, um estudo de associação de genoma completo ou “*genome-wide association study*” (GWA), foi elaborado em 2009 visando a compreensão da diversidade genética passível de explicar a heterogeneidade fenotípica da anemia falciforme. Os SNPs e haplótipos associados à gravidade da AF foram investigados e disponibilizados como banco de dados para toda a comunidade científica (SEBASTIANI et al., 2009).

2.3 Anemia falciforme: fisiopatologia e manifestações clínicas

2.3.1 Polimerização da HbS

A alteração genética decorrente da mutação pontual no gene da β -globina leva à produção de hemoglobina falciforme, que tem a propriedade de polimerizar em fibras longas quando em baixas tensões de oxigênio (PLATT, 2008). A polimerização da molécula de hemoglobina (HbS) desoxigenada ou em situação de hipóxia é apontada como uma condição fundamental e responsável pelas múltiplas consequências fisiopatológicas da AF. Quando a HbS é reoxigenada, boa parte dos eritrócitos em formato de foice recupera a deformabilidade, mas de forma reduzida em comparação às hemácias normais (CONNES et al., 2018).

Ao alterar a forma estrutural dos eritrócitos, a polimerização da molécula de hemoglobina interfere na função das hemácias falcizadas e desencadeia uma cascata de eventos com consequências clínicas amplas e variadas (WILLIAMS et al., 2018). O mecanismo molecular conhecido como “nucleação” caracteriza todo o processo de gelificação da HbS. O processo envolve a ligação hidrofóbica formada a partir da interação entre o grupo isopropil da cadeia lateral da valina β Val6 de uma molécula de HbS e uma fenda formada por resíduos de aminoácidos (β Ala70, β Phe85 e β Leu88) de outra molécula de HbS adjacente (GHATGE et al., 2016). Esse evento condiciona o aumento de agregados de tetrâmeros de HbS e a formação de uma massa crítica ou núcleo crítico. Esse núcleo se tornar estável com a adesão de mais agregados, formando o polímero (Figura 2).

A formação de outros núcleos críticos na superfície de polímeros já existentes leva à geração de polímeros resistentes e causa o formato foice dos eritrócitos com formação de cristais de HbS, além do aumento da viscosidade interna dos eritrócitos. A progressão da polimerização é afetada por outros fatores, tais como o nível elevado intracelular de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) que facilita a desoxigenação dos eritrócitos falciformes pela redução da afinidade da HbS ao oxigênio, o baixo pH e temperaturas acima de 37°C (PICCIN et al., 2019; RAB et al., 2019). De acordo com Li et al. (2017), eventos repetitivos de falcização dos eritrócitos podem levar a defeitos nas membranas eritrocitárias, redução da deformabilidade de hemácias por serem rígidas, aumento do tempo de aderência de hemácias às vênulas, e eventualmente, vaso-oclusão (Figura 3).

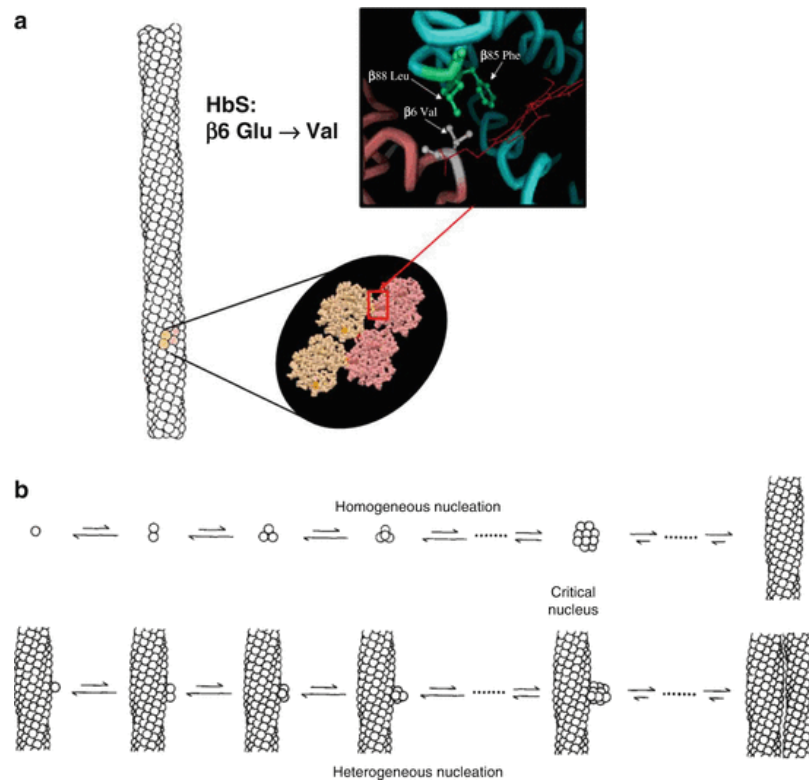


Figura 2: Polímero deoxyHbS (processos homogêneos e heterogêneos de nucleação). (a) Formação de polímeros a partir da adesão lateral entre tetrâmeros subjacentes formados por fibras. (b) Processos de polimerização envolvem dupla nucleação - A nucleação homogênea é formada a partir da interação entre o grupo isopropil da cadeia lateral da valina β Val6 de uma molécula de Hb S, e uma fenda formada por resíduos de aminoácidos (β Ala70, β Phe85 e β Leu88) de outra molécula de Hb S adjacente. A nucleação heterogênea é formada a partir do polímero homogêneo que fornece estabilidade para o crescimento exponencial de novo polímero subjacente. Retirado de Steinberg (2016).

2.3.2 Vaso-occlusão

De acordo com White et al. (2020), a vaso-occlusão é uma consequência frequente e imprevisível da DF que pode desencadear lesão crônica de órgãos e redução da expectativa de vida dos pacientes. Entre as complicações mais comuns observadas em pacientes com AF estão crises vaso-oclusivas sistêmicas ou crises dolorosas agudas, caracterizadas por eventos de dor, disfunção endotelial e inflamação aumentada. Os eritrócitos falciformes resultam em maior adesão intercelular e adesão ao endotélio pela apresentação de moléculas de superfície anormais na membrana, com crescentes interações envolvendo células de defesa, plaquetas, células do músculo liso, citocinas, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular

(SHAH et al., 2019; PLATT, 2008).

O elevado nível de plaquetas ativadas e a hipercoagulabilidade contribuem para a fisiopatologia da AF. O mecanismo envolvido no desencadeamento da hiperatividade das plaquetas não está bem definido. Entretanto, o aumento de plaquetas está associado ao processo de vaso-oclusão. Moléculas de superfície na superfície dos glóbulos vermelhos como a fosfatidilserina, assim como a liberação de difosfato de adenosina (ADP) pelos glóbulos vermelhos hemolisados, podem levar à ativação plaquetária. Além de produzir citocinas inflamatórias como TNFSF14 (membro 14 da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral), as plaquetas ativadas podem expressar níveis elevados de moléculas de adesão, como o ligante CD40 (CD40L), ICAM-1 e E-selectina em sua superfície. Essas moléculas favorecem o agregado plaquetário, a adesão das plaquetas ao endotélio, a adesão aos eritrócitos falciformes e leucócitos, comprometendo o fluxo normal do vaso sanguíneo (PROENÇA-FERREIRA et al., 2014; REZANIA et al., 2017). Por outro lado, a estimulação dos receptores toll-like 4 (TLR4) e dos receptores NLR *family pyrin domain-containing 3* (NLRP3) (presente no citosol plaquetário) podem desencadear a formação de um complexo inflamassoma NLRP3 mediado pela via das caspases-1 nas plaquetas e, conseqüentemente, desencadear a ativação, agregação plaquetária e trombose (VOGEL et al., 2018; BOONE et al., 2019).

A propriedade adesiva das hemácias falciformes é possibilitada pela super expressão das moléculas de superfícies. A fosfatidilserina, bem como receptores eritroides como Lu/BCAM (*Lutheran/basal cell-adhesion molecule*), ICAM-4 (*intercellular adhesion molecule-4*), a Integrina $\alpha 4\beta$, CD36 e LFA-3 desempenham importantes papéis interagindo com as respectivas glicoproteínas de superfície endoteliais laminina $\alpha 5$, Integrinas $\alpha V\beta 3$, VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*) e Trombospondina (TSP-1) (BROUSSE et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Entre outras moléculas que medeiam a adesão das hemácias às paredes vasculares estão a fibronectina, P-selectina e receptores específicos da fosfatidilserina (KUCUKAL et al., 2020). As interações entre os eritrócitos com os vasos provocam a inflamação, levando a ativação das células endoteliais e recrutamento das células de defesa, como neutrófilos, monócitos, mastócitos e as plaquetas. A adesão multicelular leva, portanto, a vaso oclusão com ativação dos nociceptores, resultando em crise dolorosa única (DARBARI et al., 2020).

A fagocitose extravascular seria em grande parte responsável, por exemplo, pela hemólise das HbS por macrófagos, embora ocorra também em meio intravascular. As células endoteliais, uma vez ativadas pelas HbS, produzem diversos mediadores que têm implicações

importantes na manutenção da inflamação e estimulação das células leucocitárias. As citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6, IL-17 α , IL-18, IL-1 β têm níveis plasmático aumentados durante os eventos de inflamação aguda e crônica nos pacientes (BANDEIRA et al., 2014), (A BARBU et al., 2020). Algumas citocinas como IL-12, IL-17, IL-10, IL-8, quimiocinas CXCL10/IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , CCL5/RANTES, assim como os fatores de crescimento VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), FGF (Fator de crescimento fibroblástico) e GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos) parecem ser mais elevados em pacientes, independentemente de condição laboratorial ou clínica. As crises vaso oclusivas decorrentes da polimerização da HbS têm como consequências, além das obstruções dos vasos, apoptose precoce eritrocitária que pode levar a um processo cíclico de hipóxia e reperfusão (GARCIA et al., 2020).

Além das interações celulares, os pacientes com AF apresentam redução significativa da biodisponibilidade do óxido nítrico (ON) e aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), devido à hemólise intravascular, o que pode levar a uma condição de vasculopatia aguda ou crônica (MCMAHON et al., 2019). O ON é conhecido como um vasodilatador, atuando também na ativação de células endoteliais, plaquetas e leucócitos. Portanto, a sua depleção pode contribuir para o aumento da inflamação na AF (KIM-SHAPIRO et al., 2018). A redução do ON ativo está diretamente ligada ao aumento da HbS e heme livre no plasma, podendo ativar e causar dano endotelial (NADER et al., 2020).

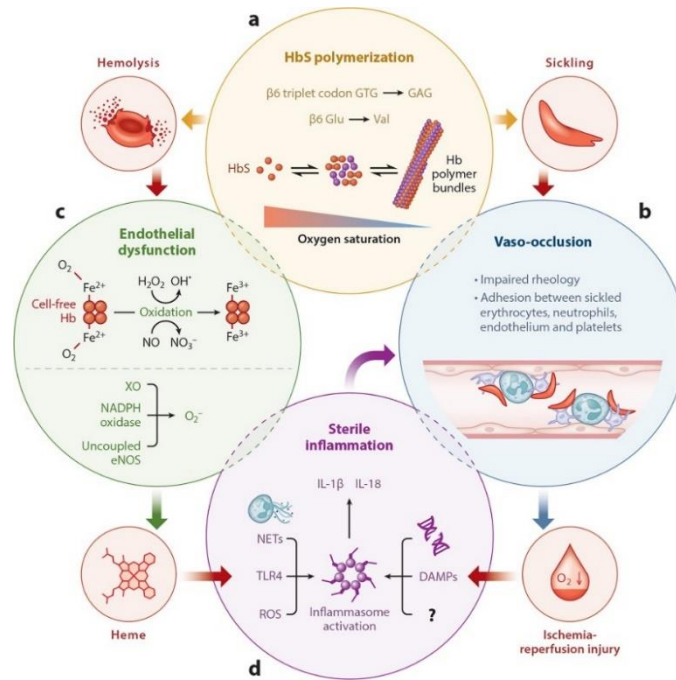


Figura 3: Fisiopatologia da AF. (a) A baixa saturação de oxigênio da HbS contribui para a formação de polímeros, eritrócitos falciformes e hemólise intravascular. (b) Alto nível de Hb falciforme eleva a viscosidade do sangue e aumenta a adesão ao endotélio, neutrófilos e plaquetas, causando a oclusão dos vasos e, conseqüentemente, lesão de isquemia-reperfusão. (c) A liberação de HbFe²⁺ livre oriunda da hemólise promove a disfunção endotelial (prejudica a vasodilatação), causando lesão vascular pela depleção do óxido nítrico (ON) e formação de radicais livres de oxigênio. O esgotamento do ON se deve à reação de oxidação que envolve HbFe²⁺ e NO. A formação de radicais livres é decorrente da reação HbFe²⁺ e H₂O₂, além de outras reações envolvendo NADPH, xantina oxidase (XO) e a ON-sintase endotelial desacoplada (eONS). As reações de oxidação dão origem a metemoglobina (HbFe³⁺) que se degrada para liberar heme livre de células. (d) Os radicais livres de oxigênio, o heme livre e a isquemia criam um ambiente de inflamação que aumenta a atividade das células de defesa e plaquetárias e promove a manutenção da vaso-occlusão. Figura retirada de Sundd et al. (2019).

2.3.3 Manifestação clínica da AF

As alterações clínicas na AF envolvem uma ampla variedade de órgãos, porém o grau de envolvimento de cada órgão não está muito bem compreendido (WILLIAMS et al., 2018). A vaso oclusão e a hemólise constituem algumas das peças fundamentais na variabilidade da manifestação clínica da AF. A hemólise está associada a diversas complicações clínicas como disfunção vasomotora, vasculopatia proliferativa, vasculopatia pulmonar, hipertensão pulmonar, úlceras de perna, priapismo, doença renal crônica e acidente vascular cerebral isquêmico de grande artéria (KATO et al., 2017). Por outro lado, eventos

clínicos como a crise dolorosa, infecções agudas e síndrome torácica aguda estão etiológicamente associados à vaso oclusão e outros fatores, como a hipóxia isquemia e reperfusão (STUART; NAGEL, 2004), (WILLIAMS et al., 2018).

2.3.4 Apoptose

A apoptose ou morte celular programada é fundamental para a grande variedade de processos fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvimento e envelhecimento das células. Além de desempenhar função homeostática em uma ampla gama de organismos vivos como plantas, fungos e bactérias unicelulares, a apoptose pode estar associada à defesa imunológica em resposta a danos celulares causados por agentes tóxicos ou doenças (ROMERO et al., 2015). De acordo com Saik et al. (2019), a apoptose é um mecanismo de morte celular caracterizado por alterações morfológicas e moleculares que incluem, além da exposição da fosfatidilserina na membrana celular, encolhimento celular, formação de bolhas citoplasmáticas, rearranjo de citoesqueleto, colapso nuclear, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos.

As células apoptóticas apresentam várias características morfológicas e bioquímicas alteradas induzidas por um grupo de proteases de cisteína, conhecido como caspases. O mecanismo de morte celular programada envolve mais de uma via. As principais vias conhecidas para apoptose são a via intrínseca ou mitocondrial e a via extrínseca ou de receptor de morte (Figura 4). A via extrínseca tem envolvimento de receptores de morte, tais como o receptor FAS e o receptor do TNF (TNF-R), enquanto a via intrínseca é dependente do envolvimento de mitocôndrias. De modo geral, as células candidatas a apoptose sofrem inversão da membrana celular liberando proteínas que intercedem no processo apoptótico (citocromo C), deixando exposto sinalizadores de morte celular, como a fosfatidilserina (PS). Esse processo leva à formação do apoptossoma e, conseqüentemente, a destruição da célula por macrófagos circulantes (ELMORE, 2007).

A via intrínseca é regulada pela família de proteínas Bcl-2, que pode ser dividida em moléculas anti- e pró-apoptóticas. As proteínas (Bcl- 2, Bcl-x, Bcl-w, Bf-1, Bcl-XL, B-XS, Bcl-w, BAG) que pertencem ao grupo anti-apoptótico, atuam contra a ocorrência da apoptose impedindo por exemplo a liberação de citocromo C, responsável pela suscetibilidade ao processo apoptótico. Por outro lado, as proteínas pró-apoptóticas (Bak, Bcl-10, BAX, Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk) atuam a favor da apoptose induzindo a liberação do citocromo C (BRUIN;

MEDEMA, 2008). A hipóxia, danos no DNA ou estresse oxidativo, podem induzir um sinal intracelular, levando a permeabilização da membrana celular mitocondrial e consequente ativação dos membros pró-apópticos, como o BAX. Esse evento leva à liberação do citocromo C que, ao interagir com o fator de ativação 1 da protease apoptótica (APAF-1), resulta na formação do apoptossoma que ativa uma cascata de proteínas, tais como a pró-caspase-9 e a caspase-3. A caspase-3 por sua vez cliva diferentes proteíno quinases, que conduz a célula a morte (KIRAZ et al., 2016; JAN et al., 2019).

A via extrínseca da apoptose é acionada a partir de estímulos externos que ativam os receptores da superfamília do TNFR e FAS. O TNF-alfa ou TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado a TNF) e o FASL ativam respectivamente os receptores de morte TNFR-1 e FAS, desencadeando uma série de sinais que levam ao recrutamento de proteínas adaptadoras conhecidas como domínios de morte citoplasmáticos (XU et al., 2019). Os domínios de morte associados a FAS (FADD), TNF (TRADD), recrutam as procaspase-8 ou procaspase-10 via domínios efetores de morte (DED). Ao interagirem, essas proteínas formam um complexo ativo que induz as células à morte por uma série de clivagens proteolíticas (SHARP et al., 2010). Por muito tempo, o mecanismo apoptótico foi considerado um fenômeno exclusivo das células nucleadas. Porém, ele também ocorre em células anucleadas como eritrócitos ou mesmo em plaquetas (GYULKHANDANYAN et al., 2012).

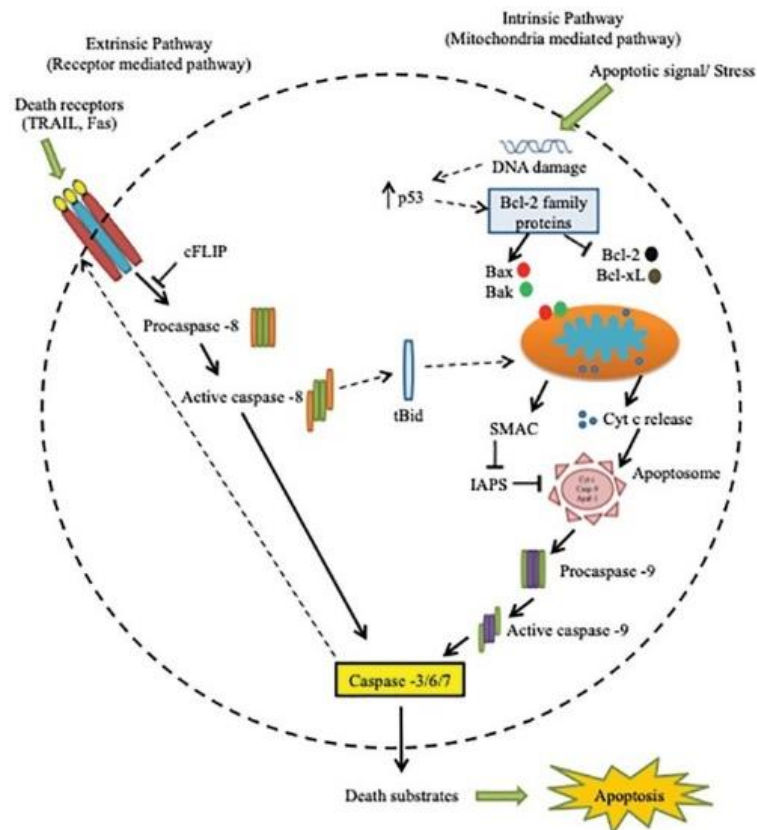


Figura 4: Vias da apoptose. As principais vias para apoptose são a intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca é mediada pela inserção de BAX/Bak na membrana mitocondrial com liberação do citocromo c que combina com Apaf-1, e procaspase-9 para dar origem ao apoptossoma seguido pela ativação da cascata de caspase 3/6/7 indutora de morte. A via extrínseca envolve a ativação dos receptores da superfamília do TRail e FAS. As procaspase-8 são ativadas via domínios efetores de morte (DED). Ao interagirem, essas proteínas formam um complexo ativo que induz a ativação das caspases 3/6/7 levando à morte celular. Retirado de Jan et al. (2019).

2.3.4.1 Apoptose de células anucleadas

Desde a década 1990 sabe-se que algumas células anucleadas podem sofrer apoptose e apresentar características morfológicas semelhantes às células nucleares apoptóticas. Essa informação sugere, portanto, que a morte celular programada não depende exclusivamente do núcleo (JACOBSON et al., 1994). Nesse sentido, células anucleadas como eritrócitos e as plaquetas possuem a maquinaria de apoptose, podendo sofrer processos apoptóticos semelhantes aos das células nucleadas (MINDUKSHEV et al., 2013).

A morte programada das células eritrocitárias (eriptose) está envolvida em vários distúrbios hematológicos e condições fisiopatológicas de diversas doenças (BIGDELOU;

FARNOUD, 2020). A eriptose é um mecanismo fisiológico que leva à destruição dos eritrócitos, onde os glóbulos vermelhos acometidos sofrem encolhimento celular, vesiculação e externalização da fosfatidilserina na superfície da membrana (Figura 5) (JACOB et al., 2019). A externalização da fosfatidilserina na membrana permite aos macrófagos se ligarem às hemácias para fagocitá-las (BRATOSIN et al., 2001). Ainda, a exposição da fosfatidilserina na superfície da membrana causa a aderência das células “eriptóticas” à parede vascular e pode impedir a microcirculação, além de estimular a coagulação do sangue e promover trombose (LANG et al., 2012). A eriptose das células vermelhas falciformes pode ser desencadeada através da ativação dos canais catiônicos na membrana, tais como o canal de K^+ “Gardos” e o sistema de co-transporte do KCl, sensíveis ao cálcio (NGUYEN et al., 2016; FÖLLER et al., 2008).

O estresse oxidativo é uma das principais causas de lesão eritrocitária capaz de ativar os canais não seletivos como TRPC6 permeáveis ao Ca^{2+} , possibilitando, portanto, o aumento do nível intracelular de cálcio na AF e causando uma condição hiperosmótica no eritrócito (BISSINGER et al., 2018). A hiperatividade citosólica do Ca^{2+} junto à elevada concentração osmótica, estimula os canais de Gardo e os canais KCl levando a perda de K^+ , KCl e subsequentemente desidratação, encolhimento e desestruturação da membrana celular com exposição de fosfatidilserina na superfície eritrocitária (FÖLLER et al., 2008).

O choque hiperósmotico junto com a constante perda da Cl^- levam a liberação da prostaglandina E2 (PGE2), responsável pela ativação dos canais catiônicos não seletivo de Ca^{2+} (LANG et al., 2006). Por outro lado, existem fatores estimuladores da eriptose como os leucotrienos e ácido lipóico, além do estresse oxidativo que podem condicionar a ativação das caspases (proteases aspárticas e cisteínicas) e desencadear a exposição da fosfatidilserina na superfície da membrana eritrocitária (LANG; LANG, 2015; FÖLLER et al., 2008). Ainda, as ceramidas que são produtos da clivagem dos esfingolipídios, pela enzima esfingomielinase, constituem um gatilho para exposição da fosfatidilserina na superfície da membrana do eritrócito durante a eriptose (FÖLLER; LANG, 2020). No entanto, a ativação da esfingomielinase é estimulada pelo fator de ativação plaquetária (PAF) devido ao estímulo da fosfolipase A2 pelo aumento da concentração osmótica na hemácia. As ceramidas estão envolvidas também na apoptose das células nucleadas e são vinculadas ao receptor CD95 (FASR), indutor da morte celular (LANG; LANG, 2015; FÖLLER; LANG, 2020) (Figura 5).

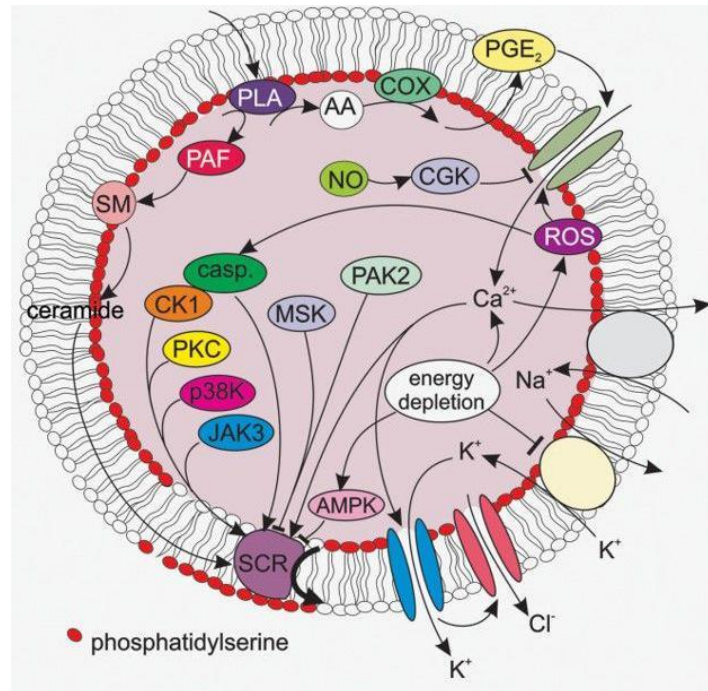


Figura 5: Principais indutores da eritose: AA, ácido araquidônico; AMPK, quinase ativada por AMP; casp, caspases; cGK, quinase ativada por GMP; CK1, caseína quinase 1; COX, cicloxigenase; JAK3, cinase 3 ativada por janus; MSK, mitógeno e quinase ativada por estresse; PAK2, quinase 2 ativada por p21; p38 MAPK, proteína quinase ativada por mitogênio p38; PAF, fator de ativação plaquetária; PGE2, prostaglandina E2; PKC, proteína quinase C; PLA, fosfolipase A; SCR, scramblase; SM, esfingomielinase. Retirado de Lang et al. (2017).

Assim como os eritrócitos, as plaquetas podem sofrer apoptose, em resposta às condições fisiopatológicas de várias doenças. A morte programada das plaquetas pode ser desencadeada por vários fatores químicos (peróxido de hidrogênio, trombina, epinefrina, aumento de cálcio intracelular, entre outros), fatores físicos (aumento da agregação plaquetária) e condições patológicas induzidas por estresse oxidativo (ROS derivadas de plaquetas ou de vasculatura), além da senescência (THUSHARA et al., 2015).

Existem duas vias associadas à apoptose plaquetária: a via intrínseca dependente da mitocôndria e a via extrínseca, que ainda não está bem definida na literatura. A via intrínseca é semelhante à da célula nucleada, podendo ser caracterizada pela despolarização do potencial transmembranar da membrana mitocondrial interna, aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas tais como BAX, Bak, e consequente diminuição da expressão das proteínas anti-apoptóticas como bcl-2 e bcl-xl, ativação das caspases-3 e externalização da fosfatidilserina (BAO; LIN, 2014; KILE, 2009; ZHANG et al., 2011).

Já na via extrínseca, os típicos receptores de morte (TNFR, FASR, TRAIL, entre outros) das células nucleadas parecem não estar envolvidos na apoptose plaquetária. No

entanto, a ativação do receptor ativado por protease 1 (PAR 1) pela trombina parece induzir além da ativação e agregação plaquetária, a translocação de proteínas pró-apoptóticas ativas para a mitocôndria e desencadear a apoptose plaquetária. Entre outros, os receptores de superfície plaquetária como a Glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) e a interação da Glicoproteína Ib α (GP1b α) com o Fator de von Willebrand (VWF) podem estar diretamente associados a morte programada das plaquetas (LEYTIN et al., 2019; JOSEFSSON et al., 2014; BAO; LIN, 2014).

2.3.4.2 Variantes polimórficas associadas à apoptose

Em condições normais, o controle fisiológico entre a proliferação celular e a apoptose é realizado pelas proteínas da família BCL-2, que consistem em diferentes reguladores de apoptose (NÜCKEL et al., 2006). A apoptose é regulada por vias envolvendo genes que promovem ou inibem a morte celular. Os reguladores de apoptose incluem os produtos do gene do linfoma 2 de células B antiapoptótico (*BCL-2*) e do gene da proteína X associada ao linfoma 2 de células B pró-apoptótico (*BAX*). As proteínas desses genes interagem fisicamente entre si, e a taxa de apoptose celular se associa aos níveis relativos das duas proteínas. Portanto, a expressão relativa desses dois genes desempenha um papel fundamental na homeostase celular (CHEN et al., 2007).

Entre outros, o gene *FAS* é importante na regulação de morte celular por controlar a via extrínseca. O gene *FAS* é considerado como marcador de várias doenças, notadamente, relacionado à disfunção vascular em pacientes com DF e relacionado com o aumento da inflamação em pacientes com AF (ADLY et al., 2016). Os genes polimórficos associados a apoptose, tais que *BAX*, *BCL2*, *FAS*, foram relacionados a morbidade ou susceptibilidade de diversas doenças inflamatórias crônicas, sistêmicas e autoimunes (MICHITA et al., 2019; GLESSE et al., 2016; ANNUAR et al., 2021).

BCL2

O *BCL2* é um gene anti-apoptótico ou inibidor de apoptose, localizado no cromossomo 18q21 humano e composto por 3 exons e dois promotores P1 e P2 (Figura 6). O P1 possui como função o aumento da expressão do gene *BCL2*, enquanto P2 regula negativamente a atividade do gene diminuindo a atividade de P1. O SNP -938C>A (rs2279115) está localizado no promotor P2 do gene *BCL2* e é fortemente associado ao nível de expressão da proteína

BCL2 nas células (NÜCKEL et al., 2006). O alelo C está associado ao aumento da atividade de P2, ou seja, se correlaciona com a redução da expressão da proteína *BCL2*, em oposição ao alelo A. Portanto, os indivíduos portadores do genótipo AA apresentam expressão aumentada da proteína *BCL2* e, conseqüentemente, atividade anti-apoptótica em comparação aos portadores de genótipo CC (NÜCKEL et al., 2006; BACHMANN et al., 2007; ZHANG et al., 2011; OPFERMAN; KOTHARI, 2017).

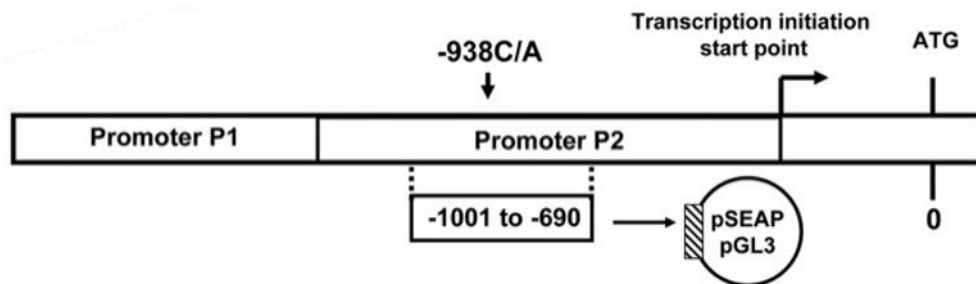


Figura 6: Estrutura do promotor do gene *BCL2*. As regiões consistem em promotor P1 “estimulador” e o promotor P2 “inibitório” da atividade gênica. O polimorfismo (-938) C>A está localizado na região P2 (nt: 690 a 1001) e foi avaliado através da construção de vetores pSEAPe pGL3. Retirado de Nückel, Ulrich (2006).

BAX

O *BAX* é um gene pró-apoptótico localizado no cromossomo 19q13.3 humano, possuindo seis exons e uma região promotora. Variações de sequência na região do promotor e sequência de codificação podem abolir sua função pró-apoptótica (PASTOR-IDOATE et al., 2015). O SNP -248 G>A está localizado na região do promotor (rs4645878) do gene *BAX*, e foi associado à baixa expressão da proteína *BAX*. Ou seja, o alelo G e o genótipo GG estão associados à diminuição da expressão do *BAX* (STARCZYNSKI et al., 2005; NÜCKEL et al., 2006; SAXENA et al., 2002).

FAS

O *FAS* é um receptor transmembrana entre os receptores de morte da superfície celular pertencente à superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). Quando esse receptor se liga a seu ligante natural (FASL) a célula alvo sofre apoptose. O gene *FAS* está localizado no cromossomo 10q24.1 humano, possuindo nove exons e oito introns (LU et al., 2012), (MOHAMMADZADEH et al., 2011). SNPs funcionais dentro da região promotora do gene *FAS* são capazes de afetar a transcrição e, subsequentemente, modular o risco de

doenças. Os SNPs -1377 G>A (rs2234767) e -670 A>G (rs1800682), localizados na região promotora do gene, interferem com os locais de ligação do fator de transcrição SP1 e STAT1, respectivamente, afetando a atividade do promotor e, por sua vez, a expressão do gene *FAS* (WANG et al., 2016; OZDEMIRKIRAN et al., 2017).

3. JUSTIFICATIVA

A AF é uma doença inflamatória crônica onde os pacientes acometidos com crises graves apresentam vasculopatia (disfunção e lesão vascular), devido ao aumento de adesão de eritrócitos falciforme e agregados plaquetários ao endotélio, elevado nível de células fagocíticas monocíticas ativadas, abundância de neutrófilos e células endoteliais circulantes.

Naturalmente, os eritrócitos senescentes, bem como os eritrócitos falciformes são condenados a morte precoce ao apresentarem nas suas membranas a fosfatidilserina. Durante as crises da AF, o aumento de hemácias falciformes na circulação sanguínea pode aumentar o nível de presença e atividade dos monócitos, ao passar pelo baço, por exemplo, e desencadear uma doença inflamatória sistêmica.

A adesão dos eritrócitos falciformes ao endotélio causa a oclusão dos vasos e lesão isquêmica de reperfusão, o que pode danificar ou levar a perda da integridade do endotélio vascular. As células endoteliais vasculares se tornam, portanto, alvo das células fagocíticas.

A lesão do endotélio da parede vascular em AF, deixa exposta a sua matriz subendotelial, onde as plaquetas ativadas aderem. A persistência da lesão e a manutenção da inflamação causam maior recrutamento e agregação plaquetária, ocluindo o vaso.

Diante desses cenários, a apoptose pode constituir uma ferramenta para o controle do equilíbrio homeostático do organismo vivo, pois o defeito no mecanismo de morte programada pode contribuir para a persistência da inflamação e a progressão clínica da doença.

A análise do perfil gênico e polimorfismos envolvendo genes apoptóticos e sua regulação mostrou-se importante em várias doenças sistêmicas, inflamatórias e autoimune. Variações na sequência de DNA poderiam se implicar no agravamento da AF.

4. MARCO CONCEITUAL

A AF é uma doença inflamatória crônica caracterizada por crises dolorosas associadas à vaso oclusão (formação de agregados de células), lesão isquêmica de reperfusão, entre outros.

O aumento da formação de eritrócitos falciformes no sangue, e a formação de radicais livres de oxigênio contribuem para a permanência da inflamação.

Em condições de hipóxia, os eritrócitos falciformes perdem a deformabilidade e podem ter as membranas comprometidas expondo a fosfatidilserina, responsável pela sua morte precoce, mediada pelos macrófagos.

O aumento dessa ocorrência pode mobilizar e acentuar a ativação dos macrófagos na circulação sistêmica, comprometendo a vida do paciente.

A apoptose como mecanismo homeostático pode ser uma solução para reestabelecer o equilíbrio fisiológico. Portanto, desequilíbrios nesse mecanismo podem representar um fator agravante para a inflamação na AF

Por esta razão, propomos investigar em primeiro momento a variabilidade genética em pacientes com anemia falciforme, focando em genes envolvidos nas vias que atuam nesse processo fisiológico.

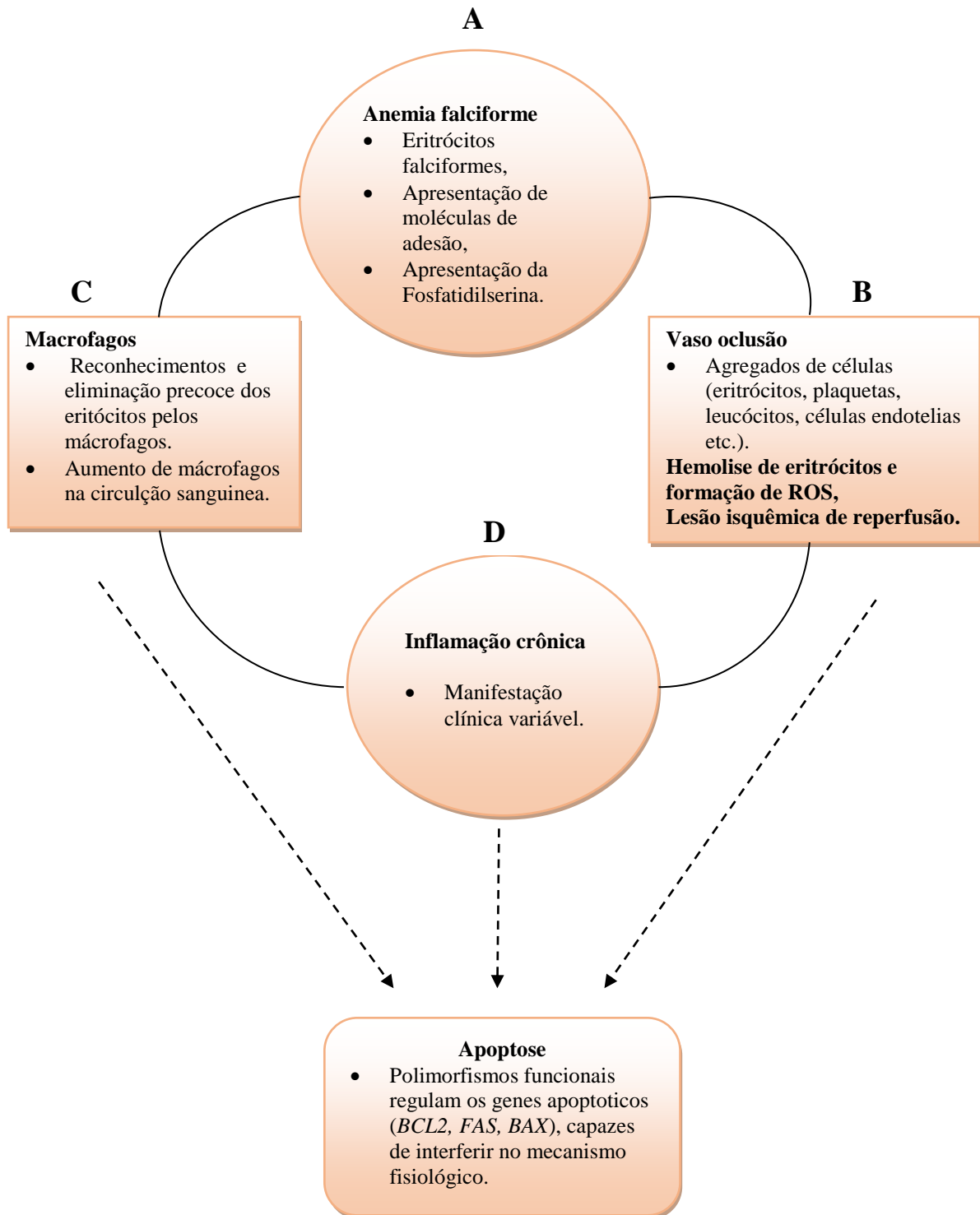


Figura 7: Marco conceitual caracterizando estudo de apoptose em anemia falciforme.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Investigar o perfil genético de pacientes com AF através da análise da presença e frequência de variantes polimórficas em genes associados a apoptose, comparando estes dados com indivíduos controles.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANNUAR, Aziati Azwari et al. Impact of FAS/FAS1 Gene Polymorphisms on Susceptibility Risk and Imatinib Mesylate Treatment Response in Chronic Myeloid Leukaemia Patients. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention*, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 565-571, 1 fev. 2021. EpiSmart Science Vector Ltd. <http://dx.doi.org/10.31557/apjcp.2021.22.2.565>
2. Sedrak A, Kondamudi NP. Sickle Cell Disease. 2021 Feb 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 29494006
3. A BARBU, Emilia et al. Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises. *Cytokine*, [S.L.], v. 127, p. 154933, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154933>
4. Bender MA. Sickle Cell Disease. 2003 Sep 15 [updated 2017 Aug 17]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2020. PMID: 20301551.
5. BIGDELOU, Parnian; FARNOUD, Amir M.. Induction of Eryptosis in Red Blood Cells Using a Calcium Ionophore. *Journal Of Visualized Experiments*, [S.L.], n. 155, p. 60659, 21 jan. 2020. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/60659>
6. DARBARI, Deepika S. et al. The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: definition, pathophysiology, and management. *European Journal Of Haematology*, [S.L.], v. 105, n. 3, p. 237-246, 19 maio 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ejh.13430>
7. FÖLLER, Michael; LANG, Florian. Ion Transport in Eryptosis, the Suicidal Death of Erythrocytes. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, [S.L.], v. 8, p. 597, 8 jul. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.00597>
8. GARCIA, Nadja Pinto et al. Sickle Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP-1 β , IL-12/VEGF, and IL-10/IP-10 Axis. *Journal Of Immunology Research*, [S.L.], v. 2020, p. 1-22, 8 jan. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/4585704>
9. JAIN, Aakanchha et al. Polymerase Chain Reaction. *Basic Techniques In Biochemistry, Microbiology And Molecular Biology*, [S.L.], p. 29-31, 2020. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_14
10. ELEONORE, Ngo Linwa Esther et al. Malaria in patients with sickle cell anaemia: burden, risk factors and outcome at the laquintinie hospital, cameroon. *Bmc Infectious Diseases*, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 40-40, 14 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-019-4757-x>
11. NADER, Elie et al. The Red Blood Cell—Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. *Frontiers In Immunology*, [S.L.], v. 11, p. 454, 13 mar. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00454>

12. NNODU, Obiageli e et al. Implementing newborn screening for sickle cell disease as part of immunisation programmes in Nigeria: a feasibility study. *The Lancet Haematology*, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 534-540, jul. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3026\(20\)30143-5](http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3026(20)30143-5)
13. ADDAI-MENSAH, Otchere; GYAMFI, Daniel; DUNEEH, Richard Vikpebah; DANQUAH, Kwabena O.; ANNANI-AKOLLOR, Max E.; BOATENG, Lillian; OWIREDU, Eddie-williams; AMPONSAH, Francis A.; AFRIYIE, Edward Y.; ASARE, Renate. Determination of Haematological Reference Ranges in Healthy Adults in Three Regions in Ghana. *Biomed Research International*, [s.l.], v. 2019, p. 1-6, 5 fev. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/7467512>
14. ACOB, Sanu Susan et al. Computerized Morphometric Analysis of Eryptosis. *Frontiers In Physiology*, [S.L.], v. 10, p. 1230, 24 set. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.01230>
15. BOONE, Brian A. et al. The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in a murine model of pancreatic cancer and promotes platelet aggregation and tumor growth. *Annals Of Hematology*, [S.L.], v. 98, n. 7, p. 1603-1610, 24 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-019-03692-0>
16. DATTA, Dibyadyuti et al. Zinc for Infection Prevention in Sickle Cell Anemia (ZIPS): study protocol for a randomized placebo-controlled trial in ugandan children with sickle cell anemia. *Trials*, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 460-460, 26 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13063-019-3569-z>
17. CRUZ, Pedro R. S. et al. Genetic comparison of sickle cell anaemia cohorts from Brazil and the United States reveals high levels of divergence. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 10896, 26 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-47313-2>
18. JAN, Rehmat et al. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 205-218, 1 jun. 2019. Maad Rayan Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2019.024>
19. LEYTIN, Valery et al. Platelet Apoptosis Can Be Triggered Bypassing the Death Receptors. *Clinical And Applied Thrombosis/Hemostasis*, [S.L.], v. 25, p. 107602961985364, 1 jan. 2019. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1076029619853641>
20. MCMAHON, Timothy J. et al. Nitric oxide loading reduces sickle red cell adhesion and vaso-occlusion in vivo. *Blood Advances*, [S.L.], v. 3, n. 17, p. 2586-2597, 4 set. 2019. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/bloodadvances.2019031633>
21. PICCIN, Andrea et al. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. *European Journal Of Haematology*, [S.L.], v. 102, n. 4, p. 319-330, 21 fev. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ejh.13212>
22. RAB, Minke A.e. et al. Rapid and reproducible characterization of sickling during automated deoxygenation in sickle cell disease patients. *American Journal Of Hematology*, [S.L.], v. 94, n. 5, p. 575-584, 8 mar. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.25443>
23. SAIK, Olga V. et al. Prioritization of genes involved in endothelial cell apoptosis by

their implication in lymphedema using an analysis of associative gene networks with ANDSystem. *Bmc Medical Genomics*, [S.L.], v. 12, n. 47, p. 118-140, mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12920-019-0492-9>

24. SHAH, Nirmish et al. Sickle cell disease complications: prevalence and resource utilization. *Plos One*, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 0214355, 5 jul. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0214355>

25. XU, Xuebo et al. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, [S.L.], v. 39, n. 1, jan. 2019. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20180992>

26. CONNES, Philippe et al. Blood rheological abnormalities in sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology And Microcirculation*, [S.L.], v. 68, n. 2-3, p. 165-172, 28 mar. 2018. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/ch-189005>

27. BISSINGER, Rosi et al. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *The Febs Journal*, [S.L.], v. 286, n. 5, p. 826-854, 18 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.14606>

28. CASTILHO, Lilian; DINARDO, Carla Luana. Optimized Antigen-Matched in Sickle Cell Disease Patients: Chances and Challenges in Molecular Times - the Brazilian Way. *Transfusion Medicine And Hemotherapy*, [s.l.], v. 45, n. 4, p.258-262, 2018. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000490713>

29. Haplotypes Reveal Single Origin of the Sickle Allele during the Holocene Wet Phase. *The American Journal Of Human Genetics*, [s.l.], v. 102, n. 4, p. 547-556, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.003>

30. IGNARRO, Louis J. Nitric oxide is not just blowing in the wind. *British Journal Of Pharmacology*, [S.L.], v. 176, n. 2, p. 131-134, 16 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14540>

31. KAPOOR, Sargam; LITTLE, Jane A.; PECKER, Lydia H.. Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Mayo Clinic Proceedings*, [S.L.], v. 93, n. 12, p. 1810-1824, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.08.001>

32. KIM-SHAPIRO, Daniel B. et al. Nitric oxide pathology and therapeutics in sickle cell disease. *Clinical Hemorheology And Microcirculation*, [S.L.], v. 68, n. 2-3, p. 223-237, 28 mar. 2018. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/ch-189009>

33. NIIHARA, Yutaka et al. A Phase 3 Trial of L-Glutamine in Sickle Cell Disease. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 379, n. 3, p. 226-235, 19 jul. 2018. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1715971>

34. WILLIAMS, Thomas N.; THEIN, Swee Lay. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annual Review Of Genomics And Human Genetics*, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 113-147, 31 ago. 2018. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021320>

35. VOGEL, Sebastian et al. The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in sickle cell disease via HMGB1/TLR4 and Bruton tyrosine kinase. *Blood Advances*, [S.L.], v. 2, n. 20, p. 2672-2680, 17 out. 2018. American Society of Hematology.

<http://dx.doi.org/10.1182/bloodadvances.2018021709>

36. ARDUINI, Giovanna Abadia Oliveira et al. Mortality by sickle cell disease in Brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 52-56, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.09.008>
37. ATAGA, Kenneth I. et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 376, n. 5, p. 429-439, 2 fev. 2017. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1611770>
38. de ALMEIDA, Renata Araujo; BERETTA, Ana Laura Remédio Zeni. Sickle Cell Disease and laboratory approach: a brief literature review. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 131-134, 17 fev. 2017. *Revista Brasileira de Analises Clinicas*. <http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.201700530>
39. JEMÀÀ, Mohamed et al. Methods Employed in Cytofluorometric Assessment of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death. *Cellular Physiology And Biochemistry*, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 431-444, 2017. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000480469>
40. KAPOOR, Sargam et al. Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Mayo Clinic Proceedings*, [S.L.], v. 93, n. 12, p. 1810-1824, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.08.001>
41. KATO, Gregory J.; STEINBERG, Martin H.; GLADWIN, Mark T.. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *Journal Of Clinical Investigation*, [S.L.], v. 127, n. 3, p. 750-760, 1 mar. 2017. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci89741>
42. KOLLIPOULOU, Alexandra et al. Key Pharmacogenomic Considerations for Sickle Cell Disease Patients. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 314-322, jun. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/omi.2017.0058>
43. LI, Xuejin et al. Biomechanics and biorheology of red blood cells in sickle cell anemia. *Journal Of Biomechanics*, [S.L.], v. 50, p. 34-41, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.11.022>
44. MACHARIA, Alex W. et al. The clinical epidemiology of sickle cell anemia In Africa. *American Journal Of Hematology*, [S.L.], v. 93, n. 3, p. 363-370, 18 dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.24986>
45. MCGANN, Patrick T.; HERNANDEZ, Arielle G.; WARE, Russell E.. Sickle cell anemia in sub-Saharan Africa: advancing the clinical paradigm through partnerships and research. *Blood*, [S.L.], v. 129, n. 2, p. 155-161, 12 jan. 2017. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-09-702324>
46. OPFERMAN, Joseph T; KOTHARI, Anisha. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death & Differentiation*, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 37-45, 3 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.170>
47. OZDEMIRKIRAN, Fusun Gediz et al. FAS/FASL gene polymorphisms in Turkish patients with chronic myeloproliferative disorders. *Archives Of Medical Science*, [S.L.], v. 2, p. 426-432, 2017. Termedia Sp. z.o.o.. <http://dx.doi.org/10.5114/aoms.2015.53963>

48. RENOUX, Céline et al. Alpha-thalassaemia promotes frequent vaso-occlusive crises in children with sickle cell anaemia through haemorheological changes. *Pediatric Blood & Cancer*, [S.L.], v. 64, n. 8, p. 26455-26455, 18 jan. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/psc.26455>
49. REZANIA, Samin et al. Platelet hyperactivation, apoptosis and hypercoagulability in patients with acute pulmonary embolism. *Thrombosis Research*, [S.L.], v. 155, p. 106-115, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2017.05.009>
50. SOARES, Leonardo Ferreira et al. Prevalência de hemoglobinas variantes em comunidades quilombolas no estado do Piauí, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, [S.L.], v. 22, n. 11, p. 3773-3780, nov. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172211.04392016>
51. SHRINER, Daniel; ROTIMI, Charles N.. Whole-Genome-Sequence-Based WAILOO, Keith. Sickle Cell Disease — A History of Progress and Peril. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 376, n. 9, p.805-807, 2 mar. 2017. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmp1700101>
52. ZHANG, Jing et al. Regulation of Active ICAM-4 on Normal and Sickle Cell Disease RBCs via AKAPs Is Revealed by AFM. *Biophysical Journal*, [S.L.], v. 112, n. 1, p. 143-152, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.3204>
53. ADLY, Amira A. et al. Soluble FAS/FASL ratio as a marker of vasculopathy in children and adolescents with sickle cell disease. *Cytokine*, [S.L.], v. 79, p. 52-58, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.12.022>
54. GHATGE, Mohini S. et al. Crystal structure of carbonmonoxy sickle hemoglobin in R-state conformation. *Journal Of Structural Biology*, [S.L.], v. 194, n. 3, p. 446-450, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.04.003>
55. GLESSE, N et al. Evaluation of polymorphic variants in apoptotic genes and their role in susceptibility and clinical progression to systemic lupus erythematosus. *Lupus*, [S.L.], v. 26, n. 7, p. 746-755, 5 dez. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0961203316678671>
56. KIRAZ, Yağmur et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, [S.L.], v. 37, n. 7, p. 8471-8486, 9 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>
57. NGUYEN, Duc Bach et al. Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells. *Cellular Physiology And Biochemistry*, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 1085-1099, 2016. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000443059>
58. TOTINO, Paulo R. R.; DANIEL-RIBEIRO, Cláudio T.; FERREIRA-DA-CRUZ, Maria de Fátima. Evidencing the Role of Erythrocytic Apoptosis in Malarial Anemia. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, [S.L.], v. 6, p. 176, 9 dez. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2016.00176>
59. WANG, Shizhi et al. FAS rs2234767 and rs1800682 polymorphisms jointly contributed to risk of colorectal cancer by affecting SP1/STAT1 complex recruitment to chromatin. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 19229, 13 jan. 2016. Springer Science and

Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep19229>

60. AL-SALEM, Ahmed. History of Sickle Cell Anemia. Medical And Surgical Complications Of Sickle Cell Anemia, [s.l.], p.1-17, 15 dez. 2015. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-24762-5_1
61. BROUSSE, Valentine et al. Erythroid Adhesion Molecules in Sickle Cell Anaemia Infants: insights into early pathophysiology. Ebiomedicine, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 154-157, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2014.12.006>
62. CAVAZZANA, Marina et al. Outcomes of Gene Therapy for Severe Sickle Disease and Beta-Thalassemia Major Via Transplantation of Autologous Hematopoietic Stem Cells Transduced Ex Vivo with a Lentiviral Beta AT87Q-Globin Vector. Blood, [S.L.], v. 126, n. 23, p. 202-202, 3 dez. 2015. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v126.23.202.202>
63. DAMPIER, Carlton. Orphan drugs for sickle vaso-occlusion: dawn of a new era of targeted treatment. Orphan Drugs: Research and Reviews, [s.l.], p.99-99, nov. 2015. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/odrr.s46305>
64. GREENE, Dina N. et al. Advances in detection of hemoglobinopathies. Clinica Chimica Acta, [S.L.], v. 439, p. 50-57, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.006>
65. HOBAN, Megan D. et al. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. Blood, [S.L.], v. 125, n. 17, p. 2597-2604, 23 abr. 2015. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-12-615948>
66. LANG, Elisabeth; LANG, Florian. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. Seminars In Cell & Developmental Biology, [S.L.], v. 39, p. 35-42, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2015.01.009>
67. PASTOR-IDOATE, Salvador et al. BAX and BCL-2 polymorphisms, as predictors of proliferative vitreoretinopathy development in patients suffering retinal detachment: the retina 4 project. Acta Ophthalmologica, [S.L.], v. 93, n. 7, p. 541-549, 19 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/aos.12718>
68. PENG, Yu et al. Polymorphisms of BCL2 and BAX Genes Associate with Outcomes in Advanced Non-small cell lung cancer Patients treated with platinum-based Chemotherapy. Scientific Reports, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1, dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep17766>
69. ROBAZZI, Teresa Cristina M.V. *et al.* Coexistência de lúpus eritematoso sistêmico e doença falciforme: relato de caso e revisão da literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 68-74, jan. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2013.05.005>
70. ROMERO, A. et al. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: an update. Fish & Shellfish Immunology, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 79-87, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.038>

71. THUSHARA, R.M. et al. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: an outlook. *Critical Reviews In Oncology/Hematology*, [S.L.], v. 93, n. 3, p. 149-158, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.11.002>
72. BAO, Jinli; LIN, Lin. Platelet apoptosis in patients with acute coronary syndromes. *Journal Of Thrombosis And Thrombolysis*, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 539-546, 17 dez. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11239-014-1160-8>
73. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. Doença falciforme: atenção e cuidado: a experiência brasileira: 2005-2010 / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. – 1. Ed., 1. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 80 p disponível em www.saude.gov.br
74. PROENÇA-FERREIRA, Renata et al. Endothelial Activation by Platelets from Sickle Cell Anemia Patients. *Plos One*, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 89012, 13 fev. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089012>
75. BANDEIRA, Izabel C.J. et al. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB*S haplotype. *Cytokine*, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 217-221, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.10.009>
76. JOSEFSSON, Emma C. et al. Platelet production proceeds independently of the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Nature Communications*, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 3455, 17 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4455>
77. HERRICK, James B.. Peculiar Elongated and Sickle-Shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. *Jama*, [s.l.], v. 312, n. 10, p.1063, 10 set. 2014. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.11011>
78. MAJERUS, Elaine M. et al. NKTT120 Reduces iNKT Cells without Dose Limiting Toxicity in Stable Adult Sickle Cell Patients in a Phase 1 Trial. *Blood*, [S.L.], v. 124, n. 21, p. 2718, 6 dez. 2014. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v124.21.2718.2718>
79. SARAF, Santosh L. et al. Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. *Paediatric Respiratory Reviews*, [s.l.], v. 15, n. 1, p.4-12, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2013.11.003>
80. SZONDY, Zsuzsa et al. Impaired Clearance of Apoptotic Cells in Chronic Inflammatory Diseases: therapeutic implications. *Frontiers In Immunology*, [S.L.], v. 5, p. 354, 1 ago. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00354>
81. FIELD, Joshua J. et al. Sickle cell vaso-occlusion causes activation of iNKT cells that is decreased by the adenosine A2A receptor agonist regadenoson. *Blood*, [S.L.], v. 121, n. 17, p. 3329-3334, 25 abr. 2013. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-11-465963>
82. LOBO, Clarisse Lopes de Castro et al. Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. *Pediatric Blood & Cancer*, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 34-39, 4 set. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.24711>

83. Mindukshev IV, Rukoiatkina NI, Dobrylko IA, Skverchinskaia EA, Nikitina ER, Krivoshlyk VV, Gambarian SP, Krivchenko AI. [Characterisation of enucleated cells apoptosis: human platelets and erythrocytes]. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2013 Jan;99(1):92-110. Russian. PMID: 23659060
84. PIEL, Frédéric B et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *The Lancet*, [S.L.], v. 381, n. 9861, p. 142-151, jan. 2013. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)61229-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61229-x)
85. SILLA, Lucia Mariano da Rocha et al. High Prevalence of Anemia in Children and Adult Women in an Urban Population in Southern Brazil. *Plos One*, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 68805, 29 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068805>
86. SCHEUPLEIN, Felix et al. A Humanized Monoclonal Antibody Specific for Invariant Natural Killer T (iNKT) Cells for In Vivo Depletion. *Plos One*, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 76692, 27 set. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076692>
87. WEATHERALL, David J.. The Role of the Inherited Disorders of Hemoglobin, the First “Molecular Diseases,” in the Future of Human Genetics. *Annual Review Of Genomics And Human Genetics*, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-24, 31 ago. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153500>
88. FAVALORO, B. et al. Role of Apoptosis in disease. *Aging*, [S.L.], v. 4, n. 5, p. 330-349, 31 maio 2012. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.100459>
89. GYULKHANDANYAN, Armen V. et al. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *Journal Of Thrombosis And Thrombolysis*, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 397-411, 1 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11239-012-0688-8>
90. LANG, Florian et al. Physiology and Pathophysiology of Eryptosis. *Transfusion Medicine And Hemotherapy*, [S.L.], v. 39, n. 5, p. 308-314, 2012. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000342534>
91. LU, Man-Man et al. Association of FAS gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a case-control study and meta-analysis. *Experimental And Therapeutic Medicine*, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 497-502, 28 jun. 2012. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2012.625>.
92. ROSENFELD, Ricardo. Hemograma. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, [S.L.], v. 48, n. 4, p. 244-244, ago. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442012000400001>
93. SANTOS, Jean Leandro dos et al. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. *Química Nova*, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 783-790, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422012000400025>
94. LERVOLINO, Luciana Garcia et al. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 49-54, 2011. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (RBHH)*.

<http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20110015>

95. MOHAMMADZADEH, Adel et al. Evaluation of apoptosis-related gene FAS (CD95) and FASL (CD178) polymorphisms in Iranian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology International*, [S.L.], v. 32, n. 9, p. 2833-2836, 31 ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-011-2065-x>
96. ZHANG, Ning et al. BCL-2 (-938C > A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. *Bmc Medical Genetics*, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 48, 1 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2350-12-48>
97. ZHANG, Weilin et al. Calpain Activator Dibucaine Induces Platelet Apoptosis. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 2125-2137, 25 mar. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12042125>
98. FERTRIN, Kleber Yotsumoto et al. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert Review Of Hematology*, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 443-458, ago. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/ehm.10.44>
99. ALI, Imran; ABOUL-ENEIN, Hassan Y.; CAZES, Jack. A JOURNEY FROM MIKHAIL TSWETT TO NANO-LIQUID CHROMATOGRAPHY. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*, [S.L.], v. 33, n. 5, p. 645-653, 16 fev. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10826071003608728>
100. CAVAZZANA-CALVO, Marina et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, [S.L.], v. 467, n. 7313, p. 318-322, set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09328>
101. FERTRIN, Kleber Yotsumoto et al. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. : implications for clinical diversity and treatment. *Expert Review Of Hematology*, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 443-458, ago. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/ehm.10.44>
102. PRABHAKAR, Hari; HAYWOOD, Carlton; MOLOKIE, Robert. Sickle cell disease in the United States: Looking back and forward at 100 years of progress in management and survival. *American Journal Of Hematology*, [s.l.], 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21676>
103. KILE, B. T.. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, [S.L.], v. 7, p. 214-217, jul. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03366.x>
104. SEBASTIANI, Paola et al. Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. *American Journal Of Hematology*, [S.L.], p. 29-35, 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21572>
105. WALLACE, Kori L. et al. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN- γ and CXCR3 chemokines. *Blood*, [S.L.], v. 114, n. 3, p. 667-676, 16 jul. 2009. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-02-205492>

106. ASHLEY-KOCH, Allison E. et al. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*, [S.L.], v. 111, n. 12, p. 5721-5726, 15 jun. 2008. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-02-074849>
107. BRUIN, Elza C. de; MEDEMA, Jan Paul. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews*, [S.L.], v. 34, n. 8, p. 737-749, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.001>
108. FÖLLER, Michael et al. Erythrocyte programmed cell death. *Iubmb Life*, [S.L.], v. 60, n. 10, p. 661-668, out. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.106>.
109. MANOLIO, Teri A.; BROOKS, Lisa D.; COLLINS, Francis S.. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *Journal Of Clinical Investigation*, [S.L.], v. 118, n. 5, p. 1590-1605, 1 maio 2008. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci34772>
110. UDA, M. et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of thalassemia. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 105, n. 5, p. 1620-1625, 1 fev. 2008. *Proceedings of the National Academy of Sciences* <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711566105>
111. SEBASTIANI, Paola et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: bayesian modeling of genetic associations. *American Journal Of Hematology*, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 189-195, 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21048>
112. SEDGEWICK, Amanda E. et al. BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with β -hemoglobinopathies. *Blood Cells, Molecules, And Diseases*, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 255-258, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2008.06.007>
113. BACHMANN, Hagen S. et al. The AA Genotype of the Regulatory BCL2 Promoter Polymorphism (-938C>A) Is Associated with a Favorable Outcome in Lymph Node-Negative Invasive Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, [S.L.], v. 13, n. 19, p. 5790-5797, 1 out. 2007. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-2673>
114. CHEN, K. et al. Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, [S.L.], v. 28, n. 9, p. 2008-2012, 11 ago. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgm172>
115. FERRAZ, Maria Helena C.; MURAO, Mitiko. Diagnóstico laboratorial da DFem neonatos e após o sexto mês de vida. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 218-222, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842007000300005>
116. ELMORE, Susan et al. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1080/01926230701320337>
117. MA, Q et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response

- to hydroxyurea. *The Pharmacogenomics Journal*, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 386-394, 13 fev. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.tpj.6500433>
118. MENZEL, Stephan et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nature Genetics*, [S.L.], v. 39, n. 10, p. 1197-1199, 2 set. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ng2108>
119. NOLAN, Vikki G. et al. Estimated glomerular filtration rate in sickle cell anemia is associated with polymorphisms of bone morphogenetic protein receptor 1B. *American Journal Of Hematology*, [S.L.], v. 82, n. 3, p. 179-184, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.20800>
120. THEIN, S. L. et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 104, n. 27, p. 11346-11351, 25 jun. 2007. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611393104>
121. ADEWOYE, Adeboye H. et al. Association of Polymorphisms of IGF1R and Genes in the Transforming Growth Factor- β /Bone Morphogenetic Protein Pathway with Bacteremia in Sickle Cell Anemia. *Clinical Infectious Diseases*, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 593-598, set. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/506356>
122. CANALI, Stefano; CORBELLINI, Gilberto. *Clinical, Epidemiological, and Genetic Investigations on Thalassemia and Malaria in Italy. Malaria: Genetic and Evolutionary Aspects*, [s.l.], v. 5, n. 5, p.55-80, dez. 2006. Kluwer Academic Publishers. http://dx.doi.org/10.1007/0-387-28295-5_4
123. LANG, Florian et al. Mechanisms and Significance of Eryptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, [S.L.], v. 8, n. 7-8, p. 1183-1192, jul. 2006. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2006.8.1183>
124. NOLAN, Vikki G. et al. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and snps in klotho, tek and genes of the tgf-beta/bmp pathway. *British Journal Of Haematology*, [S.L.], v. 133, n. 5, p. 570-578, jun. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06074.x>
125. NÜCKEL, H et al. BAX gene G(-248)A promoter polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: lack of association with incidence, disease stage and progression-free survival. *Leukemia*, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 724-724, 2 fev. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404126>
126. NÜCKEL, Holger et al. Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, [S.L.], v. 109, n. 1, p. 290-297, 7 set. 2006. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-03-007567>
127. BALDWIN, Clinton et al. Association of klotho, bone morphogenetic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood*, [S.L.], v. 106, n. 1, p. 372-375, 1 jul. 2005. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-02-0548>

128. CHRISTOPH, Garrott W. et al. Understanding the Shape of Sickled Red Cells. *Biophysical Journal*, [s.l.], v. 88, n. 2, p. 1371-1376, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.051250>
129. COSTA, Raimundo N P et al. Association of the G-463A myeloperoxidase polymorphism with infection in sickle cell anemia. *Haematologica*, [S.I.], v. 90, n. 7, p. 977-979, jul. 2005
130. SKOGSBERG, Å et al. The G(-248)A polymorphism in the promoter region of the BAX gene does not correlate with prognostic markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 77-81, 24 nov. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404030>
131. WINN, R. K.; HARLAN, J. M.. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, [S.L.], v. 3, n. 8, p. 1815-1824, ago. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01378.x>
132. STARCZYNSKI, Jane et al. Common Polymorphism G(-248)A in the Promoter Region of the BAX Gene Results in Significantly Shorter Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia Once Treatment Is Initiated. *Journal Of Clinical Oncology*, [S.L.], v. 23, n. 7, p. 1514-1521, 1 mar. 2005. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2005.02.192>
133. THORISSON, G. A. et al. The International HapMap Project Web site. *Genome Research*, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 1592-1593, 1 nov. 2005. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.4413105>
134. HOPPE, Carolyn et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood*, [S.L.], v. 103, n. 6, p. 2391-2396, 15 mar. 2004. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-09-3015>
135. OUTOVSKY, Alla et al. HPLC Retention Time as a Diagnostic Tool for Hemoglobin Variants and Hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clinical Chemistry*, [S.L.], v. 50, n. 10, p. 1736-1747, 1 out. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2004.034991>
136. SERJEANT, Graham R.. The emerging understanding of sickle cell disease. *British Journal Of Haematology*, [S.L.], v. 112, n. 1, p. 3-18, jan. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02557.x>
137. SHARAN, K. et al. Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *British Journal Of Haematology*, [S.L.], v. 124, n. 2, p. 240-243, jan. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04762.x>
138. STUART, Marie J; NAGEL, Ronald L. Sickle-cell disease. *The Lancet*, [s.l.], v. 364, n. 9442, p. 1343-1360, out. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)17192-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(04)17192-4)
139. Wyszynski DF, Baldwin CT, Cleves MA, et al. Polymorphisms near a chromosome 6q QTL area are associated with modulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004;50 (1):23-33

140. CONSORTIUM, International Hapmap. The International HapMap Project. *Nature*, [S.L.], v. 426, n. 6968, p. 789-796, dez. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02168>
141. HOPPE, Carolyn et al. Distinct HLA associations by stroke subtype in children with sickle cell anemia. *Blood*, [S.L.], v. 101, n. 7, p. 2865-2869, 1 abr. 2003. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-09-2791>
142. REES, David C et al. Guidelines for the management of the acute painful crisis in sickle cell disease. *British Journal Of Haematology*, [S.L.], v. 120, n. 5, p. 744-752, mar. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04193.x>
143. Daudt LE, Zechmaister D, Portal L, Neto EC, Silla LM, Giugliani R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil [Neonatal screening for hemoglobinopathies: a pilot study in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil]. *Cad Saúde Publica*. 2002 May-Jun;18(3):833-41.
144. SAXENA, Anurag et al. Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Letters*, [S.L.], v. 187, n. 1-2, p. 199-205, dez. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835\(02\)00378-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00378-6)
145. CHIES, J.A.B.; NARDI, N.B. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Medical Hypotheses*, [s.l.], v. 57, n. 1, p.46-50, jul. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1054/mehy.2000.1310>
146. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 1143-1156, dez. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4400946>
147. BLOUIN, Marie-José et al. Genetic correction of sickle cell disease: insights using transgenic mouse models. *Nature Medicine*, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 177-182, fev. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/72279>
148. STYLES, Lori A. et al. Evidence for HLA-related susceptibility for stroke in children with sickle cell disease. *Blood*, [S.L.], v. 95, n. 11, p. 3562-3567, 1 jun. 2000. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v95.11.3562>
149. CHARACHE, Samuel et al. Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle Cell Anemia. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 332, n. 20, p. 1317-1322, 18 maio 1995. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199505183322001>
150. REES, David C. et al. The metabolites of nitric oxide in sickle-cell disease. *British Journal Of Haematology*, [S.L.], v. 91, n. 4, p. 834-837, dez. 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05397.x>
151. JACOBSON, M.D. et al. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *The Embo Journal*, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 1899-1910, abr. 1994. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06459.x>

152. ETTRE, L. S.; SAKODYNSKII, K. I. M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: early work (1899-1903). *Chromatographia*, [S.L.], v. 35, n. 3-4, p. 223-231, fev. 1993. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02269707>
153. KODISH, Eric et al. Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 325, n. 19, p. 1349-1353, 7 nov. 1991. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199111073251905>
154. MILNER, Paul F. et al. Sickle Cell Disease as a Cause of Osteonecrosis of the Femoral Head. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 325, n. 21, p. 1476-1481, 21 nov. 1991. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199111213252104>
155. PLATT, Orah S. et al. Pain in Sickle Cell Disease. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 325, n. 1, p. 11-16, 4 jul. 1991. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199107043250103>
156. RIEDER, R. F. et al. Effect of β -Globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. *American Journal Of Hematology*, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 184-189, mar. 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.2830360305>
157. EATON, William A.; HOFRIKTER, James. Sickle Cell Hemoglobin Polymerization. *Advances In Protein Chemistry*, [s.l.], v. 40, n. , p. 63-279, Não é um mês valido! 1990. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60287-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60287-9)
158. FARBER, M et al. Cooperative Study of Sickle Cell Disease: demographic and socioeconomic characteristics of patients and families with sickle cell disease. *Journal Of Chronic Diseases*, [S.L.], v. 38, n. 6, p. 495-505, 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681\(85\)90033-5](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681(85)90033-5)
159. Gilman JG, Huisman TH. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. *Blood*. 1985;66(4):783-787
160. ANTONARAKIS, S. E. et al. Origin of the beta S-globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. : the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both.. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 81, n. 3, p. 853-856, 1 fev. 1984. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.81.3.853>
161. PAGNIER, J. et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 81, n. 6, p. 1771-1773, 1 mar. 1984. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.81.6.1771>
162. PLATT, O s et al. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *Journal Of Clinical Investigation*, [S.L.], v. 74, n. 2, p. 652-656, 1 ago. 1984. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci111464>
163. KAN, Y. W.; DOZY, A. M.. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation.. : relationship to sickle mutation.. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 75, n. 11, p. 5631-5635, 1 nov. 1978. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.75.11.5631>

164. BENESCH, Ruth E. et al. Location and bond type of intermolecular contacts in the polymerisation of haemoglobin S. *Nature*, [s.l.], v. 269, n. 5631, p. 772-775, out. 1977. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/269772a0>

165. WISHNER, B.c. et al. Crystal structure of sickle-cell deoxyhemoglobin at 5 Å resolution. *Journal Of Molecular Biology*, [s.l.], v. 98, n. 1, p. 179-194, out. 1975. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(75\)80108-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80108-2)

166. BERTLES, John F.. Hemoglobin Interaction and Molecular Basis of Sickling. *Archives Of Internal Medicine*, [s.l.], v. 133, n. 4, p. 538, 1 abr. 1974. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1974.00320160032004>

167. MAKLER, M. T.; BERTHRONG, M.; LOCKE, H. R.; DAWSON, D. L.. A New Variant of Sickle-Cell Disease with High Levels of Foetal Haemoglobin Homogeneously Distributed within Red Cells. *British Journal Of Haematology*, [s.l.], v. 26, n. 4, p.519-526, abr. 1974. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1974.tb00495.x>

168. PEARSON, Howard A. et al. Routine Screening of Umbilical Cord Blood for Sickle Cell Diseases. *Jama: The Journal of the American Medical Association*, [s.l.], v. 227, n. 4, p. 420-421, 28 jan. 1974. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1974.03230170036010>

169. SERJEANT, Beryl e et al. Screening Cord Bloods for Detection of Sickle Cell Disease in Jamaica. *Clinical Chemistry*, [s.l.], v. 20, n. 6, p. 666-669, 1 jun. 1974. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/20.6.666>

170. RILBE, Harry. HISTORICAL AND THEORETICAL ASPECTS OF ISOELECTRIC FOCUSING. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 209, n. 1, p. 11-22, jun. 1973. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1973.tb47515.x>

171. HUNTSMAN, R. G. et al. A rapid whole blood solubility test to differentiate the sickle-cell trait from sickle-cell anaemia. *Journal Of Clinical Pathology*, [s.l.], v. 23, n. 9, p. 781-783, 1 dez. 1970. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.23.9.781>

172. BENESCH, R.; BENESCH, R. E.; YU, C. I.. Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 526-532, 1 fev. 1968. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.59.2.526>

173. DÖBLER, Johanna; BERTLES, John F.. THE PHYSICAL STATE OF HEMOGLOBIN IN SICKLE-CELL ANEMIA ERYTHROCYTES IN VIVO. *The Journal Of Experimental Medicine*, [s.l.], v. 127, n. 4, p. 711-716, 1 abr. 1968. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.127.4.711>

174. GILLES, H.M.; Fletcher, K.A.; Hendrickse, R.G.; Lindner, R.; Reddy, S.; Allan, N.. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in african children in south western nigeria. *The Lancet*, [s.l.], v. 289, n. 7482, p.138-140, jan. 1967. elsevier bv. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(67\)91037-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(67)91037-9)

175. CONLEY, C. Lockard; WEATHERALL, David J.; RICHARDSON, Stuart N.;

SHEPARD, Marguerite K.; CHARACHE, Samuel. Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin: A Study of 79 Affected Persons in 15 Negro Families in Baltimore. *Blood*, [s.l.], v. 21, n. 3, p.261-281, 1 mar. 1963. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v21.3.261.261>

176. HERMAN, Emery C.; CONLEY, C.Lockard. Hereditary persistence of fetal hemoglobin. *The American Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 9-17, jul. 1960. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(60\)90003-6](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(60)90003-6)

177. CRONE, Richard I.. Gross Hematuria in Sickle-Cell Trait. A.m.a. *Archives Of Internal Medicine*, [s.l.], v. 100, n. 4, p.597-597, 1 out. 1957. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1957.00260100081009>

178. EDINGTON, G. M.; LAING, W. N.. Relationship Between Haemoglobins C and S and Malaria in Ghana. *Bmj*, [s.l.], v. 2, n. 5037, p.143-145, 20 jul. 1957. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.2.5037.143>

179. ALLISON, A. C.. THE SICKLE-CELL and HAEMOGLOBIN C GENES IN SOME AFRICAN POPULATIONS. *Annals Of Human Genetics*, [s.l.], v. 21, n. 1, p.67-89, set. 1956. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-1809.1971.tb00266.x>

180. COLBOURNE, M. J.; EDINGTON, G. M.. Sickling and Malaria in the Gold Coast. *Bmj*, [s.l.], v. 1, n. 4970, p.784-786, 7 abr. 1956. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.1.4970.784>

181. ABEUTLER, E.; DERN, R. J.; FLANAGAN, C. L.. Effect of Sickle-cell Trait on Resistance to Malaria. *Bmj*, [s.l.], v. 1, n. 4923, p.1189-1191, 14 maio 1955. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.1.4923.1189>

182. RAPER, A. B.. Malaria and the Sickling Trait. *Bmj*, [s.l.], v. 1, n. 4923, p.1186-1189, 14 maio 1955. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.1.4923.1186>. Vandepitte, J. (1955). *DAcum.Med. geogr. irop. (Ams-)*, 7. I4. Zuelzer, W. W., Neel, J. V., and Colaert, J. (1955). *Blood*. 10, 341

183. ALLISON, A.c. The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, [s.l.], v. 48, n. 4, p.312-318, jul. 1954. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90101-7](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(54)90101-7)

184. PERUTZ, M. F. et al. X-Ray and Solubility Studies of the Hæmoglobin of Sickle-Cell Anæmia Patients. *Nature*, [s.l.], v. 167, n. 4258, p. 929-931, jun. 1951. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/167929a0>

185. PERUTZ, M. F.; MITCHISON, J. M.. State of Hæmoglobin in Sickle-Cell Anæmia. *Nature*, [s.l.], v. 166, n. 4225, p. 677-679, out. 1950. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/166677a0>

186. DALAND, Geneva A.; CASTLE, William B.. A simple and rapid method for demonstrating sickling of the red blood cells: The use of reducing agents. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, Usa*, v. 33, n. 9, p. 1082-1088, 1 set. 1948

187. BAUER, Julius. SICKLE CELL DISEASE. Archives Of Surgery, [s.l.], v. 41, n. 6, p.1344-1345, 1 dez. 1940. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archsurg.1940.01210060041005>
188. CUMMER, Clyde L.. ULCERS OF THE LEGS IN SICKLE CELL ANEMIA. Archives Of Dermatology, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 1015-1039, 1 dez. 1940. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1940.01490180024002>
189. DIGGS, L. W.; BIBB, Juanita. THE ERYTHROCYTE IN SICKLE CELL ANEMIA. Journal Of The American Medical Association, [s.l.], v. 112, n. 8, p. 695-701, 25 fev. 1939. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1939.02800080015004>
190. EMMEL, Victor E.. A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles. archives Of Internal Medicine, [s.l.], v. , n. 4, p. 586, 1 out. 1917. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1917.00090040108005>

7. ARTIGO

8. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANEXO A

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
SERVIÇO DE HEMATOLOGIA CLÍNICA
LABORATÓRIO DE CULTURA E ANÁLISE MOLECULAR DE CÉLULAS HUMANAS

Nº do projeto GPPG ou CAAE: **17870719.0.0000.5327**

Título do Projeto: Avaliação de variantes polimórficas em genes apoptóticos e seus papéis na suscetibilidade e progressão clínica da Doença Falciforme

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é investigar a presença e a frequência das variantes polimórficas em genes associados a apoptose, buscando possíveis associações entre esses polimorfismos e progressão clínica da anemia falciforme. Esta pesquisa está sendo realizada pelo serviço de Hematologia e hemoglobinopatias do HCPA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários. A sua amostra de sangue (1,5 ml de sangue venoso) coletada previamente no projeto sob o número 2010-0585, será usada para a análise genética dos polimorfismos.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa. Apenas o tempo dispensado para aplicação desse termo, associada a leitura compreensão e assinatura.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos e terapias futuras, ampliando o campo de conhecimento genético da doença, e possibilitando uma nova abordagem terapêutica, ou um tratamento diferenciado para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Lucia Silla pelo telefone (51) 33598850, com o pesquisador Dr: José Artur Bogo Chies, com a pesquisadora Ianaê Indiará Wilke e Pesquisador executor Crepin Aziz Jose O. Agani – (51) 995521991 do serviço de Hematologia e Hemoglobinopatia do HCPA ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Pelo presente Consentimento Pós-informação, declaro que li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Fui igualmente informado de receber esclarecimentos sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, do anonimato e caráter confidencial das informações.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do Responsável (se aplicável)

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANEXO B

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
SERVIÇO DE HEMATOLOGIA CLÍNICA
LABORATÓRIO DE CULTURA E ANÁLISE MOLECULAR DE CÉLULAS HUMANAS

Nº do projeto GPPG ou CAAE: **17870719.0.0000.5327**

Título do Projeto: Avaliação de variantes polimórficas em genes apoptóticos e seus papéis na suscetibilidade e progressão clínica da Doença Falciforme

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é investigar a presença e a frequência das variantes polimórficas em genes associados a apoptose, buscando possíveis associações entre esses polimorfismos e progressão clínica da anemia falciforme. Para realização deste estudo é necessário comparar um grupo de pacientes que apresentam a característica estudada com um grupo de colaboradores que não apresenta esta característica. Você está sendo convidado então, a participar do grupo controle, ou seja, que não possui a doença em questão. Esta pesquisa está sendo realizada pelo serviço de Hematologia e hemoglobinopatias do HCPA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários e uma coleta de 3 ml de sangue da veia, neste caso, será utilizada uma alíquota do sangue doado. Procedimento que pode provocar um leve desconforto no momento da coleta, no local onde a agulha for introduzida. Poderá surgir neste local uma área vermelha ou até mesmo roxa (hematoma) na pele, mas que também desaparecerá com o decorrer do tempo.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa. Apenas o tempo dispensado para aplicação desse termo, associada a leitura compreensão e assinatura.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos e terapias futuras, ampliando o campo de conhecimento genético da doença, e possibilitando uma nova abordagem terapêutica, ou um tratamento diferenciado para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Lucia Silla pelo telefone (51) 33598850, com o pesquisador Dr: José Artur Bogo Chies,

com a pesquisadora Ianaê Indiara Wilke e Pesquisador executor Crepin Aziz Jose O. Agani – (51) 995521991 do serviço de Hematologia e Hemoglobinopatias do HCPA ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Pelo presente Consentimento Pós-informação, declaro que li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Fui igualmente informado de receber esclarecimentos sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, do anonimato e caráter confidencial das informações.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do Responsável (se aplicável)

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

