



UAlg FCT

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Diagnóstico e tratamento da drepanocitose:
novas metodologias**

Bruno Miguel Pargana Vila Nova

*Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas*

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

*Trabalho efetuado sob orientação da Professora Doutora Isabel Maria Júlio da
Silva e coorientação da Doutora Solange Camacho*

2022

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Diagnóstico e tratamento da drepanocitose:
novas metodologias**

Bruno Miguel Pargana Vila Nova

*Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas*

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

*Trabalho efetuado sob orientação da Professora Doutora Isabel Maria Júlio da
Silva e coorientação da Doutora Solange Camacho*

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser o autor desde trabalho que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados nos textos e constam da listagem de referências incluída.

(Bruno Miguel Pargana Vila Nova)

Copyright © 2022 Bruno Miguel Pargana Vila Nova

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de reportórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Foram 6 anos desafiantes a nível académico, intercetados pela entrada no curso de Mestrado em Medicina na Universidade do Algarve, exatamente naquele que seria o ano de conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Conciliar a realização desta dissertação com um curso tão trabalhoso e exigente como o de Medicina não foi de todo tarefa fácil. A sua conclusão significa o encerrar de um ciclo e de um objetivo finalmente possível. Objetivo esse que não seria possível se não estivesse rodeado de pessoas fantásticas que me apoiaram em todos os momentos.

Começo por agradecer à Professora Doutora Isabel Júlio e à Doutora Solange Camacho, pela partilha de conhecimentos e pela disponibilidade, dedicação e paciência demonstrados ao longo destes últimos 2 anos.

À minha mãe, pelo apoio incondicional, por nunca me deixar desistir e por insistir incansavelmente para que este dia chegasse. Ao meu pai e ao meu irmão por estarem presentes em todos os momentos e me incentivarem sempre a ser e fazer melhor. À minha restante família, avós, tios, primos, sogros, pelo carinho e suporte.

A todos os meus colegas e amigos que estiveram presentes desde o início pela amizade e pelos momentos de partilha, em especial ao João Pereira, Ricardo Gomes e Anna Struck.

Por fim, à Rita, a quem devo a conclusão da minha tese. Pelo amor, amizade e apoio em todos os momentos. Por colocar os seus interesses em segundo plano, e estar sempre presente da primeira à última letra.

RESUMO

A hemoglobina é a molécula constituinte dos glóbulos vermelhos, responsável pelo transporte de oxigênio para todo o corpo. Mutações nos genes desta molécula podem resultar em alterações na sua síntese a nível quantitativo ou estrutural, afetando a sua normal função e desencadeando as hemoglobinopatias. Dentro das hemoglobinopatias existem as doenças falciformes que se particularizam pela presença obrigatória da variante hemoglobina S (Hb S). A drepanocitose, tipo de doença falciforme mais grave e incapacitante, é uma doença genética hereditária com transmissão autossômica recessiva. Caracteriza-se pela sua cronicidade, marcada por anemia e hemólise, aumentando a suscetibilidade a infeções e ao surgimento de crises vaso-oclusivas. Atualmente, é notório um crescente interesse na procura de novas terapêuticas para o tratamento deste tipo de doenças. As principais apostas a nível terapêutico recaem sobre a hidroxiureia, transfusões sanguíneas, transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas e a terapia genética. Porém, tendo em conta a gravidade da doença e a insuficiência relativamente às opções terapêuticas curativas, o rastreio e diagnóstico atempados constituem ferramentas valiosas para a prevenção e atuação precoce com o intuito de reduzir complicações clínicas resultantes da drepanocitose. Com a presente dissertação de mestrado pretende-se reunir, através de uma revisão bibliográfica, a mais recente evidência científica sobre a drepanocitose e as novas metodologias de diagnóstico e tratamento. A terapia genética surge como uma abordagem terapêutica promissora que já demonstrou colmatar as limitações terapêuticas anteriormente instituídas. Não obstante, terá de ser demonstrada a sua eficácia e segurança a longo prazo para se tornar no tratamento de eleição para a drepanocitose.

Palavras-chave: hemoglobinopatias, mutação genética, hemoglobina S, drepanocitose, anemia falciforme, diagnóstico, terapêutica para anemia falciforme, terapia genética

ABSTRACT

Hemoglobin is the constituent molecule of red blood cells, responsible for transporting oxygen throughout the body. Mutations in the genes of this molecule can result in alterations in its synthesis at a quantitative or structural level, affecting its normal function and triggering hemoglobinopathies. Among the hemoglobinopathies are sickle cell diseases, which are characterized by the obligatory presence of variant hemoglobin S (Hb S). Sickle cell disease, the most serious and disabling type of sickle cell disease, is an inherited genetic disease with autosomal recessive transmission. It is characterized by its chronicity, marked by anemia and hemolysis, increasing susceptibility to infections and the onset of vaso-occlusive crises. Currently, there is a growing interest in the search for new therapies for the treatment of this type of disease. The main therapeutic options are hydroxyurea, blood transfusions, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and gene therapy. However, considering the severity of the disease and the insufficiency of curative therapeutic options, timely screening and diagnosis are valuable tools for prevention and early action to reduce clinical complications resulting from sickle cell disease. This master's thesis aims to gather, through a literature review, the most recent scientific evidence on sickle-cell disease and new diagnostic and treatment methodologies. Gene therapy emerges as a promising therapeutic approach that has been shown to overcome previously established therapeutic limitations. Nevertheless, its long-term efficacy and safety will have to be demonstrated to become the treatment of choice for sickle cell disease.

Keywords: Hemoglobinopathies, genetic mutation, hemoglobin S, sickle cell anemia, diagnosis, therapy for sickle cell anemia, gene therapy

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 9 |
| INDICE DE TABELAS..... | 10 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 11 |
| I. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| II. HEMOGLOBINA..... | 15 |
| 2.1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO..... | 15 |
| 2.2. FUNÇÕES..... | 16 |
| 2.3. SÍNTESE DA HEMOGLOBINA..... | 17 |
| 2.4. ONTOGENIA DA HEMOGLOBINA..... | 19 |
| III. HEMOGLOBINOPATIAS..... | 22 |
| 3.1. DEFINIÇÃO E ALTERAÇÕES GENÉTICAS..... | 22 |
| | 22 |
| 3.2. EPIDEMIOLOGIA..... | 23 |
| IV. DREPANOCITOSE..... | 25 |
| 4.1. ORIGEM GENÉTICA E EPIDEMIOLOGIA..... | 25 |
| 4.2. DEFINIÇÃO E ETIOLOGIA..... | 26 |
| 4.3. FISIOPATOLOGIA..... | 27 |
| 4.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS..... | 29 |
| 4.5. TRANSMISSÃO GENÉTICA..... | 33 |
| | 34 |
| 4.6. FATORES GENÉTICOS MODULADORES DOS FENÓTIPOS E MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES GLOBÍNICOS...34 | |
| 4.7. RASTREIO E DIAGNÓSTICO..... | 37 |
| 4.7.1. PREVENÇÃO DAS FORMAS GRAVES DE DREPANOCITOSE..... | 41 |
| 4.8. ABORDAGENS TERAPÊUTICAS..... | 42 |
| 4.8.1. HIDROXIUREIA..... | 43 |
| 4.8.2. TRANSFUSÕES SANGUÍNEAS..... | 43 |
| 4.8.3. L-GLUTAMINA..... | 44 |
| 4.8.4. TRANSPLANTE DE CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS..... | 44 |
| 4.8.5. OUTRO TIPO DE TERAPÊUTICA PRESCRITA NA DREPANOCITOSE..... | 45 |
| 4.8.1. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS - GENÉTICAS..... | 48 |
| V. CONCLUSÃO..... | 52 |
| VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura II.1. Estruturas quaternária e molecular da hemoglobina A. Adaptado de ¹⁴ | 15 |
| Figura II.2. Etapas da síntese da molécula de hemoglobina. Adaptado de ¹⁶ | 18 |
| Figura II.3. A transição da forma tensa(desoxigenada) da hemoglobina para a forma relaxada(oxigenada) relaxada Adaptado de (12) Erro! Marcador não definido. | |
| Figura II.4. Representação dos genes da globina β , no cromossoma 11, e globina α , no cromossoma 16. Adaptado de ¹⁸ | 19 |
| Figura II.5. Linha temporal de produção das cadeias de globina desde a vida intrauterina até à fase adulta. Adaptado de ¹⁶ | 20 |
| Figura II.6. A estrutura genómica dos clusters das globinas α e β e os tipos de hemoglobina característicos de cada fase do desenvolvimento humano. Adaptado de ² | 21 |
| Figura III.1. Hemoglobinopatias. Adaptado de ²⁵ | 22 |
| Figura III.2. Prevalência dos portadores de β -talassemia e drepanocitose em Portugal, nos anos 80. Adaptado de ²⁷ | 24 |
| Figura IV.1. Esfregaço sanguíneo de um doente com drepanocitose. Adaptado de ¹⁵ 25 | |
| Figura IV.2. Número de recém-nascidos com anemia falciforme nos vários países em 2015. Adaptado de ²⁹ | 26 |
| Figura IV.3. Patologia molecular da anemia falciforme. Adaptado de ² | 27 |
| Figura IV.4. Alterações genéticas em HBB. Adaptado de ³⁵ | 29 |
| Figura IV.5. Episódio de Vaso oclusão, característico da drepanocitose. Adaptado de ⁵⁷ | 30 |
| Figura IV.6. Manifestações clínicas (agudas e crónicas) da drepanocitose. Adaptado de ³⁵ | 33 |
| Figura IV.7. Transmissão genética de progenitores com traço falciforme. Adaptado de ⁵¹ | 34 |
| Figura IV.8. Modificadores genéticos e não genéticos da severidade fenotípica na drepanocitose. Adaptado de ²⁹ | 37 |
| Figura IV.9. Cromatografia líquida de troca catiónica de alta performance (HPLC). Adaptado de ⁶⁵ | 39 |
| Figura IV.10. Estratégias de terapia genética para drepanocitose. Adaptado de ⁸⁵ | 50 |

INDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Abordagens terapêuticas para a drepanocitose em fases de estudo. Adaptado de ³⁵ | 46 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH – *microarray-based comparative genome hybridation*

ADN – ácido desoxirribonucleico

AL – arab/india

AVC – acidente vascular cerebral

BAN – bantu

BEN – benin

cADN – ADN complementar

CAM – camarões

CEH – células estaminais hematopoiéticas

CNVs – *so-called copy number variants*

CRISPR/Ca9 - *clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein-9nuclease*

FDA – *food and drug administration*

GMPc - monofosfato cíclico de guanosina

Hb – hemoglobina

HBB – gene que codifica a β -globina

HbC – hemoglobina C

HbE – hemoglobina E

HbF – hemoglobina fetal

HbS – hemoglobina S

HLA – antígeno leucocitário humano

HPLC – cromatografia líquida de troca catiónica de alta performance

HRQOL – *health-related quality of life*

IEF – focagem isoelétrica

LDH – lactato desidrogenase

MS/MS ou MS2 – espectrometria de massa em tandem

NGS – *next generation sequencing*

No – óxido nítrico

NO₃⁻ - nitrato

PCR – reação em cadeia de polimerase

PCV – hematócrito

QTL – *quantitative trait loci*

RFLP – polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

RGNs – *RNA-guided nucleases*

RNA – *ribonucleic acid*

RT-PCR – reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa

SEN – Senegal

TALENs - transcription activator-like effector nucleases

TCEH – transplante de células estaminais hematopoiéticas

VCM – volume corpuscular médio

ZNF – *zinc-finger nucleases*

I. INTRODUÇÃO

A hemoglobina (Hb) é uma proteína conjugada que possui um papel indispensável na vida humana. A sua estrutura é composta por 4 cadeias de globina, duas do tipo α e duas do tipo β .¹ Esta proteína possui como principal função o transporte de oxigênio (O_2), dos pulmões para todo o corpo, e de parte do dióxido de carbono (CO_2), dos tecidos do corpo para os pulmões. As funções da hemoglobina no corpo humano dependem da sua estrutura molecular, pelo que alterações estruturais da molécula de Hb vão afetar o seu normal funcionamento no corpo humano e originar as hemoglobinopatias.²

O termo genérico “hemoglobinopatia” inclui todos os distúrbios genéticos da hemoglobina. As hemoglobinopatias são doenças hereditárias monogénicas, de transmissão autossómica recessiva, que resultam de mutações e/ou deleções nos genes responsáveis pela síntese das cadeias de alfa e beta globina da molécula de Hb.³ Estas mutações desencadeiam alterações quantitativas ou qualitativas na produção da hemoglobina que prejudicam diretamente o seu normal funcionamento no corpo humano.⁴ Quando os defeitos genéticos causam distúrbios na síntese de Hb, dão origem a talassemias. A estrutura da hemoglobina nestes casos é normal. Quando as alterações são na estrutura da Hb, dão origem a hemoglobinas anormais (hemoglobinas variantes). As mais importantes são a HbS, HbC, HbE.³

A drepanocitose (HbS) é a hemoglobinopatia grave clinicamente mais relevante em todo o mundo e constitui um importante problema de saúde pública.² Em termos históricos tem origem nas zonas mais afetadas pela malária, em África, Índia, Médio Oriente e algumas zonas mediterrâneas. Porém, a elevada migração da população originária dessas zonas tem vindo a aumentar a distribuição da drepanocitose no mapa mundo. Algumas das regiões mais afetadas por esses movimentos migratórios, em termos de incidência desta patologia, são a América do Norte e a Europa Ocidental.⁵

A drepanocitose resulta de alterações estruturais da molécula de hemoglobina, causadas pela presença homocigótica da hemoglobina S (HbS).³ A HbS é uma variante da hemoglobina que é desencadeada por uma mutação genética pontual, no gene HBB, onde uma timina é substituída por uma adenina provocando a mudança de um aminoácido, na estrutura proteica, de glutamato para valina.⁶ As moléculas de Hb S têm tendência a agregar-se em longas cadeias rígidas que distorcem a forma dos glóbulos vermelhos, levando-os a assumir a forma de foice, característica da drepanocitose. Perante esta situação, registam-se alterações a nível do funcionamento normal dos eritrócitos, levando ao surgimento de problemas graves e característicos desta doença

como crises vaso-oclusivas, anemia hemolítica, lesão de órgãos-alvo e morte prematura.^{2,6}

As complicações clínicas da drepanocitose dividem-se em agudas e crônicas. As principais complicações agudas desta patologia são as crises de dor aguda, acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda e sequestros hepático e esplênico. Já as complicações crônicas afetam órgãos-alvo como o cérebro, coração, olhos, rins, pulmão e fígado.⁷ Estas complicações associadas à drepanocitose necessitam de tratamentos de ambulatório, internamentos e admissões à urgência frequentes, que se refletem de forma negativa na qualidade de vida de crianças e adultos com esta patologia.⁸

Atualmente, assiste-se a um crescente interesse na procura de novas opções terapêuticas para este tipo de doenças. Daí, os tratamentos agora utilizados estarem focados essencialmente no controlo e diminuição dos sintomas da doença, como é o exemplo das transfusões sanguíneas e da terapêutica a longo prazo com hidroxiureia.⁹

O único tratamento curativo da drepanocitose é o transplante de células estaminais hematopoiéticas. Porém, surgem cada vez mais opções de tratamento inovadoras com base no conhecimento genético da doença. Estas novas abordagens terapêuticas apresentam resultados promissores com o objetivo de alcançar uma cura definitiva para esta patologia.⁹

Tendo em conta a gravidade da doença e a lacuna existente a nível terapêutico, o rastreio e diagnóstico precoce constituem ferramentas valiosas para a prevenção das formas graves da drepanocitose. Neste sentido, o objetivo da presente monografia é reunir, através de uma revisão bibliográfica, a mais recente evidência científica sobre a drepanocitose e as novas metodologias de diagnóstico e tratamento.

II. HEMOGLOBINA

A hemoglobina é uma proteína heterotetramérica que desempenha um papel importante no organismo humano. Está presente no interior dos glóbulos vermelhos ou eritrócitos e é responsável pela sua coloração vermelha característica.^{10,11}

Cada eritrócito contém cerca de 200 a 300 milhões de moléculas de hemoglobina. Os valores de referência desta proteína no sangue rondam os 13,5-18g/dl nos homens e 11,5-16 g/dl nas mulheres.¹²

2.1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO

A molécula de hemoglobina (**Figura II.1**) possui uma estrutura quaternária, constituída por quatro monómeros unidos entre si por ligações não covalentes. Esta proteína é constituída por dois pares de cadeias polipeptídicas, as globinas, cada uma ligada a um grupo prostético heme.^{12,13}

Existem vários tipos de globinas como a alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ) e épsilon (ϵ). Pelo que a molécula de Hb é constituída obrigatoriamente por duas globinas alfa (α) e duas globinas não alfa ($\beta, \gamma, \delta, \epsilon$), o que justifica a existência de diferentes tipos de hemoglobina como a Hb A1 ($\alpha_2\beta_2$), Hb A2 ($\alpha_2\delta_2$) e Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). Sendo que a maioria da hemoglobina em adultos normais é a Hb A1, a Hb A2 representa apenas 3% da hemoglobina adulta e a Hb F corresponde à hemoglobina fetal.⁴

O grupo prostético heme é constituído por uma parte orgânica (protoporfirina IX) e um átomo de ferro central.¹³

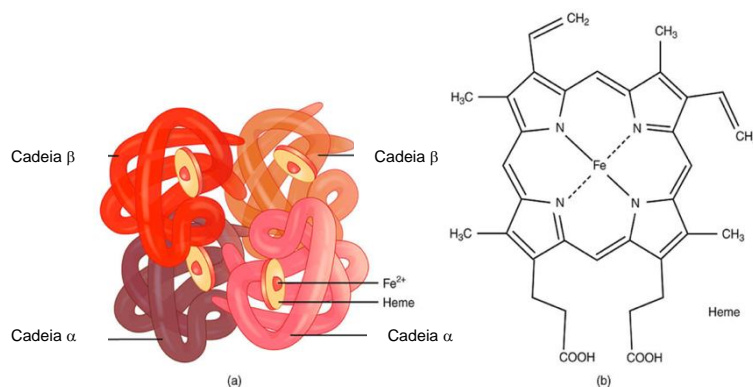


Figura II.1. Estruturas quaternária e molecular da hemoglobina A. Adaptado de ¹⁴

2.2. FUNÇÕES

A hemoglobina desempenha múltiplas funções de elevada importância no corpo humano. A sua principal função passa pelo transporte de oxigénio desde os pulmões até aos tecidos do organismo e, conseqüente extração do dióxido de carbono dos tecidos que irá ser transportado até aos pulmões.¹⁴

A forma bicôncava dos eritrócitos é mantida pela hemoglobina. Estes possuem a forma de discos achatados com uma depressão no centro, o que aumenta a área de superfície da célula e favorece a difusão de oxigénio e dióxido de carbono.¹⁴ O facto destas células sanguíneas serem anucleadas também permite que elas se liguem e troquem o maior número de moléculas de oxigénio. Além disso, são bastante flexíveis e maleáveis, o que facilita a circulação pelos vasos sanguíneos.¹⁵ Esta resistência e flexibilidade é assegurada por uma densa rede citoesquelética que rodeia a face interna da membrana. A actina é a principal proteína responsável pela flexibilidade e está ligada à espectrina que garante a integridade estrutural e a forma bicôncava.¹⁵

A hemoglobina atua absorvendo o oxigénio em áreas de maior pressão deste gás (pulmões) e libertando-o nas de menor pressão, como é o caso dos tecidos. O oxigénio liga-se de forma reversível ao ião de ferro do grupo heme da Hb. O átomo de ferro é incapaz de estabelecer uma ligação reversível com o oxigénio por si só, uma vez que oxida. A globina evita sua oxidação, permitindo que o grupo heme fique envolvido por uma bolsa hidrofóbica e se ligue reversivelmente ao oxigénio.¹³ Cada molécula de hemoglobina pode transportar até quatro moléculas de oxigénio.^{12,14}

A hemoglobina é uma proteína alostérica pelo que a ligação do oxigénio a um grupo heme vai aumentar a afinidade do oxigénio para os restantes grupos heme, devido a uma alteração na estrutura quaternária da hemoglobina. Pelo que a forma da fenda determina a facilidade de a molécula de oxigénio chegar ao seu lugar de ligação. Na hemoglobina totalmente desoxigenada a sua estrutura encontra-se tensa, pelo que a fenda é pequena e dificulta o acesso do oxigénio ao grupo heme. À medida que as moléculas de oxigénio se ligam à hemoglobina levam a um sucessivo relaxamento desta molécula, aumentando a fenda de ligação das globinas e a sua afinidade para o oxigénio. Quando completamente oxigenada, a hemoglobina atinge a sua estrutura relaxada (**Figura II.2**).¹²

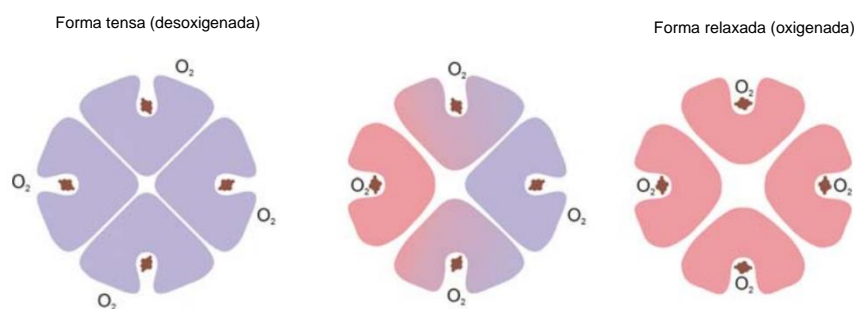


Figura II.2. A transição da forma tensa(desoxigenada) da hemoglobina para a forma relaxada(oxigenada) relaxada Adaptado de (12)

2.3. SÍNTESE DA HEMOGLOBINA

O processo de síntese da molécula de hemoglobina ocorre nas células precursoras dos eritrócitos maduros, na medula óssea. Embora as sínteses do grupo heme e das cadeias de globina ocorram de forma separada, as suas etapas de produção são coordenadas de forma cuidadosa de modo a garantir eficácia final na produção da hemoglobina.^{12,16}

A síntese do grupo heme ocorre nas mitocôndrias e no citosol das células precursoras dos eritrócitos. É um processo que segue etapas complexas e é finalizado quando ocorre a ligação entre a protoporfirina IX ao íon Fe_2^+ no interior das mitocôndrias.^{16,17} (**Figura II.3**),

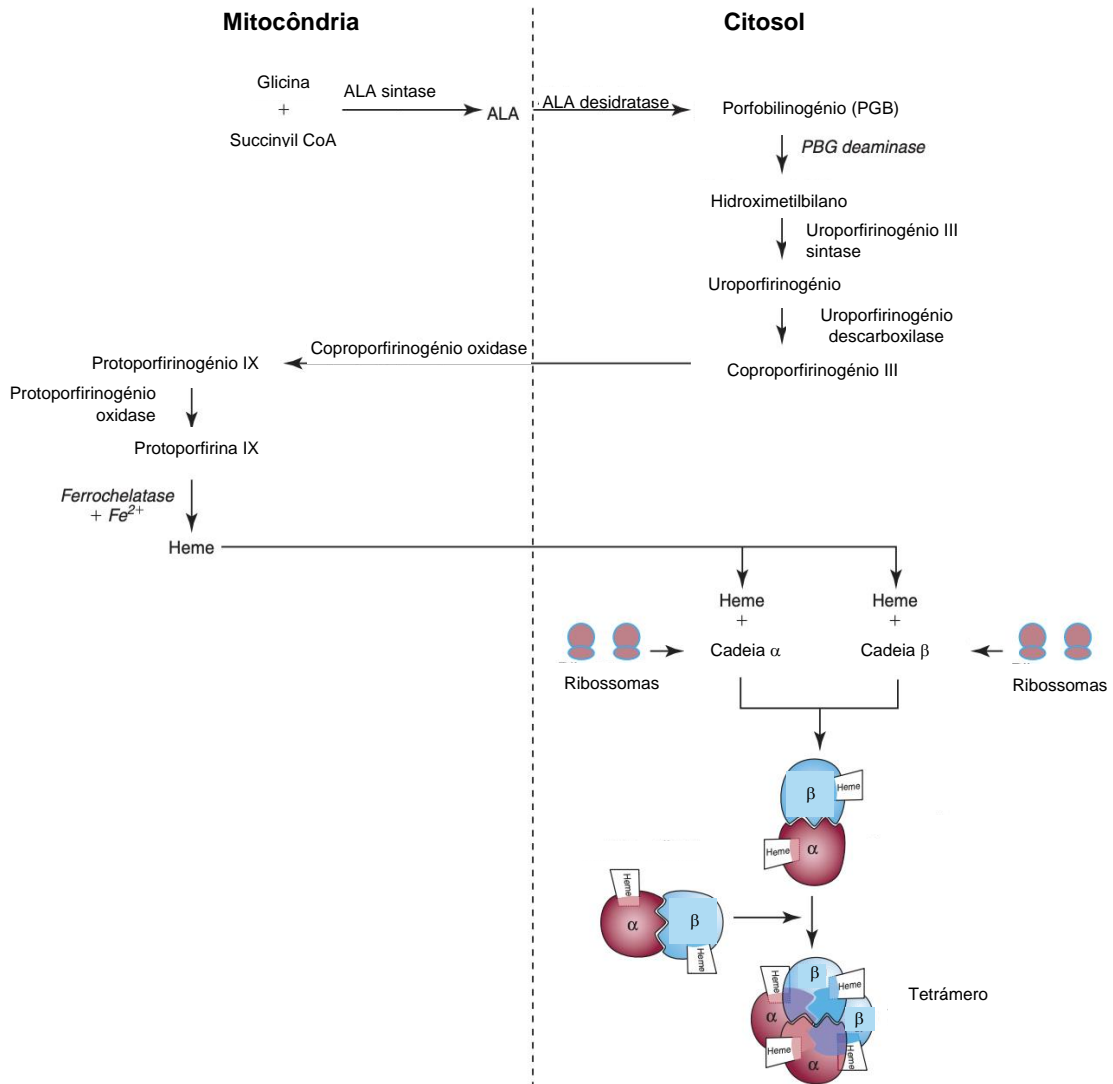


Figura II.3. Etapas da síntese da molécula de hemoglobina. Adaptado de ¹⁶

Por sua vez, a síntese das cadeias de globina ocorre nos ribossomos do citoplasma das células precursoras dos eritrócitos maduros por um processo de transcrição e tradução de genes. As globinas são codificadas por dois agrupamentos genéticos que se encontram nos cromossomas 11 e 16 compostos por um total de oito genes. Estes genes estão dispostos de forma sequencial no sentido 5'→3', de acordo com a ordem de ativação e expressão durante a ontogénese. Os genes globínicos partilham todos uma estrutura semelhante, sendo compostos por três exões (regiões codificantes) que se intercalam com os intrões (regiões não codificantes).^{17,18}

O agrupamento α -globínico encontra-se no cromossoma 16 e é composto, no sentido 5'→ 3', pelo gene zeta (ζ), pelo pseudogene zeta ($\psi\zeta$), por dois pseudogenes alfa ($\psi\alpha 2$ e $\psi\alpha 1$), por dois genes alfa ($\alpha 2$ e $\alpha 1$) e pelo gene teta (θ).¹⁸

O agrupamento β -globínico localiza-se no cromossoma 11 e é composto no sentido 5'→ 3', pela seguinte ordem: gene ϵ (epsilón), *HBE*; por dois genes γ (gama), G_γ e A_γ ou *HBG2* e *HBG1*; pelo $\psi\beta$ (pseudogene beta); pelos genes δ (delta), *HBD*, e o gene β (beta), *HBB*. Sabe-se que os pseudogenes presentes em ambos os agrupamentos α e β -globínicos são homólogos não funcionais dos genes globínicos, ou seja, são transcritos, mas não traduzidos e por isso não são expressos.¹⁸

Os genes da globina β , no cromossoma 11, e da globina α , no cromossoma 16 estão representados na **Figura II.4**.

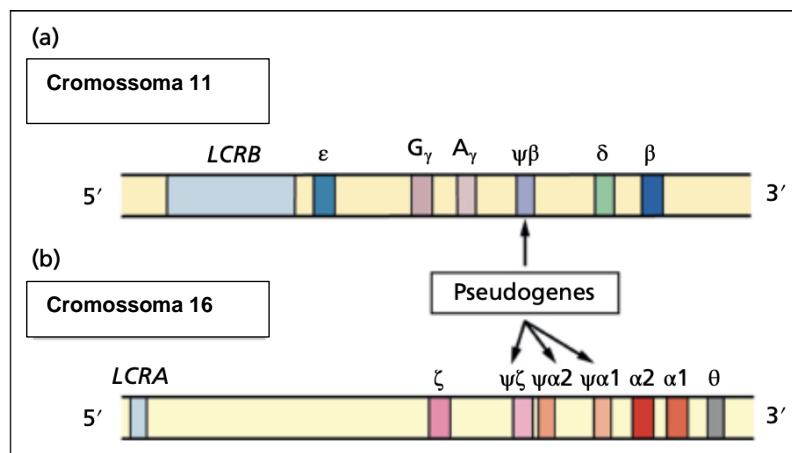


Figura II.4. Representação dos genes da globina β , no cromossoma 11, e globina α , no cromossoma 16. Adaptado de ¹⁸

A etapa final da síntese da molécula de hemoglobina ocorre quando as cadeias de globina produzidas se unem aos grupos heme também já sintetizados e dão origem a uma proteína tetramérica.¹⁶

2.4. ONTOGENIA DA HEMOGLOBINA

Durante as diferentes fases de embrião, feto, recém-nascido e adulto as necessidades de oxigênio e suas fontes de obtenção vão variando. Neste sentido, diferentes tipo de hemoglobina surgem de forma a adaptar-se às diferentes fases do desenvolvimento humano.¹⁹ São seis os tipos de hemoglobina que existem e a sua percentagem é alterada consoante a fase de desenvolvimento humano.¹⁶ Estas

alterações refletem uma expressão genética específica e sequencial dos genes das globinas, um processo denominado de ontogenia da hemoglobina.^{19,20}

A eritropoiese corresponde ao processo de síntese dos glóbulos vermelhos. A eritropoiese num adulto ocorre quase de forma exclusiva na medula óssea.¹⁶ Porém, durante o desenvolvimento embrionário existem outros órgãos implicados neste processo. As primeiras moléculas de hemoglobina são produzidas no saco vitelino sendo depois ativada a eritropoiese hepática, esplênica e só depois a medular (**Figura II 5**).^{21,22}

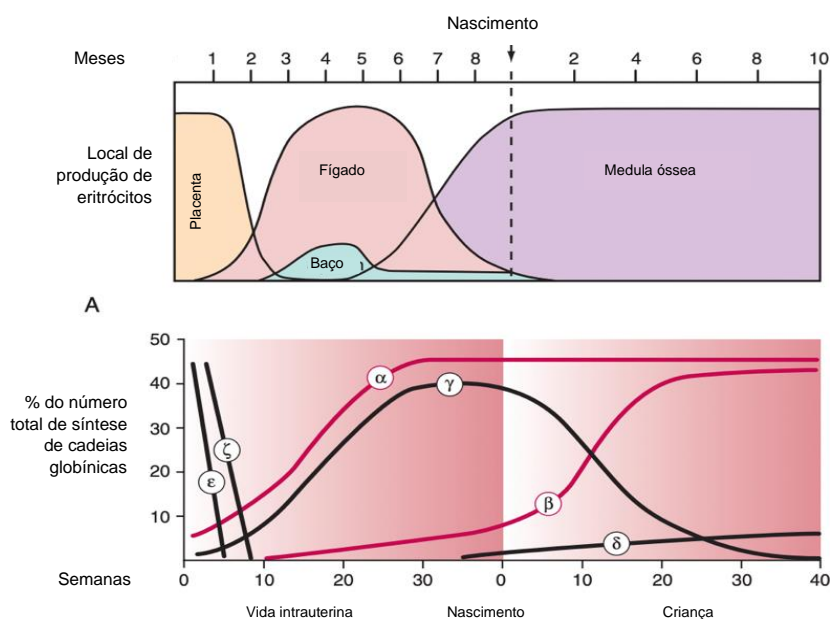


Figura II.5. Linha temporal de produção das cadeias de globina desde a vida intrauterina até à fase adulta. Adaptado de ¹⁶

O processo de ontogenia da hemoglobina sucede-se do gene zeta (ζ) para o gene α -globínico no cromossoma 16 e do gene ϵ (epsilón) para os genes γ (gama), δ (delta) e o gene β -globínico no cromossoma 11.¹⁶

A primeira molécula de hemoglobina é detetada durante o primeiro trimestre da fase embrionária e a eritropoiese ocorre no saco vitelino, sendo produzidas as cadeias ζ e ϵ . Durante esta fase existem três tipos de hemoglobinas embrionárias: Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$) composta por duas cadeias da globina ζ e duas cadeias da globina ϵ ; a Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) contém 2 cadeias globínicas α e duas ϵ e a Portland ($\zeta_2\gamma_2$). que contém duas cadeias de globina ζ e duas γ .^{17,23}

No decorrer do segundo trimestre ocorre o 1º *switch*. A produção das cadeias globínicas ζ e ϵ termina e inicia-se a síntese das cadeias α e γ no fígado, surgindo a formação da hemoglobina fetal HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Este processo é explicado pela expressão dos genes HBG1 e HBG2 e repressão de HBE.¹⁷ A HbF torna-se o tipo de hemoglobina predominante até aos seis meses de idade.^{16,23} Após o nascimento surge o 2º *switch* de hemoglobina fetal predominante para hemoglobina adulta (HbA), através da supressão da expressão dos genes HBG1 e HBG2 e expressão dos genes HBD e HBB, que codificam as globinas δ e β .²¹ A partir dos seis meses de vida e durante a fase adulta a HbA ($\alpha_2\beta_2$) é a que existe em maior quantidade, aproximadamente 97%, seguindo-se de pequenas quantidades de HbA2 ($\alpha_2\delta_2$), cerca de 2%, e de HbF que ronda os 1%.²³

O agrupamento genético (cluster) α e β -globínicos, observado na **Figura II 6**, localizam-se nos cromossomas 16 e 11, respetivamente, e são constituídos por genes funcionais, cuja ordem de expressão corresponde ao estado de desenvolvimento.²³

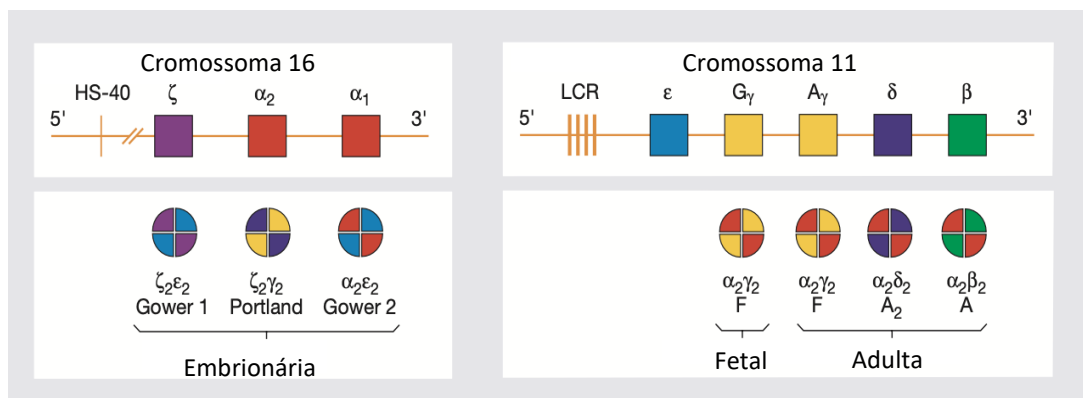


Figura II.6. A estrutura genómica dos clusters das globinas α e β e os tipos de hemoglobina característicos de cada fase do desenvolvimento humano. Adaptado de ²

III. HEMOGLOBINOPATIAS

3.1. DEFINIÇÃO E ALTERAÇÕES GENÉTICAS

As hemoglobinopatias são doenças monogénicas hereditárias de transmissão autossómica recessiva. Estas doenças resultam de mutações genéticas em genes envolvidos na síntese ou na regulação da síntese das cadeias de globina da Hb.²⁴ Foram identificadas e caracterizadas mais de 1.000 alterações da síntese e/ou da estrutura da hemoglobina.²³

As hemoglobinopatias podem ser classificadas como quantitativas ou qualitativas (**Figura III.1**) dependendo da forma como afetam a molécula de Hb.²⁵ As hemoglobinopatias quantitativas, as talassemias, caracterizam-se por uma redução ou ausência da síntese de uma ou várias cadeias de globina. Por outro lado, quando a estrutura da Hb é afetada, surgem as hemoglobinopatias qualitativas que resultam de uma ou mais mutações na sequência de aminoácidos das cadeias de globina, originando uma molécula de Hb anormal como é o caso da Hb S na drepanocitose. Esta alteração afeta diretamente a estrutura da molécula de hemoglobina e consequentemente as suas funções.^{25,26}

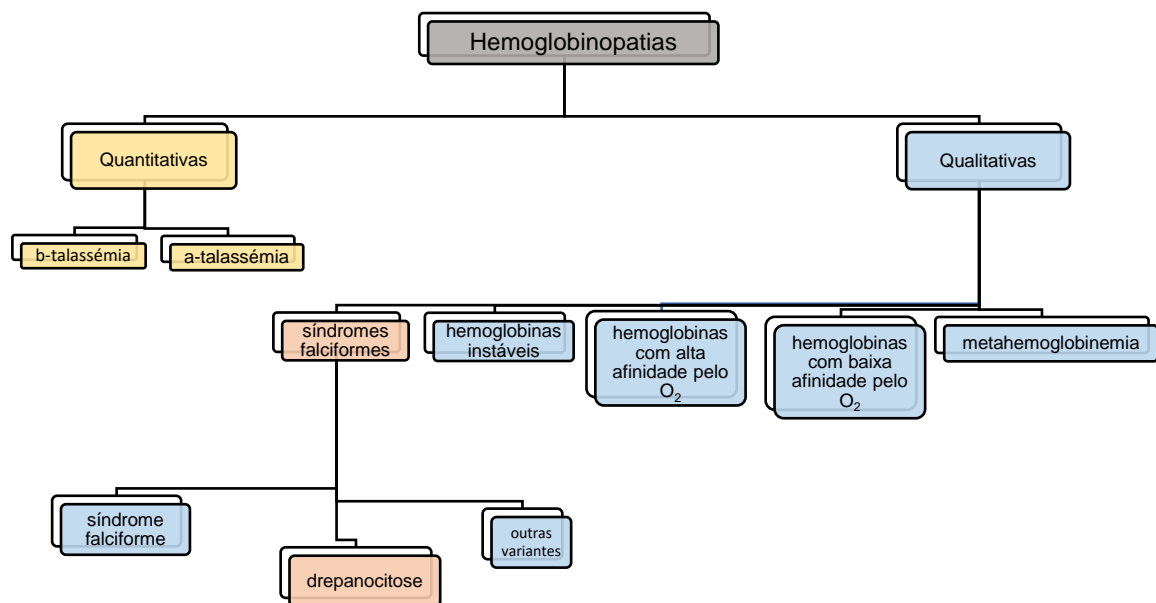


Figura III.1. Hemoglobinopatias. Adaptado de ²⁵

No largo espectro das hemoglobinopatias, existem variados genótipos que podem influenciar aquele que vai ser o fenótipo do indivíduo.²⁵ Sendo estas doenças de origem genética, podem por vezes coincidir no mesmo indivíduo, uma talassemia e drepanocitose (por exemplo: HBSβ⁺). Desta forma, podem surgir uma grande amplitude

de síndromes e a sua gravidade e o tipo de sintomas podem ser completamente distintos entre si, variando de uma patologia mais ligeira até situações incompatíveis com a vida e que necessitem de transplante ou transfusões sanguíneas e cuidados de saúde permanentes.³

3.2. EPIDEMIOLOGIA

As hemoglobinopatias são consideradas as doenças monogénicas mais comuns e um dos principais problemas de saúde no mundo, afetando cerca de 7% da população mundial. Mais de 300 000 crianças nascem todos os anos com algum tipo de distúrbio genético da hemoglobina, sendo que 80% ocorrem em países cujos rendimentos rondam o médio/baixo.^{10,16}

Inicialmente as hemoglobinopatias predominavam na área do Mediterrâneo, Ásia e África. Posteriormente, a migração internacional encarregou-se de as dispersar por todo o mundo.¹⁶

Nos anos 80 foi realizado em Portugal, o primeiro e único estudo epidemiológico de grande escala (**Figura III.2**), sobre a prevalência de anemias hereditárias em Portugal.²⁴ Neste estudo, a prevalência global de portadores de hemoglobinopatias foi definida entre 1 e 2% e a incidência da β -talassemia (0,45%) revelou-se superior à das síndromes falciformes (0,32%).²⁴ No seguimento deste estudo, em 1986, foi criado em Portugal o Programa Nacional de Controlo das Hemoglobinopatias, coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge em cooperação com a Organização Mundial de Saúde. Este programa teve como principais objetivos a prevenção e aconselhamento, o cuidado otimizado aos portadores, a investigação científica e epidemiológica e a formação dos profissionais de saúde, tendo sido implementado nas regiões do país identificadas com maior prevalência destas doenças, como Beja, Évora, Faro, Leiria, Lisboa, Santarém e Setúbal.²⁷

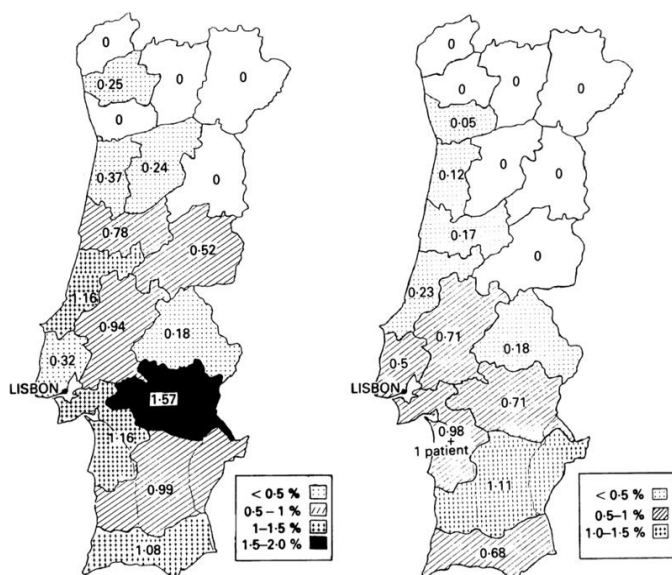


Figura III.2. Prevalência dos portadores de β -talassemia e drepanocitose em Portugal, nos anos 80.

Adaptado de ²⁷

IV. DREPANOCITOSE

4.1. ORIGEM GENÉTICA E EPIDEMIOLOGIA

A Drepanocitose, ou anemia falciforme, surgiu pela primeira vez em 1910 após terem sido identificados eritrócitos em forma de foice num esfregaço realizado a um estudante de medicina dentária com sintomas pulmonares (**Figura IV.1**). No entanto, nesta altura ainda não sabiam se esta alteração na forma dos eritrócitos seria uma doença ou uma manifestação secundária a outra doença.²⁸

Nos quinze anos que se seguiram foram surgindo novos casos semelhantes e novas experiências que forneceram evidências suficientes para uma avaliação clínica global e posterior descrição patológica da doença. Em 1945, Linus Pauling colocou pela primeira vez a hipótese de ser uma doença decorrente de uma alteração da molécula de hemoglobina. Neste mesmo ano, demonstram que era uma doença autossómica recessiva e em 1959 comprovaram que a hemoglobina alterada (HbS) se distinguia da hemoglobina normal (HbA) por uma mudança em apenas um aminoácido.²⁸

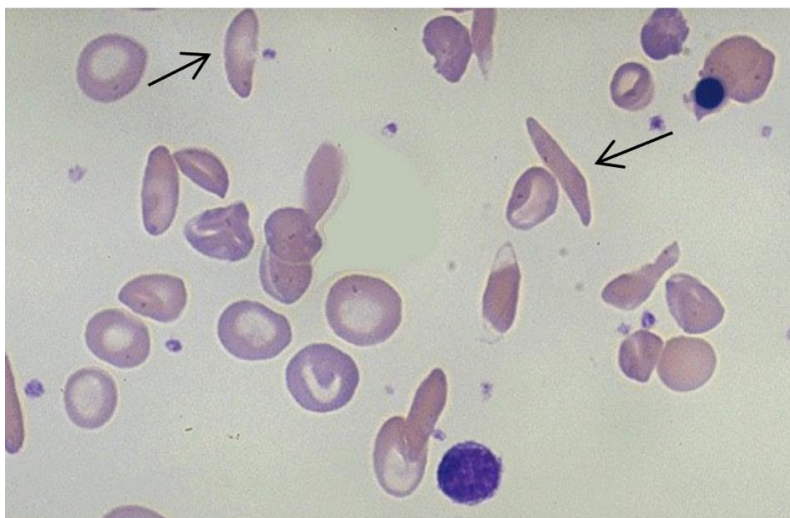


Figura IV.1. Esfregaço sanguíneo de um doente com drepanocitose. Adaptado de ¹⁵

A anemia falciforme é a doença monogénica mais comum no mundo e tem maior prevalência nos países mais afetados pela Malária, como África Subsariana, Bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente e Índia. Estima-se que anualmente nascem cerca de 300.000 bebés com drepanocitose, sendo que a maior parte dos nascimentos ocorrem na Nigéria, República Democrática do Congo e Índia (**Figura IV.2**).²⁹

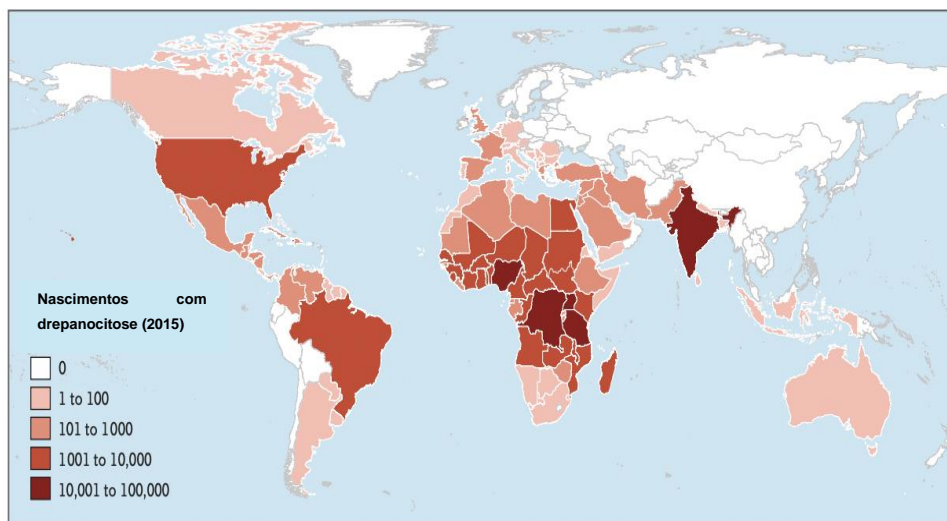


Figura IV.2. Número de recém-nascidos com anemia falciforme nos vários países em 2015.

Adaptado de ²⁹

Existem países que, para além de apresentarem uma elevada prevalência da doença, possuem também elevados níveis de pobreza. Deste modo, países, como os localizados na região de África Subsaariana, apresentam uma taxa de mortalidade infantil mais elevada do que os restantes (cerca de 15% da mortalidade entre crianças com idade inferior a cinco anos).³⁰

4.2 DEFINIÇÃO E ETIOLOGIA

A drepanocitose ou anemia falciforme é uma doença hematológica com origem genética.³¹ Constitui uma anemia hemolítica crónica que é resultante de alterações na estrutura das cadeias β da hemoglobina, levando à substituição de HbA por HbS.³²

A HbS tem origem numa mutação pontual que substitui o segundo nucleótido do 6ºcodão do gene HBB, que codifica a cadeia β da hemoglobina. Esta mutação provoca uma alteração na composição das bases azotadas da hemoglobina em que uma adenina é substituída por uma timina (GAG->GTC), causando mudanças na tradução proteica do gene originando o aminoácido valina na 6ªposição da cadeia de globina β em vez do glutamato (**Figura IV.3**).³³ Esta mudança de aminoácido leva à substituição de HbA por HbS e representa alterações bioquímicas na molécula de hemoglobina que prejudicam a sua função biológica.^{2,32}

| | | | | |
|------------------------------|--|-----|-----|-----|
| Cadeia β normal | Aminoácido Composição das bases azotadas | pro | glu | glu |
| | | CCT | GAG | GAG |
| Cadeia β falciforme | Composição das bases azotadas | CCT | GAG | GAG |
| | Aminoácido | pro | val | glu |

Figura IV.3. Patologia molecular da anemia falciforme. Adaptado de ²

A anemia falciforme é uma doença hereditária, que pode ser transmitida pelos progenitores de forma autossômica recessiva (HbSS).³⁴ Sendo que quando ambos os pais são portadores de HbS, cada filho tem 25% de probabilidade de ter drepanocitose (HbSS).³¹ No entanto, para além dos indivíduos homozigóticos, existe ainda um leque de várias síndromes falciformes relacionadas. Estas surgem em indivíduos heterozigóticos, ou seja, que possuem apenas um dos alelos afetado pelo traço falciforme (HbS). Esta particularidade deve-se a uma variedade de outras alterações que podem estar presentes no outro alelo, como por exemplo HbS/ β -talassémia ou HbSC. Estas diferentes síndromes falciformes apresentam manifestações clínicas distintas entre si e um variado espectro de gravidade e complicações adjacentes.^{3,34}

4.3 FISIOPATOLOGIA

A alteração de apenas um aminoácido na cadeia de aminoácidos da globina β (**Figura IV.4**), provoca alterações drásticas na estabilidade molecular da hemoglobina. A valina é um aminoácido hidrofóbico (não polar), distinto do ácido glutâmico que é hidrofílico (polar), afetando a mobilidade eletroforética da Hb. Esta mutação afeta também a forma como as moléculas de Hb interagem entre si no citosol dos eritrócitos.¹⁶ O ácido glutâmico enquanto molécula polar, quando a cadeia β se dobra e este se estende para fora da superfície da Hb, liga-se à água e contribui para a solubilidade da Hb no citosol. Enquanto a valina hidrofóbica, quando se estende para fora do tetrâmero da Hb, não se liga à água e procura uma área hidrofóbica para se ligar. Quando a HbS está totalmente oxigenada, não é fornecida uma área hidrofóbica para a valina, o que ajudaria na solubilidade da hemoglobina no citosol eritrocitário e na manutenção da forma de disco bicôncavo dos glóbulos vermelhos.¹⁶

A mudança alostérica ocorre na desoxigenação da Hb, e perante condições de baixas concentrações de oxigénio é criada uma bolsa hidrofóbica para a valina na área da fenilalanina 85 e leucina 88. Consequentemente, a valina induz na molécula de

hemoglobina uma atração hidrofóbica entre cadeias β adjacentes levando a uma polimerização de moléculas de Hb.^{35,36}

A polimerização de moléculas de Hb é um processo termodinamicamente instável e quando este processo engloba um número de moléculas de hemoglobina excessivo, ocorre o processo de ciclização do eritrócito por ter sido atingido o ponto crítico.³⁷ A Hb adota então a forma de foice que induz um aumento da rigidez da membrana dos eritrócitos, aumento da viscosidade, desidratação, diminuição da elasticidade e anormal aumento da sua capacidade de aderência, deixando de exercer as suas normais funções fisiológicas. A desoxigenação é o fator que mais contribui para a ciclização, mas existem outros fatores químicos e biológicos como concentração de 2,3-difosfoglicerato, pH, temperatura e concentração de monóxido de carbono.³⁶

O processo de ciclização dos eritrócitos provoca alterações substanciais, a nível fisiológico, como perda de função da hemoglobina e conseqüentemente dos eritrócitos e ainda uma vasta panóplia de manifestações clínicas patológicas.³⁸

Sabe-se que a afinidade do oxigénio com a HbS é bastante inferior à da Hb normal.³⁹

A fisiopatologia da drepanocitose é complexa e para além da alteração mais óbvia, a ciclização dos eritrócitos, existem diversos fatores e mecanismos que explicam a grande variedade de manifestações clínicas.³⁵ O mecanismo primário da fisiopatologia da drepanocitose, a polimerização, provoca alteração da forma dos eritrócitos. Esta alteração leva à desidratação celular, aumento da hemólise e interações anormais com outras células do plasma.^{40,41}

O stress oxidativo está presente nos eritrócitos que sofrem o processo de ciclização. Este estado de elevado stress oxidativo contribui para o aumento de danos celulares e de hemólise. A membrana celular danificada expõe antigénios e fosfatidilserina que vão promover a hemólise extravascular, através da fagocitose por macrófagos. Por outro lado, a hemólise intravascular leva à libertação do conteúdo celular dos eritrócitos para o plasma, incluindo a Hb. A Hb livre no plasma tem a capacidade, juntamente com espécies reativas de oxigénio, de captar o óxido nítrico (NO). Na ausência de NO é promovida a vasoconstrição, agregação plaquetária e coagulação.^{28,35,42}

Para além dos mecanismos enumerados, o conteúdo celular, libertado dos eritrócitos, induz uma resposta inflamatória e a ativação de células endoteliais através da estimulação de macrófagos e monócitos. Isto causa um estado pró-inflamatório nos vasos, para além de existir uma maior adesão das células sanguíneas entre si e ao endotélio ativado promovendo a ocorrência de eventos vaso-oclusivos.³⁵

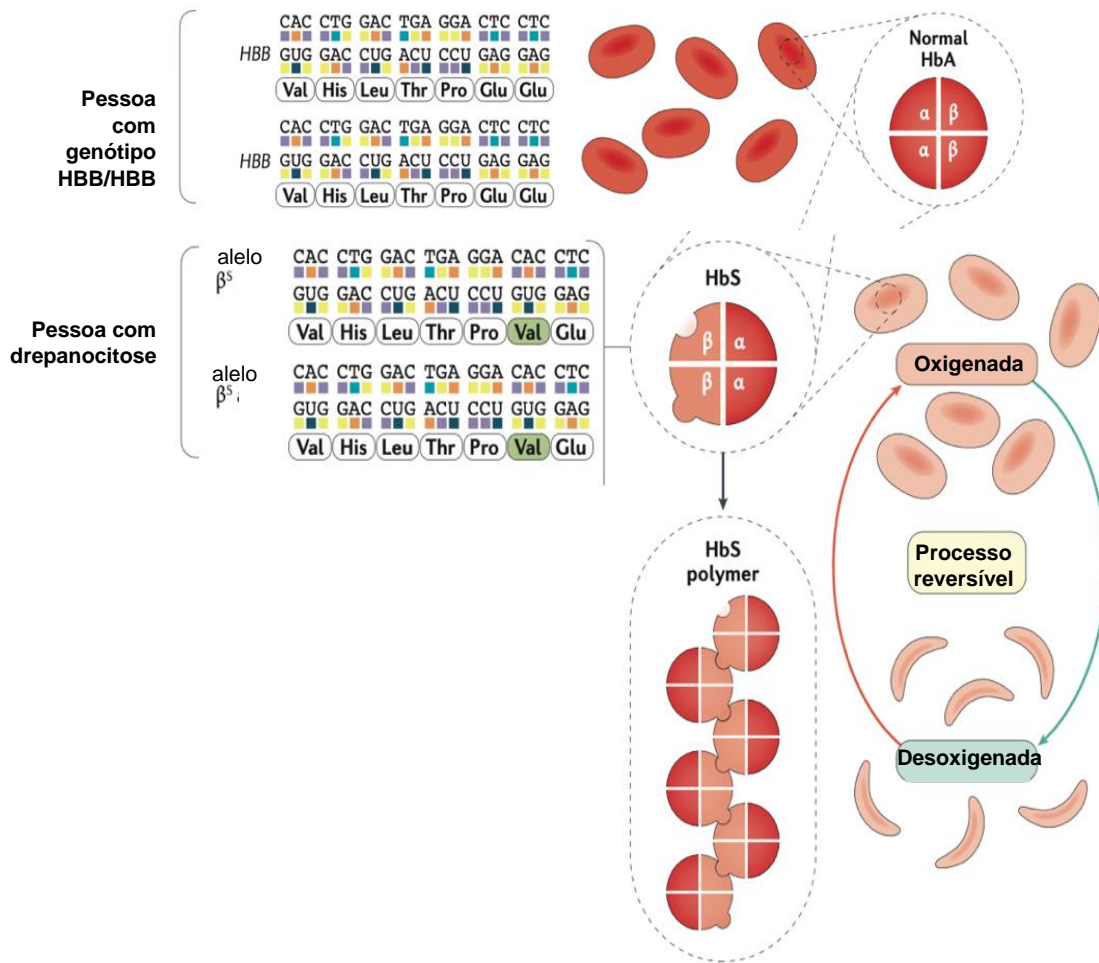


Figura IV.4. Alterações genéticas em HBB. Adaptado de ³⁵

4.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A drepanocitose é uma patologia em que o estado clínico do doente pode oscilar entre a ausência de sintomas e uma condição potencialmente letal. As manifestações clínicas da drepanocitose variam ainda de acordo com os grupos étnicos, sendo que no povo indiano a doença se expressa de uma forma muito mais leve do que no povo africano.¹⁶

Os indivíduos com drepanocitose estão normalmente assintomáticos até aos 6 meses de vida, devido a uma maior concentração de Hb F nestes primeiros meses de vida, o que leva a uma inibição da polimerização da variante Hb S. A partir desta idade a concentração de Hb F começa a diminuir e, conseqüentemente, surgem as manifestações clínicas da drepanocitose.³⁹

As manifestações clínicas comuns da drepanocitose resultam dos episódios de vaso-oclusão que contribuem para a disfunção múltipla de órgãos.⁴³ Estas manifestações podem dividir-se em agudas e crônicas. São complicações agudas desta patologia e associadas às crises de vaso-oclusão, os episódios de dor vaso-oclusiva, a suscetibilidade aumentada a infeções pneumocócicas invasivas, sequestro esplênico, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral e priapismo. Dentro das manifestações clínicas crônicas estão a anemia crónica, dano cerebrovascular como a estenose dos vasos que leva a enfartes isquémicos e hemorrágicos, doença renal, hipertensão pulmonar, necrose avascular e cálculos biliares.⁴⁴

Com a polimerização e conseqüente produção de hemoglobina falciforme, dá-se um comprometimento na elasticidade dos eritrócitos levando ao rompimento da sua membrana eritrocitária e libertação de Hb e arginase livres na circulação. A acumulação de Hb plasmática livre transforma o óxido nítrico (NO) em nitrato (NO_3^-) e a arginase reduz os níveis de arginina (precursora do óxido nítrico) diminuindo ainda mais o NO biodisponível. O óxido nítrico é responsável por mecanismos de vasodilatação pelo que a sua diminuição promove a agregação plaquetária e vasoconstrição. Neste sentido, surgem os episódios de vaso-oclusão (**Figura IV.5**) e conseqüente isquemia tecidual e disfunção orgânica, característica da drepanocitose.³⁶

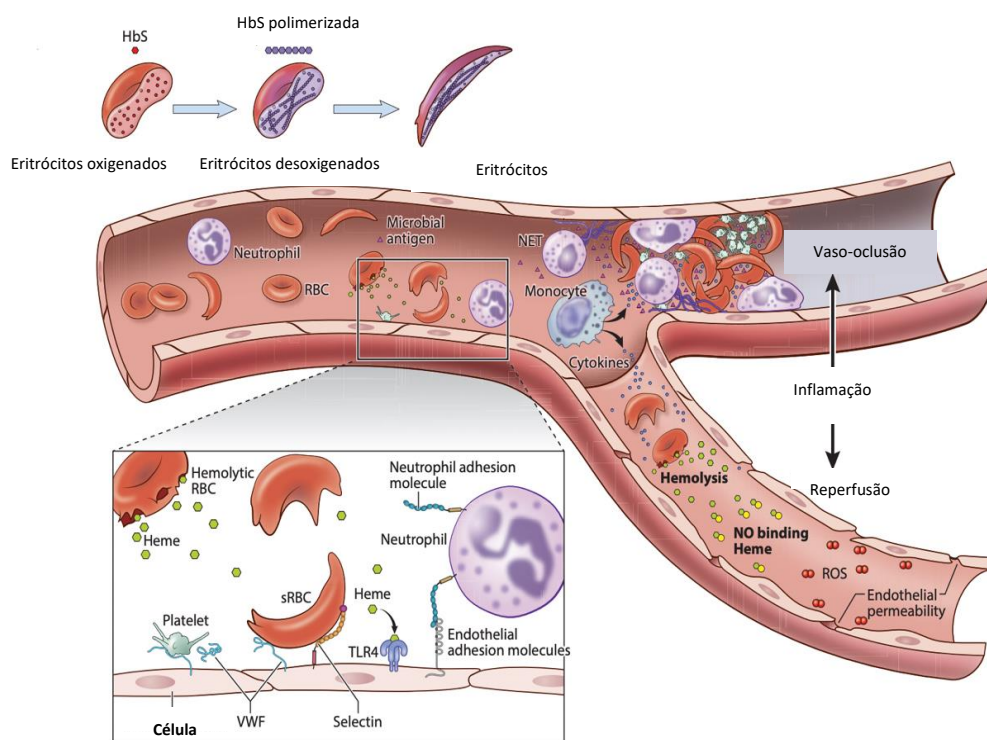


Figura IV.5. Episódio de Vaso oclusão, característico da drepanocitose. Adaptado de ⁵⁷

Os episódios de dor aguda são uma das principais complicações associadas à drepanocitose e a causa mais comum de hospitalização em indivíduos com drepanocitose.³⁵ A maioria dos indivíduos com esta doença sofrem de dores moderadas a severas durante toda a sua vida.⁴⁵ Este tipo de dor surge em consequência da vaso-occlusão e caracterizam-se por uma dor aguda que afeta principalmente as extremidades ósseas, peito e costas.⁴⁶

A dactilite é uma manifestação bastante comum em bebês e crianças, descrita por dor e inchaço das mãos ou pés, afetando essencialmente a região dorsal das extremidades e pode envolver apenas um ou os quatro membros. Apesar das consequências imediatas desta complicação serem raras, é considerada um fator de risco para doença grave.⁴³

Cerca de metade dos indivíduos com drepanocitose sofrem de um evento de anemia aguda. Sendo esta provocada por crises de sequestro esplênico, crise aplástica, onde a eritropoiese é temporariamente suspensa ou crise hiper-hemolítica.³⁵ A sequestração esplênica é mais frequente entre os seis meses e os três anos de idade. Caracteriza-se por um aumento do tamanho do baço devido à retenção sanguínea e consequente hipovolémia com queda súbita dos valores de Hb (<2g/dL abaixo do valor de referência de um indivíduo). Crianças com esta condição podem descrever dor abdominal, náuseas, vômitos, irritabilidade e letargia. Sendo que episódios recorrentes destes sintomas podem levar à necessidade de esplenectomia. Habitualmente, uma criança com HbSS terá um baço disfuncional no primeiro ano de vida o que contribui para o aumento de infeções e risco de sépsis.^{35,43}

As infeções bacterianas aumentam acentuadamente em pessoas com drepanocitose, em particular em crianças até aos cinco anos que possuem elevado risco de septicemia e meningite, desencadeadas por bactérias encapsuladas como *Streptococcus pneumonia*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenza*. Para além disso, há o risco acrescido de outras infeções como osteomielite, síndrome torácica e crises aplásticas provocadas essencialmente por Parvovírus. Isto deve-se ao facto de o baço deixar de exercer as suas funções nos primeiros anos de vida, como consequência da sequestração esplênica induzido pela falciformização característica da drepanocitose.⁴⁴

A síndrome torácica aguda definida por lesão pulmonar aguda, afeta tanto crianças como adultos e está entre as principais causas de mortalidade associadas à drepanocitose.⁴⁷ É uma manifestação que pode estar associada a etiologias diversas cujo diagnóstico é confirmado pela presença de um novo infiltrado pulmonar numa

radiografia tórax de um indivíduo com anemia falciforme. Surge frequentemente em consequência de um episódio vaso-oclusivo e os indivíduos apresentam sintomas respiratórios, dores torácicas, hipoxemia e febre. É uma complicação que pode evoluir muito rapidamente e levar à necessidade de intubação e suporte ventilatório.⁴³

Entre as manifestações clínicas agudas comuns na anemia falciforme estão também as complicações neurológicas. Estas incluem o acidente vascular cerebral (AVC), enfarte cerebral silencioso, hemorragia cerebral entre outras anomalias e doenças relacionadas com o comprometimento do fluxo sanguíneo cerebral.⁴³ O AVC pode ser hemorrágico ou isquémico, constituindo uma emergência médica. As crianças com drepanocitose têm um risco 300 vezes maior de desenvolver um AVC em relação a crianças saudáveis.³⁵ O AVC deixa habitualmente sequelas irreversíveis nomeadamente hemiparesia, monoparesia, afasia, convulsões, disfasia, paralisia do nervo cariano, alterações do estado mental, entre outras.⁴³

O priapismo é outra complicação aguda bastante comum nos homens com drepanocitose. O sexo masculino sofre com crises de ereções espontâneas dolorosas e indesejadas que variam entre crises intermitentes (com duração de duas a quatro horas de forma recorrente) e episódios mais graves (com duração superior a quatro horas). Estes últimos necessitam de intervenção médica rápida, pois existe risco elevado de danos permanentes nos tecidos (fibrose) e impotência.^{43,48}

Outras complicações associadas à drepanocitose são a necrose avascular, retinopatia, cardiomiopatia, atraso no crescimento, nefropatia, colelitíase, hipertensão pulmonar, doença pulmonar restritiva, sequestração hepática.⁴⁷

Na **Figura IV.6** encontram-se esquematizadas as diferentes manifestações agudas e crónicas da drepanocitose.

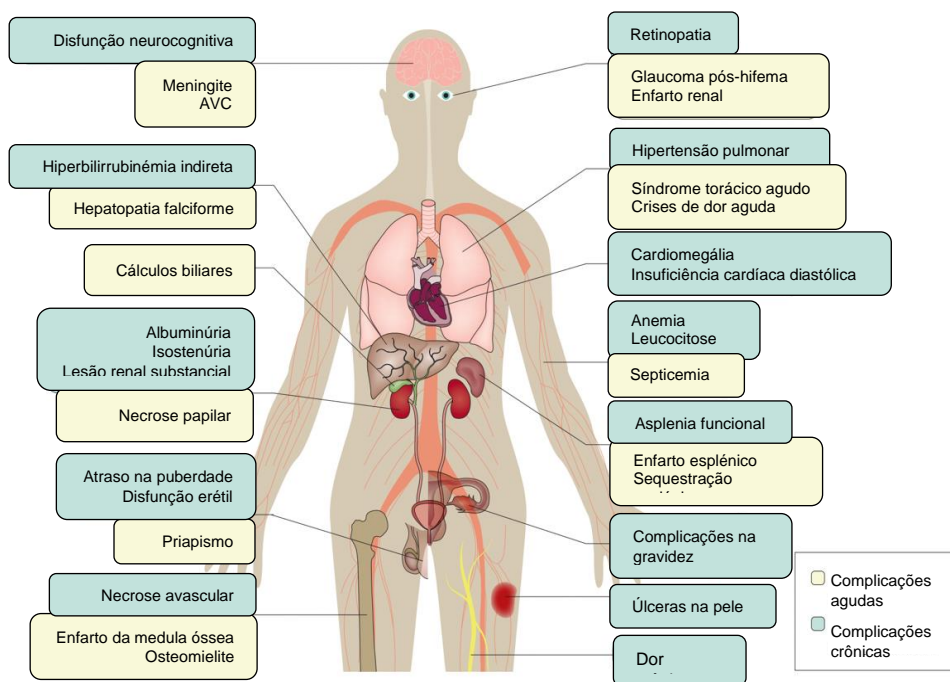


Figura IV.6. Manifestações clínicas (agudas e crônicas) da drepanocitose. Adaptado de ³⁵

4.5. TRANSMISSÃO GENÉTICA

A drepanocitose é uma doença autossômica recessiva, pelo que a sua transmissão genética é característica de uma doença autossômica recessiva típica, com indivíduos portadores heterozigóticos e doentes homozigóticos. Porém, esta doença tem algumas particularidades distintas. Em determinadas situações, pode-se manifestar sendo o indivíduo heterozigótico no gene HBB.⁴⁹ Esta diversidade de padrões fenotípicos está associada a um grupo de doenças chamados síndromes falciformes. Este grupo de doenças tem em comum o facto de todos os indivíduos apresentarem um alelo que codifica para HbS e outro que não codifica para HbA, isto é, indivíduos heterozigóticos que não tem nenhum alelo HbA e pelo menos um alelo HbS. Ou seja, para um individuo apresentar uma síndrome falciforme é necessário apresentar o genótipo homozigótico característico da drepanocitose (HbSS) ou HbS mais um alelo de uma patologia associada à cadeia beta da hemoglobina, como são as β -talassémias ou hemoglobinas C, D, E e O.⁴³

Para entender a transmissão genética deste tipo de doenças é importante entender o conceito de portador. Este conceito explica o facto de dois indivíduos que não manifestam doença, possam vir a ter um filho que manifeste a doença. Deste modo, um indivíduo portador é aquele que tem um gene que codifica HbS, mas por ser

heterozigótico com um alelo saudável (HbS/HbA), não manifesta doença. Esta situação no contexto da drepanocitose tem uma denominação específica, o traço falciforme.⁵⁰

Neste sentido, se dois indivíduos com traço falciforme tiverem um filho, esse filho tem 50% de probabilidade de ter o genótipo HbS/HbA, sendo também ele um portador, 25% de probabilidade de ser homozigótico HbS/HbS e manifestar a doença, ou por último ser homozigótico HbA/HbA e não manifestar a doença nem ser portador de traço falciforme (**Figura IV.7**).⁵⁰

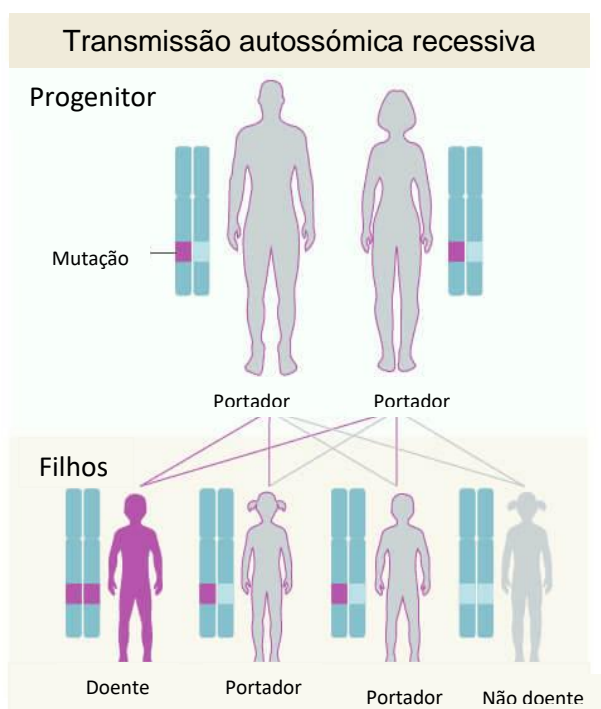


Figura IV.7. Transmissão genética de progenitores com traço falciforme.
Adaptado de ⁵¹

4.6. FATORES GENÉTICOS MODULADORES DOS FENÓTIPOS E MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES GLOBÍNICOS

Uma grande variedade de fatores pode afetar a clínica de um indivíduo com drepanocitose, ou seja, o seu fenótipo. A coexistência de uma doença como a α -talassemia ou a própria Hb F têm um papel modificador no fenótipo da doença.⁵²

As síndromes falciformes são também fatores modificadores do fenótipo. As características clínicas e severidade da doença variam consoante o genótipo individual. Ou seja, heterozigotia de HbS com outra patologia que interfira na cadeia β da hemoglobina.⁵² Indivíduos com os genótipos Hb S/S ou Hb⁰-talassemia apresentam, de

um modo geral, prognósticos mais severos do que outros genótipos como Hb S/C ou S/ β^+ -talassemia.⁴³

Os indivíduos portadores do traço falciforme, normalmente, nunca apresentam manifestações clínicas da doença.⁵³

Cerca de 30% dos doentes com drepanocitose com origem africana e 50% de origem indiana apresentam também α -talassemia.⁵⁴ De uma forma generalizada os indivíduos com herança de α -talassemia apresentam uma severidade atenuada da drepanocitose. Isto deve-se ao facto da α -talassemia provocar uma redução da concentração intracelular da Hb S, diminuição da polimerização e da hemólise resultando no aumento do tempo de vida dos eritrócitos.^{43,52,55} Consequentemente, nos achados laboratoriais verifica-se um aumento da concentração da Hb, aumento do hematócrito (PCV), diminuição do volume corpuscular médio (VCM), maior taxa de HbA₂, menor concentração de lactato desidrogenase (LDH), redução da contagem de reticulócitos, baixos níveis séricos de bilirrubina, menor número de eritrócitos falciformes e não se verificam grandes modificações na concentração de HbF.⁵⁶

No que respeita a complicações clínicas ocorre uma diminuição de certas complicações da doença, em adultos e crianças, como por exemplo, hipertensão pulmonar, síndrome torácica aguda, priapismo, AVC, úlceras da perna e sequestração esplénica.^{54,56,57} No entanto, em adultos com drepanocitose e α -talassemia, não se observa uma diminuição de determinadas complicações, estando estas, pelo contrário, aumentadas. Exemplo disso são os episódios de dor aguda, síndrome torácica aguda e osteonecrose, relacionados com um aumento do hematócrito (PCV) e conseqüente aumento da viscosidade do sangue.^{54,56} Estas alterações estão sempre dependentes do número de genes α -globínicos afetados.⁵⁶

Embora a α -talassemia possua alguns efeitos positivos na modificação clínica da drepanocitose, não apresenta um impacto tão significativo como a HbF.⁵⁴

A HbF e o haplótipo de *cluster* do gene β^s HBB são dois importantes modificadores do fenótipo da drepanocitose.⁵⁸

Nos primeiros meses de vida, os indivíduos com drepanocitose apresentam elevados níveis de HbF circulantes, o que explica o facto de se manterem assintomáticos até os níveis de HbF começarem a diminuir.⁴⁹

A HbF é um dos principais modeladores genéticos da drepanocitose, sendo aquele que já foi mais estudado.⁵⁴ A sua concentração em doentes com drepanocitose

é variável e herdada geneticamente, podendo oscilar entre 1% e 30%, com uma média de 8%.^{54,59}

Sabe-se que concentrações elevadas de HbF diluem a quantidade de HbS e perturbam a sua polimerização. Neste sentido, a presença de elevadas concentrações de HbF leva a uma menor severidade da drepanocitose.⁵² O mecanismo de ação da HbF, que impede a polimerização da hemoglobina, advém da presença de tetrâmeros híbridos ($\alpha_2\gamma\beta S$) e de HbF ($\alpha_2\gamma_2$), que diluem a concentração celular de HbS ($\alpha_2\beta S_2$). Para além disso, a HbF e o tetrâmero híbrido não participam quimicamente na polimerização que caracteriza a HbS. Esta característica química permite, mesmo em situações de pequenas reduções de concentração de HbS, atrasar a polimerização.⁵⁷

Clinicamente concentrações mais elevadas de HbF estão associadas à redução de úlceras nos membros inferiores, eventos dolorosos agudos, osteonecrose, frequência do síndrome torácico agudo, sequestro esplênico e maior esperança de vida.^{54,57}

Por outro lado, a concentração de HbF de um indivíduo com drepanocitose não se correlaciona com a severidade e/ou frequência de certas complicações da doença, como por exemplo: AVC, hipertensão pulmonar, priapismo e agravamento da função renal.⁵⁴ A ausência de associação entre a concentração de HbF e a severidade destas manifestações clínicas, pode ser explicada pelo facto de alguns eritrócitos não apresentarem níveis de HbF que permitam atuar como protetores de eventos de hemólise intravascular. Isto justifica-se pela fisiopatologia de algumas destas complicações da drepanocitose estarem associadas à hemólise e não tanto a eventos de polimerização da HbS, uma vez que este tipo de complicações é menos influenciado pelos níveis de HbF, apresentando maior dependência do fluxo sanguíneo e lesões oxidativas, por exemplo.^{54,60}

Existem três locus quantitativos (QTL-*Quantitative trait loci*) que são responsáveis pelas variações da concentração de HbF na drepanocitose.⁵⁹ Estes são o polimorfismo Xmn1 na região promotora do gene da globina γ , o locus HMIP localizado no cromossoma 6 e o locus BCL11A no cromossoma 2.⁶¹ O BCL11A é responsável por suprimir as cadeias γ e, conseqüentemente, a produção de HbF. O que provoca a diminuição dos níveis de HbF circulante.⁵⁸

O haplótipo de *cluster* do gene β^s HBB é outro importante modificador do fenótipo da drepanocitose. Estão identificados cinco tipos diferentes de haplótipos que são denominados de acordo com a região onde são predominantes: BEN (Benin); SEN (Senegal); AI (Arab/India); BAN (Bantu) e CAM (Camarões). Sabe-se que o AI e o SEN apresentam uma concentração eritrocitária de HbF mais elevada e, portanto, um fenótipo de menor severidade. Por oposição o haplótipo BAN está associado a um fenótipo mais severo e BEN e CAM com uma severidade mediana (**Figura IV.8**).⁵⁸

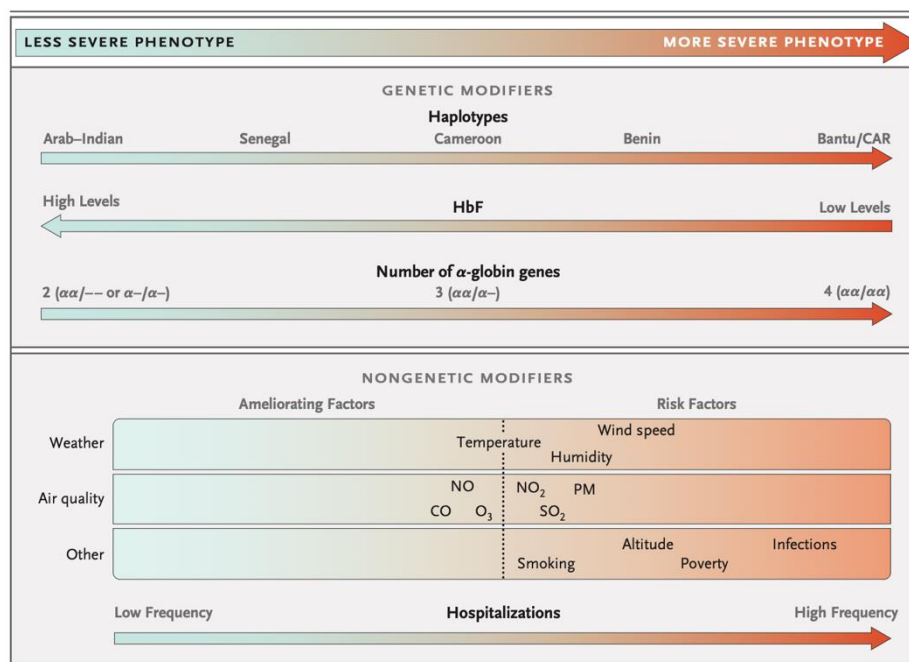


Figura IV.8. Modificadores genéticos e não genéticos da severidade fenotípica na drepanocitose. Adaptado de ²⁹

4.7. RASTREIO E DIAGNÓSTICO

A drepanocitose é uma das formas mais graves de hemoglobinopatias comuns em Portugal e em todo o mundo, constituindo um relevante problema de saúde pública. Neste sentido a deteção e informação precoce de adultos portadores (heterozigotos) é essencial.⁶²

Os objetivos e métodos de diagnóstico variam consoante a idade da pessoa. O rastreio pode ser efetuado em quatro fases diferentes: preconcepção, pré-natal, neonatal ou em qualquer altura durante a vida humana.^{35,57}

Na fase de preconcepção o rastreio permite identificar potenciais pais portadores assintomáticos cujos descendentes correm o risco de obter drepanocitose. Neste sentido são utilizados métodos básicos baseados em proteínas como eletroforese de

Hb, cromatografia líquida de troca catiónica de alta performance (HPLC) e focagem isoelétrica (IEF).³⁵

Na fase pré-natal o procedimento é sugerido aos casais que testaram positivo na triagem pré-concepcional. O diagnóstico é habitualmente seguro, porém invasivo uma vez que requer amostras de ADN fetal obtidas através de uma biopsia das vilosidades coriônicas (obtenção de células da placenta, córion) entre as 8 e 12 semanas de gestação.^{35,39} As amostras de ADN fetal podem ainda ser obtidas por outra técnica invasiva e com potencial risco de perda fetal, a amniocentese, a partir do líquido amniótico às 16 semanas de gestação.³⁹

Estão a ser estudadas novas técnicas menos invasivas de diagnóstico pré-natal como a deteção de ADN fetal na circulação materna às quatro semanas de gestação, contudo, ainda se encontram em investigação.³⁵

A triagem neonatal para drepanocitose é realizada na primeira semana de vida, antes do surgimento dos sintomas. São selecionados bebés de pais de alto risco (triagem direcionada) ou são identificados recém-nascidos com a doença através de uma triagem universal, permitindo prevenir a mortalidade associada a esta patologia.³⁵

Para muitos indivíduos, a apresentação inicial da drepanocitose surge através de uma infeção grave ou sequestro esplénico.³⁵ Pelo que a aplicação de medidas preventivas na fase neonatal está associada a uma redução da morbilidade e mortalidade por drepanocitose.^{35,63} Os programas de rastreio neonatal são universais e realizam-se através de cromatografia líquida de troca catiónica de alta performance (HPLC) e focalização isoelétrica com confirmação por análise de ADN.³⁹

No que respeita aos métodos disponíveis para o diagnóstico da drepanocitose, a identificação definitiva de uma hemoglobinopatia pode ser alcançada por uma abordagem algorítmica passo a passo. Começando com uma história clínica detalhada, por meio de avaliação hematológica que inclui hemograma completo, contagem de reticulócitos, morfologia de glóbulos vermelhos, métodos analíticos baseados em proteínas como a eletroforese de Hb ou focagem isoelétrica (IEF).⁵⁷ Na eletroforese de Hb ou IEF as variantes de Hb separam-se pelas suas cargas elétricas permitindo confirmar o diagnóstico de anemia falciforme homozigótica, excluindo outras hemoglobinopatias.³⁹ Existe ainda a HPLC, HPLC de fase reversa ou eletroforese capilar (CE) que permite determinar concentrações relativas das diferentes frações de Hb.^{57,58} Dentro dos métodos baseados em ácidos nucleicos existe a reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR de transcrição reversa RT-PCR, sequenciação de ADN

genómico e sequenciação de cADN de globina amplificado por RT-PCR do gene de interesse.⁵⁷

A Cromatografia líquida de troca catiónica de alta performance (HPLC) é uma forma de cromatografia líquida, onde ocorre a separação entre uma fase móvel e uma fase estacionária. Dependendo da natureza da fase estacionária, o processo de separação pode ocorrer por quatro modos diferentes: cromatografia de adsorção, cromatografia de partição, cromatografia de troca iónica (**Figura IV.9**), e cromatografia de exclusão de tamanho. É a tecnologia mais simples e acessível a qualquer laboratório de análises clínicas.⁶⁴

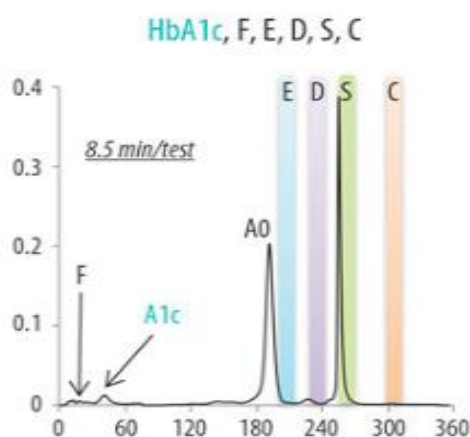


Figura IV.9. Cromatografia líquida de troca catiónica de alta performance (HPLC). Adaptado de ⁶⁵

Infelizmente, alguns destes métodos tornam-se ambíguos. Quando a HbA2 é estimada por HPLC em pacientes que possuem simultaneamente drepanocitose e também talassemia, torna-se difícil fazer o diagnóstico correto. Isto torna-se um problema em algumas partes do mundo, especialmente no Mediterrâneo e no Médio Oriente, onde os traços HbS e β -thal são predominantes e heterozigotos formam uma proporção significativa da população. Por isso, muitas vezes, são necessários estudos moleculares para confirmar um diagnóstico.⁵⁸ Estes mesmos estudos são também obrigatórios para o diagnóstico pré-natal, onde as mutações parentais são verificadas, para a triagem definitiva de um feto, usando vários métodos de ADN, desde PCR até ao sequenciamento. Estes estudos moleculares permitem descobrir modificadores genéticos que modulam o fenótipo, tornando-o mais predisposto ou protegido de diferentes complicações. Na drepanocitose há uma enorme variabilidade de fenótipos. Neste sentido, torna-se necessário determinar o genótipo de cada doente para um aconselhamento mais completo e holístico.⁵⁸

A determinação do haplótipo permite realizar um prognóstico da severidade da doença associada a cada doente. Os haplótipos são determinados através de um método de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) no gene *cluster* HBB, através da detecção de uma diferença nas sequências homólogas de ADN, pela presença de fragmentos de diferentes comprimentos, após digestão dessas amostras de ADN por oito enzimas de restrição específicas. Outro método de haplotipagem é uma transferência de energia de ressonância de fluorescência, em conjunto com um ensaio de fusão de alta resolução. Porém, são métodos que exigem bastante trabalho. É possível identificar mutações em HBB através de técnicas moleculares baseadas em PCR, nomeadamente a técnica de hibridização de oligonucleótidos específicos de alelos, a amplificação do sistema de mutação refratária e a análise restrita de endonucleases de produtos de PCR.⁵⁸

Recentemente têm surgido novos métodos inovadores de diagnóstico através da detecção de mutações no ADN dos indivíduos associadas à drepanocitose, como o GAP-PCR, método de Sanger, *microarray-based comparative genome hybridation (aCGH)* e *Next generation sequencing(NGS)*. O GAP-PCR é uma técnica que permite detetar algumas deleções comuns no *cluster* do gene globínico. O método de Sanger através de sequenciação direta, identifica deleções e duplicações na cadeia de ADN. O aCGH é utilizado para caracterizar alterações nas cópias de números devido a deleções e duplicações para identificação de *so-called copy number variants (CNVs)*.⁵⁸ O método de NGS é comparativamente com o método de Sanger, mais adequado na pesquisa de novas mutações pela grande diferença de ADN lido por NGS, em relação ao método de Sanger.⁶⁶

Na fase neonatal, a expressão da hemoglobina adulta é ainda baixa o que leva a uma redução da sensibilidade do teste. Para tentar contornar esta situação, foram desenvolvidas novas abordagens diagnósticas como a espectrometria de massa em Tandem (conhecida como MS/MS ou MS2), diagnóstico de ADN que inclui Taqman PCR e análise da sequência dos genes amplificados HBB) e análises de sequenciação da próxima geração. Porém são testes que estão disponíveis essencialmente em países de altos rendimentos devido ao seu elevado custo. Para países de baixos recursos existe um teste rápido para despiste da presença de HbS que consiste num teste de fluxo lateral baseado em anticorpos.⁵⁷

A espectrometria de massa Tandem surgiu recentemente como um método alternativo para o rastreio de doenças falciformes nos recém-nascidos. Esta técnica diagnóstica permite detetar péptidos de hemoglobina, após a reação enzimática entre

tripsina e uma amostra de sangue do indivíduo em estudo, resultando na formação de 15 péptidos reproduzíveis da cadeia β HbA *wild-type*. As mutações na Hb vão gerar um aumento nos péptidos específicos para essas mutações em relação aos péptidos do tipo *wild-type*.⁶⁷

4.7.1. PREVENÇÃO DAS FORMAS GRAVES DE DREPANOCITOSE

O diagnóstico precoce e a intervenção preventiva na drepanocitose são essenciais no sentido de evitar o desenvolvimento de complicações clínicas e, conseqüentemente, reduzir a morbidade e mortalidade associadas a esta doença, pelo que as diversas triagens nas diferentes fases da vida dos utentes de risco são essenciais.⁶³

Com o intuito de reduzir a morbidade e mortalidade e aumentar a qualidade de vida das pessoas com drepanocitose, podem e devem ser colocadas em prática uma série de medidas preventivas, entre elas, o rastreio de recém-nascidos, a profilaxia com antibióticos, a educação familiar, a prevenção das manifestações clínicas, evitando fatores de risco para o seu aparecimento, a vacinação.^{43,44,63}

O rastreio de recém-nascidos para despiste de drepanocitose é realizado logo após o nascimento, ou seja, antes do aparecimento de sintomas. Assim permite uma intervenção precoce e a prevenção de futuras complicações clínicas assim como a redução da mortalidade associada a esta doença.³⁵

As crianças com anemia falciforme apresentam uma maior suscetibilidade para infeções bacterianas severas essencialmente por *Streptococcus pneumoniae*, pelo que a meningite, a pneumonia e a septicémia são das principais causas de morte em crianças com esta patologia.⁶⁸ A profilaxia com penicilina previne 84% de episódios de infeções graves provocadas por *Streptococcus pneumoniae*, e por isso, todas as crianças com diagnóstico de drepanocitose devem receber profilaxia de penicilina aos dois meses de idade, e uma dose de reforço aos cinco anos de idade. Em casos de alergia à penicilina pode-se substituir por eritromicina ou azitromicina, avaliando sempre o risco de alterações no metabolismo ou outras complicações associadas.⁴³

A vacinação é essencial para indivíduos com drepanocitose. Em pessoas asplénicas devem ser administradas vacinas contra bactérias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* tipo b. Para além disso, é conferida prioridade alta para a vacina anual contra a gripe a quem detém esta patologia.^{43,44}

A suplementação de ácido fólico é importante no sentido de estimular o aumento da síntese dos glóbulos vermelhos.⁶⁹

Indivíduos com drepanocitose que recebem transfusões sanguíneas como forma de profilaxia ou tratamento, devem ser vigiados, porque pode existir sobrecarga de ferro.⁴³

No que respeita à educação familiar, as famílias devem ser educadas no sentido de valorizarem a importância de consultas de rotina, medicação profilática e intervenção precoce para manifestações clínicas agudas ou crónicas. Para isso, deve ser explicada a necessidade de uma rápida atuação médica em casos de febre, sintomas respiratórios, dor torácica, distensão abdominal, cefaleias, palidez, letargia, priapismo e alterações neurológicas.^{44,70}

Na drepanocitose, as suas complicações clínicas requerem intervenções médicas frequentes e causam alguma inatividade desencadeando impacto nas atividades da vida diária do doente como o trabalho, lazer, escola, entre outras. Todas estas implicações apresentam um grande impacto nas várias vertentes emocional, física, social, psicológica, no sono e educação do doente com esta patologia.^{35,71}

Existem vários instrumentos para medir a qualidade de vida dos doentes com drepanocitose. A HRQOL (*health-related quality of life*) permite a comparação entre indivíduos com Drepanocitose e indivíduos saudáveis. Existem ainda outro tipo de questionários mais específicos para esta doença ou para o contexto pediátrico. Este tipo de instrumento é mais um método que permite acompanhar de forma cuidada o doente e a evolução da doença, considerando alterações da sua qualidade de vida.^{35,72}

4.8. ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

A drepanocitose está associada a morbilidade multissistémica e aumenta o risco de morte precoce. Todavia, nas últimas décadas tem-se assistido a um aumento considerável da sobrevivência de crianças com esta patologia, devido essencialmente à implementação de várias medidas preventivas e ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas da doença.⁷³ Assim, avanços nos cuidados médicos gerais, diagnóstico precoce e novas opções terapêuticas vieram permitir um aumento da esperança média de vida dos indivíduos com drepanocitose.^{35,71}

A anemia falciforme é uma doença complexa que apresenta complicações clínicas agudas e crónicas. No que respeita às condições agudas, deve ser realizada analgesia e pode existir a necessidade de oxigénio suplementar e administração de fluídos.⁷⁴

As principais abordagens terapêuticas da drepanocitose têm como objetivo diminuir as complicações agudas associadas à doença, e incluem a hidroxiureia ou hidroxicarbamida, transfusões sanguíneas de eritrócitos e L-glutamina.^{35,71} Porém apenas o transplante de células-tronco hematopoiéticas funciona como terapia curativa para a drepanocitose.⁷⁵

4.8.1. HIDROXIUREIA

A hidroxiureia, um citotóxico de baixa atividade, é a única intervenção farmacológica que tem demonstrado melhorias em episódios de dor e taxas de sobrevivência para doentes com drepanocitose.⁷⁴ O tratamento a longo prazo com hidroxiureia oral reduz ou previne muitas complicações agudas e crônicas da drepanocitose.⁷⁶

Este medicamento aumenta a produção de hemoglobina fetal (HbF) e reduz a produção de HbS o que vai levar a uma diminuição no número de eritrócitos com capacidade de falciformização. Para além disso, aumenta o tamanho dos eritrócitos e melhora a sua deformabilidade, aumentando o fluxo sanguíneo e reduzindo a vasooclusão. Isto porque diminui a adesão dos eritrócitos ao endotélio por diminuição da expressão de moléculas de adesão. Reduz ainda a contagem de neutrófilos, monócitos e reticulócitos. Há ainda a referir que associada à L-arginina aumenta as concentrações de NO, que por sua vez, eleva os níveis de GMP (monofosfato cíclico de guanosina).⁷⁷

Assim sendo, na presença de hidroxiureia ocorrem menos eventos vaso-oclusivos, menos episódios dolorosos, redução da anemia e hemólise, diminuição da necessidade de transfusão de eritrócitos e hospitalizações e consequente promoção da qualidade de vida das pessoas com drepanocitose.^{74,76}

No que respeita às reações adversas da hidroxiureia, as mais comuns são dores abdominais, náuseas, hiperpigmentação e escurecimento das unhas. É considerado um tratamento seguro, e é cada vez mais prescrito com frequência na idade pediátrica, sendo que as crianças podem iniciá-lo aos nove meses de idade mesmo em assintomáticos.⁷⁶

4.8.2. TRANSFUSÕES SANGUÍNEAS

As transfusões sanguíneas de eritrócitos são também utilizadas como método terapêutico eficaz na gestão da drepanocitose e prevenção das suas complicações.⁷⁸ Os eritrócitos provenientes de um indivíduo doador contêm hemoglobina normal (HbA), pelo que a sua transfusão em doentes com drepanocitose provoca uma redução nos

eritrócitos circulantes com HbS, aumentando a capacidade transportadora de oxigênio do sangue.⁷⁶ As transfusões sanguíneas de eritrócitos melhoram o fluxo microvascular, diminuindo o número de eritrócitos falciformes e por consequência, regista-se uma redução da lesão endotelial e de danos inflamatórios.³⁵ Podem ser utilizadas em adultos, crianças e grávidas com drepanocitose.⁷⁵

A frequência das transfusões de eritrócitos como tratamento da drepanocitose varia de acordo com o seu efeito desejado em determinado momento da doença. Ou seja, existem transfusões esporádicas (para uma situação específica, complicação aguda ou de modo profilático) e transfusões a longo prazo ou recorrentes.⁷⁶

A terapia transfusional crônica reduz o risco de AVC em crianças com risco elevado, assim como pode melhorar e prevenir este tipo de eventos e crises vaso-oclusivas em adultos que apresentem também alto risco de desenvolver um AVC.⁵⁷ Porém, esta estratégia terapêutica apresenta limitações à sua utilização. É um tratamento que não está acessível de forma uniforme e apresenta efeitos adversos como sobrecarga de ferro, tromboembolismo, aloimunização, reações transfusionais hemolíticas e transmissão de infeções, daí a sua utilização limitada e de potenciais benefícios no tratamento da drepanocitose.^{57,78}

4.8.3. L-GLUTAMINA

A L-glutamina é um dos fármacos mais utilizados na redução de complicações agudas da drepanocitose. Foi aprovado em 2017 pela FDA (*Food and Drug Administration*) para doentes acima dos 5 anos de idade. A utilização da L-glutamina está associada a uma diminuição da frequência dos episódios de dor aguda e do número de hospitalizações.⁷¹

4.8.4. TRANSPLANTE DE CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS

O transplante de células estaminais hematopoiéticas (TCEH) é a única terapêutica curativa disponível para drepanocitose.^{79,80} Esta opção terapêutica para a drepanocitose atua através da substituição das células estaminais hematopoiéticas existentes por células de um doador alogénico compatível, este transplante leva à eliminação da Hb S circulante.⁸

O TCEH apenas pode ser considerado em indivíduos sintomáticos com um antígeno leucocitário humano (HLA) compatível com o familiar doador. Porém, a maioria dos utentes não possui um HLA compatível com o doador, esta escassez de doadores compatíveis disponíveis limita a sua utilização como cura da drepanocitose.^{35,80} Sendo

que apenas 14-20% dos doentes com drepanocitose apresentam um HLA compatível com doadores irmãos. Esta abordagem terapêutica está ainda associada a um risco elevado de rejeição de transplante (10%), de infeção e infertilidade associados a esta técnica. Para além disso, a percentagem de mortalidade associada a esta técnica é de 5-10%.⁶⁹

4.8.5. OUTRO TIPO DE TERAPÊUTICA PRESCRITA NA DREPANOCITOSE

Os episódios de dor aguda são uma das principais complicações que indivíduos com drepanocitose experimentam ao longo da vida. São a razão mais comum de admissão de doentes com drepanocitose nos hospitais, tanto em crianças como adultos.⁵⁹ O tratamento da dor aguda na drepanocitose é essencialmente realizado através da administração parenteral de opioides e anti-inflamatórios não esteroides.^{35,59,71} É importante que seja realizada, frequentemente, uma reavaliação da eficácia da medicação utilizada para alívio da dor.⁷¹

A dor crónica é caracterizada por uma dor profunda e constante, que persiste durante, pelo menos, 3 meses. A abordagem terapêutica mais comum na dor crónica são os fármacos opioides, que podem ser utilizados em conjunto com terapêuticas não farmacológicas para alívio da dor.^{35,71} Os opioides devem ser utilizados para a dor que não é aliviada por outros fármacos não opioides. São também utilizados anti-inflamatórios não esteroides, gabapentina, antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação da serotonina e norepinefrina. As intervenções não farmacológicas como massagens, meditação, técnicas de relaxamento também fazem parte do tratamento deste tipo de dor.⁷¹

Para além das terapêuticas direcionadas para a drepanocitose que já se encontram aprovadas e em utilização universal, existem outras ainda em diferentes fases de estudo (**Tabela 1**).³⁵

Tabela 1 - Abordagens terapêuticas para a drepanocitose em fases de estudo. Adaptado de ³⁵

| Terapêutica | Mecanismo de ação | Vantagens | Limitações |
|--|---|--|---|
| Fase III de estudo | | | |
| Rivipansel (GMI-1070) | Inibidor de pan-seletina | Pode reduzir a duração das crises de dor e das hospitalizações e reduz a utilização de medicação opioide | <ul style="list-style-type: none"> - Apenas via endovenosa; - Os resultados da fase III ainda não estão disponíveis |
| Hidroxicarbamida | Aumenta a expressão de HbF | Reduz a frequência dos episódios de dor aguda, síndrome torácico agudo e transfusões em adultos e crianças | <ul style="list-style-type: none"> - Não é conhecida a carcinogenicidade, teratogenia e sua influência na fertilidade |
| Prasugrel | Inibidor de plaquetas | Hipótese de reduzir a duração das crises vaso-oclusivas; bem tolerado em doses terapêuticas e doses aumentadas | <ul style="list-style-type: none"> - Baixa importância na fase III em que se encontra |
| Vepoloxamer (MST-188) | Aumenta o fluxo sanguíneo microvascular | Hipótese de reduzir a duração e severidade das crises de dor aguda | <ul style="list-style-type: none"> - Na fase III ainda não estão demonstrados os seus efeitos |
| L-Arginina | Substrato para síntese de óxido nítrico | Reduz de forma significativa a severidade das crises vaso-oclusivas na fase II de estudos | <ul style="list-style-type: none"> - Os resultados da fase III ainda não estão disponíveis |
| N-Acetilcisteína | Antioxidante | Administração oral | <ul style="list-style-type: none"> - Na fase III ainda não estão demonstrados os seus efeitos |
| Sulfato de Magnésio | Multimodal | Vasodilatador, anti-inflamatório e alívio da dor | <ul style="list-style-type: none"> - Na fase III ainda não estão demonstrados os seus efeitos |
| Transfusões para enfarte cerebral silencioso | Transfusão de eritrócitos | Reduz de forma significativa a incidência recorrente do AVC isquêmico em crianças | <ul style="list-style-type: none"> - Complicações para concretização na prática |

(Continuação)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Transfusões para prevenção de AVC | Transusão de eritrócitos | Reduz de forma significativa a incidência do primeiro AVC em crianças com fluxo sanguíneo da artéria cerebral elevado | – Um estudo de <i>follow-up</i> demonstrou que não é seguro parar transfusões regulares após 30 meses |
| Transfusões alternadas com hidroxycarbamida | Aumenta a expressão da HbF | Eficaz na profilaxia do primeiro AVC | – Não apresenta vantagens em relação à transfusão crónica para profilaxia secundária de AVC |
| GBT440 | Inibidor da polimerização de HbS | Bem tolerado; comprovado o aumento da necessidade de oxigénio e a redução de HbS circulante | – Os resultados da fase III ainda não estão disponíveis |
| Fase II de estudos | | | |
| Crizanlizumab (SelG1) | Inibidor P-Selectina | Reduz a incidência de complicações agudas de 45-63% | – Necessidade de perfusão endovenosa mensal |
| Óxido nítrico inalado | Vasodilatador pulmonar | Fornece NO para corrigir a diminuição da sua biodisponibilidade | – Os resultados da fase II não comprovaram o efeito na duração ou severidade de crises de dor vaso-oclusiva |
| Sildenafil | Inibidor PDE5A | Aprovado pela FDA para tratar a hipertensão pulmonar e disfunção erétil | – Fase II terminou precocemente devido ao aumento da frequência de episódios de dor aguda |
| <i>Sanguinate</i> | Promove os níveis de oxigénio nos tecidos | Hipótese de prevenir crises vaso-oclusivas e úlcera da perna | – Dados limitados |

(Continuação)

| | | | |
|-------------------|---|---|-------------------|
| Sevuparin (DF02) | Aumenta o fluxo sanguíneo microvascular | Pode diminuir a adesão dos eritrócitos e favorecer o fluxo sanguíneo normal e reduz o risco de vaso-oclusão | – Dados limitados |
| Fase I de estudos | | | |
| Pomalidomida | Aumenta a expressão de HbF | Bem tolerado; aumenta HbF e níveis de Hb total; efeitos anti-inflamatórios | – Dados limitados |
| IMR-687 | Inibidor de PDE9A | Dados pré-clínicos indicam diminuição da polimerização, da adesão dos neutrófilos e da vaso-oclusão | – Dados limitados |
| SCD-101 | Inibidor da polimerização de HbS | Produto natural | – Dados limitados |

4.8.1. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS - GENÉTICAS

As limitações em torno do TCEH e os avanços tecnológicos genéticos associados às células estaminais hematopoiéticas vieram incentivar novos estudos de terapia genética para a drepanocitose.^{69,81} Para além disso, a falta de terapêutica para esta doença levou a FDA a definir como prioridade elevada a criação de novas terapêuticas dirigidas à drepanocitose, de modo a acelerar o desenvolvimento e aprovação de novos fármacos.³⁵

A terapia genética apresenta-se como a terapêutica mais desafiadora e promissora no futuro do tratamento da drepanocitose. Esta técnica tem como base teórica a edição genética *in vitro*, de células do próprio indivíduo, permitindo o

transplante autólogo de células estaminais hematopoiéticas do próprio doente. Assim, é possível contornar possíveis incompatibilidades de dador. A obtenção de células apropriadas para transplante autólogo é realizada, preferencialmente, pelo isolamento de células hematopoiéticas do doente. Porém, como alternativa, existe a possibilidade de isolar células somáticas da pele ou sangue e induzir uma reprogramação de modo a se tornarem células estaminais pluripotentes induzidas.^{82,83}

A terapia genética tem atualmente 3 grandes focos relativamente às técnicas terapêuticas. A correção genética pode ser realizada de duas formas distintas, correção direta ou indireta do gene HBB. A técnica supramencionada efetua a edição do genoma de células estaminais hematopoiéticas, este processo acontece pela ação de nucleases programáveis como são exemplo, as *zinc-finger nucleases* (ZNFs), *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) e as *RNA-guided nucleases* (RGNs), utilizando esta última a técnica denominada de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein-9nuclease* (CRISPR/Cas9).⁸⁴

A adição genética é realizada também através de células estaminais hematopoiéticas, embora seja adicionado conteúdo genético por via de vetores lentiviricos.⁸⁴

A edição ou correção genética pode ter como objetivo a correção da mutação adenina por timina no gene HBB, denominando-se de *HBB Mutation-Specific Genome Editing Strategies*. Este método pretende corrigir diretamente, nas células estaminais hematopoiéticas do doente, a causa da doença através de nucleases programáveis especificamente dirigidas. Outro método de correção genética denomina-se *HBB Mutation-Independent Genome Editing* e tem como alvo a correção de genes supressores ou inibidores da expressão da HbF. Este último tem variados *locus* para o efeito, existindo diferentes técnicas como *forced chromatin looping*, *Disruption of BCL11A enhancer* e *shRNA knockdown of BCL11A*.^{83,85}

Um dos grandes desafios da adição genética é a construção e transporte de um gene, sendo utilizados os vírus, como os veículos para incorporar os genes desejados nas células estaminais hematopoiéticas. Apesar de existirem 3 classes de vírus utilizados nesta técnica, retrovírus, lentivírus e spumavirus, os mais utilizados são os lentivírus.⁷⁵ Neste tipo de abordagem terapêutica o objetivo primário é a adição de genes que atuem nos mecanismos fisiopatológicos da doença. Deste modo, a longo prazo têm sido experimentadas adições de diferentes genes, entre eles, a adição de genes mutados expressando β^{AT87Q} - globina ou β^{A63} - globina responsáveis pela atividade anti polimerização característica da γ -globina pertencente à hemoglobina fetal.^{69,86} Outro tipo

de genes utilizado na técnica de adição genética por meio de lentivírus, foram genes híbridos que expressam as regiões codão de γ -globina e as regiões anti ciclização da β -globina, regiões não-codão (**Figura IV.10**).⁸⁵

Atualmente, a terapia genética encontra-se num estado de grande desenvolvimento, existindo várias patentes em fases pré-clínicas. Mais bem-sucedida do que a adição genética, a edição genética tem mostrado capacidade de ser uma terapêutica promissora.⁸³

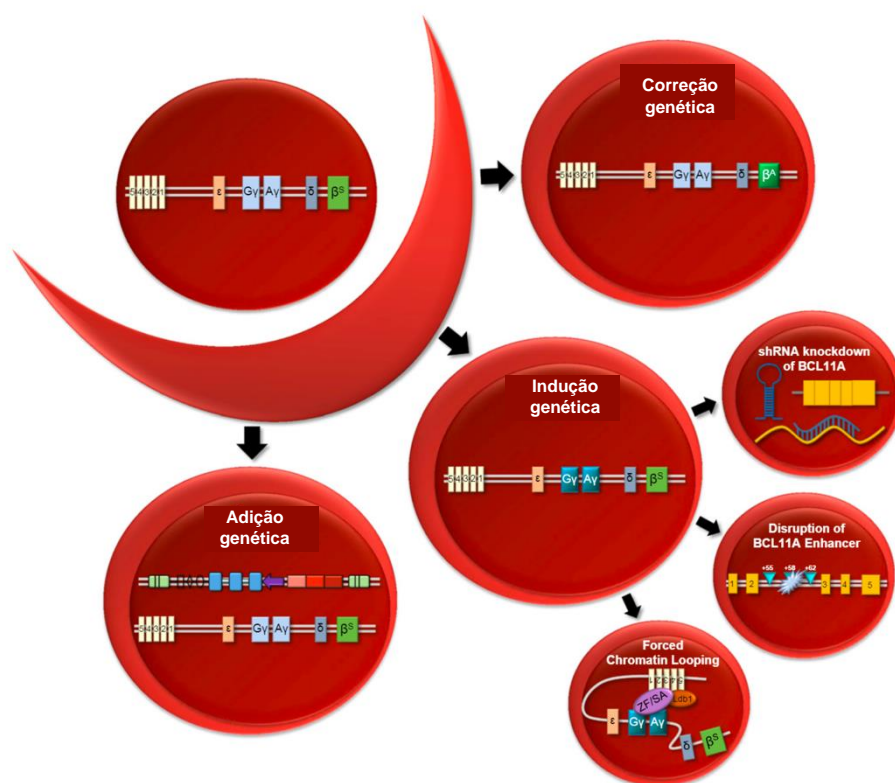


Figura IV.10. Estratégias de terapia genética para drepanocitose. Adaptado de ⁸⁵

Embora a capacidade terapêutica da terapia genética seja promissora, existem vários desafios que têm de ser ultrapassados de modo a garantir um resultado positivo deste tipo de terapêuticas. Para além dos critérios exigidos às diversas terapêuticas para a respetiva utilização, a terapia genética direcionada para a drepanocitose apresenta alguns fatores específicos que são críticos para o seu sucesso. Alguns exemplos são:⁸¹

- Fonte de células estaminais hematopoiéticas (CEH) e procedimento para a sua aquisição;

- Processo de enriquecimento e purificação destas células;
- Quantidade de células estaminais hematopoiéticas que, na realidade, teve o seu ADN modificado com sucesso (sendo este um dos fatores mais importantes);
- Crescimento e sobrevivência das CEH após correção ou adição genética;
- Otimização do rendimento dos processos de transdução genética;
- Via de administração de CEH;
- Escolha do regime de condicionamento das CEH, ou seja, da preparação pré-transplante do doente tratado com terapia genética (quimioterapia e/ou radioterapia);
- Influência da idade;
- Microambiente da medula óssea, visto que existem condições clínicas externas ao quadro da drepanocitose que a podem influenciar.

V. CONCLUSÃO

A hemoglobina é uma proteína presente nos eritrócitos que desempenha funções indispensáveis à manutenção da vida humana. Mutações nos genes que codificam esta proteína levam a alterações estruturais que comprometem o seu normal funcionamento, surgindo as hemoglobinopatias. As hemoglobinopatias são um grupo de doenças onde se inclui a drepanocitose.

A drepanocitose é uma doença que apresenta elevada prevalência nas regiões do Médio Oriente, África Subsariana, Índia e Mediterrâneo. Afeta milhares de crianças e adultos em todo o mundo, um número que aumenta se considerarmos todos os indivíduos portadores da doença. Apresenta um impacto significativo na qualidade de vida dos indivíduos devido à severidade das suas manifestações clínicas.

Na drepanocitose, o indivíduo pode ser assintomático ou apresentar sinais e sintomas muito graves dependendo se se trata de HbS em monozigotia ou heterozigotia. Os tratamentos existentes embora alguns sejam promissores para um melhor futuro destes doentes ainda não satisfazem as necessidades dos mesmos. Razão pela qual a prevenção, tentando identificar os prováveis portadores de um só alelo para HbS se torna essencial para evitar que 2 indivíduos portadores desse alelo originem uma criança com drepanocitose.

O cuidado de uma equipa profissional de saúde pode ser útil e pode incluir para além do médico de família, obstetra, geneticista e hematologista, sobretudo para evitar associações com outras hemoglobinopatias.

Atualmente, existem várias opções terapêuticas que atuam essencialmente no sentido de reduzir as manifestações clínicas resultantes da drepanocitose, tais como a hidroxiureia, a L-glutamina e as transfusões sanguíneas. A única abordagem terapêutica curativa, até à data, é o transplante de células estaminais hematopoiéticas. Porém, este tratamento apresenta algumas limitações como o número limitado de doadores compatíveis e a possibilidade de uma rejeição ao transplante.

Quase um século após a drepanocitose ter sido descrita pela primeira vez, podemos estar no início de uma nova era na qual um médico pode usar informações genéticas para selecionar um ou mais medicamentos que visam aspetos específicos da fisiopatologia da doença que são relevantes para um determinado paciente.

Recentemente, diversas técnicas foram utilizadas na terapia genética da drepanocitose. As mais promissoras atualmente são a correção genética, diretamente no gene HBB ou por indução da expressão de HbF, e a adição genética. A adição

genética distingue-se pela utilização de vetores lentivíricos para integração de material genético no genoma de células estaminais hematopoiéticas. Por outro lado, a correção genética do gene HBB utiliza nucleases programáveis (ZNFs, TALENs, RGNs utilizando CRISPR/Cas9). Finalmente o último método de correção genética utiliza uma técnica que é a edição genética independente do gene HBB, ou seja, são identificados potenciais alvos de correção em genes supressores ou inibidores da expressão de HbF.

A terapia genética abre caminho para uma revolução futura no tratamento da drepanocitose. Surge como um tratamento curativo bastante promissor que atua diretamente na origem da doença (genética) e promete melhorar a qualidade de vida dos indivíduos com esta patologia. Apesar de se encontrar em fase de estudo e de vários estudos já terem demonstrado segurança e exequibilidade na sua utilização, ainda é necessário ultrapassar alguns desafios que comprometem a sua utilização efetiva.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brandan N., Aguirre M.V., Giménez C.E. Hemoglobina. Cátedra de Bioquímica – Facultad de Medicina UNNE; 2008.
2. Hoffbrand A.V., Moss P.A.H. Fundamentos em hematologia de Hoffbrand. 7ª ed. John Wiley & Sons Editora. 71-81; 2016.
3. Kohne E. Hemoglobinopathies. Deutsches Arzteblatt. 108, 532-540; 2011.
4. Bishop M.L., Fody E.P., Schoeff, LE. Clinical Chemistry Principles, Techniques, and Correlations. 8ªed. Wolters Kluwer. 1035-1080; 2018.
5. Piel F., Patil A., Howes R., Nyangiri O., Gething P., Williams T., et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. Nat Commun. 1(8), 1-2; 2010.
6. Azar S., Wong T. Sickle Cell Disease: a brief update. Medical Clinics of North America. 101, 375-293; 2017.
7. Ballas S.K., Kesen M.R., Goldberg M.F., Luty G.A., Dampier C., Osunkwo I., et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. 2012; 2012.
8. Kapoor S., Little J.A., Pecker L.H. Advances in the treatment of sickle cell disease. Mayo Clinic Proceedings. 93, 1810-1824; 2018.
9. Demirci S., Uchida N., Tisdale J.F. Gene therapy for sickle cell disease: an update. Cytotherapy. 20, 899-910; 2018.
10. Voon H.P.J., Vadolas J. Controlling α -globin: a review of a α -globin expression and its impact on β -thalassemia. Haematologica. 93, 1868-1876; 2008.
11. Abott Diagnostiv. Learning Guide Hematology. American Society for Clinical Patology. 13-52; 2010.
12. Thomas C., Lumb A.B. Physiology of haemoglobin. Continuing education in anaesthesia critical care and pain. 12(5), 251-256; 2012
13. Actas de bioquímica. Hemoglobinas normais e anormais: drepanocitose. 8, 125-131; 2007.
14. Panawala L. What is the function of hemoglobina in the human body [Internet].[citado em 2022 Set 16]; 2017. Disponível em: <http://pediaa.com/what>
15. Thelml H., Diem H., Haferlach T. Color atlas of hematology: practical microscopic and clinical diagnosis. 2ªed. Thieme Flexibook. 7; 2004.
16. Keohane E.M., Otto C.N., Walenga J.M. Rodak's hematology: clinical principles and applications. 6ªed. Elsevier. 91-101; 2020.
17. Pallister C., Watson M. Haematology. 2ªed. Scion Publishing. 384-387; 2011.
18. Bain B.J. Haemoglobinopathy diagnosis. 3ªed. Wiley Blackwell. 1-10;2020.

19. Fathollahipour S., Patil P.S., Leipzig N.D. Oxygen regulation in development: lessons from embryogenesis towards tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 205, 350-371; 2019.
20. Hoeger U., Harris J. Vertebrate and invertebrate respiratory proteins, lipoproteins and other body fluid proteins. Springer. 94, 275-280; 2020.
21. Bauer D.E., Orkin S.H. Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. *Curr Opin Pediatr*. 23(1), 1-8; 2011.
22. Sankaran V.G., Orkin S.H. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 3(1), 1-10; 2013.
23. Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*. 112(10), 2927-3938; 2008.
24. Costa S., Madeira S., Sobral M.A., Delgadinho G. Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família. *Revista Portuguesa Medicina Geral e Familiar*. 32, 416-424; 2016.
25. Forget B.G., Franklin B.H. Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 3(2), 2-8; 2013.
26. Bain B.J. Hemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. *Blood rev*. 25(5), 205-213; 2011.
27. Martins M.C., Olim G., Melo J., Magalhães H.A., Rodrigues M.O. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *Journal Med Genet*. 30(3), 235-239; 1993.
28. Frenette P.S., Atweh G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *Journal of Clinical Investigation*. 117(4), 850-858; 2007.
29. Piel F.B., Steinberg M.H., Rees D.C. Sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*. 376(16), 1561-1573; 2017.
30. Marcão A., Vilarinho L. Rastreio neonatal da drepanocitose na europa: observações e consensos de uma reunião pan-europeia. (9), 44-47; 2019.
31. Associação portuguesa de pais e doentes com hemoglobinopatias. Drepanocitose (doença falciforme). [Internet]. [citado 2022 Set 16]. Disponível em: <https://www.appdh.org.pt/drepanocitose>
32. Salyer S.W. *Essential emergency medicine: for the healthcare practitioner*. 1ªed. Elsevier. 1237-1244; 2007.
33. Wajih N., Basu S., Jailwala A., Kim H.W., Ostrowski D., Perlegas A., et al. Potential therapeutic action of nitrite in sickle cell disease. *Redox Biol*. 12, 1026-1039; 2017.
34. Adewoyin A.S. Management of sickle cell disease: a review for physician education in Nigeria (Sub-Saharan Africa). *Hindawi Journal*. 2015, 1-21; 2015.

35. Kato G.J., Piel F.B., Reid C.D., Gaston M.H., Ohene-Frempong K., Krishnamurti L., et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 4(18010), 1-18; 2018.
36. Piccin A., Murphy C., Eakins E., Rondinelli M.B., Daves M., Vecchiato C., et al. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. *European Journal of Haematology*. 102, 319-330; 2019.
37. Ferrone F.A., Hofrichter J., Eaton W.A. Kinetics of sickle hemoglobin polymerization II: a double nucleation mechanism. *Journal Mol Biol*. 183(4). 611-631; 1985.
38. Inusa B.P.D., Hsu L.L., Kohli N., Patel A., Ominu-Evbota K., Anie K.A., et al. Sickle cell disease: genetics, pathophysiology, clinical presentation and treatment. *International Journal of Neonatal Screening*. 5(2), 1-15; 2019.
39. Tebbi C.K. Sickle cell disease: a review. *Hemato*. 3(2), 341-366; 2022.
40. Fadok V.A., de Cathelineau A., Daleke D.L., Henson P.M., Bratton D.L. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 276(2), 1071-1077; 2001.
41. Kuypers F.A. Hemoglobin S polymerization and red cell membrane changes. *Hematol Oncol Clin North Am*. 28(2), 155-179; 2014.
42. Kassim A.A., DeBaun M.R. Sickle cell disease, vasculopathy, and therapeutics. *Annual Review of Medicine*. 64, 451-466; 2013.
43. Bender M.A. Sickle cell disease. 1-34; 2021.
44. Mburu J., Odame I. Sickle cell disease: reducing the global disease burden. *Int J Lab Hematol*. 41(1), 82-88; 2019.
45. Zhang D., Xu C., Manwani D., Frenette P.S. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood*. 127(7), 801-809; 2016.
46. Ware R.E., de Montalembert M., Tshilolo L., Abboud M.R. Sickle cell disease. *Lancet*. 390(10091), 311-323; 2017.
47. Sundd P., Gladwin M.T., Novelli E.M. Pathophysiology of sickle cell disease. *Annu Rev Pathol*. 14, 263-292; 2019.
48. Pinto V.M., Balocco M., Quintino S., Forni G.L. Sickle cell disease: a review for the internist. *Intern Emerg Med*. 14(7), 1051-1064; 2019.
49. Serjeant G.R. The natural story of sickle cell disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 3(10); 1-11; 2013.
50. Al-Salem A. Medical and surgical complications of sickle cell anemia. Springer. 19-39; 2016.

51. Genetic and rare diseases information center. Anemia falciforme. [Internet]. [citado 04 Out 2022]. Disponível em: <http://rarediseases.info.nih.gov/diseases/8614/sickle-cell-anemia>
52. Steinberg M.H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Scientific World Journal*. 9, 46-67; 2009.
53. Naik R.P., Smith-Whitley L., Hassell K.L., Umeh N.I., de Montalembert M., Sahota P., et al. Clinical outcomes associated with sickle cell trait: a systematic review. *Ann Intern Med*. 169(9), 619-627; 2018.
54. Steinberg M.H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*. 129(4), 465-481; 2005.
55. Raffield L.M., Ulirsch J.C., Naik R.P., Lessard S., Handsaker R.E., Jain D., et al. Common alpha-globin variants modify hematologic and other clinical phenotypes in sickle cell trait and disease. *PLoS Genet*. 14(3), 1-21; 2018.
56. Steinberg M.H., Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am J Hematol*. 87(8), 795-803; 2012.
57. Williams T.N., Thein S.L. Sickle cell anemia and its phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 19, 113-147; 2018.
58. Adekile A., Akbulut-Jeradi N., Al Khaldi R., Fernandez M.K., Sukuraman J. Diagnosis of sickle cell disease and HBB haplotyping in the era of personalized medicine. *J Pers Med*. 11(6), 454; 2021.
59. Rees D.C., Williams T.N., Gladwin M.T. Sickle-cell disease. *Lancet*. 376(9757), 2018-2031; 2010.
60. Akinsheye I., Alsultan A., Solovieff, N., Ngo D., Baldwin C.T., Sebastiani P., et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*. 118(1), 19-27; 2011.
61. Steinberg M.H. Fetal hemoglobin in sickle hemoglobinopathies: high HbF genotypes and phenotypes. *J Clin Med*. 9(11), 1-10; 2020.
62. Direção Geral da Saúde. Prevenção das formas graves de hemoglobinopatia. Nº18/DSMIA. 2004.
63. Pecker L.H., Schaefer B.A., Luchtman-Jones L. Knowledge insufficient: the management of haemoglobin SC disease. *British Journal Haematology*. 176(4), 515-526; 2017.
64. Kutlar F. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. *Hemoglobin*. 31(2), 243-250; 2007.
65. Menarini diagnostics. Chromatograms. [Internet]. [citado 2022 Out 14]. Disponível em: <https://www.menarinidiagnostics.com/en-us/Home/Professional-Diagnostics/Haemoglobin-Analysis/Hb9210-Resolution/Chromatograms>

66. Sikkema-Raddatz B., Johansson L.F., de Boer E.N., Almomani R., Boven L.G., Van Den Berg M.P., et al. Targeted next-generation sequencing can replace sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat.* 34(7), 1035-1042; 2013.
67. Moat S.J., Rees D., George R.S., King L., Dodd A., Ifedery A., et al. Newborn screening for sickle cell disorders using tandem mass spectrometry: three years experience of using a protocol to detect only the disease states. *Ann Clin Biochem.* 54(5), 601-611; 2017.
68. Gaston M.H., Verter J.I., Woods G., Pegelow C., Kelleher J., Presbury G., et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. *The New England Journal of Medicine.* 314(25), 1593-1599; 1986.
69. Tanhehco Y.C. Gene therapy for hemoglobinopathies. Elsevier. 60(1), 1-4; 2021.
70. National Center of Birth Defects and Developmental Disabilities. Living well with sickle cell disease: self-care toolkit. 2011. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/28027>
71. Onimoe G., Rotz S. Sickle cell disease: a primary care update. *Cleve Clin J Med.* 87(1). 19-27; 2020.
72. Bhagat V.M., Baviskar S.R., Mudey A.B., Goyal R.C. Poor health related quality of life among patients of sickle cell disease. *Indian J Palliat Care.* 20(2), 107-111; 2014.
73. Quinn C.T., Rogers Z.R., McCavit T.L., Buchanan G.R. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood.* 115(17), 2447-3452; 2010.
74. Monus T., Howell, C.M. Current and emerging treatments for sickle cell disease. *J Am Acad Physician Assist.* 32(9), 1-5; 2019.
75. Fernandes Q. Therapeutic strategies in sickle cell anemia. The past present and future. *Life Sci.* 178, 100-108; 2017.
76. Yawn B.P., Buchanan G.R., Afenyi-Annan A.N., Ballas S.K., Hassell K.L., James A.H., et al. Management of sickle cell disease: summary of 2014 evidence-based report by expert panel members. *Journal of the American Medical Association.* 312(10), 1033-1048; 2014.
77. Gonçalves C.C., Marques J.S., Luz-Rodrigues H. Drepanocitose: novas perspectivas da abordagem terapêutica. *Boletim da SPHM.* 22(4), 5-24; 2007.
78. Cisneros G.S., Thein S.L. Recent advances in the treatment of sickle cell disease. *Frontiers in Physiology.* 11, 435; 2020.
79. Gardner R.V. Sickle cell disease: advances in treatment. *Ochsner Journal.* 18(4), 377-389; 2018.

80. Robinson T.M., Fuchs E.J. Allogeneic stem cell transplantation for sickle cell disease. *Curr Opin Hematol.* 23(6), 524-529; 2016.
81. Lidonnici M.R., Ferrari G. Gene therapy and gene editing strategies for hemoglobinopathies. *Blood Cells Mol Dis.* 70, 87-101; 2018.
82. Tasan I., Jain S., Zhao H. Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease. *Hum Genet.* 135(9), 1011-1028; 2016.
83. Ware R.E., Montalembert M., Tshilolo L., Abboud M.R. Sickle cell disease. *Lancet.* 390(10091), 311-323; 2017.
84. Zittersteijn H.A., Harteveld C.L., Klaver-Flores S., Lankester A.C., Hoeben R.C., Staal F.J.T., et al. A small key for a heavy door: genetic therapies for the treatment of hemoglobinopathies. *Front Genome Ed.* 2, 1-25; 2020.
85. Hoban M.D., Orkin S.H., Bauer D.E. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. *Blood.* 127(7), 839-848; 2016.
86. Ribeil J.A., Hacein-Bey-Abina S., Payen E., Magnani A., Semeraro M., Magrin E., et al. Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *New England Journal of Medicine.* 376(9), 848-855; 2017.