



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ALEXSANDRO PEDRO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs10754558 E
rs4612666 NO GENE *NLRP3* COM A OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES
CLÍNICAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Recife
2023

ALEXSANDRO PEDRO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs10754558 E
rs4612666 NO GENE *NLRP3* COM A OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES
CLÍNICAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular. Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo

Coorientadora: Profa. Dra. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer

Recife

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva,
CRB4/1381

Silva, Alexsandro Pedro da.

Investigação da Associação dos polimorfismos rs10754558 e rs 4612666 no gene NLRP3 com a ocorrência de complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme. / Alexsandro Pedro da Silva. – 2023.

107 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Coorientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo

Coorientadora: Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer.

Dissertação (mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências, anexos e apêndice.

Doença falciforme;. 2. Inflamassoma NLRP3 . 3. rs10754558 . 4. rs4612666. I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti. (Orient.). II. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (Coorient.). III. Hatzlhofer, Betânia Lucena Domingues (Coorient.). IV. Título.

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-249

ALEXSANDRO PEDRO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs10754558 E
rs4612666 NO GENE *NLRP3* COM A OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES
CLÍNICAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular. Área de concentração: Genética.

Aprovado em: 20/10/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Édis Belini Júnior
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Dr. Magnun Nueldo Nunes dos Santos
Universidade de Campinas

Recife
2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, À DEUS, que me deu o dom da vida e está comigo em todos os momentos.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, por contribuir com meu crescimento profissional e científico.

À Fundação HEMOPE e seus servidores, pela infraestrutura cedida e apoio; e aos pacientes com anemia falciforme que se voluntariaram para participar dessa pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

Aos meus pais Marina e José Pedro, as maiores dádivas que DEUS me deu, pelo amor incondicional. Ao meu sobrinho Jadson, pela ajuda com Excel.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra por aceitar-me como seu orientando e acreditar em mim, além de todo o suporte concedido e conhecimento compartilhado.

À minha amiga Madi, por sempre me incentivar e acreditar em mim, sem ela eu não estaria no mestrado.

À minha amiga Gabriela Arcanjo, por estar comigo em todas as etapas dessa dissertação, por toda paciência, aprendizado transmitido, carinho e por ser uma Arcanjo na minha vida.

Aos membros do NHCL, em especial aos meus coorientadores Prof. Dr. Antonio Roberto e Prof^a Dr^a Betânia Hatzlhofer, pelo apoio técnico e científico.

E por fim, a todos aqueles que contribuíram para a concretização desse mestrado.

Os meus sinceros agradecimentos.

“A colaboração é a chave do progresso científico; é quando compartilhamos nossas descobertas que a ciência avança”. (Stephen Hawking)

RESUMO

A anemia falciforme (AF), doença causada por uma mutação em homozigose no gene da beta globina e formação de uma variante estrutural da hemoglobina (HbS), é caracterizada por quadro hemolítico e inflamatório crônico desencadeando sintomatologia heterogênea entre os pacientes. O grupo heme, liberado na hemólise, promove a ativação do inflamassoma NLRP3 culminando na liberação de IL-1 β e IL-18. Polimorfismos no gene *NLRP3* já foram associados com doenças inflamatórias e podem estar relacionados com a fisiopatologia da AF. Neste estudo foi avaliada a associação dos polimorfismos rs10754558 e rs4612666 do gene do inflamassoma *NLRP3* em 880 indivíduos (58% adultos e 42% pediátricos) com AF atendidos no HEMOPE. As genotipagens foram realizadas utilizando sondas TaqMan®. No grupo pediátrico, o SNP rs10754558 foi associado com menor frequência de sequestro esplênico agudo (SEA) nos pacientes de genótipo CC ($p = 0,003$) e alelo C ($p = 0,009$). Nestes mesmos pacientes foram observadas menor incidência cumulativa para o desenvolvimento SEA ($p = 0,003$) quando comparados os genótipos CC versus CG/GG, assim também, foram associados com menor recorrência dessa manifestação clínica nos pacientes com genótipo CC ($p=0,001$) e com o alelo C ($p = 0,0008$). O rs10754558 também foi associado com maior frequência de priapismo no grupo pediátrico ($p = 0,047$). Os pacientes pediátricos de genótipo CC para o polimorfismo rs1075455 apresentaram menores níveis de hemoglobina ($p = 0,045$). No grupo adulto não foram encontradas associações para os SNPs analisados e nem para o SNP rs4612666 no grupo pediátrico. Dessa forma, esses resultados apontam o polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* como um potencial modulador de risco para complicações clínicas de pacientes com AF.

Palavras-chave: Doença falciforme; Inflamassoma NLRP3; rs10754558; rs4612666.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA), a disease caused by a homozygous mutation in the beta-globin gene and the formation of a structural variant of hemoglobin (HbS), is characterized by a chronic hemolytic and inflammatory condition that leads to heterogeneous symptoms among patients. The heme group, released during hemolysis, triggers the activation of the NLRP3 inflammasome, resulting in the release of IL-1 β and IL-18. Polymorphisms in the *NLRP3* gene have been previously associated with inflammatory diseases and may be related to the pathophysiology of SCA. In this study, the association of the rs10754558 and rs4612666 polymorphisms of the *NLRP3* inflammasome gene was evaluated in 880 individuals (58% adults and 42% pediatric) with SCA treated at HEMOPE. Genotyping was performed using TaqMan® probes. In the pediatric group, the SNP rs10754558 was associated with a lower frequency of acute splenic sequestration (ASS) in patients with the CC genotype ($p = 0.003$) and the C allele ($p = 0.009$). These patients also showed a lower cumulative incidence of ASS development ($p = 0.003$) when comparing genotypes CC versus CG/GG. Likewise, they were associated with a lower recurrence of this clinical manifestation in patients with the CC genotype ($p = 0.001$) and the C allele ($p = 0.0008$). rs10754558 was also associated with a higher frequency of priapism in the pediatric group ($p = 0.047$). Pediatric patients with the CC genotype for the rs1075455 polymorphism had lower hemoglobin levels ($p = 0.045$). No associations were found in the adult group for the analyzed SNPs or for the SNP rs4612666 in the pediatric group. Thus, these results suggest that the rs10754558 polymorphism in the *NLRP3* gene could be a potential risk modulator for clinical complications in SCA patients.

Keywords: Sickle cell disease; NLRP3 inflammasome; rs10754558; rs4612666.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Alterações genéticas no gene da beta globina.....	19
Figura 2 -	Número estimado de nascimentos de indivíduos com anemia falciforme por 100.000 nascimentos por país no ano de 2015..	20
Figura 3 -	Estimativa de casos de doença falciforme (DF) e traço falciforme (AS) por nascidos vivos e óbitos por DF relatados no Brasil no ano de 2021	21
Figura 4 -	Resumo dos principais eventos fisiopatológicos da anemia falciforme..	23
Figura 5 -	Contribuição da hemólise intravascular para vasculopatia, inflamação e vaso-oclusão.....	27
Figura 6 -	Complicações clínicas comuns da anemia falciforme.	34
Figura 7 -	Componentes estruturais dos inflamassomas.....	39
Figura 8 -	Informações estruturais do inflamassoma NLRP3.	40
Figura 9 -	Priming e ativação do inflamassoma NLRP3.	42
Figura 10 -	Mecanismos fisiopatológicos da AF induzidos pelo heme e inflamassoma.....	45
Figura 11 -	Organização estrutural do gene <i>NLRP3</i>	47
Figura 12 -	Representação esquemática de polimorfismos no gene <i>NLRP3</i> comumente investigados em relação a desfechos patológicos.....	48
Figura 13 -	Incidência cumulativa de sequestro esplênico agudo (SEA) em pacientes pediátricos com AF de acordo com modelo dominante para o polimorfismo rs10754558 do gene <i>NLRP3</i>	64
Figura 14 -	Incidência cumulativa de priapismo em pacientes pediátricos com AF de acordo com modelo dominante para o polimorfismo rs10754558 do gene <i>NLRP3</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo separado por faixa etária.	57
Tabela 2 -	Caracterização clínica dos pacientes adultos incluídos no estudo....	58
Tabela 3 -	Caracterização clínica dos pacientes pediátricos incluídos no estudo.	59
Tabela 4 -	Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos rs10754558 e rs4612666 do gene <i>NLRP3</i> na população total e dividida por faixa etária.	60
Tabela 5 -	Comparação dos achados clínicos-laboratoriais dos pacientes pediátricos com AF para o polimorfismo <i>NLRP3</i> rs10754558, conforme modelo de herança dominante.	62
Tabela 6 -	Regressão logística binária e regressão de riscos proporcionais de Cox univariada e multivariada para o desenvolvimento de sequestro esplênico agudo no grupo pediátrico.	66
Tabela 7 -	Associação dos alelos e genótipos do polimorfismo <i>NLRP3</i> rs10754558, com o número de eventos de sequestro esplênico agudo (SEA) em pacientes pediátricos com AF.	67
Tabela Suplementar 1 -	Estimativa de casos de doença falciforme (DF) e traço falciforme (AS) por nascidos vivos e número de óbitos por DF relatados no Brasil no ano de 2021.	98
Tabela Suplementar 2 -	Comparação dos achados clínicos-laboratoriais dos pacientes pediátricos com AF para o polimorfismo <i>NLRP3</i> rs4612666, conforme modelo de herança codominante.	99
Tabela Suplementar 3 -	Comparação dos achados clínicos-laboratoriais dos pacientes adultos com AF para o polimorfismo <i>NLRP3</i> rs4612666, conforme modelo de herança codominante.	101
Tabela Suplementar 4 -	Comparação dos achados clínicos-laboratoriais dos pacientes adultos com AF para o polimorfismo <i>NLRP3</i> rs10754558, conforme modelo de herança codominante.	103

Tabela Suplementar 5 - Comparação dos achados clínicos-laboratoriais dos pacientes com AF para o polimorfismo <i>NLRP3</i> rs10754558, conforme modelo de herança codominante.....	105
Tabela Suplementar 6 - Associação das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo <i>NLRP3</i> rs10754558, com o número de eventos de priapismo em pacientes pediátricos com AF.	107

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
α	Alfa
$\alpha^{3,7kb}$	Deleção $\alpha^{3.7kb}$
β	Beta
β^S	Cadeia globínica beta com alteração para a formação da Hb S
2,3-DPG	2,3 difosfoglicerato
AF	Anemia Falciforme
ARB	Árabe-Indiano
ASC	Proteína adaptadora do tipo <i>speck</i> associada à apoptose contendo um domínio CARD
AVC	Acidente vascular cerebral
BEN	Benin
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
BTK	Tirosina quinase de Bruton
CAPS	Síndrome periódica associada à criopirina
CAR	República Central Africana
CARD	Domínio de recrutamento de caspase
CLRs	Receptores de lectina tipo C
CVO	Crise vaso-oclusiva
DAMPs	do inglês, <i>damage-associated molecular patterns</i>
DCV	Doença cerebrovascular
DF	Doença falciforme
DTC	Doppler transcraniano
eDAMPs	do inglês, <i>erythrocyte damage-associated molecular patterns</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ET-1	Endotelina-1
FvW	Fator de von Willebrand
GSDMD	Gasdermina D
GWAS	do inglês, <i>Genome-Wide Association Study</i>
Hb A	Hemoglobina A

Hb AS	Indivíduo traço falciforme
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb S	Hemoglobina S
Hb S/ β^0	S/ β^0 talassemia
HBB	Gene da β globina
HMGB1	do inglês, <i>high mobility group box 1 protein</i>
HU	Hidroxiuréia
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
K ⁺	Potássio
LabCen	Laboratório Central
LDH	Lactato desidrogenase
LRR	Domínio de repetições ricas em leucina
MD-2	Fator de diferenciação mieloide-2
miRNAs	microRNAs
MPTs	Modificações pós-traducionais
NETs	do inglês <i>neutrophil extracellular traps</i>
NEK7	Quinase relacionada ao NIMA 7
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
NOD	Receptores do tipo NOD
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PS	Fosfatidilserina
PRRs	do inglês, <i>pattern recognition receptors</i>
PYD	Domínio de pirina
RLRs	Receptores semelhantes a RIG-I
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Radicais livres de oxigênio
SEA	Sequestro esplênico agudo
SEN	Senegal

SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SRE	Sistema retículo endotelial
STA	Síndrome torácica aguda
TLRs	Receptores do tipo Toll
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VCM	Volume corpuscular médio
VMMF	Velocidade máxima de fluxo
WBC	do inglês, <i>White blood cells</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 ANEMIA FALCIFORME	18
2.1.1 Breve histórico e etiologia	18
2.1.2 Epidemiologia.....	20
2.1.2 Fisiopatologia	22
2.1.2.1 Vaso-oclusão	24
2.1.2.2 Hemólise	26
2.1.2.3 Inflamação.....	28
2.2 COMPLICAÇÕES CLÍNICAS	30
2.3 MODULAÇÃO GENÉTICA NA HETEROGENEIDADE CLÍNICA DA ANEMIA FALCIFORME.....	35
2.4 OS INFLAMASSOMAS.....	37
2.4.1 Inflamassoma NLRP3: Estrutura e função	39
2.4.2 Ativação e formação do inflamassoma NLRP3	41
2.4.3 Papel do inflamassoma NLRP3 na anemia falciforme	44
2.5 POLIMORFISMOS NO GENE NLRP3.....	47
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1 CASUÍSTICA	52
4.2 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS	52
4.3 ASPECTOS ÉTICOS	54
4.4 DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.....	54
4.5. ANÁLISE MOLECULAR	54
4.5.1 Extração de DNA genômico e determinação dos marcadores clássicos ..	54
4.5.2 Genotipagem dos polimorfismos do gene <i>NLRP3</i>	55
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5 RESULTADOS.....	57

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA COORTE.....	57
5.2 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE NLRP3 E DETERMINAÇÃO DOS MODULADORES CLÁSSICOS DA AF	60
5.3 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPS DO GENE NLRP3 COM AS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA AF	61
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	93
ANEXO B – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	95
APÊNDICE A – TABELA SUPLEMENTAR 1.....	98
APÊNDICE B – TABELA SUPLEMENTAR 2.....	99
APÊNDICE C – TABELA SUPLEMENTAR 3.....	101
APÊNDICE D – TABELA SUPLEMENTAR 4.....	103
APÊNDICE E – TABELA SUPLEMENTAR 5.....	105
APÊNDICE F – TABELA SUPLEMENTAR 6.....	107

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hereditária causada pela homozigose de uma mutação de ponto no gene da globina β (HBB), a qual leva a substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina na 6ª posição da cadeia β globínica, resultando na formação de uma variante estrutural da hemoglobina, a hemoglobina S (Hb S). Sob condições de hipóxia, a Hb S se organiza na forma de polímeros, causando alterações morfológicas na hemácia, resultando por fim na falcização da mesma. A interação dessas células falcizadas com o endotélio vascular, leva a produção de radicais de oxigênio pelas células endoteliais, além da ativação de fatores de transcrição que regulam a síntese de moléculas de adesão. Este panorama produz um quadro pró-inflamatório, com ativação de leucócitos e plaquetas circulantes e aumento de citocinas pró-inflamatórias, culminando por fim em episódios de vaso-oclusão, seguido por isquemia e infarto em vários tecidos. A ocorrência desses eventos, juntamente com a hemólise, compõe um conjunto de fatores fisiopatológicos determinantes da grande maioria dos sinais e sintomas presentes nos pacientes com AF.

Grande parte da hemólise na AF ocorre via reconhecimento e destruição extravascular das hemácias falcizadas por macrófagos teciduais, entretanto cerca de um terço da hemólise é intravascular. A hemólise crônica, característica da doença, promove a liberação constante de hemoglobina livre que é oxidada liberando o heme, um importante padrão molecular associado a danos (DAMP, do inglês *Damage-associated molecular patterns*). O heme promove a formação de espécies reativas de oxigênio, ativação do receptor Toll-like 4 (TLR4, do inglês, *Toll like receptor*), geração de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*) e liberação de mais DAMPs derivados de tecidos ou células. O heme livre pode contribuir para a inflamação estéril, ativando o complexo inflamassoma nas células vasculares e inflamatórias com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, a inflamação estéril promove ainda mais a vaso-oclusão por meio da ativação contínua da adesão de neutrófilos, plaquetas e células endoteliais.

Os inflamassomas são complexos multiméricos ativados por DAMPs derivados de células e tecidos. Após a ativação, os inflamassomas processam e liberam IL-1 β e IL-18 ativadas. Dentre os inflamassomas, o NLRP3 é o complexo

inflamassoma mais estudado. Foi apontado que o heme livre e a hemoglobina livre oxidada promovem a ativação do NLRP3. Dessa forma, tendo em vista o processo de hemólise crônica, é provável que na AF a ativação de NLRP3 esteja aumentada. Níveis elevados de NLRP3, IL-1 β e IL-18 foram observados em pacientes com AF, em comparação com indivíduos controles saudáveis, sugerindo papel do inflamassoma na fisiopatologia da doença.

Uma das características da AF é a variabilidade de suas manifestações clínicas, e as razões para essa heterogeneidade ainda não são completamente entendidas. Diante disso, percebe-se a relevância da investigação de marcadores genéticos específicos que possam predizer a susceptibilidade de indivíduos portadores de AF quanto ao risco de desenvolvimento de complicações clínicas graves relacionadas à doença. Polimorfismos nos genes *NLRP3* e *IL18* já foram relacionados com quadro clínico adverso em pacientes com AF. Assim, considerando o papel do inflamassoma NLRP3 no desencadeamento de quadro inflamatório exacerbado, a investigação de polimorfismos no gene *NLRP3* torna-se relevante a fim de identificar possíveis marcadores prognósticos, além de fornecer novos dados sobre a patogênese desta doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANEMIA FALCIFORME

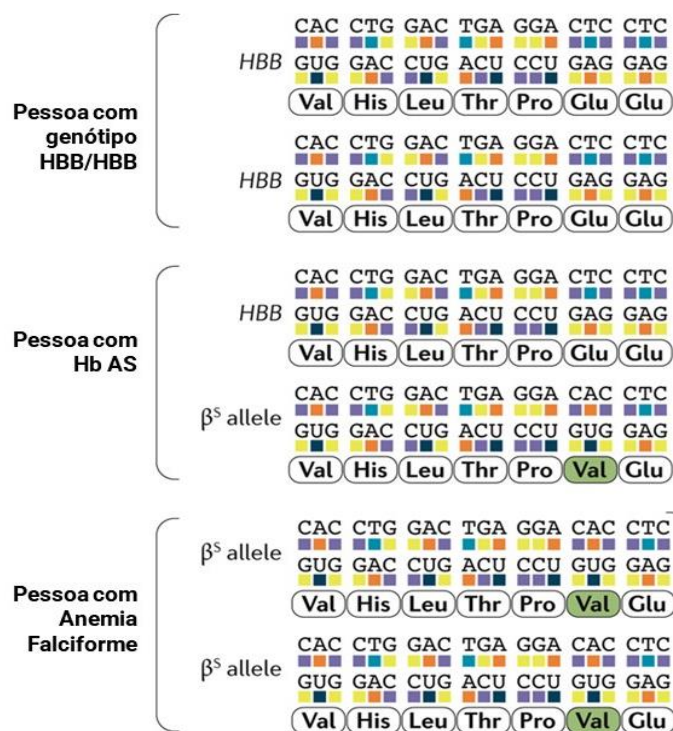
2.1.1 Breve histórico e etiologia

Em 1910, o médico James Herrick, descreveu o caso de um jovem afrodescendente nos Estados Unidos que apresentava anemia grave, icterícia, úlcera de perna e dores fortes nas articulações aliados à presença de hemácias peculiarmente alongadas no estiraço sanguíneo (HERRICK, 1910). A primeira descrição na literatura de um caso de anemia falciforme (AF) seguiu-se de anos de relatos de caso similares e de rápido desenvolvimento na elucidação das bases etiológicas da doença (SERJEANT, 2010; SERJEANT *et al.*, 2017). O formato em forma de foice, característico das hemácias dos doentes, batizou a condição de “doença das células falciformes” ou anemia falciforme (MASON, 1922). Àquela época o termo AF era designado para descrever indivíduos, em sua maioria negros, com predisposição hereditária para anemia, episódios de icterícia e crises de dor nas articulações (HAHN; GILLESPIE, 1927). O padrão de herdabilidade autossômico recessivo da AF foi corretamente proposto em 1947 pelo estudante de medicina baiano Jessé Accioly (ACCIOLY, 1947). Nesse tempo, o trabalho permaneceu oculto nos arquivos da universidade local, recebendo reconhecimento internacional apenas em 1973 (AZEVEDO, 1973), enquanto os já consagrados trabalhos de Neel e Beet levaram o pioneirismo da descoberta (BEET, 1949; NEEL, 1949).

Ainda em 1949, ao observar diferenças no padrão eletroforético das hemoglobinas de indivíduos normais, de doentes e de portadores da AF, Linus Pauling e colaboradores, demonstraram que a AF era uma doença molecular, a primeira já descrita (PAULING *et al.*, 1949). Apoiados nestas descobertas, os estudos subjacentes em bioquímica e genética contribuíram para a compreensão das bases moleculares desta, e de outras doenças. Hoje sabe-se que a AF é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva decorrente de uma mutação no gene que codifica a beta globina (*HBB*), localizado no cromossomo 11p15.15 (SERJEANT *et al.*, 2017) (Figura 1). A alteração molecular da AF consiste na substituição da base adenina por timina no sexto códon do gene *HBB*, levando à troca do aminoácido ácido glutâmico pela valina (*HBB* rs334; β^S GAG→GTG; glu6val). Dessa forma, ao

invés da síntese de tetrâmeros de hemoglobina normal (Hb A), há a formação de uma hemoglobina variante, a hemoglobina S (Hb S) (KATO *et al.*, 2018; WILLIAMS; THEIN, 2018).

Figura 1 - Alterações genéticas no gene da beta globina. Indivíduos com hemoglobina A (HbA) possuem duas subunidades α -globina e duas subunidades β -globina a qual é codificada pelo gene HBB. O alelo β^S , é resultante de uma substituição de adenina por timina levando a substituição do ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia β -globina madura, formando a hemoglobina S. Indivíduos com um alelo β^S têm o traço falciforme (HbAS), enquanto indivíduos com anemia falciforme, possuem os dois alelos β^S .



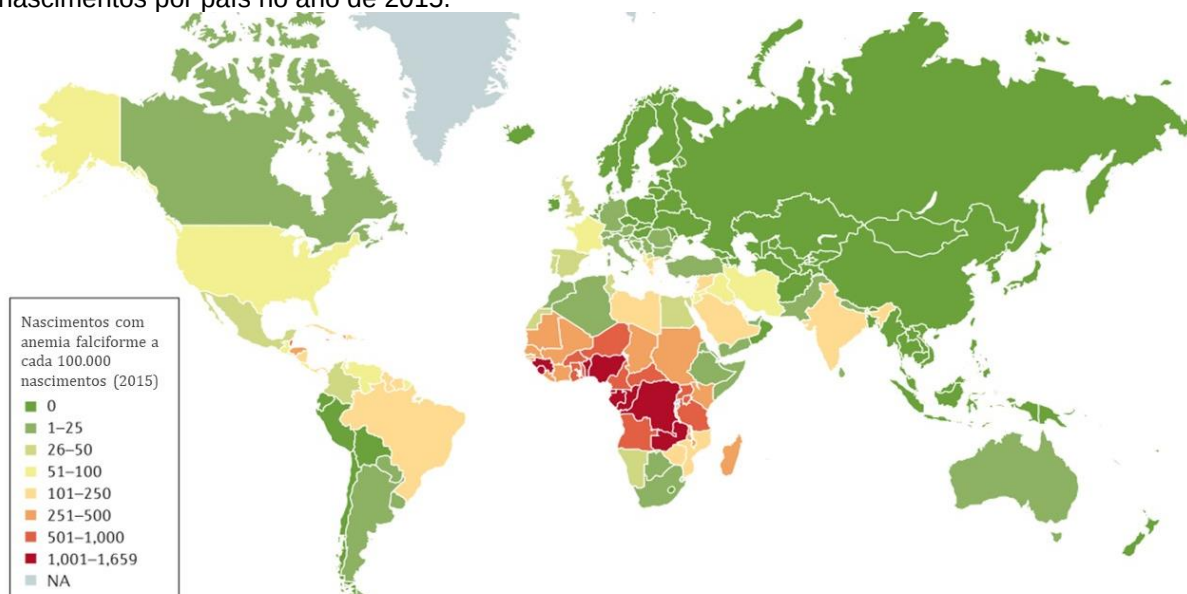
Fonte: Adaptado de Kato *et al.* 2018.

Ao espectro de doenças caracterizadas pela presença da alteração da Hb S em homozigose ou heterozigose composta, dá-se o nome de doença falciforme (DF). Dos casos de DF, a maioria são de indivíduos com homozigose para a Hb S, isto é, com AF (REES *et al.*, 2010). A alteração β^S pode ainda ser herdada em associação com outros defeitos qualitativos ou quantitativos na cadeia beta globínica, como outras hemoglobinas variantes (por exemplo Hb C e Hb D), ou distúrbios beta-talassêmicos (β^+ ou β^0 talassemia), justificando a clínica variável da DF (AZAR; WONG, 2017; PINCEZ *et al.*, 2022). A condição de heterozigose (Hb AS), chamada de traço falciforme, é clinicamente assintomática e não há formação de hemácias falcizadas no sangue sob condições normais (AZAR; WONG, 2017).

2.1.2 Epidemiologia

A origem presumida do aparecimento da mutação do alelo β^S remonta de mais 7.000 anos atrás no continente africano (SHRINER; ROTIMI, 2018). Assim, é sem surpresa que atualmente a prevalência da AF seja alta em regiões endêmicas para a malária como a África subsaariana, o Oriente Médio, e a Índia devido à vantagem de sobrevivência que o traço falciforme proporciona contra a infecção pelo *Plasmodium falciparum* (PIEL *et al.*, 2010; SERJEANT, 2013). Aliado a isso, as ondas migratórias populacionais e o comércio de escravos vindos da África favoreceram a dispersão do alelo β^S mundialmente (PIEL *et al.*, 2014, 2017). Por ano, aproximadamente 300.000 nascimentos no mundo são de indivíduos com AF e estimativas apontam que no ano de 2050 este número possa chegar a mais 400.000 nascimentos, dos quais 85% serão na África (Figura 2) (PIEL *et al.*, 2013).

Figura 2 - Número estimado de nascimentos de indivíduos com anemia falciforme por 100.000 nascimentos por país no ano de 2015.



Fonte: Adaptado de Kato *et al.* (2018).

No Brasil, a AF é mais prevalente em indivíduos afrodescendentes, reflexo do tráfico negreiro forçado na época da colonização (SANTOS *et al.*, 2021). Segundo dados estimados do Ministério da Saúde, estima-se que existam entre 60.000 a 100.000 pessoas com DF no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). A prevalência do alelo β^S no Brasil é bastante heterogênea, variando de 1.2% a 10.9%

a depender da região do país, sendo mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste (KATO *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2021).

Considerado um problema de saúde pública no país, dados mostram que de 2000-2019, ocorreram 2.422 mortes devido a DF em indivíduos menores de 20 anos, com maior incidência até os 4 anos de idade (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022). Segundo dados do Programa de Triagem Neonatal, para o ano de 2021, foi estimada uma incidência de DF no Brasil de 1 para cada 2.567 nascidos vivos, de traço falciforme de 1 para cada 43 nascidos vivos e 442 mortes atribuídas à DF (Tabela suplementar 1). Em Pernambuco, a incidência de DF no ano de 2021 foi de 1 para cada 3.236 nascidos vivos, de traço falciforme de 1 para cada 51 nascidos vivos e 15 mortes atribuídas à DF (PNTN-CGSH/DAET/SAES/MS, 2023) (Figura 3).

Figura 3 - Estimativa de casos de doença falciforme (DF) e traço falciforme (AS) por nascidos vivos e óbitos por DF relatados no Brasil no ano de 2021.



Fonte: Autoria própria, com dados extraídos do Relatório Anual de dados do PNTN, 2020-2022, Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM/MS e Plataforma Integrada de Vigilância em Saúde – Plataforma IVIS/MS.

O ano de 2001 marca a época em que, mediante portaria nº 822/01, o Ministério da Saúde incorporou a pesquisa de DF e outras hemoglobinopatias como parte do Programa Nacional de Triagem Neonatal, atingindo a universalização para todos os estados em 2014 (SANTOS *et al.*, 2021; SILVA-PINTO *et al.*, 2019). Além

do diagnóstico precoce, o *screening* de hemoglobinopatias contribuiu para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes e implementação de medidas profiláticas, cruciais principalmente nos 5 primeiros anos de vida (SANTOS *et al.*, 2021). Apesar dos avanços, as taxas de mortalidade ainda apontam para a necessidade de descentralização do diagnóstico e do tratamento da doença no país (CORDOVIL *et al.*, 2023).

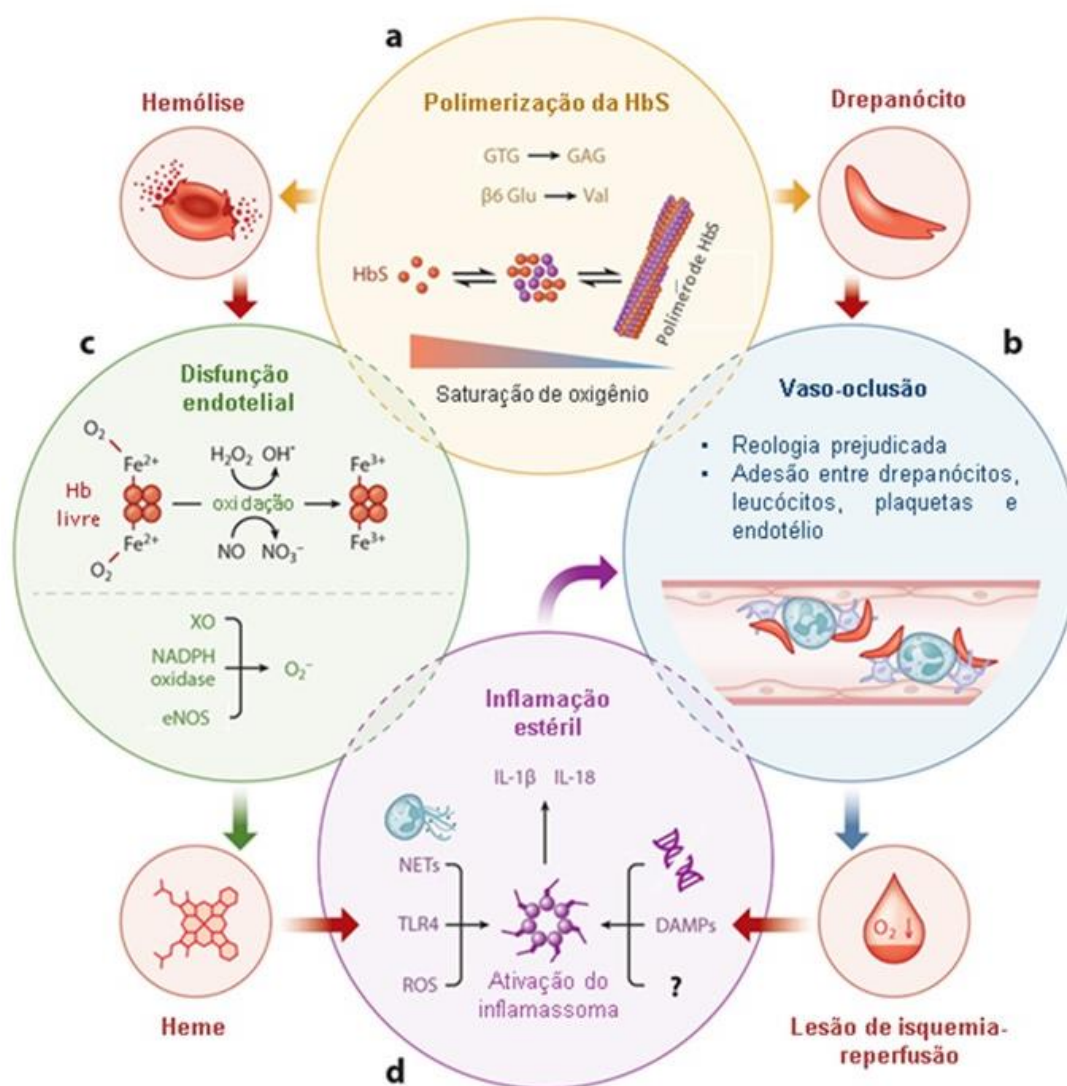
2.1.2 Fisiopatologia

O evento central responsável pelo desencadeamento da fisiopatologia da AF é a polimerização da Hb S em situações de baixa tensão de oxigênio (O_2) (WILLIAMS; THEIN, 2018). A troca do aminoácido hidrofílico ácido glutâmico pela valina hidrofóbica afeta a região externa do tetrâmero de hemoglobina. Dessa forma, a hidrofobicidade do aminoácido valina promove a sua interação molecular com regiões hidrofóbicas de cadeias beta globínicas adjacentes, favorecendo a polimerização dos tetrâmeros quando desoxigenados (EATON, 2020; PICCIN *et al.*, 2019). Os polímeros individuais rapidamente se desenvolvem e se agregam em longas fibras que levam à deformabilidade e rigidez dos eritrócitos, tornando-os falcizados (SUNDD *et al.*, 2019). O processo de polimerização é reversível quando restabelecidas tensões normais de O_2 . No entanto, ciclos de polimerização e despolimerização subsequentes causam danos ao citoesqueleto eritrocitário, tornando as células irreversivelmente falcizadas (KATO *et al.*, 2018; STEINBERG, 2008). A hemácia falcizada, ou drepanócito, possui modificações nas propriedades da membrana, com redução da sua flexibilidade e resistência, além de maior aderência ao endotélio vascular (Figura 4) (KUYPERS, 2014).

Além da concentração de O_2 , o fenômeno de polimerização da Hb S é dependente de outros fatores como a concentração intraeritrocitária de Hb S, concentração de difosfoglicerato (2,3-DPG), pH, temperatura, redução de água e íons celulares (desidratação) e presença de outras hemoglobinas como a Hb A ou a Hb fetal (Hb F) (FERRONE, 2018; PICCIN *et al.*, 2019). A taxa de polimerização é diretamente proporcional à concentração intraeritrocitária de Hb S e inversamente proporcional à concentração de Hb F. Esta última copolimeriza menos efetivamente com a Hb S, diminuindo, portanto, a taxa de falcização, impactando favoravelmente nos desfechos clínicos da doença (AZAR; WONG, 2017; SAAH *et al.*, 2022). Além

disso, a desidratação eritrocitária afeta consideravelmente a polimerização da Hb S.

Figura 4 - Resumo dos principais eventos fisiopatológicos da anemia falciforme. (A) A polimerização da desoxi-HbS leva à formação de eritrócitos falcizados. (B) As células falcizadas desencadeiam a oclusão microvascular através de interações com neutrófilos e plaquetas ativadas e adesão ao endotélio vascular, levando à isquemia e hipóxia tecidual. (C) Devido à hemólise há liberação de hemoglobina com consequente oxidação do heme. O heme funciona como um DAMP que ativa as células endoteliais, macrófagos e neutrófilos e promove a formação de NETs via ligação com o TLR4. A NADPH oxidase, a xantina oxidase (XO) e a NO-sintase endotelial (eNOS) geram radicais livres de oxigênio que contribui para a disfunção endotelial. (D). Tais fatores contribuem para a inflamação estéril, ativando a via do inflamassoma em células vasculares e inflamatórias para liberar IL-1 β e IL-18. Finalmente, a inflamação estéril promove ainda mais a vaso-oclusão, aumentando a adesividade dos neutrófilos, plaquetas e células endoteliais.



Fonte: Adaptado de Sundd et al. (2019).

Na AF, a atividade de importantes canais de transporte iônico membranares, como o canal de cotransporte de potássio (K^+) e cloro (Cl^-) e o canal de Gardos

[canal de transporte de K^+ ativado pelo aumento do cálcio (Ca^{2+}) intracelular], encontra-se alterada (BRUGNARA, 2018). O efluxo aumentado de K^+ pelos dois sistemas de transporte, é acompanhado pelo efluxo de água, causando desidratação celular e consequentemente aumento na concentração de Hb S, favorecendo a polimerização (BRUGNARA, 2018; SHMUKLER *et al.*, 2019).

A falcização promove alterações reológicas e lesão celular culminando por fim em uma cascata de eventos que afetam diversos tipos celulares e tecidos, com diversas consequências clínicas e patológicas (WILLIAMS; THEIN, 2018). Assim a fisiopatologia da AF pode ser dividida em quatro eventos cruciais, que acontecem simultaneamente e se retroalimentam: a polimerização da desoxi-Hb S, a adesão endotelial com oclusão na microvasculatura, a hemólise e disfunção endotelial e a inflamação estéril (SAAH *et al.*, 2022) (Figura 4).

2.1.2.1 Vaso-oclusão

A vaso-oclusão, um dos principais eventos responsáveis pela fisiopatologia da AF, consiste na obstrução de vasos, principalmente na microcirculação, favorecida pelo fluxo sanguíneo mais lento e concentrações de O_2 diminuídas nessas regiões (CONRAN; EMBURY, 2021). A nível celular, os eventos vaso-oclusivos são resultado da disfunção endotelial e interações entre os eritrócitos falcizados aderentes, leucócitos e plaquetas. A hemácia falcizada possui perda da distribuição assimétrica de fosfolípidios na bicamada lipídica membranar, resultando na exposição de fosfatidilserina (PS) negativamente carregada na sua superfície externa (KUYPERS, 2014). Essa mudança, além de favorecer a retirada precoce dos eritrócitos de circulação pelo sistema retículo endotelial (SRE), também promove uma maior adesão dessas células por meio da interação da PS com receptores de células endoteliais, como o receptor específico de fosfatidilserina (PSR) e a molécula de adesão CD36 (GpIIb) (PICCIN *et al.*, 2019; SETTY; GAYEN BETAL, 2008).

Além desses receptores, a interação de várias moléculas de adesão tem sido implicada na fisiopatologia do processo vaso-oclusivo, incluindo a integrina $\alpha 4\beta 1$ expressa na superfície de leucócitos, a proteína luterana/molécula de adesão celular basal (Lu/BCAM) expressa em eritrócitos e em células endoteliais, a trombospondina 1 (TSP-1) e fator de von Willebrand (FvW) que medeiam a

interação dos eritrócitos com o endotélio, entre outros (DARBARI *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2022).

Aliado a isto, a interação dos eritrócitos falcizados com o epitélio endotelial, leva a produção de radicais livres de oxigênio (ROS) pelas células endoteliais, o que por sua vez induz a ativação da expressão de vários genes que expressam moléculas de adesão como a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), a E-selectina e a P-selectina na superfície do endotélio (CONRAN; EMBURY, 2021). A P-selectina, também expressa na superfície de plaquetas, é uma importante molécula para desencadeamento da vaso-oclusão, pois medeia o rolamento e adesão dos leucócitos e hemácias falcizadas à superfície do vaso, além de favorecer a formação de agregados entre as plaquetas e os neutrófilos (KUTLAR; EMBURY, 2014; ZHANG, DACHUAN *et al.*, 2016). Dessa forma, além dos eritrócitos falcizados, os leucócitos e plaquetas aparecem como importantes contribuintes para a oclusão vascular (TORRES; HIDALGO, 2022; ZHANG, DACHUAN *et al.*, 2016).

Outro evento pelo qual os neutrófilos podem contribuir para a vaso-oclusão, é por meio da formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*). As NETs são estruturas extracelulares de cromatina descondensada, histonas e proteínas derivadas de grânulos, como elastase neutrofílica, gelatinase, catepsina G e mieloperoxidase (NADER *et al.*, 2021a; TORRES; HIDALGO, 2022). Fisiologicamente estas estruturas são liberadas pelos neutrófilos em resposta à presença de patógenos, favorecendo a ativação da resposta imune inata (SUNDD *et al.*, 2019). Na AF, a liberação das NETs é favorecida pela presença de mediadores liberados no processo hemolítico, como o heme, o que contribui para a agregação de outros neutrófilos e plaquetas, favorecendo a vaso-oclusão (CHEN, GRACE *et al.*, 2014; NADER; CONRAN; *et al.*, 2021; ZHANG, DACHUET *et al.*, 2016).

Em conjunto, estes eventos formam um panorama complexo com interação de diversos tipos celulares, moléculas de adesão e mediadores inflamatórios culminando, por fim, na oclusão de vasos de pequeno calibre, seguido de hipóxia, isquemia, lesão de reperfusão, dano tecidual isquêmico e inflamação (JANG *et al.*, 2021; SUNDD *et al.*, 2019).

2.1.2.2 Hemólise

A anormalidade estrutural da hemácia falcizada além de favorecer a adesão celular, também determina flexibilidade e resistência eritrocitária reduzidas, sendo a destruição precoce ou hemólise crônica uma característica marcante na AF (CONRAN; BELCHER, 2018). A destruição dos drepanócitos é tanto intravascular, mediada pelo sistema complemento, quanto extravascular, mediada pelo reconhecimento das hemácias alteradas por macrófagos do SRE (PICCIN *et al.*, 2019). A hemólise ocorre principalmente via fagocitose extravascular por macrófagos teciduais, entretanto cerca de um terço ocorre através de destruição intravascular (KATO *et al.* 2018).

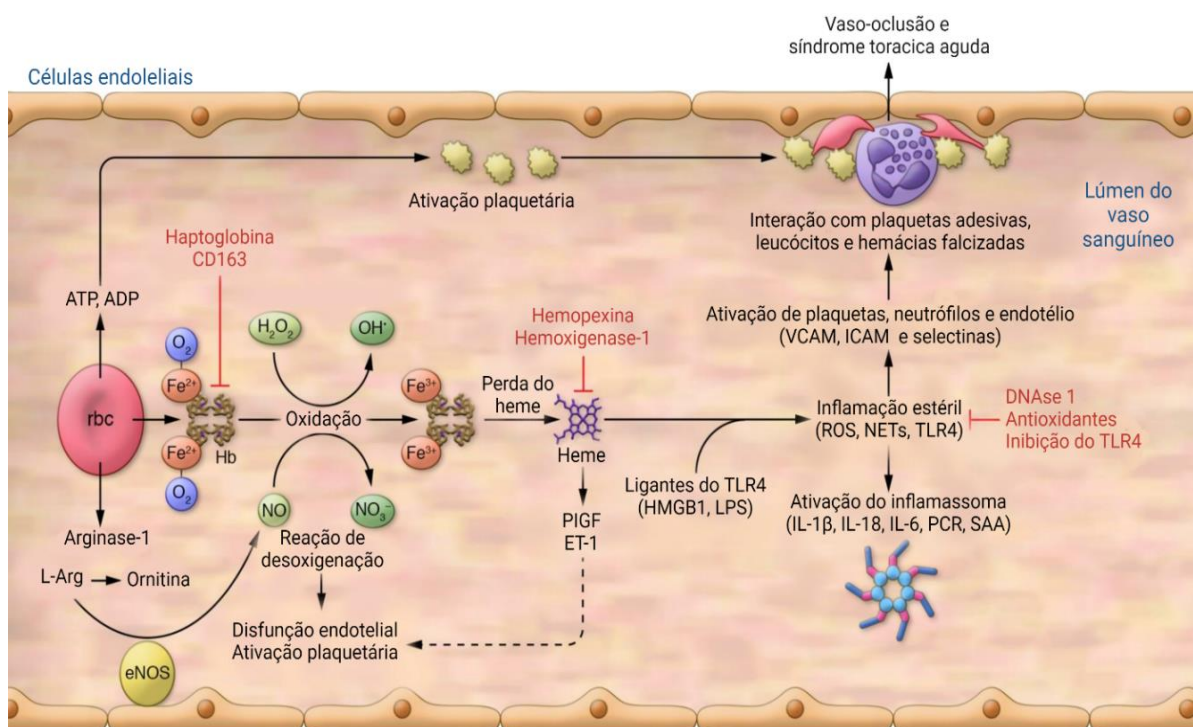
A hemoglobina (Hb), liberada durante a destruição das hemácias, é propensa à oxidação, levando à formação de formas de Hb oxidadas, como a metahemoglobina e ferril Hb (GBOTOSHO *et al.*, 2021). A oxidação do ferro heme enfraquece a associação entre este e a cadeia globínica, tornando mais fácil, portanto, a sua liberação (NYAKUNDI *et al.*, 2019b).

Sob condições normais, a Hb livre e o heme livre, são depurados por meio da sua ligação com as glicoproteínas haptoglobina e a hemopexina, respectivamente (Figura 5) (BUEHLER *et al.*, 2009; PICCIN *et al.*, 2019). No entanto, a hemólise crônica esgota a capacidade dessas proteínas de remoção dos subprodutos tóxicos na hemólise (YALAMANOGLU *et al.*, 2018). Como consequência, a liberação aumentada de moléculas intraeritrocitárias, desencadeia a diminuição da disponibilidade do óxido nítrico (NO) e o aumento do estresse oxidativo e inflamação (GBOTOSHO *et al.*, 2021).

O NO é um gás vasodilatador produzido principalmente pelas células endoteliais, numa reação que consiste na conversão do aminoácido L-arginina em citrulina mediado pela classe de enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (MORRIS, 2011). Na AF, a diminuição da biodisponibilidade do NO é desencadeada por três mecanismos resultantes da hemólise. No primeiro mecanismo, a Hb livre sequestra o NO formando metahemoglobina e nitrato (KATO *et al.*, 2017; REITER *et al.*, 2002). Além disso, a arginase-1, uma enzima intraeritrocitária liberada durante a lise das hemácias, consome a arginina que é o principal substrato para síntese de NO, produzindo ornitina (KATO GJ, HEBBEL RP, STEINBERG MH, 2009). Por fim, a Hb e o heme livre, aumentam o estresse oxidativo e as ROS como a xantina

oxidase diminuem a disponibilidade de NO (KATO *et al.*, 2017). Dessa forma, a depleção crônica de NO contribui para a vasoconstrição, vasculopatia proliferativa, ativação de moléculas de adesão endotelial como VCAM-1 e ICAM-1, ativação de plaquetas e produção de endotelina, um potente vasoconstritor (GBOTOSHO *et al.*, 2021; KATO GJ, HEBBEL RP, STEINBERG MH, 2009; STEINBERG, 2008).

Figura 5 - Contribuição da hemólise intravascular para vasculopatia, inflamação e vaso-oclusão. A hemólise intravascular contribui para a diminuição do óxido nítrico (NO). Além disso a hemoglobina oxidada libera heme livre, que pode ativar a liberação do fator de crescimento da placenta (PIGF) e endotelina-1 (ET-1), contribuindo para vasculopatia crônica. O heme e ligantes endógenos (HMGB1) e exógenos (LPS) do receptor toll-like 4 (TLR4) promovem ativação da produção de ROS, armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e ativação do inflamassoma. A hemólise intravascular também libera nucleotídeos de adenina, incluindo ATP e ADP, o que contribui para a ativação plaquetária. Moléculas de adesão na superfície do endotélio ativado (P-selectina, E-selectina, VCAM1, ICAM1) interagem com plaquetas adesivas, neutrófilos e eritrócitos falciformes, favorecendo a vaso-oclusão. L-Arg. L-Arginina; PCR, proteína C reativa; SAA, proteína amiloide A sérica; Orn, ornitina.



Fonte: Adaptado de Kato *et al.* (2017).

O aumento da produção de ROS, desencadeado pelo efeito da Hb e o heme livre, promove ainda, a ativação endotelial e inflamação vascular através da ativação de fatores de transcrição sensíveis a ROS (NADER *et al.*, 2021a). Além de promover a liberação das NETs, o heme também se mostrou como um potente ativador da adesão leucocitária por via dependente de NF- κ B e geração de ROS (Figura 5) (MIGUEL *et al.*, 2021; NADER *et al.*, 2020). Ademais, o heme livre se

mostrou um potente indutor do fator tecidual (TF), sugerindo uma ligação da hemólise crônica com a desregulação de mecanismos trombóticos na AF (DE SOUZA *et al.*, 2017; SETTY *et al.*, 2008).

A Hb e heme livre são considerados padrões moleculares associados a danos eritróides (eDAMPS – do inglês *erythrocyte damage-associated molecular patterns*) (SUNDD *et al.*, 2019). Além disso, o dano induzido por ROS, como a peroxidação da membrana lipídica e a fragmentação do DNA, também contribui para a liberação de vários padrões moleculares associados a danos (DAMPs do inglês *damage-associated molecular patterns*) derivados de tecidos e células (NADER *et al.*, 2020). Dentre os principais DAMPs liberados em decorrência da hemólise estão as microvesículas eritrocitárias, proteína de choque térmico 70 (Hsp70), ATP, DNA extracelular, DNA mitocondrial, proteína de alta mobilidade do grupo Box-1 (HMGB1 – do inglês *high mobility group box 1 protein*) e ciclofilina A (BOZZA; JENEY, 2020; CONRAN; BELCHER, 2018; NADER *et al.*, 2021b; XU *et al.*, 2014). Tanto os eDAMPS quanto os DAMPs têm sido implicados no desencadeamento e propagação do estresse oxidativo e da inflamação estéril (Figura 5).

2.1.2.3 Inflamação

A hemólise crônica é uma importante fonte desencadeadora da inflamação estéril na AF. De fato, eDAMPS e DAMPS descritos, têm sido relacionados com a ativação do sistema imune inato, por meio do seu reconhecimento por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) (BOZZA; JENEY, 2020; DUTRA *et al.*, 2014; DUTRA; BOZZA, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Dentre os principais PRRs, estão as vias sinalização dos receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*) e receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *Nod-like receptors*) (BOZZA; JENEY, 2020; DA GUARDA *et al.*, 2017). O heme livre tem sido descrito com um potente ativador de TLR4 em monócitos/macrófagos e células endoteliais (ALLALI *et al.*, 2020; BELCHER *et al.*, 2014; CONRAN; BELCHER, 2018). Por meio de um mecanismo dependente TLR4 em macrófagos, o heme leva ao aumento da secreção do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). A indução do TLR4 mediado pelo heme livre, promove ainda a ativação do NF- κ B, degranulação dos corpos de Weibel-Palade endotelial, aumento da expressão de moléculas de adesão com a P-

selectina e o FvW, favorecendo assim a vaso-oclusão na AF (BELCHER *et al.*, 2014).

Classicamente, a sinalização via TLR4 induzida pelo seu ligante canônico, o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias, requer a presença dos cofatores CD14 e o fator de diferenciação mieloide-2 (MD-2, do inglês *Myeloid Differentiation Factor-2*) (CONRAN; BELCHER, 2018). Após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) de bactérias, o MD-2 forma um heterodímero estável com o domínio extracelular de TLR4, culminando na ativação de vias de sinalização e produção de citocinas pró-inflamatórias (SALGAR *et al.*, 2023). Foi identificado que o heme, na AF, ativa a sinalização do TLR4 via ligação com MD-2 (BELCHER *et al.*, 2020). Níveis elevados de MD-2 solúvel foram observados no plasma de pacientes com AF e contribuem para a liberação de citocinas dependentes de TLR4 nas células endoteliais, como a interleucina 8 (IL-8) por meio da ligação com heme livre (ZHANG *et al.*, 2021).

Como um agonista pró-inflamatório, o heme também estimula a ativação da via do inflamassoma, um complexo multimérico citoplasmático de reconhecimento de danos que promove a maturação e liberação de IL-1 β e IL-18 (SUNDD *et al.*, 2019). O complexo inflamassoma NLRP3 (do inglês *nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing family, pyrin domain containing 3*) é o mais extensivamente estudado, e consiste classicamente no PRR NLRP3, a proteína *speck-like* associada à apoptose com CARD (ASC), e a protease inflamatória caspase-1 (SALGAR *et al.*, 2023). O heme promove a ativação do complexo NLRP3 tanto em macrófagos quanto em células endoteliais levando à liberação de IL-1 β e IL-18 (DUTRA *et al.*, 2014; ERDEI *et al.*, 2018). Além de promover a ativação do inflamassoma NLRP3 e a secreção de IL-1 β por macrófagos, contribuindo para a inflamação estéril, o heme e a resposta inflamatória desencadeada levam a dano tecidual e letalidade induzida pela hemólise (DUTRA; BOZZA, 2014). Além do heme, outros eDAMPS como a ferril Hb, uma forma de hemoglobina oxidada, contribuem para a ativação do NLRP3 (NYAKUNDI *et al.*, 2019b). Na AF, o inflamassoma NLRP3 está mais expresso em plaquetas em resposta à regulação do HMGB1, TLR4 e a tirosina quinase de Bruton (BTK, do inglês *Bruton tyrosine*

kinase), demonstrando ativação do inflamassoma em outros tipos celulares (VOGEL *et al.*, 2018).

Níveis elevados de IL-1 β e IL-18 já foram observados na AF, indicando a formação de inflamassoma por células inflamatórias (ALAGBE *et al.*, 2018; CERQUEIRA *et al.*, 2011; PITANGA *et al.*, 2016). A citocina IL-1 β pode estimular a ativação de leucócitos e células endoteliais (CONRAN; BELCHER, 2018). Enquanto a IL-18 pode ser importante no estímulo da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares, ativação e recrutamento de neutrófilos, além de produção de IFN- γ , IL-2 e IL-12 (CERQUEIRA *et al.* 2011; CONRAN and BELCHER 2018). Em conjunto, esses achados sugerem que DAMPs resultantes da hemólise, como o heme e a Hb livre, podem desempenhar um papel importante no desencadeamento da inflamação estéril na AF, principalmente por meio de sua ligação a PRRs como o TLR4 e ativação das vias NF- κ B e NLRP3 e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL1 β e IL18 (NADER *et al.*, 2020).

2.2 COMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Os eventos vaso-oclusivos, a hemólise crônica e a inflamação, caraterísticos da fisiopatologia da AF, determinam a ocorrência de complicações clínicas de frequência e gravidade variáveis (KAVANAGH *et al.*, 2022). Os episódios de oclusão da microcirculação podem acontecer em praticamente todos os órgãos e tecidos, atribuindo um caráter sistêmico às complicações da AF (KATO *et al.*, 2018). Os primeiros sintomas clínicos podem aparecer ainda na primeira infância, após o sexto mês de vida, período em que há predomínio de síntese de cadeias globínicas β^S .

A dactilite ou “síndrome mão-pé” afeta crianças até os 04 anos de idade, e é causada por episódios de oclusão de vasos da microcirculação, especialmente aqueles localizados na região medular dos ossos das mãos e pés, levando a inchaço e dor local. A ocorrência de dactilite nos primeiros anos de vida, assim como o número de leucócitos aumentados, foram reportados como importantes preditores de severidade da AF (SILVA *et al.*, 2015).

O sequestro esplênico agudo (SEA), outra complicação comum na infância, é considerado como uma importante causa de morte na primeira década de vida de

pacientes com anemia falciforme (BROUSSE *et al.*, 2012). A prevalência estimada é de 7,5 a 30%, ocorrendo com maior frequência entre 3 meses e 5 anos de idade, sendo 76% dos casos antes dos 2 anos de idade (REZENDE *et al.*, 2009). O SEA resulta do rápido aprisionamento de hemácias no baço, podendo levar à diminuição do volume sanguíneo circulante, choque hipovolêmico e morte (REPARAZ *et al.*, 2022).

Na fisiopatologia desta complicação, a baixa velocidade do fluxo sanguíneo na circulação aberta da polpa vermelha do baço e a relativa acidez local são fatores cruciais (LADU *et al.*, 2021). Estes fatores favorecem a desoxigenação da HbS *in vivo* e consequentemente a falcização eritrocitária. Os eritrócitos falcizados exibem características que favorecem o aprisionamento na polpa vermelha do baço, incluindo rigidez e aumento da expressão de moléculas de adesão, que promovem a interação com a matriz do baço e macrófagos teciduais (BROUSSE *et al.*, 2012, 2014). O tratamento consiste no rápido diagnóstico, suporte clínico e transfusão de concentrado de hemácias (REZENDE *et al.*, 2009). Além disso, a prevenção de novos episódios pode ser alcançada por meio de um regime de transfusão crônico ou esplenectomia (REZENDE *et al.*, 2009).

Dentre as complicações de caráter agudo, a crise vaso-oclusiva (CVO), crise algica ou crise de dor, representa a maior causa de internação hospitalar em pacientes com AF de todas as faixas etárias (STEINBERG, 2008). Os episódios de CVO resultam de eventos de oclusão vascular em diversos tecidos, com lesão de isquemia-reperfusão, ocorrendo mais comumente nas extremidades, tórax, abdome e costas (WILLIAMS; THEIN, 2018). Diversos fatores podem desencadear a CVO, como infecções, febre, desidratação, acidose, exposição a altas temperaturas, umidade e a própria dor, que pode precipitar as crises dolorosas (ARZOUN *et al.*, 2022).

A fisiopatologia da dor na AF é complexa e envolve tanto a dor neuropática, quanto a dor nociceptiva local resultante da ativação de nociceptores teciduais por mediadores inflamatórios (KAVANAGH *et al.*, 2022; VELUSWAMY *et al.*, 2019). As crises dolorosas podem ter duração de horas a dias (ou raramente semanas) e começam no início da infância, tornando-se mais frequentes em adolescentes e adultos (BALLAS *et al.*, 2010). O manejo das CVOs varia desde identificar a causa que desencadeou a crise (se houver), hidratação e uso de analgésicos orais, até

uso de opioides injetáveis nos casos mais severos (ARZOUN *et al.*, 2022). Adicionalmente, estudos recentes com pacientes com AF mostraram que o uso do crizanlizumabe, um anticorpo monoclonal anti P-selectina, foi associado à redução das crises de dor e do tempo até a primeira crise, além da diminuição da necessidade de uso de opioides (MIGOTSKY *et al.*, 2022).

A síndrome torácica aguda (STA), segunda maior causa de internamentos na AF, é definida como um novo infiltrado pulmonar visualizado na imagem de raio-X de tórax, mais qualquer um dos seguintes sintomas: dor torácica pleurítica, hipoxemia, taquipneia ou febre (JAIN *et al.*, 2017; KAVANAGH *et al.*, 2022). Em uma porcentagem dos casos, a STA pode surgir como desdobramento de uma internação por CVO aguda ou desenvolver-se *de novo* como um diagnóstico de internação (NOVELLI; GLADWIN, 2016; STEINBERG, 2008). As causas mais comuns que podem desencadear a STA incluem infecções agudas, embolia gordurosa da medula óssea e microembolia de células sanguíneas agregadas (WILLIAMS; THEIN, 2018). Estudos mostraram que níveis elevados de heme livre plasmático e hemina (porção prostética oxidada da Hb), foram associados com aumento do risco de STA, destacando papel da hemólise crônica na fisiopatologia desta complicação (ADISA *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2013).

Menor idade, menor concentração de HbF, Hb basal mais alta e contagem basal mais alta de leucócitos (WBC) foram considerados fatores de risco significativos para a STA (JAIN *et al.*, 2017). Associada com considerável morbimortalidade, a STA tem maior incidência em crianças de 2 a 4 anos de idade e, embora diminua gradualmente com a idade, permanece comum em adultos (BALLAS *et al.*, 2010). O tratamento da STA consiste em manter a oxigenação adequada e hidratação, além da necessidade de transfusões de hemácias (HELVACI *et al.*, 2014).

O acidente vascular cerebral (AVC) representa uma grave complicação da AF, sendo responsável por cerca de 20% da mortalidade entre adultos e crianças, antes do estabelecimento dos protocolos terapêuticos, além de desencadear graves sequelas cognitivas e motoras (HOPPE, 2005). O AVC é definido como uma síndrome neurológica aguda, secundária a oclusão de uma artéria, resultando em isquemia focal acompanhada de sinais e sintomas neurológicos (BALLAS *et al.*, 2010; FASANO *et al.*, 2015). O AVC pode ser isquêmico, secundário a vasculopatia

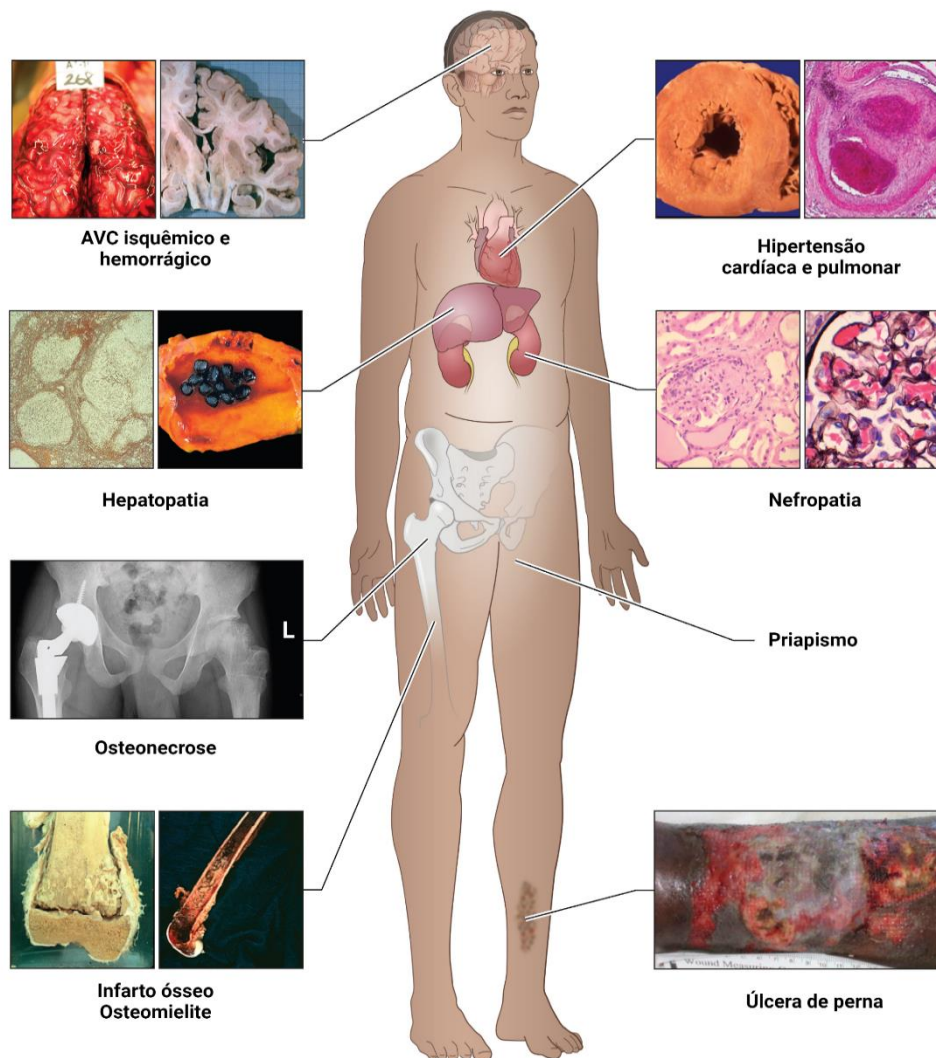
dos vasos cerebrais, mais comum na infância ou hemorrágico, mais comum na idade adulta (Figura 6) (FAROOQ; TESTAI, 2019). O risco para o AVC pode ser determinado em indivíduos até os 16 anos de idade, por meio da ultrassonografia por Doppler transcraniano (DTC), uma ferramenta que permite detectar a média da velocidade máxima de fluxo (VMMF) sanguíneo nas grandes artérias intracranianas do polígono de Willis (BERNAUDIN *et al.*, 2011; GUILLIAMS *et al.*, 2019). Dessa forma, o risco para AVC é proporcional a VMMF sanguíneo das artérias (BREWIN *et al.*, 2017).

O uso do DTC proporcionou uma redução significativa na incidência de AVC em crianças, por promover o diagnóstico e intervenção precoce nos indivíduos com alterações no fluxo vascular cerebral (LEE *et al.*, 2006). Contudo, considerando a fisiopatologia complexa do AVC, a busca por novos marcadores que auxiliem na predição de risco ainda é de grande necessidade (FLANAGAN *et al.*, 2011). As medidas terapêuticas incluem o regime crônico de transfusões de hemácias para prevenir tanto o AVC primário nos casos de DTC alterado, quanto a recorrência do AVC (BREWIN *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2006). Além disso, o uso da hidroxiuréia, droga quimioterápica com benefício principal de aumentar os níveis de Hb F, tem sido empregado como substituto das transfusões na prevenção do AVC (WARE *et al.*, 2016).

O priapismo, caracterizado como uma ereção peniana sem estímulo ou desejo sexual que dura mais de 2 horas, é uma complicação que pode atingir entre 20% a 89% dos homens e meninos com AF durante a vida (WANG *et al.*, 2016). Dentre os tipos de priapismo, a forma isquêmica, comum na AF, está associada a dor peniana e necrose de tecido erétil, podendo levar à disfunção erétil permanente (SHAKERI *et al.*, 2015). Apesar da fisiopatologia do priapismo ser pouco conhecida, é provável que a disfunção na biodisponibilidade de NO possa desempenhar um papel importante na sua gênese (KATO *et al.*, 2007). Além disso, algumas drogas, como antidepressivos, antipsicóticos, anticoagulantes, álcool e cocaína, foram relatadas como causadoras de priapismo (IDRIS *et al.*, 2022). O tratamento padrão consiste no uso de analgésicos, hidratação, aspiração e irrigação dos corpos cavernosos e, apesar de eficácia controversa, transfusões (JOICE *et al.*, 2015). Para casos mais severos de priapismo prolongado, a cirurgia de *shunt*, onde é feita

uma comunicação entre os corpos cavernosos e o esponjoso no pênis, é recomendada (IDRIS *et al.*, 2022).

Figura 6 - Complicações clínicas comuns da anemia falciforme



Fonte: Adaptado de Williams & Thein (2018).

Dentre as complicações crônicas da AF, a úlcera de perna é a manifestação cutânea/músculo-esquelética mais comum da doença, sendo associada com grande morbidade (Figura 6) (ALAVI; KIRSNER, 2015). As úlceras podem ter duração aguda ou crônica, podendo essas últimas se prolongarem ativas por meses ou anos, cicatrizando e reativando a ferida múltiplas vezes (MINNITI *et al.*, 2010). A fisiopatologia das úlceras na AF é complexa e multifatorial, envolvendo mecanismos como oclusão vascular, hemólise, infecções, traumas mecânicos, controle autonômico anormal com vasoconstrição excessiva, trombose, diminuição

da capacidade de transporte de oxigênio devido à anemia e disfunção endotelial (JONES et al. 2013; BOWERS et al. 2013). O manejo clínico das úlceras de perna inclui medidas de prevenção, proteção, controle da infecção local, desbridamento e curativos de compressão (ALTMAN et al., 2016; MINNITI; KATO, 2016).

A osteonecrose (necrose avascular, asséptica ou isquêmica), é uma complicação esquelética prevalente na AF, atribuída à lesão repetida de isquemia-reperusão de superfícies articulares (Figura 6). O infarto das superfícies articulares leva a degeneração e destruição da cartilagem articular, levando a dor e comprometimento da mobilidade (ADESINA; NEUMAYR, 2019). Geralmente o sítio mais afetado é cabeça do fêmur, podendo ocorrer também nos quadris, nos ombros, joelhos e outras articulações (STEINBERG, 2008). Comumente, a osteonecrose é detectada em homens até os 50 anos de idade e pode afetar entre 20 a 50% dos pacientes com AF (SEVERYNS; GAYET, 2021). O tratamento com redução do peso, anti-inflamatórios não esteroides e fisioterapia têm sido empregados como medidas básicas, apesar de não retardar a progressão (SEVERYNS; GAYET, 2021). A descompressão da cabeça do fêmur pode ser realizada como tratamento cirúrgico conservativo em casos iniciais, e na situação de insucesso, a artroplastia total do quadril pode ser considerada (ADESINA; NEUMAYR, 2019; GATIN et al., 2016).

Além dessas, outras complicações agudas e crônicas de dano cumulativo podem ser observadas como a colelitíase ou cálculos biliares, retinopatia, insuficiência renal, cardiopatias, infarto silencioso, hipertensão pulmonar, entre outras (BALLAS et al., 2010; WILLIAMS; THEIN, 2018).

2.3 MODULAÇÃO GENÉTICA NA HETEROGENEIDADE CLÍNICA DA ANEMIA FALCIFORME

Pacientes com AF ao longo da vida podem apresentar diferentes cursos clínicos, variando de casos mais brandos até casos severos com múltiplos internamentos ao ano e lesão de múltiplos órgãos (WILLIAMS; THEIN, 2018). Apesar da alteração da globina β desencadear os eventos fisiopatológicos da AF para todos os pacientes, fatores ambientais, socioeconômicos, estilo de vida e outros fatores genéticos podem impactar sobremaneira na gravidade dos sintomas

clínicos individuais (STEINBERG; ADEWOYE, 2006). Neste contexto, ao longo dos anos, diversos estudos demonstraram a influência de moduladores genéticos na ocorrência das complicações clínicas da doença, sendo os principais: os níveis de Hb F, os haplótipos β^S e a coherança com a alfa (α) talassemia (DOMINGOS *et al.*, 2014; HATZLHOFFER *et al.*, 2021; SERJEANT *et al.*, 2017).

A Hb F é um tetrâmero de Hb, formado por duas cadeias α e duas cadeias γ , que é predominante no período fetal de desenvolvimento, mas após o nascimento tem sua síntese reprimida (STEINBERG, Martin H, 2020). Entretanto, ainda por causas diversas e pouco compreendidas, alguns indivíduos com AF apresentam síntese elevada de HbF na vida adulta (STEINBERG, Martin H., 2020). Assim, esses indivíduos apresentam uma tendência a uma clínica mais branda, visto que a Hb F não participa do polímero de Hb S, diminuindo dessa forma a taxa de polimerização e, conseqüentemente, a ocorrência das complicações clínicas da doença (ADEKILE, 2021).

Os haplótipos da globina β^S são combinações de sítios polimórficos ao longo do cluster da β -globina, em desequilíbrio de ligação com a alteração β^S , que já foram relacionados com a regulação dos níveis de Hb F (ADEKILE, 2021; BERNAUDIN *et al.*, 2018). Cinco diferentes combinações, ou haplótipos, mais prevalentes foram identificados e nomeados de acordo com a região geográfica e o grupo étnico em que foram descobertos, são eles: Árabe-Indiano ou Saudi (ARB ou SAU), Bantu ou República Centro Africana (BAN ou CAR), Benin (BEN), Senegal (SEN) ou Camarões (CAM) (SERJEANT *et al.*, 2017). Assim, influenciado por variantes polimórficas na região promotora do gene da globina γ , os indivíduos com AF e haplótipos ARB e SEN apresentam maiores concentrações de Hb F, tendendo a cursar com clínica mais branda e o haplótipo BEN cursa com concentrações de Hb F intermediária. O haplótipo CAR, mais comum na maioria das regiões do Brasil, cursa com menores concentrações e tende a cursar com clínica mais adversa (BEZERRA *et al.*, 2007; DOMINGOS *et al.*, 2014; STEINBERG; ADEWOYE, 2006).

A coherança com a talassemia- α também é um modulador importante na AF. Na talassemia- α há diminuição de síntese de cadeias globínicas do tipo α , levando a um desbalanço de síntese entre as globinas α e β . Assim, uma vez que há menos subunidades de globina α , há diminuição da síntese e concentração da Hb S (PINCEZ *et al.*, 2022; SERJEANT *et al.*, 2017). A coherança com a talassemia- α

na AF limita a taxa de hemólise e está associada com maiores níveis de hemoglobina basal, volume corpuscular médio (VCM) diminuído, menores níveis de reticulócitos, bilirrubina e lactato desidrogenase (LDH), além de menor incidência de cálculos biliares, AVC, priapismo e úlceras de perna e possivelmente a um aumento na taxa de crises de dor, osteonecrose e sequestro esplênico (STEINBERG; ADEWOYE, 2006; STEINBERG; SEBASTIANI, 2012)

Apesar de influenciar no fenótipo, para grande parte dos pacientes, a influência desses moduladores não é bem definida. Considerando a fisiopatologia complexa da AF e os múltiplos mecanismos envolvidos, é provável que genes envolvidos nas vias da inflamação, vasorregulação, adesão celular, hemólise e hemostasia possam influenciar nos subfenótipos da doença (FERTRIN; COSTA, 2010; STEINBERG; ADEWOYE, 2006). Dessa forma, estratégias de análise de genes candidatos e estudos de associação ampla do genoma (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Study*), permitiram a identificação de diversas variantes, ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) em associação com complicações da AF (ALSULTAN *et al.*, 2018; BATISTA *et al.*, 2021a; FLANAGAN *et al.*, 2013). A identificação de marcadores moleculares promove tanto o acompanhamento preventivo, quanto o estudo de estratégias terapêuticas focadas nos processos que afetam diversas vias fisiopatológicas, a fim de prevenir danos aos órgãos (PINCEZ *et al.*, 2022). Neste contexto, genes envolvidos com o processo da inflamação na AF, podem influenciar nos fenótipos da AF e serem prováveis moduladores da doença.

2.4 OS INFLAMASSOMAS

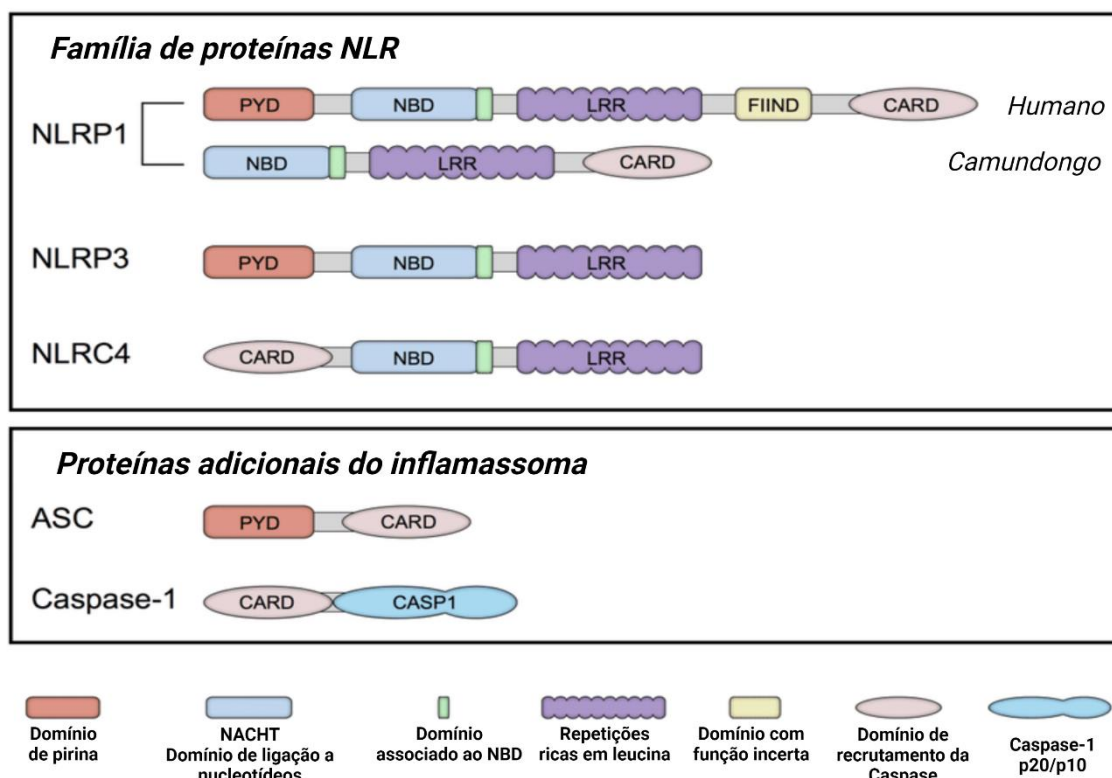
O processo inflamatório, desencadeado pelo sistema imune inato, acontece em resposta à presença de PAMPs microbianos e DAMPs teciduais. A ativação do sistema imune inato é majoritariamente mediada pelo reconhecimento de sinais de dano por PRRs celulares (ACCOGLI *et al.*, 2023; XU; NÚÑEZ, 2022). Diversos PRRs já foram descritos incluindo os receptores TLRs, os receptores de lectina tipo C (CLRs, do inglês *C-type lectin receptors*), os receptores semelhantes a RIG-I (RLRs, do inglês *RIG-I-like receptors*) e os receptores semelhantes a domínios de oligomerização e ligação de nucleotídeos (NOD, do inglês *nucleotide binding and*

oligomerization domain) ricos em repetições de leucina (NLRs) (LAMKANFI; KANNEGANTI, 2010). Os receptores TLRs e os CLRs são complexos transmembranares que reconhecem PAMPs ou DAMPs na superfície celular, enquanto os receptores RLRs e NLRs reconhecem componentes intracelulares (LAMKANFI and KANNEGANTI 2010; SEOANE et al. 2020). Os receptores NLRs participam da formação do inflamassoma, um complexo intracelular proteico multimérico, que processa e cliva citocinas pró-inflamatórias em forma maduras contribuindo para a resposta imune pró-inflamatória (MEYERS; ZHU, 2020).

Os complexos inflamassomas são formados por três componentes principais: um sensor, um adaptador e um efetor. Os inflamassomas diferenciam-se em dois grupos a depender do sensor/receptor intracelular que o compõe, são eles os receptores NLRs ou os receptores do tipo AIM2 (ausente no melanoma 2) (ALRs) (MEYERS; ZHU, 2020). As proteínas adaptadoras promovem a interação entre as proteínas sensores e efetoras. A proteína adaptadora do tipo *speck* associada à apoptose contendo um domínio de recrutamento de caspase (CARD) (ASC, do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), possui um domínio de pirina (PYD) amino-terminal para interação com o sensor e um domínio CARD para ligação a várias proteínas efetoras de caspase (Figura 7) (HAFNER-BRATKOVIČ, 2023). Por fim, a proteína efetora é frequentemente a pró-caspase-1 (JIMÉNEZ-CASTRO et al., 2019).

A família de receptores NLR é formada por 22 membros em humanos e 34 membros descritos em camundongos (MAN; KANNEGANTI, 2015). Até o momento alguns inflamassomas pertencentes à família de receptores NLR já foram bem caracterizados, incluindo o NLRP1, NLRC4 e NLRP3 (Figura 7) (MENU; VINCE, 2011). O inflamassoma NLRP1 (NALP1/CARD7) foi o primeiro já descrito e é ativado após a detecção da toxina letal da bactéria *Bacillus anthracis* (MAN; KANNEGANTI, 2015). Já o inflamassoma NLRC4 (IPAF/CARD12) detecta flagelina e componentes do sistema de secreção tipo 3 de bactérias patogênicas Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, e *Legionella pneumophila* e o bacilo Gram-positivo *Listeria monocytogenes* (FRANCHI et al., 2009). Assim, por ser o inflamassoma mais bem caracterizado, o inflamassoma NLRP3 tem sido implicado em muitas condições distintas (MEYERS; ZHU, 2020).

Figura 7 - Componentes estruturais dos inflamassomas



Fonte: Adaptado de Yaron (2015).

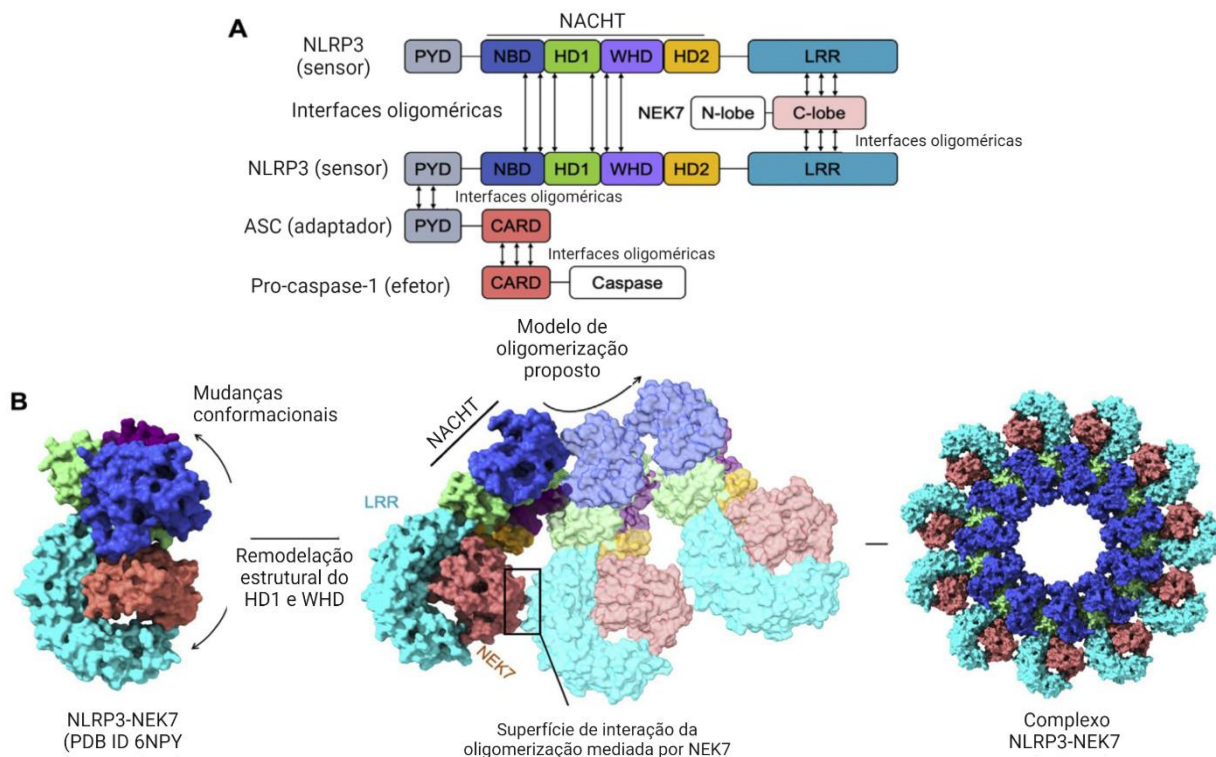
2.4.1 Inflamassoma NLRP3: Estrutura e função

O NLRP3, membro da família NLR (também conhecido como NALP3, Criopirina, CIAS1, PYPAF1 e CLR1.1) é um sensor intracelular de 118 KDa que detecta uma grande variedade de partículas microbianas e sinais endógenos culminando na liberação de mediadores inflamatórios. As mutações de ganho de função no gene *NLRP3* foram associadas à síndrome periódica associada à criopirina (CAPS) (LAMKANFI; KANNEGANTI, 2010). A CAPS é um grupo de doenças autoinflamatórias autossômicas dominante as quais fazem parte a síndrome autoinflamatória familiar ao frio (FCAS), síndrome de Muckle-Wells (MWS) e a síndrome neurológica, cutânea e articular infantil crônica (CINCA) (SWANSON *et al.*, 2019). A associação do inflamassoma NLRP3 com doenças autoimunes alavancou os estudos sobre a inflamação, além de ampliar os estudos sobre sua participação na fisiopatologia de outras doenças.

Estruturalmente o NLRP3 consiste em um sensor (NLRP3), um adaptador (ASC; também conhecido como PYCARD) e um efetor (caspase-1). O sensor

NLRP3 é uma proteína tripartite que contém um domínio amino-terminal de pirina (PYD), um domínio central ATPase, conhecido como domínio de ligação a nucleotídeos (NOD ou NACHT), e um domínio carboxi-terminal de 12 repetições ricas em leucina (LRR) (SWANSON *et al.*, 2019; XU; NÚÑEZ, 2022). O domínio PYD interage molecularmente com a proteína bipartite adaptadora. O domínio central NOD/NACHT do NLRP3 está presente em todos os outros membros da família NLR. Este domínio inclui um domínio de ligação a nucleotídeos (NBD), um domínio helicoidal 1 (HD1), um domínio helicoidal alado (WHD, do inglês *winged helix domain*) e um domínio helicoidal 2 (HD2) (LAMKANFI; KANNEGANTI, 2010; XU; NÚÑEZ, 2022). O domínio NOD/NACHT tem atividade ATPase, essencial para a auto-associação e função do NLRP3, enquanto o domínio LRR modula sua ativação, inibindo-o (Figura 8) (SWANSON *et al.*, 2019).

Figura 8 - Informações estruturais do inflamassoma NLRP3. (A) Estruturas dos domínios e interações proteína-proteína para a montagem do inflamassoma. (B) Esquerda, NLRP3 ligado a NEK7. Meio, conformação ativa modelada de NLRP3. Direita, uma vez ativada, a oligomerização do complexo NLRP3-NEK7 é propagada pelas interações NACHT(NLRP3)-NACHT(NLRP3) e NEK7-LRR(NLRP3) para formar oligômeros completos em forma de disco.



Fonte: Adaptado de Yaron (2015)

A proteína adaptadora ASC possui dois domínios funcionais, um domínio PYD N-terminal que se associa ao PYD de NLRP3 e um domínio C-terminal de

recrutamento de caspase (CARD), que interage com o CARD da caspase-1 (Figura 8). Por fim, a proteína efetora caspase-1 possui um domínio CARD N-terminal, um domínio catalítico central (p20) e um domínio menor catalítico C-terminal (p10) (ABDERRAZAK *et al.*, 2015; SWANSON *et al.*, 2019).

A expressão de NLRP3 é detectada principalmente no citoplasma de granulócitos, monócitos, células dendríticas, células T e B, células epiteliais e osteoblastos, sugerindo um papel importante nos mecanismos primários de defesa do corpo contra infecções bacterianas, fúngicas e virais (LAMKANFI; KANNEGANTI, 2010). Apesar disso, quando desregulado, o NLRP3 tem sido associado à fisiopatologia de distúrbios inflamatórios como a CAPS, Alzheimer, diabetes, gota, doenças autoinflamatórias e aterosclerose (KELLEY *et al.*, 2019). Assim, como a ativação do inflamassoma contribui para o processo inflamatório, sua ativação deve ser altamente regulada.

2.4.2 Ativação e formação do inflamassoma NLRP3

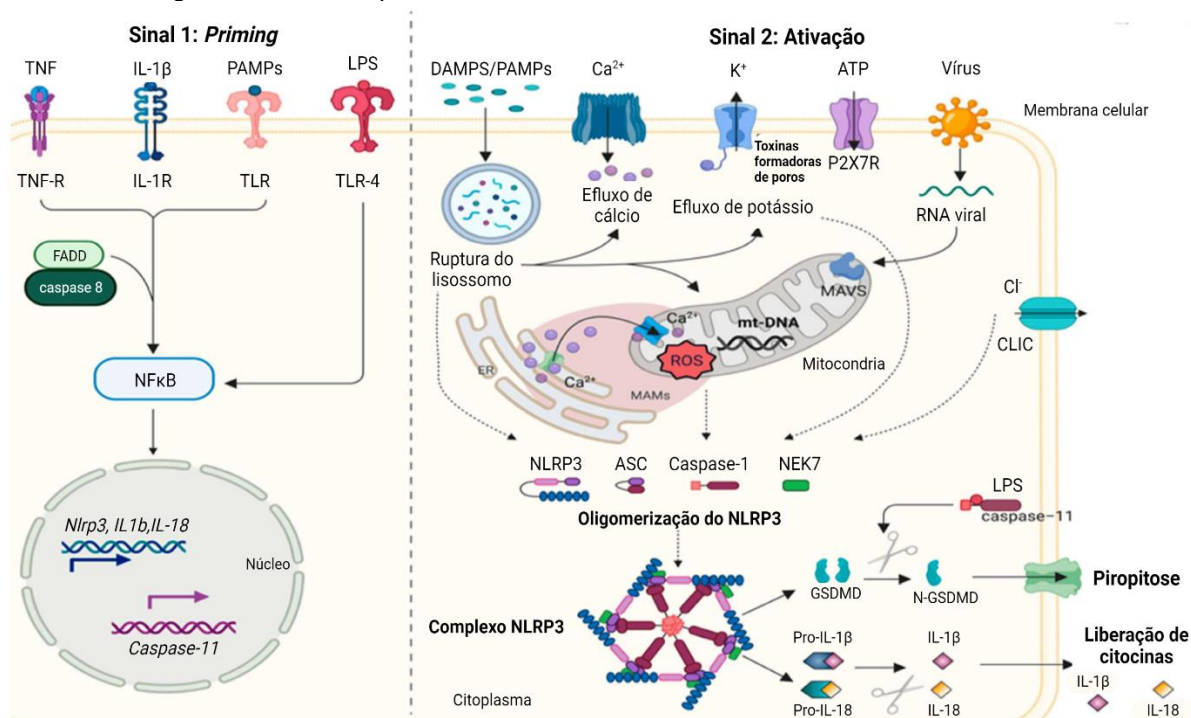
A ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos ocorre em duas etapas distintas, cada uma com um sinal de ativação diferente. O primeiro sinal (*priming*) induz a expressão dos precursores da inflamação: pro-IL-1 β , pro-IL-18 e NLRP3 (ACCOGLI *et al.*, 2023). O segundo sinal (ativação) é feito por uma variedade de fatores que incluem o ATP, toxinas formadoras de poros, agregados, cristais, nanopartículas, micróbios e seus componentes e alguns medicamentos levando a formação do complexo e liberação de IL-1 β e IL-18 (Figura 9) (XU; NÚÑEZ, 2022).

Sinal 1: Priming

Em macrófagos a etapa do *priming* é essencial para a formação do inflamassoma NLRP3 e tem ao menos duas funções. A primeira função é regular positivamente a expressão dos componentes do inflamassoma como o sensor NLRP3, a caspase-1 e a pro-IL-1 β (SWANSON *et al.*, 2019). A indução da transcrição acontece por estímulo prévio e reconhecimento de diversos PAMPs ou DAMPs por PRRs, como os receptores TLRs, os receptores NLRs, ou receptores de citocinas como os receptores do fator de necrose tumoral alfa (TNFR1/2) e o receptor da IL-1 β (IL-1 β R) levando à ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (BLEVINS *et al.*, 2022; ELLIOTT; SUTTERWALA, 2015). Além disso, o adaptador

MyD88 do receptor TLR4 e as quinases associadas ao receptor IL-1 β R, IRAK-1 e IRAK-4 desempenham papéis fundamentais no *priming* de NLRP3, e ativação do NF- κ B (ACCOGLI *et al.*, 2023; PAIK *et al.*, 2021). Adicionalmente, a proteína de domínio de morte associada a Fas (FADD, do inglês *Fas-associated protein with death domain*) e a caspase-8 desempenham uma função essencial na ativação canônica do NLRP3 por meio da transcrição dependente de NF- κ B (Figura 9) (MAN; KANNEGANTI, 2015; PAIK *et al.*, 2021). Por sua vez, NF- κ B atua regulando positivamente a expressão de NLRP3, e pró-IL-1 β , ambos expressos em quantidades insuficientes para iniciar a inflamação em estado basal (Figura 9) (BAUERNFEIND *et al.*, 2009; XU; NÚÑEZ, 2022). Apesar disso, a etapa de *priming* provavelmente não está limitada apenas à regulação positiva da transcrição dependente de NF- κ B.

Figura 9 - Priming e ativação do inflamassoma NLRP3. O processo de ativação do inflamassoma NLRP3 requer dois sinais principais: (i) sinal 1 (priming), que leva à ativação do fator de transcrição NF- κ B e à subsequente transcrição dos componentes canônicos e não canônicos do inflamassoma NLRP3; e (ii) sinal 2 (ativação), responsável pela montagem do complexo NLRP3 e posterior liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 β e IL-18). CLIC: canal intracelular de cloreto; DAMPs: padrões moleculares associados a danos; FADD: proteína de domínio de morte associada ao Fas; GSDMD: Gasdermina D; IL-18: interleucina-18; IL-1 β : interleucina-1beta; IL-1R: receptor de interleucina 1; LPS: lipopolissacarídeos; MAVS: proteína de sinalização antiviral mitocondrial; mt-DNA: DNA mitocondrial; PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; ROS: espécies reativas de oxigênio; TLR: Receptor Toll-like.



Fonte: Adaptado de Missiroli et al. (2021).

A segunda função do *priming* é a indução de modificações pós-traducionais (MPTs) do NLRP3. Múltiplas MPTs foram descritas para NLRP3, incluindo ubiquitinação, fosforilação, acetilação e sumoilação (SWANSON *et al.*, 2019). O NLRP3 é ubiquitinado em seu domínio LRR, e os sinais de *priming* induzem sua deubiquitinação através da enzima BRCC3 promovendo a ativação do inflamassoma. Os sinais de iniciação também acionam a fosforilação de NLRP3 mediada por JNK1, importante para a formação de ativação de NLRP3 (ELLIOTT; SUTTERWALA, 2015; KELLEY *et al.*, 2019). Dessa forma, os sinais de iniciação regulam a ativação do inflamassoma NLRP3 por meio de vias dependentes e independentes de transcrição.

Sinal 2: Ativação e formação do complexo NLRP3

A etapa de *priming* “licencia” a célula, entretanto uma segunda etapa ou sinal 2 é necessária para a indução e a ativação completa da formação do inflamassoma. O NLRP3 pode ser ativado por uma ampla variedade de estímulos incluindo partículas de infecções bacterianas, virais e fúngicas, bem como na inflamação estéril mediada por DAMPs endógenos como o ATP, cristais de ácido úrico e partículas exógenas como agregados, cristais, sílica, nanopartículas, alguns medicamentos (ABDERRAZAK *et al.*, 2015; SWANSON *et al.*, 2019). Considerando a variedade de diferentes ativadores do NLRP3, é improvável que todos os estímulos possam se ligar diretamente ao inflamassoma. Portanto, é provável que uma molécula ou via comum, seja responsável pela ativação do inflamassoma (ABDERRAZAK *et al.*, 2015; HAFNER-BRATKOVIČ, 2023). Estudos mostram que a presença desses DAMPs e PAMPs levam ao efluxo de K⁺, a sinalização do Ca²⁺, o influxo de Na⁺ e efluxo de cloreto, disfunção mitocondrial, produção de ROS e dano lisossomal, eventos críticos na ativação do inflamassoma NLRP3 (Figura 9) (KELLEY *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019). Todas essas vias de sinalização podem estar interrelacionadas ou ter mecanismos independentes (BAI *et al.*, 2020).

Após ser ativado pelos dois sinais, canonicamente o NLRP3 desubiquitinado liga-se a quinase relacionada ao NIMA 7 (NEK7, do inglês *NIMA-related kinase 7*), um modulador essencial para a ativação e montagem do inflamassoma (BLEVINS *et al.*, 2022). A ligação ao NEK7 promove a oligomerização do domínio NATCH e ativação do NLRP3 (SHARIF *et al.*, 2019). O NLRP3 atua como uma molécula sensora interagindo com ASC via ligação homotípica dos domínios PYD-PYD das

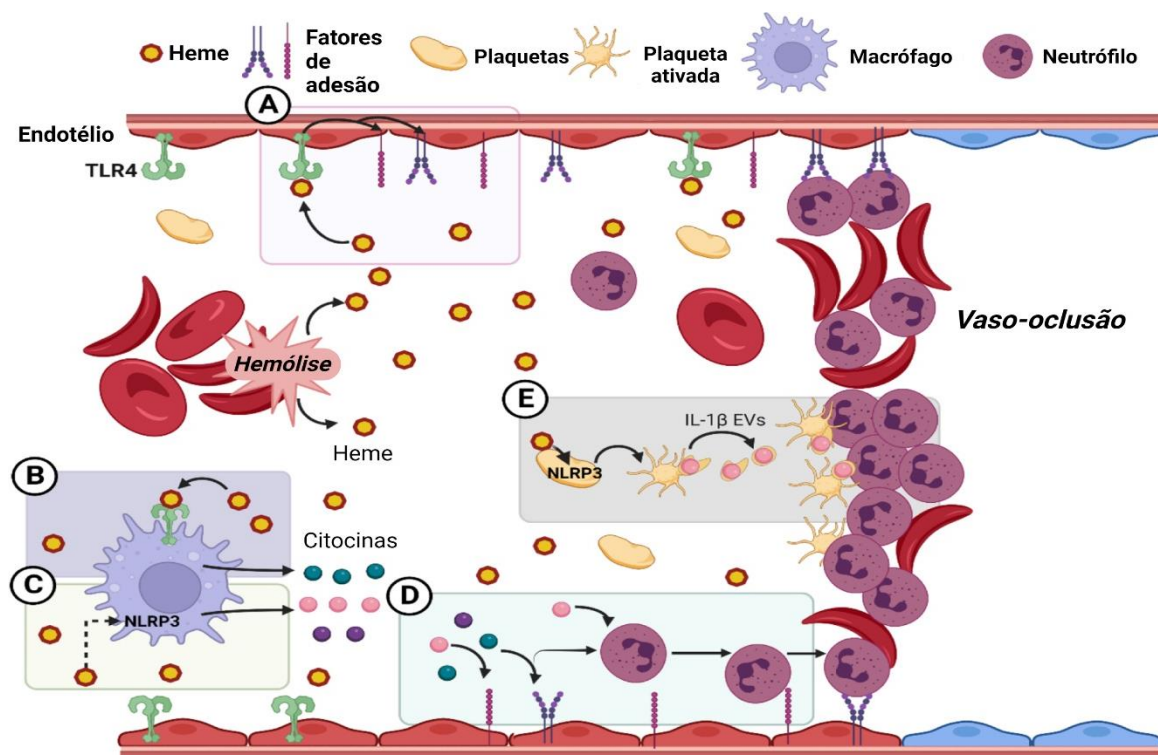
duas moléculas, induzindo a montagem de ASC em grandes estruturas filamentosas (OHTO *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2023). Posteriormente, o ASC por meio do seu domínio CARD, recruta a pró-caspase-1 via interação CARD-CARD, formando um grande complexo proteico multimérico (YANG *et al.*, 2019). A pró-caspase-1 sofre clivagem autoproteolítica, provavelmente como resultado da multimerização induzida por proximidade, produzindo a forma ativa da caspase-1 (BAI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2023). A caspase-1 ativada tem como função a ativação proteolítica das citocinas pró-inflamatórias pró-IL-1 β e pro-IL-18 em suas formas maduras (MEYERS; ZHU, 2020).

A caspase-1 também cliva uma proteína citosólica solúvel, a gasdermina D (GSDMD). Após a clivagem da GSDMD seus domínios N-terminal se oligomerizam e formam poros na membrana plasmática, desencadeando a secreção das formas maduras de IL-1 β e IL-18 e uma forma lítica e pró-inflamatória de morte celular, denominada piroptose (Figura 9) (HACHIM *et al.*, 2020; KELLEY *et al.*, 2019; PAIK *et al.*, 2021). A IL-1 β induz a expressão de genes que controlam a febre, a dor, a vasodilatação e a hipotensão favorecendo a infiltração de células imunes efetoras nos locais de inflamação, além de induzir expressão de enzimas pró-inflamatórias e regular respostas T-induzidas (MEYERS; ZHU, 2020; SALGAR *et al.*, 2023). Já a IL-18 é necessária para a estimulação da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares, estimulação da produção de interferon-gama (IFN- γ), IL-2 e IL-12, além de mediar a ativação de mastócitos e a imunidade adaptativa (CONRAN; BELCHER, 2018; KELLEY *et al.*, 2019).

2.4.3 Papel do inflamassoma NLRP3 na anemia falciforme

O heme livre e hemoglobina livre oxidada liberadas na hemólise crônica, promovem a etapa de *priming* e contribuem fortemente para a ativação do inflamassoma NLRP3 em células endoteliais, macrófagos e plaquetas (Figura 10) (ERDEI *et al.*, 2018; NYAKUNDI *et al.*, 2019b; SALGAR *et al.*, 2023; SHAVER *et al.*, 2020). Dessa forma, considerando o processo de hemólise crônica da AF é provável que a ativação de NLRP3 esteja desregulada (KATO *et al.*, 2017; NYAKUNDI *et al.*, 2019a).

Figura 10 - Mecanismos fisiopatológicos da AF induzidos pelo heme e inflamassoma. (A) Heme desencadeia a sinalização TLR4 levando à ativação de células endoteliais e expressão de moléculas de adesão endotelial (B) Heme induz a secreção do fator de necrose tumoral- α (TNF α) (círculos verdes) em macrófagos através da via de sinalização TLR4, favorecendo a ativação das células endoteliais e a expressão de fatores de adesão. (C) O heme desencadeia a ativação do inflamassoma NLRP3 para produzir as citocinas maduras IL-1 β e IL-18 (círculos rosa e roxo). (D) O recrutamento e ativação de neutrófilos leva à adesão ao endotélio e aos eritrócitos falciformes. (E) A ativação do inflamassoma NLRP3 nas plaquetas leva à geração de vesículas extracelulares (EVs) que carregam IL-1 β , promovendo a geração de agregados plaquetas-neutrófilos.



Fonte: Adaptado de Salgar et al. (2023).

Em um grupo de pacientes com AF, os níveis de ácido úrico foram positivamente correlacionados com os níveis de IL-18, demonstrando participação do inflamassoma na fisiopatologia da AF, e o papel do ácido úrico como possível molécula estimuladora da formação do inflamassoma na AF (CERQUEIRA *et al.*, 2011). Dados com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com AF mostraram que estas possuíam alta expressão de *NLRP3* e *IL-1B*. Além disso, culturas de PBMC de indivíduos com Hb AA submetidas à presença de eritrócitos intactos de pacientes com AF, exibiram aumento da expressão de componentes do inflamassoma *NLRP3*, caspase-1, IL-1 β e IL-18. Por fim, o tratamento com HU não afetou a expressão de *NLRP3*, caspase-1 e IL-1 β neste estudo (PITANGA *et al.*, 2016). Em outro estudo, culturas de PBMC de indivíduos Hb AA submetidas à presença de eritrócitos HbSS lisados mostraram aumento da

expressão dos genes *CASP1* e *IL18*, bem como aumento dos níveis de IL-1 β tanto na presença de eritrócitos HbSS lisados quanto intactos. Além disso, apesar dos pacientes tratados com HU apresentarem redução da expressão do gene *NLRP3*, não houve diferença na expressão de *CASP1*, *IL1B* e *IL18*. Apesar do papel da HU na regulação do inflamassoma NLRP3 ser incerto, estes dados sugerem que a HU não influencie nos mecanismos inflamatórios dependentes do inflamassoma (PITANGA *et al.*, 2021).

A ativação plaquetária é um importante mecanismo fisiopatológico na AF. Nas plaquetas, o inflamassoma NLRP3 é regulado positivamente na AF. Foi demonstrado que os DAMPs HMGB1 e BTK estão envolvidos na regulação do inflamassoma plaquetário NLRP3 (VOGEL *et al.*, 2018). Além disso, áreas de agregados de plaquetas no fígado de camundongos HbSS diminuíram quando estes foram tratados com MCC950 ou ibrutinib, inibidores farmacológicos do NLRP3 e BTK, respectivamente (VOGEL *et al.*, 2021).

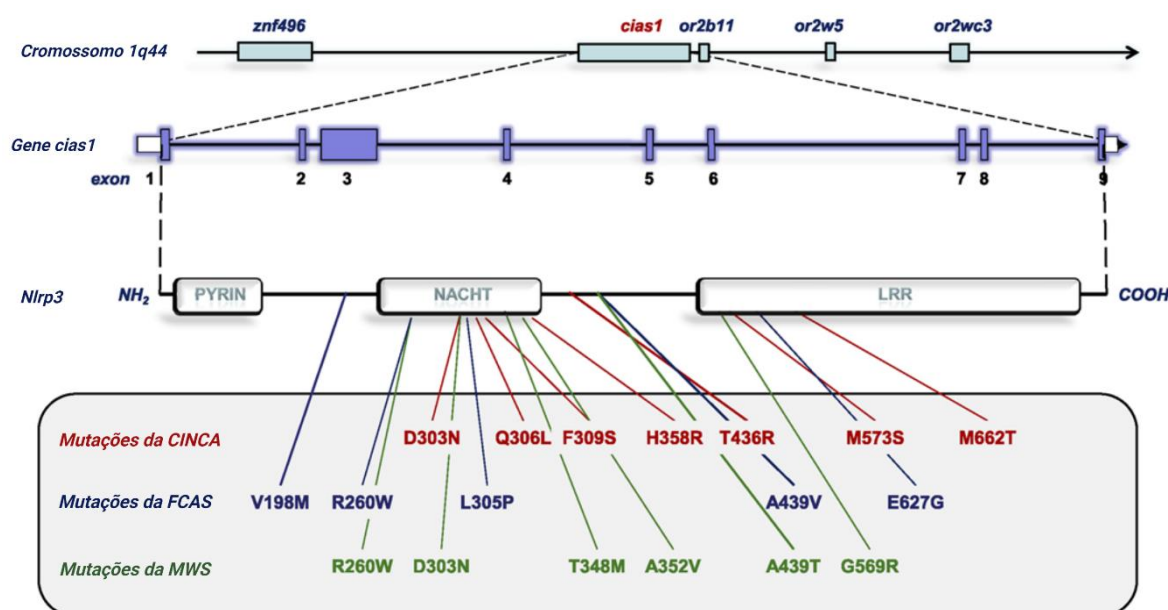
A ativação do inflamassoma plaquetário leva à geração de vesículas extracelulares de plaquetas, as quais transportam IL-1 β e caspase-1 e se ligam a neutrófilos, promovendo sua agregação com plaquetas em arteríolas pulmonares de camundongos HbSS (Figura 10). Adicionalmente, a inibição da caspase-1 e IL-1 β diminuiu a formação de vesículas extracelulares de plaquetas, preveniu a agregação entre plaquetas e neutrófilos e restaurou o fluxo sanguíneo microvascular nas arteríolas pulmonares de camundongos HbSS *in vivo* e *in vitro* (VATS *et al.*, 2020). Esses achados implicam que a inibição terapêutica da via do inflamassoma NLRP3 pode ser um alvo terapêutico promissor para pacientes com AF, particularmente para inibir a progressão da STA em pacientes que apresentam mais episódios de CVOs (VATS *et al.*, 2020).

Dessa forma, o inflamassoma NLRP3 parece estar envolvido na fisiopatologia da AF, contribuindo para um estado inflamatório crônico alterado devido a constante ativação do complexo por eDAMPs liberados da hemólise. A investigação da atuação do NLRP3 e seus produtos IL-1 β e IL-18 nas diferentes complicações clínicas da doença, pode contribuir para a compreensão da heterogeneidade clínica dos pacientes, bem como elucidar a eficácia de potenciais alvos terapêuticos para a AF dirigidos ao processo inflamatório.

2.5 POLIMORFISMOS NO GENE *NLRP3*

O gene *NLRP3* humano está localizado no cromossomo 1q44, possui 9 éxons e tem comprimento total de 32.953 pares de bases (Figura 11) (KUMAR *et al.*, 2022). Estudos mostraram que substituições *missense* em *NLRP3* podem causar doenças autoinflamatórias como as CAPS. As variantes V198M, L353P, A439V e E627G foram associadas à síndrome autoinflamatória familiar ao frio; as variantes R260W, A352V e G569R foram associadas à síndrome de Muckle-Wells; e as variantes D303N, F309S e F537 foram associadas à síndrome neurológica, cutânea e articular infantil crônica (Figura 11) (HITOMI *et al.*, 2009). Além disso, evidências sugerem que variantes genéticas no gene *NLRP3* podem influenciar nas respostas inflamatórias imunes, afetando a suscetibilidade a doenças infecciosas, autoimunes e inflamatórias (LEE; BAE, 2016; ZHANG *et al.*, 2018).

Figura 11 - Organização estrutural do gene *NLRP3*. O gene humano *CIAS1* ou *NLRP3* que codifica o Nlrp3 está localizado no cromossomo 1q44. O Nlrp3 é produzido a partir de 9 éxons. O Nlrp3 é expresso como uma proteína de 1036 aminoácidos consistindo de um domínio de pirina N-terminal, um domínio NACHT central e 12 motivos LRR C-terminais. As posições das mutações pontuais associadas a CINCA, FCAS e MWS em Nlrp3 são indicadas.

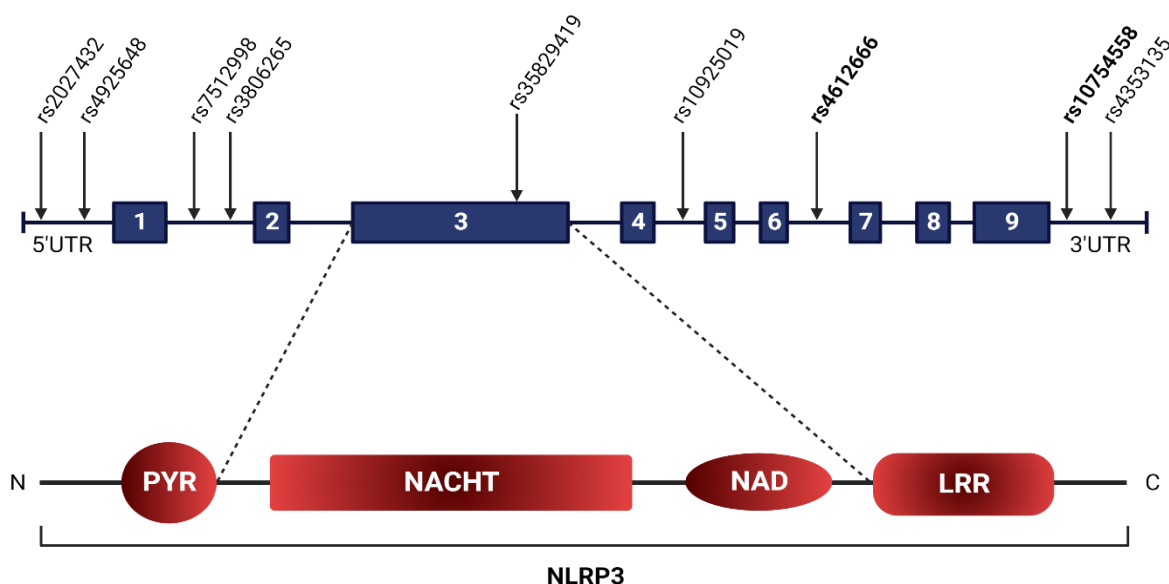


Fonte: Adaptado de Lamkanfi & Kanneganti 2010.

Polimorfismos no gene *NLRP3* têm sido associados a distúrbios e desfechos onde a inflamação desempenha um papel determinante, como o lúpus eritematoso sistêmico (EHTESHAM *et al.*, 2021), artrite reumatoide (ADDOBBATI *et al.*, 2018), tuberculose e AIDS (DE SÁ *et al.*, 2022), AVC isquêmico (ZHU *et al.*, 2016), doenças cardiovasculares (GONZALEZ-PACHECO *et al.*, 2017), diabetes

(OZBAYER *et al.*, 2022), dentre outros. Na AF a avaliação de variantes em genes do complexo inflamassoma mostrou que variantes de ganho de função nos genes *NLRP1* (rs11651270) e *IL1B* (rs16944) estavam associadas a uma clínica mais leve (DE FREITAS DUTRA *et al.*, 2022). Em outro estudo, variantes nos genes *IL1B*, *IL18*, *NLRP1* e *NLRP3* não se mostraram associadas com a severidade da AF (DE ALMEIDA *et al.*, 2019). Polimorfismos em *NLRP3*, incluindo os SNPs rs10754558 e rs4612666, que se localizam em regiões regulatórias gênicas, já se correlacionam com a modulação da expressão de *NLRP3* (Figura 12) (EHTESHAM *et al.*, 2021).

Figura 12 - Representação esquemática de polimorfismos no gene *NLRP3* comumente investigados em relação a desfechos patológicos. O painel inferior representa os diferentes domínios de *NLRP3*: PYD, domínio de pirina; NAD, domínio associado a NACHT; e LRR, repetição rica em leucina.



Fonte: Autoria própria, criado usando Biorender.com.

O SNP *NLRP3* rs10754558 está localizado na região 3'UTR do gene *NLRP3* e parece estar relacionado com mudança conformacional no RNA mensageiro (mRNA) do *NLRP3* afetando sua estabilidade, regulando assim seu nível de expressão (LV *et al.*, 2020). O alelo C do rs10754558 diminui a estabilidade do mRNA de *NLRP3* em comparação com o alelo G, que por sua vez pode alterar a secreção de IL-1 β e IL-18. (HITOMI *et al.*, 2009; LEE; BAE, 2016).

Os genótipos e alelos do *NLRP3* rs10754558 já foram associados a maior expressão de *NLRP3* e IL1 β em PBMCs, além de aumento nos níveis séricos de IL1 β em pacientes com artrite gotosa (ZHANG *et al.*, 2018). Foi observado que o alelo de risco G tem aumento da estabilidade do mRNA comparado ao alelo C.

Análises funcionais do *NLRP3* rs10754558, realizadas em células THP-1 demonstraram seu comprometimento funcional, onde a maior expressão do mRNA de *NLRP3* estava relacionada ao alelo G (HITOMI *et al.*, 2009). Além disso a ocorrência deste SNP afeta a ligação de microRNAs (miRNAs). Na presença do alelo G, existe um sítio de ligação para os miRNAs miR-3529-3p e miR-549a. A presença do alelo C anula tal sítio, e dá origem a um sítio de ligação para os miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-589-5p e miR-7153-5p. Apesar disto, o impacto deste SNP na ligação desses miRNAs *in vivo* ainda precisa ser esclarecido (ADDOBBATI *et al.*, 2018). A variante *NLRP3* rs10754558 já foi relacionada com a ocorrência de anafilaxia induzida por alimentos (HITOMI *et al.*, 2009), doença renal crônica (LA RUSSA *et al.*, 2023), diabetes tipo 2 (OZBAYER *et al.*, 2022), AVC isquêmico (ZHU *et al.*, 2016), lúpus eritematoso sistêmico (EHTESHAM *et al.*, 2021), doença arterial coronária (ZHOU *et al.*, 2016) e outras complicações.

Outro polimorfismo de *NLRP3* extensivamente estudado é o rs4612666. O *NLRP3* rs4612666 é uma variante intrônica que ocorre como uma transição T/C no íntron 7 na posição chr1:247435768 (OZBAYER *et al.*, 2022). Dados mostram que esta variante pode ter impacto funcional por meio da influência na expressão de *NLRP3*, alterando a atividade de *enhancers* ou a estabilidade do mRNA (CHENG *et al.*, 2018). Para investigar se a região genômica em torno do rs4612666 tinha atividade *enhancer*, Hitomi e colaboradores (2009) usando células THP-1 mostraram que os construtos contendo o alelo de risco C, mostrou maior atividade de intensificação da transcrição do que quando comparado com os outros construtos contendo o alelo T (HITOMI *et al.*, 2009). Ao procurar por fatores de transcrição nuclear que poderiam se ligar a sequências de DNA contendo o rs4612666, foi observado que a região genômica contendo o alelo C criava uma sequência de ligação para o fator de transcrição GATA-2 (HITOMI *et al.*, 2009). Similar ao rs10754558, para a variante *NLRP3* rs4612666 também foram observadas associações significativas com a suscetibilidade à anafilaxia induzida por alimentos (HITOMI *et al.*, 2009), periodontite (MAHENDRA *et al.*, 2021), AVCs isquêmicos ateroscleróticos de grandes artérias e microembolias (CHENG *et al.*, 2018), diabetes (OZBAYER *et al.*, 2022), gravidade da atividade da lúpus (EHTESHAM *et al.*, 2021) e outras complicações.

Dessa forma, considerando que a inflamação é um mecanismo chave para os desdobramentos da fisiopatologia da AF, é provável que variantes funcionais em *NLRP3* possam contribuir para a heterogeneidade fenotípica da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação de polimorfismos no gene *NLRP3* com complicações clínicas de pacientes com AF acompanhados pela Fundação HEMOPE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs10754558 e rs4612666 do gene *NLRP3*, em pacientes com anemia falciforme;
2. Verificar a existência de associação entre as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de *NLRP3* com as complicações clínicas de pacientes com anemia falciforme.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Este trabalho trata-se de um estudo do tipo coorte retrospectivo com comparação interna de grupos, realizado no período de setembro/2021 até dezembro/2022. As análises foram feitas comparando os indivíduos que apresentaram complicações clínicas com aqueles que não apresentaram. A amostra foi constituída de pacientes com anemia falciforme (Hb SS) de ambos os sexos, não aparentados, cadastrados e acompanhados regularmente pela instituição coparticipante, Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - HEMOPE. Foram incluídos no estudo 880 indivíduos com AF, sendo 511 (58%) indivíduos maiores de 18 anos (Grupo adulto) e 369 (42%) (Grupo pediátrico) até os 18 anos de idade. Do grupo adulto 228 (44,6%) eram do sexo masculino e 283 (55,4%) do sexo feminino. A mediana de idade destes indivíduos foi de 31 anos (variação: 19 – 65 anos). Para o grupo pediátrico 187 (50,7%) eram do sexo masculino e 182 (49,3%) do sexo feminino. A mediana de idade foi de 13 anos (variação: 04 – 18 anos).

De todos os pacientes foram analisados os perfis clínicos e laboratoriais contidos em seus prontuários de acompanhamento médico. Cerca de 8ml de sangue periférico foram coletados em tubos contendo EDTA como anticoagulante, e conduzido ao setor de Hematologia e Biologia Molecular do Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco para a realização das análises.

4.2 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS

Todas as complicações clínicas registradas adequadamente nos prontuários, desde a data de admissão no HEMOPE até a data da avaliação final dos prontuários (12/2022), foram computadas. De acordo com as complicações clínicas os pacientes foram alocados nos seguintes subgrupos:

1. Indivíduos que desenvolveram sequestro esplênico: composto por pacientes que apresentaram esplenomegalia, acompanhada pela queda nos níveis basais de hemoglobina e hiperplasia compensatória da medula óssea;
2. Indivíduos que desenvolveram dactilite: composto por pacientes que apresentaram relatos de edema em mãos e pés acompanhados de dor e/ou calor local;

3. Indivíduos que desenvolveram AVC: composto por pacientes que apresentaram registro nos prontuários de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada mostrando lesão neurológica;
4. Indivíduos que apresentaram os resultados de DTC: normal (pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo < 170 cm/s), condicionante (pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo entre 170 – 199 cm/s) e alto risco (pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo ≥ 200 cm/s);
5. Indivíduos que tiveram doença cerebrovascular (DCV): composto por pacientes que apresentam registro nos prontuários de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada mostrando lesão neurológica consequente de acidente vascular encefálico (AVE), por pacientes com elevada faixa de risco para ocorrência de AVE determinada pela alta velocidade detectada pelo DTC (≥ 200 cm/s) e por pacientes que apresentaram outras complicações neurológicas como ataque isquêmico transitório, síndrome de Moya-Moya e infarto silencioso;
6. Indivíduos que desenvolveram síndrome torácica aguda: composto por pacientes que apresentaram registro clínico de síndrome torácica aguda, acompanhada de exame de imagem (Raio-X) de tórax, mostrando a presença de infiltrado pulmonar;
7. Indivíduos que desenvolveram priapismo: composto por pacientes do sexo masculino que apresentaram registro único ou recorrente de priapismo relatado em prontuário;
8. Indivíduos que desenvolveram osteonecrose: composto por pacientes que apresentam exames de ressonância magnética e/ou raio-X mostrando lesão óssea, além de queixas ósseo-articulares e diagnóstico confirmado por ortopedista;
9. Indivíduos que desenvolveram úlcera de perna: Composto por pacientes que apresentaram registro clínico, atual ou prévio, de úlceras de perna (agudas e crônicas), decorrentes da falha do processo de reparação tecidual no local da lesão, relatados no prontuário;

Adicionalmente todos os pacientes foram analisados de acordo com o número de crises vaso-oclusivas (CVOs) que necessitaram de atendimento hospitalar reportadas ao ano: < 3 CVOs/ano, 3 - 5 CVOs/ano e > 6 CVOs/ano).

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE (CEP-CSS/UFPE) (CAAE: 49179421.0.0000.5208), tal como ao comitê de ética do HEMOPE (CAAE:49179421.0.3001.5195) (Anexo A). Foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aos pacientes envolvidos no projeto. Este trabalho foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). A coleta de dados e das amostras só foi iniciada após a aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP. Os participantes foram orientados sobre a proposta da pesquisa e quando em concordância, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP (Anexo B).

4.4 DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos pela análise de prontuários dos pacientes que compareceram regularmente à Fundação HEMOPE. Os resultados laboratoriais foram obtidos de resultados de consultas ambulatoriais, onde os pacientes estavam sem crises e sem uso de hidroxiuréia ou transfusões sanguíneas a pelo menos 3 meses antes do momento da coleta. A ocorrência das seguintes complicações clínicas foi analisada: sequestro esplênico, dactilite, frequência de crises de dor, priapismo, síndrome torácica aguda, osteonecrose, úlceras maleolares e doença cerebrovascular. Os dados laboratoriais obtidos dos prontuários foram: contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos, plaquetas, reticulócitos, hemoglobina fetal, bilirrubinas totais e frações e lactato desidrogenase (LDH).

4.5 ANÁLISE MOLECULAR

4.5.1 Extração de DNA genômico e determinação dos marcadores clássicos

A extração do DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificada, estabelecida por Davis et. al., (1986). O DNA obtido foi então solubilizado em água deionizada e estéril e quantificado utilizando o equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%. A técnica Gap-

PCR foi usada para determinar a coherança com deleção da alfa talassemia -3,7 Kb (DODÉ *et al.*, 1992). Os haplótipos do agrupamento de genes da globina β^S também foram determinados como descrito anteriormente (POWARS, 1991).

4.5.2 Genotipagem dos polimorfismos do gene *NLRP3*

Os polimorfismos foram selecionados de acordo com a relevância em publicações de estudo de associação e impacto funcional descrito (Hitomi *et al.* 2009). Também foi considerado como critério de seleção polimorfismos com frequência do alelo menor (MAF) igual ou superior a 10% nas populações europeia e africana, considerando as respectivas populações africana (YRI) e caucasiana (CEU) (<http://www.ensembl.org/index.html>). Por fim, foram escolhidas as variantes com ensaio comercial TaqMan® pronto para venda (<https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>). Dessa forma, foram selecionados para este estudo dois polimorfismos localizados no gene *NLRP3*: rs10754558 e rs4612666.

O método empregado para a realização das genotipagens foi PCR em tempo real por discriminação alélica utilizando o sistema de sondas TaqMan®. As sondas utilizadas no estudo foram VIC e FAM e os *primers* utilizados para pesquisa dos polimorfismos estão disponíveis para o uso em pesquisa de caráter científico no site (<https://products.appliedbiosystems.com> – ID: C__26052028_10 e C__26646029_10). Para realização desta técnica, foi utilizado o aparelho QuantStudio 5 Real Time PCR System (Applied Biosystems) disponibilizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães – Recife.

As reações foram preparadas em um volume final de 10 μ L, utilizando 5 μ L de *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega), 0,25 μ L de sonda Taqman na concentração de 20 vezes (Thermofisher, Foster City, EUA), 3,75 μ L de H₂O ultrapura e 1 μ L de DNA na concentração de 50 ng/ μ L. A ciclagem para os ensaios foi 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação de PCR, foi definido o *threshold* para análise, plotando-se os sinais de fluorescência para cada amostra e assim discriminando os alelos presentes, conforme recomendações do fabricante (Life Technologies, Califórnia, USA).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas considerando a idade dos indivíduos e as complicações clínicas mais prevalentes em cada faixa etária. Dessa forma, a coorte foi dividida em grupo pediátrico (até 18 anos de idade) e grupo adulto (maiores de 18 anos). As características clínico-laboratoriais dos indivíduos foram apresentadas de forma descritiva. O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado usando o teste de Chi-quadrado. Para comparações entre variáveis categóricas, o teste Chi-quadrado ou teste exato de Fisher (quando aplicável) foi utilizado, enquanto os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para comparações entre as variáveis contínuas. Quando aplicável, as comparações foram realizadas com post hoc do teste Chi-quadrado com correção de Bonferroni (MACDONALD; GARDNER, 2000). O risco para o desenvolvimento das manifestações foi avaliado a partir da análise das datas de desenvolvimento das complicações, em relação à data de nascimento. Curvas de incidência cumulativa foram construídas refletindo o tempo para o desenvolvimento das complicações com o teste de *log-rank* utilizado para a comparação das curvas.

Análises de regressão logística binária e de regressão de riscos proporcionais de Cox foram realizadas para avaliar fatores prognósticos para as complicações. A regressão logística univariada foi realizada para cada variante como preditor do desfecho clínico. A análise de regressão logística multivariada foi realizada para avaliar a relação de independência das covariáveis avaliadas. Todos os valores de p foram ajustados para os dois lados com nível de significância a 0,05. As análises foram realizadas utilizando os softwares SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation) e GraphPad Prism (version 6.0) (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA COORTE

Os dados da caracterização laboratorial da população dividida por faixa etária constam na Tabela 1. Dos 511 pacientes adultos, a colelitíase foi a complicação mais registrada (70,6%), seguida de úlcera maleolar (23,3%), síndrome torácica aguda (16,6%), necrose asséptica de cabeça de fêmur (15,9%) e acidente vascular cerebral (13,2%) (Tabela 2). Adicionalmente, 14,9% dos pacientes desenvolveram doença cerebrovascular (inclui casos de AVC, DTC alto risco). Por fim, 27,1% dos homens desenvolveram priapismo (Tabela 2).

Tabela 1 - Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo separado por faixa etária.

Variável Laboratorial	Adulto		Pediátrico	
	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	2,55	1,50 - 4,56	2,86	1,66 – 3,78
Hb (g/dL)	7,80	4,20 – 10,50	7,90	4,80 – 10,70
Ht (%)	23,6	14,80 – 35,10	22,85	14,70 – 32,70
VCM (fL)	92,5	65,00 – 121,70	87,00	61,10 – 102,90
HCM (pg)	30,8	19,20 – 40,90	28,90	19,20 – 33,30
Reticulócitos (%)	9,70	1,30 – 32,00	9,90	0,40 – 26,40
Hb Fetal (%)	6,90	0,80 – 28,00	9,80	1,10 – 28,50
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	12,00	2,71 – 34,10	14,10	2,10 – 37,90
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	420,0	115,7 – 973,0	444,0	114,0 – 875,0
LDH (U/L)	826,0	219,0 – 3542,0	814,5	211,0 – 2401,0
BT (mg/dL)	2,83	0,88 – 15,49	1,95	0,65 – 8,92
BI (mg/dL)	2,19	0,52 – 14,94	1,49	0,35 – 8,52

RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, Ht: Hematócrito, VCM, Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, HbF: Hemoglobina fetal, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, LDH: Lactato desidrogenase, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta.

Fonte: O autor (2023).

Tabela 2 - Caracterização clínica dos pacientes adultos incluídos no estudo.

Características Clínicas dos Indivíduos Incluídos no Estudo (Adulto)	Total = 511 N (%)
Sexo	
Masculino	228 (44,6%)
Feminino	283 (55,4%)
Idade	
Mediana (anos)	31
Intervalo (anos)	19 - 65
Crises vaso-oclusivas ao ano	
<3	243 (47,6%)
>3	187 (36,7%)
>6	80 (15,7%)
Priapismo	62 (27,1%) *Masculino
Mediana idade: 16 anos	
Intervalo: 3 a 51 anos	
Síndrome Torácica Aguda	84 (16,6%)
Mediana idade: 20 anos	
Intervalo: 3 a 50 anos	
Necrose Asséptica de Cabeça de Fêmur	80 (15,9%)
Mediana idade: 25 anos	
Intervalo: 4 a 45 anos	
Úlcera Maleolar	119 (23,3%)
Mediana idade: 21 anos	
Intervalo: 5 a 56 anos	
Acidente Vascular Cerebral	67 (13,2%)
Mediana idade: 10 anos	
Intervalo: 1 a 58 anos	
Doença Cerebrovascular	76 (14,9%)
Mediana idade: 10 anos	
Intervalo: 1 a 58 anos	
Grupo doença cerebrovascular, inclui pacientes que desenvolveram episódios de AVC e/ou apresentaram resultado de DTC de alto risco.	

Fonte: O autor (2023).

Para o grupo de pacientes pediátricos, a dactilite foi a complicação de mais presente (31,1%), seguida de sequestro esplênico agudo (21,2%), colelitíase (20,4%), síndrome torácica aguda (7,0%) e acidente vascular cerebral (4,7%) (Tabela 3). A doença cerebrovascular (inclui casos de AVC, DTC alto risco, Moya-Moya, ataque isquêmico transitório e infarto silencioso), esteve presente em 11,2% dos pacientes. Por fim, 13,2% dos pacientes de sexo masculino desenvolveram priapismo. Outras complicações menos frequentes (e por este motivo não utilizadas nas análises de associação) não mostradas na Tabela 3 incluem: úlcera maleolar (0 pacientes) e osteonecrose (06 pacientes).

Tabela 3 - Caracterização clínica dos pacientes pediátricos incluídos no estudo.

Características Clínicas dos Indivíduos Incluídos no Estudo (Pediátrico)	Total = 369 N (%)
Sexo	
Masculino	187 (50,7%)
Feminino	182 (49,3%)
Idade	
Mediana (anos)	13
Intervalo (anos)	4 - 18
Crises vaso-oclusivas ao ano	
<3	215 (62,1%)
>3	86 (24,9%)
>6	45 (13,0%)
Dactilite	111 (31,1%)
Mediana idade: 0,8 anos	
Intervalo: 0,1 a 6,0	
Sequestro Esplênico Agudo	76 (21,2%)
Mediana idade: 1,9 anos	
Intervalo: 0,5 a 8,7 anos	
Priapismo	24 (13,2%) *Masculino
Mediana idade: 8,7 anos	
Intervalo: 2,8 a 14,1 anos	
Síndrome Torácica Aguda	25 (7,0%)
Mediana idade: 5,3 anos	
Intervalo: 2,5 a 12,0 anos	
Acidente Vascular Cerebral	17 (4,7%)
Mediana idade: 5,5 anos	
Intervalo: 1,9 a 12,8 anos	
Doença Cerebrovascular	40 (11,2%)
Mediana idade: 3,5	
Intervalo: 1,9 a 18,0 anos	
Moya-Moya	6 (2,2%)
Mediana idade: 4,2 anos	
Intervalo: 1,9 a 10,1 anos	
Infarto Silencioso	4 (1,5%)
Mediana idade: 5,5	
Intervalo: 4,0 a 7,2	
Ataque Isquêmico Transitório	3 (1,1%)
Mediana idade: 8,3	
Intervalo: 6,3 a 10,2	
Doppler Transcraniano	
Normal	210 (68,2%)
Condicionante	68 (22,1%)
Alto Risco	30 (9,7%)

Doença cerebrovascular, inclui pacientes que desenvolveram episódios de AVC, Moya-Moya, infarto silencioso, ataque isquêmico transitório e/ou resultado de DTC alto risco.

Fonte: O autor (2023).

5.2 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE *NLRP3* E DETERMINAÇÃO DOS MODULADORES CLÁSSICOS DA AF

Para a genotipagem foram utilizados os SNPs rs10754558 e rs4612666 do gene *NLRP3*. No grupo de pacientes adultos, todos os pacientes foram genotipados para o SNP rs10754558 e 484 (95%) foram genotipados para o SNP rs4612666. Para o grupo pediátrico todos os pacientes foram genotipados para os SNPs rs10754558 e rs4612666. A distribuição genotípica do SNP rs10754558 apresentou-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), no entanto, o SNP rs4612666 não se apresentou dentro do equilíbrio. As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs10754558 e rs4612666 do gene *NLRP3* na população total e dividida por faixa etária.

SNPs do Gene <i>NLRP3</i>	Genótipos	Frequência Genotípica (N e %)	Alelos	Frequência Alélica (%)
Grupo total				
rs10754558	CC	361 (41,0%)	C	0,65
	GC	426 (48,5%)		
	GG	93 (10,5%)	G	0,35
rs4612666	CC	333 (39,0%)	C	0,64
	TC	432 (50,7%)		
	TT	88 (10,3%)	T	0,36
Grupo Adulto				
rs10754558	CC	203 (39,7%)	C	0,65
	GC	255 (49,9%)		
	GG	53 (10,4%)	G	0,35
rs4612666	CC	183 (37,8%)	C	0,63
	TC	247 (51,0%)		
	TT	54 (11,2%)	T	0,37
Grupo Pediátrico				
rs10754558	CC	158 (42,8%)	C	0,66
	GC	171 (46,4%)		
	GG	40 (10,8%)	G	0,34
rs4612666	CC	150 (40,7%)	C	0,66
	TC	185 (50,1%)		
	TT	34 (9,2%)	T	0,34

Fonte: O autor (2023).

Dos 880 indivíduos, 811 (92,1%) foram genotipados para determinação dos haplótipos β s e 831 (94,4%) tiveram a avaliação da coherança com α talassemia $-3,7\text{kb}$ determinada. Observou-se que a composição haplotípica mais prevalente na população de estudo é o CAR/CAR, o qual está presente em 459 indivíduos (56,6%). As demais combinações haplotípicas incluíam interações CAR/BEN (25,0%), CAR/ATP (10,6%), BEN/BEN (4,3%), BEN/ATP (1,4%) ou combinações com CAM, SEN e SAU. Em relação à coherança com α talassemia $-3,7\text{kb}$, 190 (22,9%) apresentavam a mutação, sendo 23 (2,8%) em homozigose ($\alpha^{-3,7\text{kb}}\alpha / \alpha^{-3,7\text{kb}}\alpha$) e 167 (20,1%) em heterozigose ($\alpha^{-3,7\text{kb}}\alpha / \alpha\alpha$).

5.3 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPS DO GENE *NLRP3* COM AS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA AF

Para as análises de associação foram aplicados os modelos de herança genético recessivo, dominante, codominante e sobredominante. Independente do modelo genético empregado, não observamos associação entre o polimorfismo rs4612666 com as complicações clínicas dos pacientes adultos e pediátricos com AF (Tabela suplementar 2 e 3). Também não foi observada nenhuma associação no grupo de pacientes adultos com o SNP rs10754558 (Tabela suplementar 4).

Para o grupo pediátrico, ao analisar o SNP rs10754558 de acordo com o modelo dominante, que assume análise do genótipo homozigoto variante (CC) versus os genótipos heterozigoto (GC) e homozigoto selvagem (GG), foi observada menor frequência de sequestro esplênico nos pacientes de genótipo CC ($p = 0,003$; OR: 0,42; IC 95%: 0,24 – 0,73) quando comparado aos genótipos GC e GG. Além disso, o genótipo CC do rs10754558 também foi associado com maior frequência de priapismo quando comparado aos genótipos GC e GG ($p = 0,047$; OR: 2,58; IC 95%: 1,04 – 6,37) (Tabela 5). Ao realizar as análises com o grupo total, adulto e pediátrico ($N = 880$), observamos que apenas a associação com SEA permaneceu ($p = 0,036$, Tabela suplementar 5).

Tabela 5 - Comparação dos achados clínicos-laboratoriais dos pacientes pediátricos com AF para o polimorfismo NLRP3 rs10754558, conforme modelo de herança dominante.

Características clínicas e laboratoriais	Todos os pacientes N= 369	Genótipo CC Total: 158 N (%)	Genótipo GC+GG Total: 211 N (%)	OR (IC 95%)	p-valor*
RBC (x10⁶/mm³) mediana	2,86	2,93	2,80		
Intervalo	1,66 – 3,78	1,85 – 3,45	1,66 – 3,78		0,574
Hb (g/dL) mediana	7,9	7,8	8,0		
Intervalo	4,8 – 10,70	4,8 – 9,9	5,0 – 10,7		0,045
Ht (%) mediana	22,8	22,5	23,3		
Intervalo	14,7 – 32,7	14,7 – 30,0	15,7 – 32,7		0,156
VCM (fL) mediana	87,0	89,9	87,2		
Intervalo	61,1 – 102,9	67,0 – 100,7	61,1 – 102,9		0,339
HCM (pg) mediana	28,9	28,8	29,3		
Intervalo	19,2 – 33,3	19,8 – 32,8	19,2 – 33,3		0,781
Ret (%) mediana	9,9	9,0	10,7		
Intervalo	0,4 – 26,4	0,4 – 22,1	1,5 – 26,4		0,123
HbF (%) mediana	9,8	9,8	9,8		
Intervalo	1,1 – 28,5	2,6 – 22,2	1,1 – 28,5		0,446
WBC (x10³/mm³) mediana	14,1	15,0	13,9		
Intervalo	2,1 – 37,9	3,3 – 37,9	2,1 – 32,5		0,475
PLT (x10³/mm³) mediana	444	450	432		
Intervalo	114 – 875	114 – 740	131 – 875		0,957
LDH (U/L) mediana	814	845	732		
Intervalo	211 – 2401	378 – 2038	211 – 2401		0,288
BT (mg/dL) mediana	1,95	1,95	1,94		
Intervalo	0,65 – 8,92	0,65 – 8,10	0,65 – 8,92		0,628
BI (mg/dL) mediana	1,49	1,44	1,50		
Intervalo	0,35 – 8,52	0,35 – 7,62	0,38 – 8,52		0,654
Idade					
Mediana (anos)	13	13	12		
Intervalo (anos)	4 - 18	4 - 18	4 - 18		0,074
Sexo					
Masculino	187 (49,3%)	85 (53,8%)	102 (48,3%)	1 (ref.) 1,24 (0,82 – 1,88)	
Feminino	182 (50,7%)	73 (46,2%)	109 (51,7%)		0,344
Crise vaso-oclusiva/ano					
<3	243 (47,6%)	91 (60,3%)	124 (63,6%)		
>3	187 (36,7%)	40 (26,5%)	46 (23,6%)		0,798
>6	80 (15,7%)	20 (13,2%)	25 (12,8%)		
Dactilite					
Sim	111 (31,1%)	46 (29,9%)	65 (32,0%)	1 (ref.) 0,90 (0,47 – 1,42)	
Não	246 (68,9%)	108 (70,1%)	138 (68,0%)		0,729
Sequestro esplênico					
Sim	76 (21,2%)	21 (13,5%)	55 (27,0%)	1 (ref.) 0,42 (0,24 – 0,73)	
Não	283 (78,8%)	134 (86,5%)	149 (73,0%)		0,003
Priapismo					
Sim	24 (13,2%)	16 (18,8%)	8 (8,2%)	1 (ref.) 2,58 (1,04 – 6,37)	
Não	158 (86,8%)	69 (81,2%)	89 (91,8%)		0,047
STA					
Sim	25 (7,0%)	9 (5,8%)	16 (7,8%)	1 (ref.) 0,72 (0,31 – 1,68)	
Não	334 (93,0%)	146 (94,2%)	188 (92,2%)		0,297
AVC					
Sim	17 (4,7%)	9 (5,8%)	8 (3,9%)	1 (ref.) 1,50 (0,56 – 3,98)	
Não	341 (95,3%)	146 (94,2%)	195 (96,1%)		0,458

Doença cerebrovascular					
Sim	40 (11,2%)	18 (11,7%)	22 (10,8%)	1 (ref.) 1,08 (0,56 – 2,11)	0,866
Não	317 (88,8%)	136 (88,3%)	181 (89,2%)		
Moya-Moya					
Sim	6 (2,2%)	3 (2,6%)	3 (1,9%)	1 (ref.) 1,40 (0,37 – 7,09)	0,696
Não	267 (97,8%)	111 (97,4%)	156 (98,1%)		
Infarto Silencioso					
Sim	4 (1,5%)	0 (0,0%)	4 (2,5%)	1 (ref.) 0,57 (0,52 – 0,63)	0,143
Não	269 (98,5%)	114 (100,0%)	155 (97,5%)		
Ataque Isquêmico					
Transitório					
Sim	3 (1,1%)	1 (0,9%)	2 (1,3%)	1 (ref.) 0,69 (0,62 – 7,75)	1,000
Não	270 (98,9%)	113 (99,1%)	157 (98,7%)		
Doppler transcraniano					
Normal	210 (68,2%)	92 (69,7%)	118 (67,0%)		0,654
Condicionante	68 (22,1%)	26 (19,7%)	42 (19,9%)		
Alto Risco	30 (9,7%)	14 (10,6%)	16 (7,6%)		

RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, Ht: Hematócrito, VCM, Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, HbF: Hemoglobina fetal, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, LDH: Lactato desidrogenase, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, STA; Síndrome torácica aguda, AVC: Acidente vascular cerebral.

* Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de Chi-quadrado ou teste exato de Fisher. Para as variáveis contínuas foi utilizado o teste de Mann Whitney.

Fonte: O autor (2023).

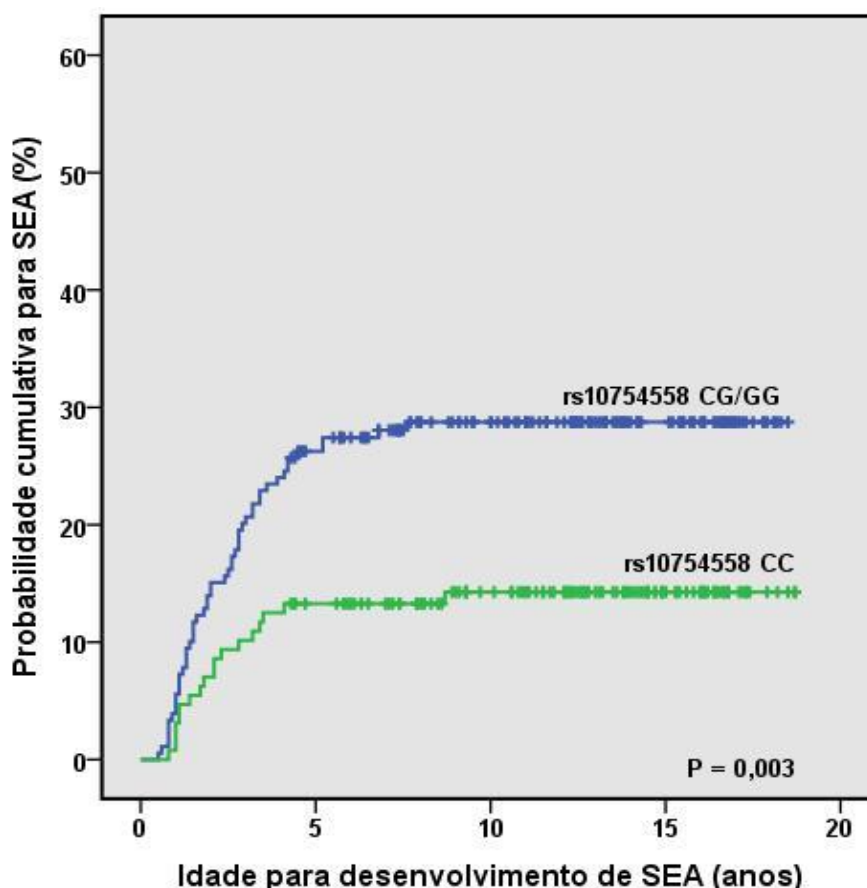
Com relação aos dados laboratoriais dos pacientes pediátricos, foi observado que indivíduos com genótipo CC para o polimorfismo *NLRP3* rs10754558 possuíam menores níveis de hemoglobina (mediana: 7,8 g/dL, 4,8 – 9,9 g/dL), quando comparado aos genótipos GC/GG (mediana: 8,0 g/dL, 5,0 – 10,7 g/dL, $p = 0,045$).

Para a análise alélica, foi observado que o alelo C do polimorfismo rs10754558 estava associado com menor frequência de desenvolvimento de sequestro esplênico em coorte pediátrica ($p = 0,009$; OR: 0.60; IC 95%: 0.42 - 0.88). Nenhuma associação estatística foi observada entre os alelos do rs10754558 e o desenvolvimento de priapismo ($p > 0,05$).

O impacto do polimorfismo rs10754558 no modelo dominante foi avaliado com relação ao tempo de desenvolvimento de sequestro esplênico na coorte pediátrica. Dos pacientes que desenvolveram SEA, 72 pacientes (95%) apresentaram o relato de diagnóstico da complicação na data aproximada, sendo estes utilizados para o modelo de risco cumulativo. A média geral de seguimento estimada para desenvolvimento de SEA foi de 15 anos (IC95%: 14 a 15 anos). Os pacientes com genótipo homozigoto selvagem (GG) e heterozigoto (GC) apresentaram um seguimento médio estimado de 13 anos (IC95%: 12 a 14) com

taxa de desenvolvimento cumulativa de SEA de 28,7%. Os pacientes com genótipo homozigoto variante (CC) apresentaram seguimento médio de 16 anos (IC95%: 15 a 17), com taxa de desenvolvimento de SEA de 14,3% ($p = 0,003$) (Figura 13).

Figura 13 - Incidência cumulativa de sequestro esplênico agudo (SEA) em pacientes pediátricos com AF de acordo com modelo dominante para o polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3*.

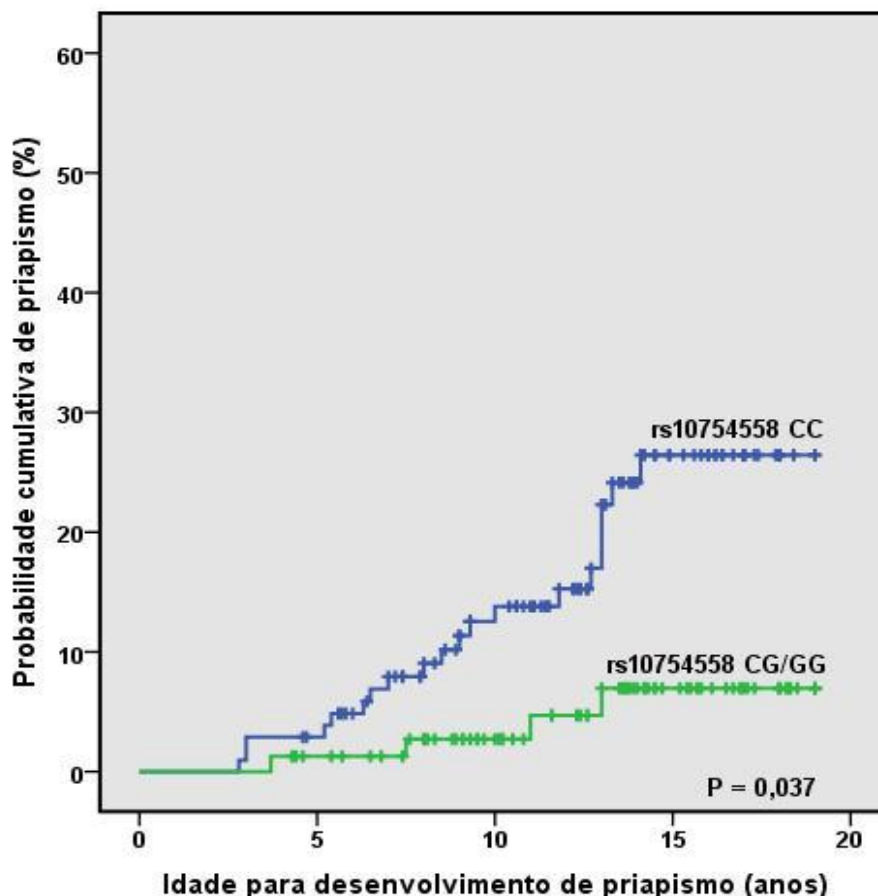


Fonte: O autor (2023).

Por fim, para o priapismo todos os pacientes que desenvolveram a complicação apresentaram o relato de diagnóstico na data aproximada, sendo estes utilizados para o modelo de risco cumulativo. A média geral de seguimento estimado para desenvolvimento de priapismo foi de 17 anos (IC95%: 16 a 17 anos). Os pacientes com genótipo homozigoto selvagem (GG) e heterozigoto (GC) apresentaram um seguimento médio estimado de 17 anos (IC95%: 17 a 18) com taxa de desenvolvimento cumulativa de priapismo de 11,3%. Os pacientes com genótipo homozigoto variante (CC) apresentaram seguimento médio de 16 anos

(IC95%: 15 a 17), com taxa de desenvolvimento de priapismo de 25,8% ($p = 0,037$) (Figura 14).

Figura 14 - Incidência cumulativa de priapismo em pacientes pediátricos com AF de acordo com modelo dominante para o polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3*.



Fonte: O autor (2023).

Em concordância, nas análises de regressão logística, o genótipo CC do rs10754558 foi associado com menor frequência de SEA comparado aos genótipos GC/GG na análise univariada ($p = 0,002$; OR: 0,42; IC 95%: 0,24 – 0,73). Além disso, um maior número de crises vaso-oclusivas ao ano foi associado com o risco de desenvolvimento SEA ($p < 0,0001$; OR: 2,83; IC 95%: 1,669 – 4,808). Na análise de regressão logística multivariada o genótipo CC do rs10754558 foi independentemente associado com menor frequência de SEA ($p = 0,013$; OR: 0,45; IC 95%: 0,24 – 0,84), considerando sexo, idade, os haplótipos da globina β^s , coerância com a mutação α -3,7Kb e número de CVO's por ano como variáveis de confudimento (Tabela 6).

Tabela 6 - Regressão logística binária e regressão de riscos proporcionais de Cox univariada e multivariada para o desenvolvimento de sequestro esplênico agudo no grupo pediátrico.

Covariáveis do Modelo		Risco de SEA			Incidência Cumulativa de SEA		
		OR	95% CI	P-valor	HR	95% CI	P-valor
Análise Univariada	Sexo (Masculino vs Feminino)	0,98	0,59 - 1,63	0,947	0,93	0,59 – 1,46	0,755
	Idade (Contínua)	1,01	0,95 - 1,08	0,654	1,07	1,00 – 1,15	0,031*
	Haplótipos (CAR/CAR vs não CAR/CAR)	0,66	0,38 – 1,15	0,150	1,50	0,92 – 2,45	0,097
	Alfa Talassemia (Mutado vs Normal)	1,13	0,60 – 2,12	0,705	1,05	0,60 – 1,83	0,861
	CVO (>3 vs ≤3 ao ano)	2,83	1,66 – 4,80	<0,0001*	2,49	1,56 – 3,97	<0,0001*
	<i>NLRP3</i> rs10754558 (CC vs GC/GG)	0,42	0,24 – 0,73	0,002*	0,48	0,29 – 0,80	0,005*
Análise Multivariada	Sexo (Masculino vs Feminino)	1,18	0,65 – 2,15	0,570	1,06	0,64 – 1,76	0,806
	Idade (Contínua)	0,96	0,88 – 1,04	0,355	1,03	0,95 – 1,12	0,461
	Haplótipos (CAR/CAR vs não CAR/CAR)	0,61	0,33 – 1,12	0,114	0,68	0,40 – 1,13	0,140
	Alfa Talassemia (Mutado vs Normal)	1,02	0,50 – 2,06	0,951	1,01	0,56 – 1,82	0,964
	CVO (>3 vs ≤3 ao ano)	3,35	1,82 – 6,16	<0,0001*	2,52	1,50 – 4,25	<0,0001*
	<i>NLRP3</i> rs10754558 (CC vs GC/GG)	0,45	0,24 – 0,84	0,013*	0,51	0,30 – 0,87	0,013*

SEA, sequestro esplênico agudo; CVO, Crise vaso-oclusiva ao ano; CAR, República Centro-africana; IC, intervalo de confiança; HR, Hazard ratio; OR, Odds ratio.

OR ou HR >1 ou <1 indicam um risco aumentado ou diminuído, respectivamente, de um evento para a primeira categoria listada.

*Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Fonte: O autor (2023).

Na análise de risco proporcional de Cox, o genótipo CC do rs10754558 foi associado com maior tempo de desenvolvimento de SEA na análise univariada ($p = 0,005$; hazard ratio, HR: 0,29; IC 95%: 0,29 – 0,80) e na análise multivariada ($p = 0,013$; HR: 0,51; IC 95%: 0,30 – 0,87), considerando sexo, idade, os haplótipos da globina β^s , coherança com a mutação α -3,7Kb e número de CVO's por ano como variáveis de confundimento (Tabela 6).

Considerando as associações observadas com o risco de SEA, avaliamos a associação do rs10754558 com a recorrência da complicação. As análises foram realizadas de acordo com o número de eventos, que foram divididos em grupos descritos como: nenhum episódio de SEA, 1-2 episódios de SEA e ≥ 3 episódios de SEA. De acordo com a Tabela 7 é possível observar que o alelo selvagem G foi associado com maior número de eventos de SEA comparado ao alelo variante C ($p = 0,0008$). O genótipo CC no modelo dominante foi associado com menor frequência ($p = 0,001$) de SEA. Para o priapismo não foram observadas associações com a recorrência da complicação (Tabela suplementar 6).

Tabela 7 - Associação dos alelos e genótipos do polimorfismo NLRP3 rs10754558, com o número de eventos de sequestro esplênico agudo (SEA) em pacientes pediátricos com AF.

Modelos	Genótipos /alelos	Número de eventos de SEA			P-valor**
		0 N (%)	1-2 N (%)	≥ 3 N (%)	
Alélico	C	330 (82,30%)	62 (15,46%)	9 (2,24%)	0,0008*
	G	156 (73,24%)	40 (18,78%)	17 (7,98%)	
Dominante	CC	134 (86,5%)	20 (12,9%)	1 (0,6%)	0,001*
	GC/GG	149 (73,0%)	40 (19,6%)	15 (7,4%)	
Recessivo	GG	28 (73,7%)	5 (13,2%)	5 (13,2%)	0,021
	CC/GC	255 (79,4%)	55 (17,1%)	11 (3,4%)	
Sobredominante	GC	121 (72,9%)	35 (21,1%)	10 (6,0%)	0,037
	CC/GG	162 (83,9%)	25 (13,0%)	6 (3,1%)	
Codominante	CC	134 (86,5%)	20 (12,9%)	1 (0,6%)	0,001*
	GC	121 (72,9%)	35 (21,1%)	10 (6,0%)	
	GG	28 (73,7%)	5 (13,2%)	5 (13,2%)	

*Diferença estatisticamente significativa.

**Comparação feita usando teste de chic-quadrado com post hoc de Bonferroni (P ajustado $< 0,008$).

Fonte: O autor (2023).

6 DISCUSSÃO

A hemólise intravascular e a inflamação estéril, por meio do grupo heme e do complexo NLRP3, contribuem diretamente para a fisiopatologia da AF. Evidências demonstraram aumento da expressão dos componentes do inflamassoma NLRP3 na AF (PITANGA *et al.*, 2016, 2021), além de participação do inflamassoma na agregação de plaquetas e neutrófilos e oclusão vascular (VATS *et al.*, 2020). Assim, a investigação dos mecanismos fisiopatológicos relacionados com a inflamação e o NLRP3 podem contribuir para a identificação de marcadores prognósticos para a doença. O impacto de variantes genéticas relacionadas com a regulação dos componentes do inflamassoma NLRP3 nas complicações clínicas da AF, ainda são poucos exploradas. Dessa forma, neste trabalho, nós observamos associação entre o polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* com a ocorrência de sequestro esplênico agudo e priapismo em pacientes pediátricos com AF.

Em um estudo com 161 pacientes brasileiros com doença falciforme, variantes em genes do complexo inflamassoma (*NLRP1* rs12150220, *NLRP1* rs11651270, *NLRP3* rs10754558, *NLRP3* rs35829419, *NLRC4* rs479333, *CARD 8* rs2043211 e *IL1B* rs16944) foram avaliadas como moduladores de risco da doença. As variantes de ganho de função *NLRP1* rs11651270 e *IL1B* rs16944 mostraram-se associadas a uma clínica mais leve, entretanto o polimorfismo *NLRP3* rs10754558 não se mostrou associado com nenhum desfecho da doença (DE FREITAS DUTRA *et al.*, 2022). Em outro estudo realizado no Brasil com 21 pacientes com AF de Manaus, não foi observada nenhuma associação dos polimorfismos *IL1B* (rs16944), *IL18* (rs187238), *NLRP1* (rs2670660/rs12150220), e *NLRP3* (rs35829419/rs10754558) com a severidade da doença (DE ALMEIDA *et al.*, 2019).

Até o momento, o nosso estudo em um grupo de 369 indivíduos com AF, foi o primeiro a relatar que o genótipo CC e o alelo C para o polimorfismo *NLRP3* rs10754558 foram associados com uma menor frequência de sequestro esplênico agudo. Além disso, este polimorfismo também se mostrou associado com menor probabilidade cumulativa e menor número de eventos de SEA em coorte pediátrica. Este polimorfismo se mostrou independentemente associado com o risco e tempo de desenvolvimento do SEA.

O baço é um órgão relacionando com a filtração e remoção do sangue de células senescentes e microrganismos por macrófagos teciduais, além de estar envolvido com a regulação de linfócitos e resposta imune adaptativa (LADU *et al.*, 2021; LAPOUM *et al.*, 2019). Na AF, o microambiente esplênico, assim como as características dos eritrócitos falcizados e aumento da expressão de moléculas de adesão, podem favorecer o rápido aprisionamento de um grande volume hemácias no baço (BROUSSE *et al.*, 2014). Além disso, os episódios de SEA podem cumulativamente propiciar o estabelecimento de um hipoesplenismo funcional, causando aumento do risco para infecções (BROUSSE *et al.*, 2014).

Apesar de ser associado com altas taxas de mortalidade nos primeiros anos de vida, a fisiopatologia e os fatores de risco do SEA ainda são pouco esclarecidos (BEN KHALED *et al.*, 2020). Esplenomegalia, palidez crônica, início precoce dos sintomas e reticulocitose foram apontados como fatores predisponentes para o SEA (BEN KHALED *et al.*, 2020). Eventos clínicos como a febre e infecção foram extremamente comuns em concomitância com um episódio de SEA, sugerindo que a inflamação exacerbada, decorrente desses eventos, também possa contribuir para o aprisionamento de hemácias no baço (BROUSSE *et al.*, 2012). Adicionalmente, fatores genéticos também podem influenciar no risco desta complicação. A variante TNF-308 G>A do gene que codifica o TNF-alfa, uma importante citocina pro-inflamatória relacionada com ativação de células endoteliais e leucócitos, adesão celular e indução da cascata de coagulação, foi associada com o risco de desenvolvimento de SEA na AF (CAJADO *et al.*, 2011). Assim como no nosso estudo, estes dados corroboram o papel da inflamação e de moduladores genéticos no desenvolvimento desta complicação.

O polimorfismo rs10754558, que se localiza na região 3'UTR do gene, mostrou-se associado com a mudança conformacional e o aumento da estabilidade do mRNA do gene *NLRP3* (HITOMI *et al.*, 2009). Em experimentos funcionais, foi observada maior atividade de construtos alelo-específicos para o alelo G quando comparado ao alelo C. Além disso, evidências apontam associação do rs10754558 com níveis de expressão de mRNA do gene *NLRP3*. Em pacientes com artrite gotosa aguda, os níveis de mRNA do *NLRP3*, e do gene *IL1B* e os níveis séricos de IL1 β eram mais altos em pacientes com genótipos GG e GC quando comparado

ao genótipo CC do polimorfismo rs10754558 (ZHANG *et al.*, 2018). Os níveis do mRNA do *NLRP3* e os níveis séricos de IL1 β também se mostraram mais elevados no genótipo GG, comparado ao genótipo CC em pacientes com AVC isquêmico (ZHU *et al.*, 2016) e doença arterial coronária (ZHOU *et al.*, 2016). Considerando estes achados, é provável que o rs10754558 influencie no risco de SEA na AF por meio da desregulação da expressão do *NLRP3* no baço.

Evidências já demonstraram o papel do inflamassoma *NLRP3* na fisiologia do baço e distúrbios esplênicos. Em modelo animal para lúpus, os níveis de expressão dos componentes indutores da piroptose (IL1 β , IL-18, *NLRP3*, Caspase-1 e TNF-alfa) foram maiores no baço quando comparado ao timo, indicando que este órgão possui um maior número de células imunorreativas (FAN *et al.*, 2020). Além disso, o aumento da expressão do *NLRP3* e a síntese e liberação excessivas de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , parecem desempenhar um papel importante na patogênese do hiperesplenismo (XIA *et al.*, 2010). Kour e colaboradores (2023) mostraram que a utilização da droga anti-inflamatória flurbiprofeno em camundongos transgênicos com AF, levou à diminuição da liberação de IL-1 β mediada pelo *NLRP3*, além de redução da congestão causada por hemácias falcizadas e melhoria na morfologia tecidual do baço e dos pulmões (KOUR *et al.*, 2023). Estes dados apontam para a relevância do complexo inflamassoma no estabelecimento de resposta inflamatória e dano tecidual no baço na AF.

Dessa forma, considerando que a inflamação é um fator desencadeador do SEA na AF, a desregulação da expressão do *NLRP3* e seus componentes pode ser um importante fator de risco. Assim, é possível que indivíduos com genótipo CC para o polimorfismo rs1075455, apresentem menores níveis de *NLRP3* e das citocinas IL1 β e IL-18, contribuindo para diminuição da resposta inflamatória exacerbada, adesão, congestão de hemácias e consequentemente, menor risco para desencadeamento do SEA.

No nosso estudo também observamos que o genótipo CC do rs10754558 foi associado com maior frequência e maior incidência cumulativa de priapismo em coorte pediátrica com AF quando comparado aos genótipos GC e GG. O priapismo é uma complicação da AF desencadeada pela vaso-oclusão e aprisionamento de hemácias nos corpos cavernosos do pênis. A hipoxemia, desidratação, pH baixo e

alterações vasculares, com aumento da adesão celular, ativação da coagulação e inflamação também contribuem para esta complicação (OZAHATA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2016). O NO é uma molécula crítica para a regulação e fisiopatologia do priapismo. Por meio da ativação da guanilato ciclase, o NO estimula a produção de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), culminando na vasodilatação e relaxamento da musculatura peniana (IDRIS *et al.*, 2022). A diminuição da biodisponibilidade do NO observada na AF, contribui para a vasculopatia e desencadeamento do priapismo. Polimorfismos no gene que codifica o Klotho (*KL*), uma proteína relacionada com a regulação da biologia do NO, já foram associados com a ocorrência de priapismo na AF (BATISTA *et al.*, 2021b).

Embora nenhum estudo, que seja do nosso conhecimento, tenha sido realizado avaliando a associação de variantes genéticas em *NLRP3* com o priapismo, evidências apontam papel do inflamassoma NLRP3 com distúrbios eréteis. Em modelo animal foi observado que a inibição do inflamassoma NLRP3 leva ao comprometimento do relaxamento dos corpos cavernosos mediado pelo NO, enquanto sua super ativação contribui para a diminuição da sensibilidade da musculatura lisa cavernosa ao NO e diminuição do relaxamento do endotélio (FAIS *et al.*, 2019). Em outro estudo foi observado que nos corpos cavernosos de ratos com baixo status androgênico (castrados), os níveis dos componentes da piroptose (*NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1 p20*, *GSDMD- N*, e *IL- 1β*) estavam significativamente elevados, quando comparado a ratos que passaram por operação simulada e ratos castrados com reposição de testosterona. Além disso, nos ratos com baixo status androgênico, foi observado aumento da fibrose dos corpos cavernosos e diminuição do NO por mecanismo dependente da piroptose (CHEN *et al.*, 2021). Tendo em vista que o inflamassoma contribui para a disfunção erétil por mecanismo dependente de NO, é provável que polimorfismos nos componentes do complexo *NLRP3* possam contribuir para a fisiopatologia do priapismo na AF.

Apesar de observada associação no grupo pediátrico, estes resultados não se confirmaram na coorte de pacientes adultos, onde a frequência de casos de priapismo é maior (pediátrico 13,2% e adulto 27,1%). Assim, nós hipotetizamos que para o grupo adulto, onde a mediana de idade de desenvolvimento de priapismo é maior, outros fatores cumulativos da doença possam ter maior impacto na ocorrência da complicação. Além disso, em contraste com os achados do sequestro

esplênico, o genótipo CC do polimorfismo *NLRP3* rs10754558 foi associado com maior risco de desenvolvimento de priapismo. Dentre as causas que possam explicar essa associação contrária, podemos citar o número pequeno de indivíduos com priapismo no grupo pediátrico (24 pacientes), fato que pode influenciar nos achados das análises de associação. Com isso, seria interessante realizar estudos com um grupo maior de indivíduos com priapismo na faixa pediátrica para verificar a existência de associação e confirmar os dados. Além disso, o impacto de variantes genéticas pode diferir dependendo dos processos e vias biológicas relevantes em um determinado tecido. Dessa forma, é possível que o rs10754558 possa influenciar o fenótipo de maneiras distintas a depender do tecido e órgão específico.

Além disso, observamos que o genótipo CC do rs10754558, se mostrou associado com menores níveis de hemoglobina quando comparado aos genótipos GC/GG. Apesar da significância estatística, nós hipotetizamos que a associação não tenha importância clínica, visto que a diferença da mediana dos níveis de hemoglobina entre os genótipos (CC = 7,8 g/dL e GC/GG = 8,0 g/dL), é muito pequena não tendo, portanto, um significado biológico.

Embora nossos achados corroborem com a importância do *NLRP3* na fisiopatologia das complicações clínicas da AF, nossos resultados são confrontados com algumas limitações. Primeiro, não determinamos os níveis de expressão dos componentes do inflamassoma *NLRP3*, a fim de melhor compreender seu impacto nas complicações da AF e as associações com as variantes genéticas encontradas. Além disso, os resultados de associação com o priapismo devem ser levados com cautela, visto que o pequeno tamanho de casos de pacientes com a complicação no grupo pediátrico, pode afetar o poder das análises de associação. Finalmente, a falta de validação em coortes independentes restringe a extrapolação de nossos achados para a população em geral.

Em resumo, nossos resultados demonstram que o polimorfismo *NLRP3* rs10754558 está associado com a ocorrência e o número de eventos de SEA em coorte pediátrica com AF. Além disso, no grupo pediátrico, o *NLRP3* rs10754558 também foi associado com a ocorrência de priapismo. Esses resultados sugerem papel da desregulação do inflamassoma na fisiopatologia das complicações clínicas da AF. Por fim, estudos futuros avaliando os níveis dos componentes do

NLRP3, podem contribuir para compreensão dos mecanismos relacionados com o impacto das variantes genéticas na inflamação e ocorrência de complicações clínicas, e para o desenvolvimento de novos métodos de avaliação de risco em pacientes com AF

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados é possível concluir que:

- O alelo C e genótipo CC do polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* mostraram-se associados com a diminuição do desenvolvimento de SEA em indivíduos pediátricos com AF;
- Pacientes com genótipo CC para o polimorfismo rs10754558, apresentaram menor incidência cumulativa para desenvolvimento de SEA, quando comparados com os genótipos GC e GG;
- O polimorfismo rs10754558 foi independentemente associado com o risco e tempo de desenvolvimento do SEA em pacientes pediátricos com AF mesmo na presença dos confundidores utilizados;
- O alelo C e o genótipo CC do polimorfismo rs10754558 foram associados com menor número de eventos de SEA em coorte pediátrica com AF;
- O genótipo CC do polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* quando comparado aos genótipos GC e GG mostrou-se associado com maior desenvolvimento de priapismo em indivíduos pediátricos com AF;
- Pacientes com o genótipo CC para o polimorfismo rs10754558, apresentaram níveis reduzidos de hemoglobina, quando comparados com os genótipos GC e GG.
- Os alelos e os genótipos dos polimorfismos rs10754558 e rs4612666 do gene *NLRP3* não foram associados com as complicações clínicas em pacientes adultos com AF;

REFERÊNCIAS

- ABDERRAZAK, A.; SYROVETS, T.; COUCHIE, D.; EL HADRI, K.; FRIGUET, B.; SIMMET, T.; ROUIS, M. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. **Redox Biology**, [s. l.], v. 4, p. 296–307, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.008>.
- ACCIOLY, J. Anemia falciforme –apresentação de um caso com infantilismo. **Arquivo da Universidade da Bahia –Faculdade de Medicina da Bahia**, [s. l.], v. 2, p. 169–198, 1947. Disponível em: www.artebahianeira.com/sobre-nos/.
- ACCOGLI, T.; HIBOS, C.; VEGRAN, F. Canonical and non-canonical functions of NLRP3. **Journal of Advanced Research**, [s. l.], 2023.
- ADDOBBATI, C.; DA CRUZ, H. L. A.; ADELINO, J. E.; MELO TAVARES RAMOS, A. L.; FRAGOSO, T. S.; DOMINGUES, A.; BRANCO PINTO DUARTE, Â. L.; OLIVEIRA, R. D. R.; LOUZADA-JÚNIOR, P.; DONADI, E. A.; PONTILLO, A.; DE AZEVEDO SILVA, J.; CROVELLA, S.; SANDRIN-GARCIA, P. Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 255–264, 2018.
- ADEKILE, A. The genetic and clinical significance of fetal hemoglobin expression in sickle cell disease. **Medical Principles and Practice**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 201–211, 2021.
- ADESINA, O. O.; NEUMAYR, L. D. Osteonecrosis in sickle cell disease: an update on risk factors, diagnosis, and management. **Hematology**, [s. l.], v. Dec, n. 1, p. 351–358, 2019.
- ADISA, O. A.; HU, Y.; GHOSH, S.; ARYEE, D.; OSUNKWO, I.; OFORI-ACQUAH, S. F. Association between plasma free haem and incidence of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome in children with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 162, n. 5, p. 702–705, 2013.
- ALAGBE, A. E.; JUSTO JUNIOR, A. S.; RUAS, L. P.; TONASSÉ, W. V.; SANTANA, R. M.; BATISTA, T. H. C.; DOMINGOS, I. F.; ARAUJO, A. S.; BEZERRA, M. A. C.; SANTOS, M. N. N.; BLOTTA, M. H. S. L. Interleukin-27 and interleukin-37 are elevated in sickle cell anemia patients and inhibit in vitro secretion of interleukin-8 in neutrophils and monocytes. **Cytokine**, [s. l.], v. 107, p. 85–92, 2018.
- ALAVI, A.; KIRSNER, R. S. Hemoglobinopathies and Leg Ulcers. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 213–216, 2015.
- ALLALI, S.; MACIEL, T. T.; HERMINE, O.; DE MONTALEMBERT, M. Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. **Haematologica**, [s. l.], v. 105, n. 2, p. 273–283, 2020.

ALSULTAN, A.; AL-SULIMAN, A. M.; ALEEM, A.; ALGAHTANI, F. H.; ALFADHEL, M. Utilizing Whole-Exome Sequencing to Characterize the Phenotypic Variability of Sickle Cell Disease. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. gtmb.2018.0058, 2018. Disponível em:

<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2018.0058>.

ALTMAN, I. A.; KLEINFELDER, R. E.; QUIGLEY, J. G.; ENNIS, W. J.; MINNITI, C. P. A treatment algorithm to identify therapeutic approaches for leg ulcers in patients with sickle cell disease. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1315–1324, 2016.

ARZOUN, H.; SRINIVASAN, M.; SAHIB, I.; FONDEUR, J.; ESCUDERO MENDEZ, L.; HAMOUDA, R. K.; MOHAMMED, L. Opioid Use in Patients With Sickle Cell Disease During a Vaso-Occlusive Crisis: A Systematic Review. **Cureus**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. e21473, 2022.

AZAR, S.; WONG, T. E. Sickle Cell Disease: A Brief Update. **Medical Clinics of North America**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 375–393, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2016.09.009>.

AZEVEDO, E. Historical note on inheritance of sickle cell anemia. **Amer J Hum Genet**, [s. l.], v. 25, p. 457–458, 1973.

BAI, B.; YANG, Y.; WANG, Q.; LI, M.; TIAN, C.; LIU, Y.; AUNG, L. H. H.; LI, P. feng; YU, T.; CHU, X. ming. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. **Cell Death and Disease**, [s. l.], v. 11, n. 9, 2020.

BALLAS, S. K.; LIEFF, S.; BENJAMIN, L. J.; DAMPIER, C. D.; HEENEY, M. M.; HOPPE, C.; JOHNSON, C. S.; ROGERS, Z. R.; SMITH-WHITLEY, K.; WANG, W. C.; TELEN, M. J. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 6–13, 2010.

BATISTA, J. V. G. F.; ARCANJO, G. S.; BATISTA, T. H. C.; SOBREIRA, M. J.; SANTANA, R. M.; DOMINGOS, I. F.; HATZLHOFFER, B. L.; FALCÃO, D. A.; PEREIRA-MARTINS, D. A.; OLIVEIRA, J. M.; ARAUJO, Amanda S.; LARANJEIRA, L. P. M.; MEDEIROS, F. S.; ALBUQUERQUE, F. P.; ALBUQUERQUE, D. M.; SANTOS, M. N.; HAZIN, M. F.; DOS ANJOS, A. C.; COSTA, F. F.; ARAUJO, Aderson S.; LUCENA-ARAÚJO, A. R.; BEZERRA, M. A. Influence of UGT1A1 promoter polymorphism, α -thalassemia and β s haplotype in bilirubin levels and cholelithiasis in a large sickle cell anemia cohort. **Annals of Hematology**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 903–911, 2021a.

BATISTA, J. V. G. F.; PEREIRA-MARTINS, D. A.; FALCÃO, D. A.; DOMINGOS, I. F.; ARCANJO, G. S.; HATZLHOFFER, B. L.; WEINHÄUSER, I.; BATISTA, T. H. C.; CARDOSO, P. R. G.; DOS ANJOS, A. C.; HAZIN, M. F.; PITTA, M. G. R.; COSTA, F. F.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAÚJO, A. R.; BEZERRA, M. A. Association of KLOTHO polymorphisms with clinical complications of sickle cell anemia. **Annals of Hematology**, [s. l.], v. 100, n. 8, p. 1921–1927, 2021b.

BAUERNFEIND, F. G.; HORVATH, G.; STUTZ, A.; ALNEMRI, E. S.; MACDONALD, K.; SPEERT, D.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; WU, J.; MONKS, B.

G.; FITZGERALD, K. A.; HORNUNG, V.; LATZ, E. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 183, n. 2, p. 787–791, 2009.

BEET, E. A. The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe. **Annals of eugenics**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 279–284, 1949.

BELCHER, J. D.; CHEN, C.; NGUYEN, J.; MILBAUER, L.; ABDULLA, F.; ALAYASH, A. I.; SMITH, A.; NATH, K. A.; HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **Blood**, [s. l.], p. 377–390, 2014. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/123/3/377/1377429/377.pdf>.

BELCHER, J. D.; ZHANG, P.; NGUYEN, J.; KISER, Z. M.; NATH, K. A.; HU, J.; TRENT, J. O.; VERCELLOTTI, G. M. Identification of a Heme Activation Site on the MD-2/TLR4 Complex. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, p. 1–10, 2020.

BEN KHALED, M.; OUEDERNI, M.; MANKAI, Y.; REKAYA, S.; BEN FRAJ, I.; DHOUIB, N.; KOUKI, R.; MELLOULI, F.; BEJAOU, M. Prevalence and predictive factors of splenic sequestration crisis among 423 pediatric patients with sickle cell disease in Tunisia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [s. l.], v. 80, n. October 2019, 2020.

BERNAUDIN, F.; ARNAUD, C.; KAMDEM, A.; HAU, I.; LELONG, F.; EPAUD, R.; PONDARRÉ, C.; PISSARD, S. Biological impact of α genes, β haplotypes, and G6PD activity in sickle cell anemia at baseline and with hydroxyurea. **Blood advances**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 626–637, 2018.

BERNAUDIN, F.; VERLHAC, S.; ARNAUD, C.; KAMDEM, A.; CHEVRET, S.; COÏC, L.; LEVEILLÉ, E.; LEMARCHAND, E.; LESPRIT, E.; ABADIE, I.; MEDEJEL, N.; MADHI, F.; LEMERLE, S.; BISCARDI, S.; BARDAKDJIAN, J.; TORRES, M.; KUENTZ, M.; FERRY, C.; SOCIÉ, G.; REINERT, P. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. **Blood**, [s. l.], v. 117, n. 4, p. 1130–1140, 2011.

BEZERRA, M. A. C.; SANTOS, M. N. N.; ARAÚJO, A. S.; GOMES, Y. M.; ABATH, F. G. C.; BANDEIRA, F. M. G. C. Molecular Variations Linked to the Grouping of Beta- And Alpha-Globin Genes in Neonatal Patients With Sickle Cell Disease in the State of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 83–88, 2007.

BLEVINS, H. M.; XU, Y.; BIBY, S.; ZHANG, S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 14, 2022.

BOWERS, A. S.; REID, H. L.; GREENIDGE, A.; LANDIS, C.; REID, M. Blood Viscosity and the Expression of Inflammatory and Adhesion Markers in Homozygous Sickle Cell Disease Subjects with Chronic Leg Ulcers. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 7, 2013.

- BOZZA, M. T.; JENEY, V. Pro-inflammatory Actions of Heme and Other Hemoglobin-Derived DAMPs. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, p. 1–13, 2020.
- BREWEN, J.; KAYA, B.; CHAKRAVORTY, S. How I manage sickle cell patients with high transcranial doppler results. **British Journal of Haematology**, [s. l.], p. 1–12, 2017.
- BROUSSE, V.; BUFFET, P.; REES, D. The spleen and sickle cell disease: The sick(led) spleen. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 165–176, 2014.
- BROUSSE, V.; ELIE, C.; BENKERROU, M.; ODIÈVRE, M. H.; LESPRIT, E.; BERNAUDIN, F.; GRIMAUD, M.; GUITTON, C.; QUINET, B.; DANGIOLO, S.; DE MONTALEMBERT, M. Acute splenic sequestration crisis in sickle cell disease: Cohort study of 190 paediatric patients. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 156, n. 5, p. 643–648, 2012.
- BRUGNARA, C. Sickle cell dehydration: Pathophysiology and therapeutic applications. **Clinical hemorheology and microcirculation**, [s. l.], v. 68, n. 2–3, p. 187–204, 2018.
- BUEHLER, P. W.; ABRAHAM, B.; VALLELIAN, F.; LINNEMAYR, C.; PEREIRA, C. P.; CIPOLLO, J. F.; JIA, Y.; MIKOLAJCZYK, M.; BORETTI, F. S.; SCHOEDON, G.; ALAYASH, A. I.; SCHAER, D. J. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. **Blood**, [s. l.], v. 113, p. 2578–2586, 2009. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/113/11/2578/1480684/zh801109002578.pdf>.
- CAJADO, C.; CERQUEIRA, B. A. V.; COUTO, F. D.; MOURA-NETO, J. P.; VILAS-BOAS, W.; DOREA, M. J.; LYRA, I. M.; BARBOSA, C. G.; REIS, M. G.; GONCALVES, M. S. TNF-alpha and IL-8: Serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 312–317, 2011.
- CERQUEIRA, B. A. V.; BOAS, W. V.; ZANETTE, A. D.; REIS, M. G.; GONCALVES, M. S. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: Contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 471–476, 2011.
- CHEN, Z. bin; LI, G.; LIN, H.; JIANG, J.; JIANG, R. Low androgen status inhibits erectile function by increasing pyroptosis in rat corpus cavernosum. **Andrology**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1264–1274, 2021.
- CHEN, G.; ZHANG, D.; FUCHS, T. A.; MANWANI, D.; WAGNER, D. D.; FRENETTE, P. S. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. **Blood**, [s. l.], v. 123, n. 24, p. 3818–3827, 2014. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/123/24/3818/1377284/3818.pdf>.

CHENG, L.; YIN, R.; YANG, S.; PAN, X.; MA, A. Rs4612666 polymorphism of the NLRP3 gene is associated with the occurrence of large artery atherosclerotic ischemic strokes and microembolic signals. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2018, 2018.

CONRAN, N.; BELCHER, J. D. Inflammation in sickle cell disease. **Clinical hemorheology and microcirculation**, [s. l.], v. 68, n. 2–3, p. 263–299, 2018.

CONRAN, N.; EMBURY, S. H. Sickle cell vaso-occlusion: The dialectic between red cells and white cells. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 246, n. 12, p. 1458–1472, 2021.

CORDOVIL, K.; TASSINARI, W.; OLIVEIRA, R. de V. C. de; HÖKERBERG, Y. Social inequalities in the temporal trend of mortality from sickle cell disease in Brazil, 1996-2019. **Cadernos de saude publica**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. e00256421, 2023.

DA GUARDA, C. C.; SANTIAGO, R. P.; FIUZA, L. M.; ALELUIA, M. M.; FERREIRA, J. R. D.; FIGUEIREDO, C. V. B.; YAHOUDEDEHOU, S. C. M. A.; DE OLIVEIRA, R. M.; LYRA, I. M.; GONÇALVES, M. de S. Heme-mediated cell activation: the inflammatory puzzle of sickle cell anemia. **Expert Review of Hematology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 533–541, 2017.

DARBARI, D. S.; SHEEHAN, V. A.; BALLAS, S. K. The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: Definition, pathophysiology, and management. **European Journal of Haematology**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 237–246, 2020.

DE ALMEIDA, E.; FRANTZ, S. R.; CESAR, P.; TARRAGÔ, A. M.; DE AMORIM XABREGAS, L.; GARCIA, N. P.; COSTA, A. G.; DE PAULA, E. V.; MALHEIRO, A. Frequency of Interleukins IL1 β /IL18 and Inflammasome NLRP1/NLRP3 Polymorphisms in Sickle Cell Anemia Patients and their Association with Severity Score. **Current Molecular Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 776–783, 2019.

DE FREITAS DUTRA, V.; LEAL, V. N. C.; FERNANDES, F. P.; SOUZA, C. R. L.; FIGUEIREDO, M. S.; PONTILLO, A. Genetic contribution and functional impairment of inflammasome in sickle cell disease. **Cytokine**, [s. l.], v. 149, 2022.

DE SÁ, N. B. R.; DE SOUZA, N. C. S.; NEIRA-GOULART, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; DA SILVA, T. P.; PILOTTO, J. H.; ROLLA, V. C.; GIACIOIA-GRIPP, C. B. W.; DE OLIVEIRA PINTO, L. M.; SCOTT-ALGARA, D.; MORGADO, M. G.; TEIXEIRA, S. L. M. Inflammasome genetic variants are associated with tuberculosis, HIV-1 infection, and TB/HIV-immune reconstitution inflammatory syndrome outcomes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2022.

DE SOUZA, G. R.; HOUNKPE, B. W.; FIUSA, M. M. L.; COLELLA, M. P.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; TRAINA, F.; COSTA, F. F.; DE PAULA, E. V. Tissue factor-dependent coagulation activation by heme: A thromboelastometry study. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1–10, 2017.

DO NASCIMENTO, M. I.; PRZIBILSKI, A. L. F.; COELHO, C. S. G.; DE AMORIM LEITE, K. F.; MAKENZE, M.; DE JESUS, S. B. Mortality attributed to sickle cell

disease in children and adolescents in Brazil, 2000–2019. **Revista de Saude Publica**, [s. l.], v. 56, 2022.

DODÉ, C.; KRISHNAMOORTHY, R.; LAMB, J.; ROCHETTE, J. Rapid analysis of α 3.7 thalassaemia and $\alpha\alpha\alpha$ anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 105–111, 1992.

DOMINGOS, I. F.; FALCÃO, D. A.; HATZLHOFFER, B. L.; CUNHA, A. F.; SANTOS, M. N.; ALBUQUERQUE, D. M.; FERTRIN, K. Y.; COSTA, F. F.; AZEVEDO, R. C.; MACHADO, C. G.; ARAÚJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Annals of Hematology**, [s. l.], v. 93, n. 7, p. 1123–1129, 2014.

DUTRA, F. F.; ALVES, L. S.; RODRIGUES, D.; FERNANDEZ, P. L.; DE OLIVEIRA, R. B.; GOLENBOCK, D. T.; ZAMBONI, D. S.; BOZZA, M. T. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 111, n. 39, p. E4110–E4118, 2014.

DUTRA, F. F.; BOZZA, M. T. Heme on innate immunity and inflammation. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 5 MAY, p. 1–20, 2014.

EATON, W. A. Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease: A retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's Science paper. **American Journal of Hematology**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 205–211, 2020.

EHTESHAM, N.; ZARE RAFIE, M.; ESMAELZADEH, E.; DEHANI, M.; DAVAR, S.; MOSALLAEI, M.; PAKZAD, B.; GHORASHI, T.; DARVISH, H.; SOOSANABADI, M. Three functional variants in the NLRP3 gene are associated with susceptibility and clinical characteristics of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, [s. l.], v. 30, n. 8, p. 1273–1282, 2021.

ELLIOTT, E. I.; SUTTERWALA, F. S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 265, n. 1, p. 35–52, 2015.

ERDEI, J.; TÓTH, A.; BALOGH, E.; NYAKUNDI, B. B.; BÁNYAI, E.; RYFFEL, B.; PARAGH, G.; CORDERO, M. D.; JENEY, V. Induction of NLRP3 inflammasome activation by heme in human endothelial cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018.

FAIS, R. S.; RODRIGUES, F. L.; PEREIRA, C. A.; MENDES, A. C.; MESTRINER, F.; TOSTES, R. C.; CARNEIRO, F. S. The inflammasome NLRP3 plays a dual role on mouse corpora cavernosa relaxation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019.

FAN, H.; ZHANG, S.; LI, N.; FAN, P.; HU, X.; LIANG, K.; CHENG, X. Stable expression ratios of five pyroptosis-inducing cytokines in the spleen and thymus of mice showed potential immune regulation at the organ level. **Lupus**, [s. l.], p. 1–13, 2020.

FAROOQ, S.; TESTAI, F. D. Neurologic Complications of Sickle Cell Disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, [s. l.], v. 19, n. 4, 2019.

FASANO, R. M.; MEIER, E. R.; HULBERT, M. L. Cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 17–25, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2014.08.007>.

FERRONE, F. A. Targeting HbS Polymerization. **Seminars in Hematology**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 53–59, 2018.

FERTRIN, K. Y.; COSTA, F. F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Review of Hematology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 443–458, 2010.

FIGUEIREDO, R. T.; FERNANDEZ, P. L.; MOURAO-SA, D. S.; PORTO, B. N.; DUTRA, F. F.; ALVES, L. S.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, P. L.; GRAÇA-SOUZA, A. V.; BOZZA, M. T. Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 28, p. 20221–20229, 2007.

FLANAGAN, J. M.; FROHLICH, D. M.; HOWARD, T. A.; SCHULTZ, W. H.; DRISCOLL, C.; NAGASUBRAMANIAN, R.; MORTIER, N. A.; KIMBLE, A. C.; AYGUN, B.; ADAMS, R. J.; HELMS, R. W.; WARE, R. E. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood**, [s. l.], v. 117, n. 24, p. 6681–6684, 2011.

FLANAGAN, J. M.; SHEEHAN, V.; LINDER, H.; HOWARD, T. A.; WANG, Y. D.; HOPPE, C. C.; AYGUN, B.; ADAMS, R. J.; NEALE, G. A.; WARE, R. E. Genetic mapping and exome sequencing identify 2 mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. **Blood**, [s. l.], v. 121, n. 16, p. 3237–3245, 2013.

FRANCHI, L.; EIGENBROD, T.; MUÑOZ-PLANILLO, R.; NUÑEZ, G. The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 241–247, 2009.

GATIN, L.; ROGIER DE MARE, A.; MARY, P.; VIALLE, R.; DAMSIN, J. P. Osteonecrosis of the femoral head: A proposed new treatment in homozygous sickle cell disease. **Hemoglobin**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 1–9, 2016.

GBOTOSHO, O. T.; KAPETANAKI, M. G.; KATO, G. J. The Worst Things in Life are Free: The Role of Free Heme in Sickle Cell Disease. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, p. 1–22, 2021.

GHOSH, S.; ADISA, O. A.; CHAPPA, P.; TAN, F.; JACKSON, K. A.; ARCHER, D. R.; OFORI-ACQUAH, S. F. Extracellular heme triggers acute chest syndrome in sickle mice. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 123, n. 11, p. 4809–4820, 2013.

GONZALEZ-PACHECO, H.; VARGAS-ALARCON, G.; ANGELES-MARTINEZ, J.; MARTINEZ-SANCHEZ, C.; PEREZ-MENDEZ, O.; HERRERA-MAYA, G.;

MARTINEZ-RIOS, M. A.; PEÑA-DUQUE, M. A.; POSADAS-ROMERO, C.; FRAGOSO, J. M. The NLRP3 and CASP1 gene polymorphisms are associated with developing of acute coronary syndrome: a case-control study. **Immunologic Research**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 862–868, 2017.

GUILLIAMS, K. P.; FIELDS, M. E.; DOWLING, M. M. Advances in Understanding Ischemic Stroke Physiology and the Impact of Vasculopathy in Children With Sick Cell Disease. **Stroke**, [s. l.], v. 50, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.118.020482>.

HACHIM, M. Y.; KHALIL, B. A.; ELEMAM, N. M.; MAGHAZACHI, A. A. Pyroptosis: The missing puzzle among innate and adaptive immunity crosstalk. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 323–338, 2020.

HAFNER-BRATKOVIČ, I. Inflammasome formation and triggers. *Em: INFLAMMASOME BIOLOGY*. [S. l.]: Elsevier, 2023. p. 17–32.

HAHN, E. v; GILLESPIE, E. B. SICKLE CELL ANEMIA: REPORT OF A CASE GREATLY IMPROVED BY SPLENECTOMY. EXPERIMENTAL STUDY OF SICKLE CELL FORMATION. **Arch Intern Med (Chic)**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 233–254, 1927. Disponível em: <http://archinte.jamanetwork.com/>.

HATZLHOFFER, B. L. D.; PEREIRA-MARTINS, D. A.; DE FARIAS DOMINGOS, I.; ARCANJO, G. da S.; WEINHÄUSER, I.; FALCÃO, D. A.; FARIAS, I. C. C.; DE FREITAS BATISTA, J. V. G.; PRADO, L. P. L.; OLIVEIRA, J. M. F.; BATISTA, T. H. C.; SOBREIRA, M. J. de V. C.; DE SANTANA, R. M.; ARAÚJO, A. B. de S.; DE MELO, M. A.; DE ANCÂNTARA, B. V.; COELHO-SILVA, J. L.; DE MOURA RAFAEL, A. B. L.; DE LIMA SILVA, D. M.; ALBUQUERQUE, F. P.; SANTOS, M. N. N.; DOS ANJOS, A. C.; COSTA, F. F.; DA SILVA ARAÚJO, A.; LUCENA-ARAÚJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C. Alpha thalassemia, but not β S-globin haplotypes, influence sickle cell anemia clinical outcome in a large, single-center Brazilian cohort. **Annals of Hematology**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 921–931, 2021.

HELVACI, M.; ACIPAYAM, C.; AYDOGAN, A.; AKKUCUK, S.; ORUC, C.; GOKCE, C. Acute chest syndrome in severity of sickle cell diseases. **Int J Clin Exp Med**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 5790–5795, 2014.

HERRICK, J. Peculiar Elongated and Sickle-Shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. **Arch Intern Med (Chic)**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 517–521, 1910.

HITOMI, Y.; EBISAWA, M.; TOMIKAWA, M.; IMAI, T.; KOMATA, T.; HIROTA, T.; HARADA, M.; SAKASHITA, M.; SUZUKI, Y.; SHIMOJO, N.; KOHNO, Y.; FUJITA, K.; MIYATAKE, A.; DOI, S.; ENOMOTO, T.; TANIGUCHI, M.; HIGASHI, N.; NAKAMURA, Y.; TAMARI, M. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 124, n. 4, 2009.

HOPPE, C. Defining stroke risk in children with sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, [s. l.], v. 128, n. 6, p. 751–766, 2005.

IDRIS, I. M.; BURNETT, A. L.; DEBAUN, M. R. Epidemiology and treatment of priapism in sickle cell disease. **Hematology**, [s. l.], p. 450–452, 2022.

JAIN, S.; BAKSHI, N.; KRISHNAMURTI, L. Acute Chest Syndrome in Children with Sickle Cell Disease. **Pediatric, Allergy, Immunology, and Pulmonology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 191–201, 2017.

JANG, T.; POPLAWSKA, M.; CIMPEANU, E.; MO, G.; DUTTA, D.; LIM, S. H. Vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: a vicious cycle of secondary events. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2021.

JIMÉNEZ-CASTRO, M. B.; CORNIDE-PETRONIO, M. E.; GRACIA-SANCHO, J.; PERALTA, C. Inflammasome-mediated inflammation in liver ischemia-reperfusion injury. **Cells**, [s. l.], v. 8, n. 10, 2019.

JOICE, G. A.; KATES, M.; SOPKO, N. A.; HANNAN, J. L.; BIVALACQUA, T. J. Sickle Cell Disease in Priapism: Disparity in Care?. **Urology**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 72–79, 2015.

JONES, H.; BLINDER, M.; ANADKAT, M. Cutaneous Manifestations of Sickle Cell Disease. **Open Journal of Blood Diseases**, [s. l.], v. 03, n. 03, p. 94–99, 2013.

KATO GJ, HEBBEL RP, STEINBERG MH, G. MT. Vasculopathy in Sickle Cell Disease: Biology, Pathophysiology, Genetics, Translational Medicine and New Research Directions. **Am J Hematol**, [s. l.], v. 84, n. 9, p. 618–625, 2009.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.

KATO, G. J.; PIEL, F. B.; REID, C. D.; GASTON, M. H.; OHENE-FREMPPONG, K.; KRISHNAMURTI, L.; SMITH, W. R.; PANEPINTO, J. A.; WEATHERALL, D. J.; COSTA, F. F.; VICHINSKY, E. P. Sickle cell disease. **Nat. Rev. Dis. Primers**, [s. l.], v. 4, n. 18010, p. 1–22, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017.

KAVANAGH, P. L.; FASIPE, T. A.; WUN, T. Sickle Cell Disease: A Review. **JAMA**, [s. l.], v. 328, n. 1, p. 57–68, 2022.

KELLEY, N.; JELTEMA, D.; DUAN, Y.; HE, Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 13, 2019.

KOUR, D.; ALI, M.; KHAJURIA, P.; SHARMA, K.; GHOSH, P.; KAUR, S.; MAHAJAN, S.; RAMAJAYAN, P.; BHARATE, S. S.; BHARDWAJ, S.; SAWANT, S. D.; REDDY, D. S.; KUMAR, A.; FLANAGAN, J. M.; KAHNT, A. S.; KUMAR, A. Flurbiprofen inhibits heme induced NLRP3 inflammasome in Berkeley sickle cell disease mice. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], n. April, p. 1–15, 2023.

- KUMAR, N.; KAUR, M.; SINGH, G.; VALECHA, S.; KHINDA, R.; DI NAPOLI, M.; SINGH, M.; SINGH, P.; MASTANA, S. A susceptibility putative haplotype within NLRP3 inflammasome gene influences ischaemic stroke risk in the population of Punjab, India. **International Journal of Immunogenetics**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 260–270, 2022.
- KUTLAR, A.; EMBURY, S. H. Cellular adhesion and the endothelium: P-selectin. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 323–339, 2014.
- KUYPERS, F. A. Hemoglobin S polymerization and red cell membrane changes. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 155–179, 2014.
- LA RUSSA, A.; LOFARO, D.; MONTESANTO, A.; LA RUSSA, D.; ZAZA, G.; GRANATA, S.; DI DIO, M.; SERRA, R.; ANDREUCCI, M.; BONOFILIO, R.; PERRI, A. Association between NLRP3 rs10754558 and CARD8 rs2043211 Variants and Susceptibility to Chronic Kidney Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 4, 2023.
- LADU, A. I.; AIYENIGBA, A. O.; ADEKILE, A.; BATES, I. The spectrum of splenic complications in patients with sickle cell disease in Africa: a systematic review. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 26–42, 2021.
- LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. D. Nlrp3: An immune sensor of cellular stress and infection. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 792–795, 2010.
- LAPOUM, C.; HOSS, S. El; COCHET, S.; DUSSIOT, M.; ELIE, C.; GUITTON, C.; MARIE, H.; KIM, C. L. Van; ARONOVICZ, Y. C.; NEMER, W. El; BROUSSE, V. Insights into determinants of spleen injury in sickle cell anemia. [s. l.], v. 3, n. 15, p. 1–3, 2019.
- LEE, Y. H.; BAE, S. C. Association between functional NLRP3 polymorphisms and susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: A meta-analysis. **Lupus**, [s. l.], v. 25, n. 14, p. 1558–1566, 2016.
- LEE, M. T.; PIOMELLI, S.; GRANGER, S.; MILLER, S. T.; HARKNESS, S.; BRAMBILLA, D. J.; ADAMS, R. J. Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia (STOP): extended follow-up and final results. **Blood**, [s. l.], v. 108, n. 3, p. 847–853, 2006.
- LV, J.; JIANG, X.; ZHANG, J.; PENG, X.; LIN, H. Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components NLRP3 and CARD8 confer risk of ischemic stroke in men. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, [s. l.], v. 29, n. 8, 2020.
- MACDONALD, P. L.; GARDNER, R. C. Type I error rate comparisons of post hoc procedures for $I \times J$ chi-square tables. **Educational and Psychological Measurement**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 735–754, 2000.

MAHENDRA, J.; RAO, A. N.; MAHENDRA, L.; FAGEEH, H. N.; FAGEEH, H. I.; BALAJI, T. M.; VARADARAJAN, S.; JAGANNATHAN, R.; MEHTA, D.; SURESH, V. V.; RAJ, A. T.; PATIL, S. Genetic polymorphisms of nlrp3 (Rs4612666) and card8 (rs2043211) in periodontitis and cardiovascular diseases. **Biology**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2021.

MAN, S. M.; KANNEGANTI, T.-D. Regulation of inflammasome activation. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 265, p. 6–21, 2015.

MASON, V. R. Sickle cell anemia. **JAMA**, [s. l.], v. 79, n. 16, p. 1318–1320, 1922.

MENU, P.; VINCE, J. E. The NLRP3 inflammasome in health and disease: The good, the bad and the ugly. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 166, n. 1, p. 1–15, 2011.

MEYERS, A. K.; ZHU, X. The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammaging. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 1808, p. 1–22, 2020.

MIGOTSKY, M.; BEESTRUM, M.; BADAWY, S. M. Recent Advances in Sickle-Cell Disease Therapies: A Review of Voxelotor, Crizanlizumab, and L-glutamine. **Pharmacy**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 123, 2022.

MIGUEL, L. I.; LEONARDO, F. C.; TORRES, L. S.; GARCIA, F.; MENDONÇA, R.; FERREIRA, W. A.; GOTARDO, É. M. F.; FABRIS, F. C. Z.; BRITO, P. L.; COSTA, F. F.; CONRAN, N. Heme induces significant neutrophil adhesion in vitro via an NFκB and reactive oxygen species-dependent pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 476, n. 11, p. 3963–3974, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/protocolos-e-diretrizes>,.

MINNITI, C. P.; ECKMAN, J.; SEBASTIANI, P.; STEINBERG, M. H.; BALLAS, S. K. Leg ulcers in sickle cell disease. *Em: AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY*, 2010, [s. l.], . **Anais [...]**. [S. l.]: Wiley-Liss Inc., 2010. p. 831–833.

MINNITI, C. P.; KATO, G. J. Critical Reviews: How we treat sickle cell patients with leg ulcers. **American Journal of Hematology**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 22–30, 2016.

MORRIS, C. R. Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. **Haematologica**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 1–5, 2011.

NADER, E.; CONRAN, N.; ROMANA, M.; CONNES, P. Vasculopathy in Sickle Cell Disease: From Red Blood Cell Sickling to Vascular Dysfunction. **Comprehensive Physiology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1785–1803, 2021a.

NADER, E.; GARNIER, Y.; CONNES, P.; ROMANA, M. Extracellular Vesicles in Sickle Cell Disease: Plasma Concentration, Blood Cell Types Origin Distribution and Biological Properties. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 8, 2021b.

NADER, E.; ROMANA, M.; CONNES, P. The Red Blood Cell—Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, p. 1–11, 2020.

NEEL, J. v. The Inheritance of Sickle Cell Anemia. **Science**, [s. l.], v. 110, p. 64–66, 1949.

NOVELLI, E. M.; GLADWIN, M. T. Crises in sickle cell disease. **Chest**, [s. l.], v. 149, n. 4, p. 1082–1093, 2016.

NYAKUNDI, B. B.; TÓTH, A.; BALOGH, E.; NAGY, B.; ERDEI, J.; RYFFEL, B.; PARAGH, G.; CORDERO, M. D.; JENEY, V. Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 β production upon intravascular hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1865, n. 2, p. 464–475, 2019a.

NYAKUNDI, B. B.; TÓTH, A.; BALOGH, E.; NAGY, B.; ERDEI, J.; RYFFEL, B.; PARAGH, G.; CORDERO, M. D.; JENEY, V. Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 β production upon intravascular hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1865, n. 2, p. 464–475, 2019b.

OHTO, U.; KAMITSUKASA, Y.; ISHIDA, H.; ZHANG, Z.; MURAKAMI, K.; HIRAMA, C.; MAEKAWA, S.; SHIMIZU, T. Structural basis for the oligomerization-mediated regulation of NLRP3 inflammasome activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [s. l.], v. 119, n. 11, p. e2121353119, 2022.

OZAHATA, M. C.; PAGE, G. P.; GUO, Y.; FERREIRA, J. E.; DINARDO, C. L.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; LOUREIRO, P.; MOTA, R. A.; RODRIGUES, D. O. W.; BELISARIO, A. R.; MAXIMO, C.; FLOR-PARK, M. V.; CUSTER, B.; KELLY, S.; SABINO, E. C. Clinical and Genetic Predictors of Priapism in Sickle Cell Disease: Results from the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study III Brazil Cohort Study. **Journal of Sexual Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 1988–1999, 2019.

OZBAYER, C.; KURT, H.; YAGCI, E.; KEBAPCI, M. N.; HASAN, C.; GUNES, V.; DEGIRMENCI, I. NLRP3-Inflammasome Gene Variations in the Risk of Type 2 Diabetes. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 1–14, 2022. Disponível em: www.begellhouse.com.

PAIK, S.; KIM, J. K.; SILWAL, P.; SASAKAWA, C.; JO, E. K. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. **Cellular and Molecular Immunology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 1141–1160, 2021.

PAULING, L.; ITANO, H. A.; SINGER, S. J.; WELLS, I. C. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. [s. l.], v. 110, p. 543–548, 1949.

PICCIN, A.; MURPHY, C.; EAKINS, E.; RONDINELLI, M.; DAVES, M.; VECCHIATO, C.; WOLF, D.; MAHON, C. M.; SMITH, O. P. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anemia and possible treatment. **Eur J Haematol.**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 319–330, 2019.

PIEL, F. B.; HAY, S. I.; GUPTA, S.; WEATHERALL, D. J.; WILLIAMS, T. N. Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010-2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. **PLoS Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2013.

PIEL, F. B.; PATIL, A. P.; HOWES, R. E.; NYANGIRI, O. A.; GETHING, P. W.; WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J.; HAY, S. I. hypothesis. **Nature Communications**, [s. l.], v. 1, n. 104, 2010.

PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017.

PIEL, F. B.; TATEM, A. J.; HUANG, Z.; GUPTA, S.; WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J. Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: A quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. **The Lancet Global Health**, [s. l.], v. 2, n. 2, 2014.

PINCEZ, T.; ASHLEY-KOCH, A. E.; LETTRE, G.; TELEN, M. J. Genetic Modifiers of Sickle Cell Disease. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1097–1124, 2022.

PITANGA, T. N.; OLIVEIRA, R. R.; ZANETTE, D. L.; GUARDA, C. C.; SANTIAGO, R. P.; SANTANA, S. S.; NASCIMENTO, V. M. L.; LIMA, J. B.; CARVALHO, G. Q.; MAFFILI, V. V.; CARVALHO, M. O. S.; ALCÂNTARA, L. C. J.; BORGES, V. M.; GONCALVES, M. S. Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. **Cytokine**, [s. l.], v. 83, p. 75–84, 2016.

PITANGA, T. N.; SANTANA, S. S.; ZANETTE, D. L.; GUARDA, C. C.; SANTIAGO, R. P.; MAFFILI, V. V.; LIMA, J. B.; CARVALHO, G. Q.; FILHO, J. R.; FERREIRA, J. R. D.; ALELUIA, M. M.; NASCIMENTO, V. M. L.; CARVALHO, M. O. S.; LYRA, I. M.; BORGES, V. M.; OLIVEIRA, R. R.; GONCALVES, M. S. Effect of lysed and non-lysed sickle red cells on the activation of NLRP3 inflammasome and LTB4 production by mononuclear cells. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 70, n. 7, p. 823–834, 2021.

PNTN-CGSH/DAET/SAES/MS. **Relatório Anual de dados do PNTN, 2020-2022**. [S. l.: s. n.], 2023.

POWARS, D. R. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematology/oncology clinics of North America**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 475–93, 1991.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X).

REITER, C. D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J. E.; HOGG, N.; CANNON, R. O.; SCHECHTER, A. N.; GLADWIN, M. T. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 1383–1389, 2002.

REPARAZ, P.; SERRANO, I.; ADAN-PEDROSO, R.; ASTIGARRAGA, I.; PEDRO OLABARRI, J. de; ECHEBARRIA-BARONA, A.; GARCIA-ARIZA, M.; LOPEZ-ALMARAZ, R.; DEL ORBE-BARRETO, R. A.; VARA-PAMPLIEGA, M.; GONZALEZ-URDIALES, P. Clinical management of the acute complications of sickle cell anemia: 11 years of experience in a tertiary hospital. **Anales de Pediatría**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 4–11, 2022.

REZENDE, P. V.; VIANA, M. B.; MURAO, M.; CHAVES, A. C. L.; RIBEIRO, A. C. F. Sequestro esplênico agudo em coorte de crianças com anemia falciforme. **Jornal de Pediatría**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 163–169, 2009.

SAAH, E.; FADAEI, P.; GURKAN, U. A.; SHEEHAN, V. Sickle Cell Disease Pathophysiology and Related Molecular and Biophysical Biomarkers. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1077–1095, 2022.

SALGAR, S.; BOLÍVAR, B. E.; FLANAGAN, J. M.; ANUM, S. J.; BOUCHIER-HAYES, L. The NLRP3 inflammasome fires up heme-induced inflammation in hemolytic conditions. **Translational Research**, [s. l.], v. 252, p. 34–44, 2023.

SANTOS, H. P.; DOMINGOS, C. R. B.; CASTRO, S. M. Twenty Years of Neonatal Screening for Sickle Cell Disease in Brazil: The Challenges of a Continental Country with High Genetic Heterogeneity. **Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening**, [s. l.], v. 9, p. e20210002, 2021. Disponível em: <http://www.scielo.br/jiems/>.

SEOANE, P. I.; LEE, B.; HOYLE, C.; YU, S.; LOPEZ-CASTEJON, G.; LOWE, M.; BROUGH, D. The NLRP3-inflammasome as a sensor of organelle dysfunction. **The Journal of cell biology**, [s. l.], v. 219, n. 12, 2020.

SERJEANT, G. R. One hundred years of sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 151, n. 5, p. 425–429, 2010.

SERJEANT, G. R. The natural history of sickle cell disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 10, p. 1–11, 2013.

SERJEANT, G. R.; VICHINSKY, E.; HERRICK, J.; MASON, V. Variability of homozygous sickle cell disease : The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, [s. l.], n. March, p. 0–1, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.06.004>.

SETTY, B. N. Y.; BETAL, S. G.; ZHANG, J.; STUART, M. J. Heme induces endothelial tissue factor expression: Potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 2202–2209, 2008.

SETTY, B. N. Y.; GAYEN BETAL, S. Microvascular endothelial cells express a phosphatidylserine receptor: a functionally active receptor for phosphatidylserine-positive erythrocytes. **Blood**, [s. l.], v. 111, n. 2, p. 905–914, 2008. Disponível em: www.bloodjournal.org.

SEVERYNS, M.; GAYET, L. E. Aseptic osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell anemia. **Morphologie**, [s. l.], v. 105, n. 349, p. 94–101, 2021.

SHAKERI, A.; VAN ASSELDONK, B.; ELTERMAN, D. S. Prevention of Ischemic Priapism in Sickle Cell Disease: Sildenafil Commentary on: Randomized Controlled Trial of Sildenafil for Preventing Recurrent Ischemic Priapism in Sickle Cell Disease. **Urology**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 1055–1056, 2015.

SHARIF, H.; WANG, L.; WANG, W. L.; MAGUPALLI, V. G.; ANDREEVA, L.; QIAO, Q.; HAUENSTEIN, A. V.; WU, Z.; NÚÑEZ, G.; MAO, Y.; WU, H. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. **Nature**, [s. l.], v. 570, n. 7761, p. 338–343, 2019.

SHAVER, C. M.; LANDSTREET, S. R.; PUGAZENTHI, S.; SCOTT, F.; PUTZ, N.; WARE, L. B.; BASTARACHE, J. A. The NLRP3 inflammasome in macrophages is stimulated by cell-free hemoglobin. **Physiological Reports**, [s. l.], v. 8, n. 21, 2020.

SHI, H.; SHAO, B.; GAO, L.; VENKATESAN, T.; MCDANIEL, J. M.; ZHOU, M.; MCGEE, S.; YU, P.; AHAMED, J.; JOURNEYCAKE, J.; GEORGE, J. N.; XIA, L. Endothelial VWF is critical for the pathogenesis of vaso-occlusive episode in a mouse model of sickle cell disease. **PNAS**, [s. l.], v. 119, n. 34, p. e2207592119, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2207592119>.

SHMUKLER, B. E.; RIVERA, A.; BHARGAVA, P.; NISHIMURA, K.; HSU, A.; KIM, E. H.; TRUDEL, M.; RUST, M. B.; HUBNER, C. A.; BRUGNARA, C.; ALPER, S. L. Combined genetic disruption of K-Cl cotransporters and Gardos channel KCNN4 rescues erythrocyte dehydration in the SAD mouse model of sickle cell disease. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [s. l.], v. 79, 2019.

SHRINER, D.; ROTIMI, C. N. Whole-Genome-Sequence-Based Haplotypes Reveal Single Origin of the Sickle Allele during the Holocene Wet Phase. **American Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 547–556, 2018.

SILVA, I. V.; REIS, A. F.; PALARÉ, M. J.; FERRÃO, A.; RODRIGUES, T.; MORAIS, A. Sickle cell disease in children: Chronic complications and search of predictive factors for adverse outcomes. **European Journal of Haematology**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 157–161, 2015.

SILVA-PINTO, A. C.; ALENCAR DE QUEIROZ, M. C.; ANTONIAZZO ZAMARO, P. J.; ARRUDA, M.; PIMENTEL DOS SANTOS, H. The neonatal screening program in Brazil, focus on sickle cell disease (SCD). **International Journal of Neonatal Screening**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2019.

STEINBERG, Martin H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, [s. l.], v. 136, n. 211, p. 2392–2400, 2020. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/136/21/2392/1789980/bloodbld2020007645.pdf>.

STEINBERG, Martin H. Fetal hemoglobin in sickle hemoglobinopathies: High HbF genotypes and phenotypes. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1–10, 2020.

STEINBERG, M. H. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. **The Scientific World JOURNAL**, [s. l.], v. 8, p. 1295–1324, 2008. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2008/798678/abs/>.

STEINBERG, M. H.; ADEWOYE, A. H. Modifier genes and sickle cell anemia. **Current opinion in hematology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 131–6, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567954>.

STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, [s. l.], v. 87, n. 8, p. 795–803, 2012.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, [s. l.], v. 14, p. 261–90, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis->.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 477–489, 2019.

TORRES, L. S.; HIDALGO, A. Neutrophils as drivers of vascular injury in sickle cell disease. **Immunological Reviews**, [s. l.], 2022.

VATS, R.; BRZOSKA, T.; BENNEWITZ, M. F.; JIMENEZ, M. A.; PRADHAN-SUNDD, T.; TUTUNCUOGLU, E.; JONASSAINT, J.; GUTIERREZ, E.; WATKINS, S. C.; SHIVA, S.; SCOTT, M. J.; MORELLI, A. E.; NEAL, M. D.; KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; SUNDD, P. Platelet extracellular vesicles drive inflammasome-IL-1 β -dependent lung injury in sickle cell disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 201, n. 1, p. 33–46, 2020.

VELUSWAMY, S.; SHAH, P.; DENTON, C.; CHALACHEVA, P.; KHOO, M.; COATES, T. Vaso-Occlusion in Sickle Cell Disease: Is Autonomic Dysregulation of the Microvasculature the Trigger?. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1690, 2019.

VOGEL, S.; ARORA, T.; WANG, X.; MENDELSON, L.; NICHOLS, J.; ALLEN, D.; SHET, A. S.; COMBS, C. A.; QUEZADO, Z. M. N.; THEIN, S. L. The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in sickle cell disease via HMGB1/TLR4 and Bruton tyrosine kinase. **Blood Advances**, [s. l.], v. 2, n. 20, p. 2672–2680, 2018.

VOGEL, S.; KAMIMURA, S.; ARORA, T.; SMITH, M. L.; ALMEIDA, L. E. F.; COMBS, C. A.; THEIN, S. L.; QUEZADO, Z. M. N. NLRP3 inflammasome and bruton tyrosine kinase inhibition interferes with upregulated platelet aggregation and in vitro thrombus formation in sickle cell mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 555, p. 196–201, 2021.

WANG, H. H. S.; HERBST, K. W.; ROTHMAN, J. A.; SHAH, N. R.; WIENER, J. S.; ROUTH, J. C. Trends in Sick Cell Disease-related Priapism in U.S. Children's Hospitals. **Urology**, [s. l.], v. 89, p. 118–122, 2016.

WARE, R. E.; DAVIS, B. R.; SCHULTZ, W. H.; BROWN, R. C.; AYGUN, B.; SARNAIK, S.; ODAME, I.; GEORGE, A.; OWEN, W.; LUCHTMAN-JONES, L.; ROGERS, Z. R.; HILLIARD, L.; GAUGER, C.; PICCONE, C.; LEE, M. T.; KWIATKOWSKI, J. L.; JACKSON, S.; MILLER, S. T.; ROBERTS, C.; HEENEY, M. M.; KALFA, T. A.; NELSON, S.; IMRAN, H.; NOTTAGE, K.; ALVAREZ, O.; RHODES, M.; WOOD, J.; PILLER, L.; WEI, P.; LUDEN, J.; MORTIER, N. A.; STUBER, S. E.; LUBAN, N. L. C.; COHEN, A. R.; PRESSEL, S.; ADAMS, R. J. Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia — TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWITCH): a multicentre , open-label , phase 3 , non-inferiority trial. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10019, p. 661–670, 2016. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01041-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01041-7).

WILLIAMS, T. N.; THEIN, S. L. Sick Cell Anemia and Its Phenotypes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 113–147, 2018.

XIA, Z.; WANG, G.; WAN, C.; LIU, T.; WANG, S.; WANG, B.; CHENG, R. Expression of NALP3 in the Spleen of Mice with Portal Hypertension. **J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]** , [s. l.], v. 30, n. 2, p. 170–172, 2010.

XU, J.; NÚÑEZ, G. The NLRP3 inflammasome: activation and regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 331–344, 2022.

XU, H.; WANDERSEE, N. J.; GUO, Y.; JONES, D. W.; HOLZHAUER, S. L.; HANSON, M. S.; MACHOGU, E.; BROUSSEAU, D. C.; HOGG, N.; DENSMORE, J. C.; KAUL, S.; HILLERY, C. A.; PRITCHARD, K. A. Sick cell disease increases high mobility group box 1: a novel mechanism of inflammation. **Blood**, [s. l.], v. 124, n. 26, p. 3978–3981, 2014. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/124/26/3978/1466005/3978.pdf>.

YALAMANOGLU, X. A.; DEUEL, J. W.; HUNT, R. C.; BAEK, J. H.; HASSELL, K.; REDINIUS, K.; IRWIN, D. C.; SCHAEER, D. J.; BUEHLER, P. W. Depletion of haptoglobin and hemopexin promote hemoglobin-mediated lipoprotein oxidation in sickle cell disease. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, [s. l.], v. 315, n. 5, p. L765–L774, 2018.

YANG, Y.; WANG, H.; KOUADIR, M.; SONG, H.; SHI, F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. **Cell Death and Disease**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2019.

YARON, J. R. **Ion Flux Regulates Inflammasome Signaling**. 2015. 1–127 f. [s. l.], 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/316635702>.

ZHANG, W. J.; LI, K. Y.; LAN, Y.; ZENG, H. Y.; CHEN, S. Q.; WANG, H. NLRP3 Inflammasome: A key contributor to the inflammation formation. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 174, 2023.

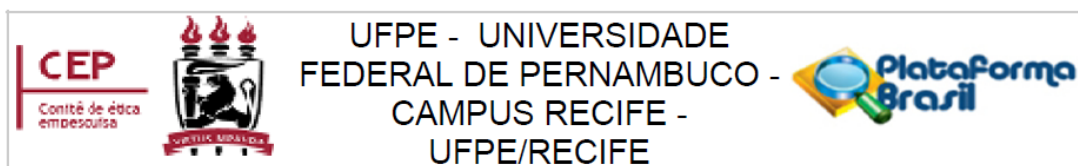
ZHANG, P.; NGUYEN, J.; ABDULLA, F.; NELSON, A. T.; BECKMAN, J. D.; VERCELLOTTI, G. M.; BELCHER, J. D. Soluble MD-2 and Heme in Sick Cell Disease Plasma Promote Pro-Inflammatory Signaling in Endothelial Cells. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, p. 1–10, 2021.

ZHANG, Q. B.; QING, Y. F.; HE, Y. L.; XIE, W. G.; ZHOU, J. G. Association of NLRP3 polymorphisms with susceptibility to primary gouty arthritis in a Chinese han population. **Clinical Rheumatology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 235–244, 2018.

ZHANG, D.; XU, C.; MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, [s. l.], v. 127, n. 7, p. 801–809, 2016.

ZHOU, D.; WANG, X.; CHEN, T.; WEN, W.; LIU, Y.; WU, Y.; YUAN, Z. The NLRP3 rs10754558 polymorphism is associated with the occurrence and prognosis of coronary artery disease in the Chinese Han population. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2016, 2016.

ZHU, Z.; YAN, J.; GENG, C.; WANG, D.; LI, C.; FENG, S.; WANG, H. A Polymorphism Within the 3'UTR of NLRP3 is Associated with Susceptibility for Ischemic Stroke in Chinese Population. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 981–988, 2016.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Investigação da associação de polimorfismos no gene NLRP3 com a ocorrência de complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme

Pesquisador: ALEXSANDRO PEDRO DA SILVA

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa em genética do comportamento.);

Versão: 1

CAAE: 49179421.0.0000.5208

Instituição Proponente: Centro de Biosciências

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.883.963

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

RECIFE, 05 de Agosto de 2021

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO ESTADO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da associação de polimorfismos no gene NLRP3 com a ocorrência de complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme

Pesquisador: ALEXSANDRO PEDRO DA SILVA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa em genética do comportamento.);

Versão: 1

CAAE: 49179421.0.3001.5195

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.962.565

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 10 de Setembro de 2021

Assinado por:
Maria Iraci Buarque Valença
(Coordenador(a))

ANEXO B – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **“INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *NLRP3* COM A OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”**, que está sob a responsabilidade do pesquisador Alexandro Pedro da Silva (Endereço: Rua Demócrito de Souza Filho, 323, apto 203, Madalena, Recife- PE, CEP:50610-120 – Fone:(81) 997006437 – e-mail: alexsandropedro78@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105- macbezerraufpe@gmail.com). Também participam desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo ((81) 99976-5136 - aderson.araujo@gmail.com), Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 99800-9382 - araujoarl@gmail.com) e Dra. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer ((81) 98824-3127 – betanialucena@yahoo.com.br).

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. O (a) senhor (a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema. Desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- A anemia falciforme é uma doença grave que altera células do seu sangue, provocando dores o que pode estar interferindo em suas atividades do dia a dia. Esta doença é causada pela presença de uma hemoglobina alterada (molécula importante para o funcionamento das células do sangue), a hemoglobina S. Alguns pacientes com anemia falciforme apresentam manifestações clínicas diferentes devido os processos de vasoclusão e inflamação crônica. Dessa forma, o objetivo do nosso trabalho é entender a variedade genética relacionada à inflamação que pode atuar na ocorrência das complicações da doença. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 8 ml de sangue (quantidade correspondente a 2 tubos pequenos de coleta de sangue), obtidos usando agulhas e seringas descartáveis, coletados por profissionais capacitados, uma única vez durante sua visita de rotina ao HEMOPE – Recife - PE. Gostaríamos ainda de solicitar sua autorização para utilização dos dados clínicos coletados em prontuários durante seu período de acompanhamento clínico no HEMOPE – Recife - PE.
- O risco por nós avaliado é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha. Isto pode ser amenizado colocando

compressas de gelo nas primeiras horas após a coleta, em seguida, podem ser colocadas compressas mornas para ajudar a eliminar o hematoma mais rapidamente. Além disso, existe a possibilidade de quebra de sigilo por meio da identificação dos pacientes, ainda que involuntária ou extravio dos exames dos prontuários. A forma de amenizar é por meio do compromisso, confidencialidade e sigilo dos dados coletados, garantindo que as informações não serão divulgadas fora desse projeto.

- Como resultado desta pesquisa não estão previstos benefícios diretos para você, entretanto, como benefício indireto os dados obtidos com este estudo poderão ser úteis na busca de novos medicamentos com alvos eficientes e poucas reações adversas para tratar e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com anemia falciforme.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos após o término da pesquisa.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o (a) senhor (a) poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br).

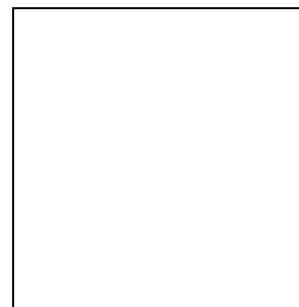
(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar no estudo **“INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *NLRP3* COM A OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local e data

Assinatura do (a) participante



Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE A – TABELA SUPLEMENTAR 1

Tabela Suplementar 1 - Estimativa de casos de doença falciforme (DF) e traço falciforme (AS) por nascidos vivos e número de óbitos por DF relatados no Brasil no ano de 2021.

Unidade Federativa	Doença falciforme (DF)	Traço falciforme	Óbitos por DF
Brasil Total	1:2567	1:43	442
Rondônia	1:4240	1:45	1
Acre	1:3140	1:44	2
Amazonas	1:6538	1: 68	4
Roraima	NR	NR	1
Pará	1:5485	NR	16
Amapá	NR	NR	NR
Tocantins	NR	NR	6
Maranhão	1:1065	1:34	20
Piauí	1:2090	1:29	15
Ceará	1:8018	1:58	11
Rio Grande do Norte	1:8686	1:59	6
Paraíba	1:8007	1:68	4
Pernambuco	1:3236	1:51	15
Alagoas	1:2569	1:39	7
Sergipe	1:1950	1:32	12
Bahia	1:1091	1:26	64
Minas Gerais	1:1572	1:35	48
Espírito Santo	1:2916	1:35	10
Rio de Janeiro	1:2110	1:35	54
São Paulo	1:3072	1:44	85
Paraná	1:12907	1:64	10
Santa Catarina	1:5676	1:89	2
Rio Grande do Sul	1:8296	1:100	3
Mato Grosso do Sul	1:5272	1:59	1
Mato Grosso	1:2629	1:48	11
Goiás	1:1624	1:47	22
Distrito Federal	1:1001	1:25	12

Fonte: Autoria própria, com dados extraídos do Relatório Anual de dados do PNTN, 2020-2022, Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM/MS e Plataforma Integrada de Vigilância em Saúde – Plataforma IVIS/MS.

NR - Relatório não encaminhado ao Ministério da Saúde.

APÊNDICE B – TABELA SUPLEMENTAR 2

Tabela Suplementar 2 - Comparação dos achados clínicos-laboratoriais dos pacientes pediátricos com AF para o polimorfismo NLRP3 rs4612666, conforme modelo de herança codominante.

Características clínicas e laboratoriais	Todos os pacientes N= 369	Genótipo CC Total: 150 (%)	Genótipo TC Total: 85 (%)	Genótipo TT Total: 34 (%)	p-valor*
RBC (x10⁶/mm³) mediana	2,86	2,83	2,84	2,97	0,805
Intervalo	1,66 – 3,78	1,85 – 3,48	1,66 – 3,78	1,86 – 3,25	
Hb (g/dL) mediana	7,9	7,9	7,9	8,3	0,179
Intervalo	4,8 – 10,7	5,0 – 10,7	4,8 – 9,8	5,6 – 9,9	
Ht (%) mediana	22,8	23,3	22,3	24,4	0,141
Intervalo	14,7 – 32,7	16,2 – 32,7	14,7 – 31,1	18,4 – 26,6	
VCM (fL) mediana	87,0	87,0	86,8	89,6	0,077
Intervalo	61,1 – 102,9	65,3 – 102,9	61,1 – 98,3	80,1 – 100,0	
HCM (pg) mediana	28,9	29,2	28,7	29,3	0,111
Intervalo	19,2 – 33,3	20,0 – 33,3	19,2 – 32,7	26,2 – 32,8	
Ret (%) mediana	9,9	10,2	10,1	8,5	0,259
Intervalo	0,4 – 26,4	1,5 – 22,3	0,4 – 26,4	4,2 – 20,6	
Hb F (%) mediana	9,8	10,8	9,2	16,6	0,100
Intervalo	1,1 – 28,5	1,6 – 28,5	1,1 – 24,2	3,5 – 20,0	
WBC (x10³/mm³) mediana	14,1	14,0	13,9	17,7	0,019
Intervalo	2,1 – 37,9	2,1 – 30,8	3,3 – 32,5	2,1 – 37,9	
PLT (x10³/mm³) mediana	444	411	453	465,0	0,574
Intervalo	114 – 875	175 – 802	114 – 802	136 – 875	
LDH (U/L) mediana	814,5	883,50	774,0	839,5	0,533
Intervalo	211 – 2401	378 – 1993	211 – 2401	635 - 1453	
BT (mg/dL) mediana	1,95	1,99	1,88	2,52	0,241
Intervalo	0,65 – 8,92	0,88 – 7,12	0,65 – 8,92	0,80 – 8,10	
BI (mg/dL) mediana	1,49	1,58	1,37	2,01	0,149
Intervalo	0,35 – 8,52	0,43 – 6,52	0,35 – 8,52	0,47 – 7,62	
Idade					0,152
Mediana (anos)	13	12	13	14	
Intervalo (anos)	4 - 18	4 – 18	4 – 18	6 - 18	0,149
Sexo					
Masculino	187 (49,3%)	76 (50,7%)	99 (53,5%)	12 (35,3%)	0,143
Feminino	182 (50,7%)	74 (49,3%)	86 (46,5%)	22 (64,7%)	
Crise vaso-oclusiva ao ano					0,143
<3	215 (62,1%)	97 (68,8%)	101 (58,7%)	17 (51,5%)	
>3	86 (24,9%)	32 (22,7%)	45 (26,2%)	9 (27,3%)	0,900
>6	45 (13,0%)	12 (8,5%)	26 (14,1%)	7 (21,2%)	
Dactilite					0,900
Sim	111 (31,1%)	46 (31,3%)	54 (30,3%)	11 (34,4%)	
Não	246 (68,9%)	101 (68,7%)	124 (69,7%)	21 (65,6%)	0,287
Sequestro esplênico					
Sim	76 (21,2%)	26 (17,7%)	44 (24,6%)	6 (18,2%)	0,878
Não	283 (78,8%)	121 (82,3%)	135 (75,4%)	27 (81,8%)	
Priapismo					0,801
Sim	24 (13,2%)	10 (12,7%)	12 (13,0%)	2 (18,2%)	
Não	158 (86,8%)	69 (87,3%)	80 (87,0%)	9 (81,8%)	0,062
STA					
Sim	25 (7,0%)	9 (6,1%)	14 (7,9%)	2 (6,1%)	0,362
Não	334 (93,0%)	139 (93,9%)	164 (92,1%)	31 (93,9%)	
AVC					0,362
Sim	17 (4,7%)	8 (5,4%)	5 (2,8%)	4 (12,1%)	
Não	341 (95,3%)	140 (94,6%)	172 (97,2%)	29 (87,9%)	0,362
Doença cerebrovascular					
Sim	40 (11,2%)	14 (9,5%)	20 (11,3%)	6 (18,2%)	

Não	317 (88,8%)	133 (90,5%)	157 (88,7%)	27 (81,8%)	0,709
Moya-Moya					
Sim	6 (2,2%)	3 (2,7%)	2 (1,5%)	1 (3,6%)	0,355
Não	267 (97,8%)	108 (97,3%)	132 (98,5%)	27 (96,4%)	
Infarto Silencioso					0,413
Sim	4 (1,5%)	3 (2,7%)	1 (0,7%)	0 (0,0%)	
Não	269 (98,5%)	108 (97,3%)	133 (99,3%)	28 (100,0%)	0,888
Ataque Isquêmico Transitório					
Sim	3 (1,1%)	1 (0,9%)	1 (0,7%)	1 (3,6%)	0,888
Não	270 (98,9%)	110 (99,1%)	133 (99,3%)	27 (96,4%)	
Doppler transcraniano					0,888
Normal	210 (68,2%)	87 (68,5%)	98 (65,8%)	25 (78,1%)	
Condicionante	68 (22,1%)	31 (24,4%)	34 (22,8%)	3 (9,4%)	0,888
Alto Risco	30 (9,7%)	9 (7,1%)	17 (11,4%)	4 (12,5%)	

RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, Ht: Hematócrito, VCM, Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, HbF: Hemoglobina fetal, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, LDH: Lactato desidrogenase, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, STA; Síndrome torácica aguda, AVC: Acidente vascular cerebral.

* Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de Chi-quadrado. Para as variáveis contínuas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Fonte: O autor (2023).

APÊNDICE C – TABELA SUPLEMENTAR 3

Tabela Suplementar 3 - Comparação dos achados clínicos-laboratoriais dos pacientes adultos com AF para o polimorfismo NLRP3 rs4612666, conforme modelo de herança codominante.

Características clínicas e laboratoriais	Todos os pacientes N: 484	Genótipo CC Total: 183	Genótipo TC Total: 247	Genótipo TT Total: 54	p-valor*
RBC (x10⁶/mm³)	2,55	2,52	2,58	2,57	
mediana	1,50 – 4,56	1,50 – 4,56	1,50 – 4,43	1,77 – 4,33	0,613
Intervalo					
Hb (g/dL) mediana	7,8	7,8	7,9	7,7	0,726
Intervalo	4,2 – 10,5	4,2 – 10,4	4,8 – 10,3	5,6 – 10,5	
Ht (%) mediana	23,6	23,5	23,8	23,5	0,787
Intervalo	14,8 – 35,1	14,8 – 35,1	14,8 – 32,3	14,9 – 32,7	
VCM (fL) mediana	92,5	92,9	92,6	90,2	0,528
Intervalo	65,0 – 121,7	69,9 – 118,0	65,0 – 121,7	74,0 – 113,0	
HCM (pg) mediana	30,8	30,8	30,9	30,8	0,760
Intervalo	19,2 – 40,9	20,2 – 39,8	19,2 – 40,9	20,8 – 36,2	
Ret (%) mediana	9,7	9,7	9,4	10,1	0,767
Intervalo	1,3 – 32,0	1,5 – 32,0	1,3 – 29,2	2,8 – 27,9	
Hb Fetal (%) mediana	6,9	7,1	6,6	6,7	0,213
Intervalo	0,8 – 28,0	1,0 – 28,0	0,9 – 24,4	0,8 – 24,0	
WBC (x10³/mm³)	12,0	12,2	12,2	10,9	0,545
mediana	2,7 – 34,1	5,1 – 32,0	2,7 – 34,1	5,1 – 27,6	
Intervalo					
Plt (x10³/mm³) mediana	420	413	415	464	0,281
Intervalo	115– 973	115 – 973	177 – 814	178 – 693	
LDH (U/L) mediana	826	795	827	873	0,841
Intervalo	219 – 3542	233 – 2756	219 – 3542	237 – 1900	
BT (mg/dL) mediana	2,83	2,85	2,97	2,59	0,454
Intervalo	0,88 – 15,49	0,93 – 14,21	0,88 – 15,49	0,94 – 7,40	
BI (mg/dL) mediana	2,19	2,08	2,34	2,09	0,470
Intervalo	0,13 – 14,94	0,35 – 9,60	0,13 - 14,94	0,74 – 7,00	
Idade					0,382
Mediana (anos)	31	31	31	30	
Intervalo (anos)	19 – 65	19 – 63	19– 65	19– 50	
Sexo					0,202
Masculino	221 (45,7%)	86 (47,0%)	109 (44,1%)	26 (48,1%)	
Feminino	263 (54,3%)	97 (53,0%)	138 (55,9%)	28 (51,9%)	
Crise vaso-oclusiva ao ano					0,365
<3	243 (47,6%)	79 (43,2%)	123 (50,0%)	28 (51,8%)	
>3	187 (36,7%)	76 (41,5%)	80 (32,5%)	19 (35,2%)	
>6	80 (15,7%)	28 (15,3%)	43 (17,5%)	7 (13,0%)	
Dactilite					0,232
Sim	49 (10,2%)	16 (8,8%)	24 (9,8%)	9 (16,7%)	
Não	433 (89,8%)	166 (91,2%)	222 (90,2%)	45 (83,3%)	
Sequestro esplênico					0,224
Sim	44 (8,6%)	14 (7,7%)	26 (10,5%)	2 (3,7%)	
Não	467 (91,4%)	169 (92,3%)	221 (89,5%)	52 (96,3%)	
Priapismo					0,390
Sim	62 (27,1%) *	25 (28,7%)	29 (26,9%)	4 (15,4%)	
Não	167 (72,9%)	62 (71,3%)	79 (73,1%)	22 (84,6%)	
STA					0,393
Sim	84 (16,6%)	25 (13,9%)	46 (18,7%)	8 (14,8%)	
Não	423 (84,1%)	155 (86,1%)	200 (81,3%)	46 (85,2%)	
Osteonecrose					0,202
Sim	80 (15,9%)	37 (20,4%)	35 (14,5%)	7 (13,0%)	
Não	423 (84,1%)	144 (79,6%)	206 (85,5%)	47 (87,0%)	

Úlcera Maleolar					0,284
Sim	119 (23,3%)	23 (12,6%)	63 (25,6%)	12 (22,2%)	
Não	391 (76,7%)	159 (87,4%)	183 (74,4%)	42 (77,8%)	
AVC					0,955
Sim	67 (13,2%)	23 (12,6%)	30 (12,2%)	6 (11,1%)	
Não	442 (86,8%)	159 (87,4%)	216 (87,8%)	48 (88,9%)	
Doença cerebrovascular					0,726
Sim	76 (14,9%)	28 (15,3%)	34 (13,8%)	6 (11,1%)	
Não	435 (85,1%)	155 (84,7%)	213 (86,2%)	48 (88,9%)	

RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, Ht: Hematócrito, VCM, Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, HbF: Hemoglobina fetal, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, LDH: Lactato desidrogenase, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, STA; Síndrome torácica aguda, AVC: Acidente vascular cerebral.

* Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de Chi-quadrado. Para as variáveis contínuas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Fonte: O autor (2023).

APÊNDICE D – TABELA SUPLEMENTAR 4

Tabela Suplementar 4 - Comparação dos achados clínicos-laboratoriais dos pacientes adultos com AF para o polimorfismo NLRP3 rs10754558, conforme modelo de herança codominante.

Características clínicas e laboratoriais	Todos os pacientes N: 511	Genótipo CC Total: 203	Genótipo GC Total: 255	Genótipo GG Total: 53	P-valor*
RBC (x10⁶/mm³) mediana	2,55	2,52	2,56	2,45	0,593
Intervalo	1,50 – 4,56	1,64 – 4,56	1,50 – 4,43	1,50 – 3,80	
Hb (g/dL) mediana	7,8	7,8	7,85	7,8	0,660
Intervalo	4,2 – 10,5	5,3 – 10,5	4,2 – 10,4	6,1 – 10,3	
Ht (%) mediana	23,6	23,5	23,7	23,6	0,918
Intervalo	14,8 – 35,1	14,9 – 33,6	14,8 – 35,1	14,8 – 32,3	
VCM (fL) mediana	92,5	93,9	91,4	93,6	0,097
Intervalo	65,0 – 121,7	65,0 – 118,0	67,6 – 121,7	73,7 – 117,4	
HCM (pg) mediana	30,8	30,8	30,5	31,6	0,200
Intervalo	19,2 – 40,9	19,2 – 39,8	20,20 – 40,9	21,3 – 39,0	
Ret (%) mediana	9,7	10,0	9,00	10,3	0,59
Intervalo	1,3 – 32,0	1,3 – 32,0	1,5 – 28,0	2,2 – 24,0	
Hb Fetal (%) mediana	6,9	7,1	6,70	7,0	0,826
Intervalo	0,8 – 28,0	0,8 – 28,0	1,0 – 26,0	1,2 – 24,5	
WBC (x10³/mm³) mediana	12,0	12,3	11,9	11,3	0,563
Intervalo	2,71 – 34,1	5,1 – 33,5	2,7 – 34,1	6,4 – 30,0	
Plt (x10³/mm³) mediana	420	404	435	411,0	0,710
Intervalo	115 – 973	142 – 973	115 – 870	164 – 693	
LDH (U/L) mediana	826	873	764	894	0,291
Intervalo	219 – 3542	219 – 3153	223 – 3000	235 – 3542	
BT (mg/dL) mediana	2,83	2,96	2,71	2,97	0,585
Intervalo	0,88 – 15,49	0,94 – 14,21	0,88 – 15,49	0,93 – 10,14	
BI (mg/dL) mediana	2,19	2,29	2,08	2,39	0,679
Intervalo	0,13 – 14,94	0,35 - 13,58	0,13 – 14,94	0,51 – 9,60	
Idade					0,143
Mediana (anos)	31	30	32	31	
Intervalo (anos)	19 – 65	19 – 60	19 – 65	19 – 64	0,202
Sexo					
Masculino	228 (44,6%)	90 (44,3%)	119 (46,7%)	21 (39,6%)	0,351
Feminino	283 (55,4%)	113 (55,7%)	136 (53,3%)	32 (60,4%)	
Crise vaso-oclusiva/ano					0,727
<3	243 (47,6%)	90 (44,3%)	126 (49,6%)	27 (50,9%)	
>3	187 (36,7%)	82 (40,4%)	86 (33,9%)	19 (35,8%)	0,883
>6	80 (15,7%)	31 (15,3%)	42 (16,5%)	7 (13,2%)	
Sequestro esplênico					0,384
Sim	44 (8,6%)	15 (7,4%)	24 (9,4%)	5 (9,4%)	
Não	467 (91,4%)	188 (92,6%)	231 (90,6%)	48 (90,6%)	0,443
Priapismo					
Sim	62 (27,1%) *	23 (26,1%)	34 (28,3%)	5 (23,8%)	0,206
Não	167 (72,9%)	65 (73,9%)	86 (71,7%)	16 (76,2%)	
STA					0,233
Sim	84 (16,6%)	28 (13,8%)	46 (18,3%)	10 (19,2%)	
Não	423 (84,1%)	175 (86,2%)	206 (81,7%)	42 (80,8%)	
Osteonecrose					
Sim	80 (15,9%)	37 (18,4%)	35 (14,0%)	8 (15,4%)	
Não	423 (84,1%)	164 (81,6%)	215 (86,0%)	44 (84,6%)	
Úlcera Maleolar					
Sim	119 (23,3%)	45 (22,2%)	66 (26,0%)	8 (15,1%)	
Não	391 (76,7%)	158 (77,8%)	188 (74,0%)	45 (84,9%)	
AVC					
Sim	67 (13,2%)	28 (13,9%)	36 (14,1%)	3 (5,7%)	
Não	442 (86,8%)	173 (96,1%)	219 (85,9%)	50 (94,3%)	

Doença cerebrovascular

0,462

Sim	76 (14,9%)	33 (16,3%)	38 (14,9%)	5 (9,4%)
Não	435 (85,1%)	170 (83,7%)	217 (85,1%)	48 (90,6%)

RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, Ht: Hematócrito, VCM, Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, HbF: Hemoglobina fetal, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, LDH: Lactato desidrogenase, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, STA; Síndrome torácica aguda, AVC: Acidente vascular cerebral.

* Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de Chi-quadrado. Para as variáveis contínuas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Fonte: O autor (2023).

APÊNDICE E – TABELA SUPLEMENTAR 5

Tabela Suplementar 5 - Comparação dos achados clínicos-laboratoriais dos pacientes com AF para o polimorfismo NLRP3 rs10754558, conforme modelo de herança codominante.

Características clínicas e laboratoriais	Todos os pacientes N: 880	Genótipo CC Total: 361	Genótipo GC Total: 426	Genótipo GG Total: 93	p-valor*
RBC (x10⁶/mm³)	2,41	2,40	2,44	2,36	
mediana	1,66 – 4,56	1,85 – 4,56	1,66 – 4,43	1,96 – 3,80	0,692
Intervalo					
Hb (g/dL) mediana	7,9	7,8	7,9	7,7	0,138
Intervalo	4,2 – 10,7	4,8 – 10,5	4,2 – 10,7	5,8 – 10,6	
Ht (%) mediana	23,4	23,4	23,5	23,5	0,525
Intervalo	14,7 – 35,1	14,7 – 33,6	14,8 – 35,1	14,8 – 32,3	
VCM (fL) mediana	90,2	91,1	89,7	91,3	0,121
Intervalo	61,1 – 121,7	65,0 – 118,0	61,1 – 121,7	73,7 – 117,4	
HCM (pg) mediana	30,1	30,1	30,1	30,6	0,313
Intervalo	19,2 – 40,9	19,2 – 39,8	19,2 – 40,9	21,3 – 39,0	
Ret (%) mediana	9,8	9,8	9,3	11,0	0,209
Intervalo	0,4 – 32,0	0,4 – 32,0	1,5 – 28,0	2,2 – 24,0	
Hb Fetal (%) mediana	7,4	7,2	7,4	7,5	0,981
Intervalo	0,8 – 28,5	0,8 – 28,0	1,0 – 28,5	1,2 – 24,5	
WBC (x10³/mm³)	12,7	13,0	12,5	12,5	0,432
mediana	2,1 – 37,9	3,3 – 37,9	2,1 – 34,1	5,9 – 30,0	
Intervalo					
PLT (x10³/mm³)	427	417	434	415	0,896
mediana	114 – 973	114 – 973	116 – 870	164 – 875	
Intervalo					
LDH (U/L) mediana	824	854	732	909	0,041
Intervalo	211 – 3542	219 – 3153	211 – 3000	235 – 3542	
BT (mg/dL) mediana	2,59	2,61	2,53	2,72	0,990
Intervalo	0,65 – 15,49	0,65 – 14,21	0,65 – 15,49	0,78 – 10,14	
BI (mg/dL) mediana	1,99	2,00	1,98	2,06	0,973
Intervalo	0,13 – 14,94	0,35 – 13,58	0,13 – 14,94	0,43 – 9,60	
Idade					0,415
Mediana (anos)	22	20	23	22,0	
Intervalo (anos)	4 – 65	4 – 64	4 – 65	4,0 – 64,0	
Sexo					0,778
Masculino	417 (47,4%)	174 (48,2%)	202 (47,4%)	41 (44,1%)	
Feminino	463 (52,6)	187 (51,8%)	224 (52,6%)	52 (55,9%)	
Crise vaso-oclusiva ao ano					0,385
<3	457 (53,4%)	180 (50,9%)	232 (55,8%)	45 (52,4%)	
>3	274 (32,0%)	123 (34,7%)	120 (28,8%)	31 (36,0%)	
>6	125 (14,6%)	51 (14,4%)	64 (15,4%)	10 (11,6%)	
Dactilite					0,472
Sim	165 (19,0%)	73 (20,4%)	73 (17,3%)	19 (21,1%)	
Não	703 (79,9%)	284 (79,6%)	348 (82,7%)	71 (78,9%)	
Sequestro esplênico					0,039
Sim	121 (13,9%)	37 (10,3%)	69 (16,4%)	15 (16,5%)	
Não	749 (86,1%)	321 (89,7%)	352 (83,6%)	76 (83,5%)	
Priapismo					0,707
Sim	86 (20,9%)	39 (22,5%)	38 (19,2%)	9 (22,5%)	
Não	325 (79,1%)	134 (77,5%)	160 (80,8%)	31 (77,5%)	
STA					0,237
Sim	109 (12,6%)	37 (10,3%)	60 (14,4%)	12 (13,3%)	
Não	757 (87,4%)	321 (89,7%)	358 (85,6%)	78 (86,7%)	
Osteonecrose					0,694
Sim	86 (10,0%)	39 (11,0%)	38 (9,1%)	9 (10,0%)	

Não	775 (90,0%)	316 (89,0%)	378 (90,9%)	81 (90,0%)	0,175
Úlcera Maleolar					
Sim	120 (13,8%)	46 (12,8%)	66 (15,7%)	8 (8,8%)	0,354
Não	749 (86,2%)	312 (87,2%)	354 (84,3%)	83 (91,2%)	
AVC					0,546
Sim	84 (9,7%)	37 (10,4%)	42 (10,0%)	5 (5,5%)	
Não	783 (90,3%)	319 (89,6%)	378 (90,0%)	86 (94,5%)	0,546
Doença cerebrovascular					
Sim	116 (13,4%)	51 (14,3%)	56 (13,3%)	9 (9,9%)	
Não	752 (86,6%)	306 (85,7%)	364 (86,7%)	82 (90,1%)	

RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, Ht: Hematócrito, VCM, Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, HbF: Hemoglobina fetal, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, LDH: Lactato desidrogenase, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, STA; Síndrome torácica aguda, AVC: Acidente vascular cerebral.

* Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste de Chi-quadrado. Para as variáveis contínuas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Fonte: O autor (2023).

APÊNDICE F – TABELA SUPLEMENTAR 6

Tabela Suplementar 6 - Associação das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *NLRP3* rs10754558, com o número de eventos de priapismo em pacientes pediátricos com AF.

Modelos	Genótipos /alelos	Número de eventos de Priapismo			P-valor*
		0 N (%)	1-4 N (%)	≥ 5 N (%)	
Alélico	C	213 (85,5%)	34 (13,7%)	2 (0,8%)	0,424
	G	103 (89,6%)	12 (10,4%)	0 (0,0%)	
Dominante	CC	69 (81,2%)	15 (17,60%)	1 (1,2%)	0,087
	GC/GG	89 (91,8%)	8 (8,2%)	0 (0,0%)	
Recessivo	GG	14 (77,80%)	4 (22,2%)	0 (0,0%)	0,417
	CC/GC	144 (87,8%)	19 (11,6%)	1 (0,6%)	
Sobredominante	GC	75 (94,9%)	4 (5,1%)	0 (0,0%)	0,017
	CC/GG	83 (80,6%)	19 (18,4%)	1 (0,9%)	
Codominante	CC	69 (81,2%)	15 (17,60%)	1 (1,2%)	0,066
	GC	75 (94,9%)	4 (5,1%)	0 (0,0%)	
	GG	14 (77,8%)	4 (22,2%)	0 (0,0%)	

*Comparação feita usando teste de chic-quadrado com post hoc (P ajustado < 0,008).

Fonte: O autor (2023).