

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto -
SP

BEATRIZ VITÓRIA DE BRITO BUENO

**Expressão do receptor inflamatório *PTGER4* e dos receptores
endocanabinoides *CNR1* e *CNR2* em pacientes com anemia falciforme**

São José do Rio Preto - SP

2025



BEATRIZ VITÓRIA DE BRITO BUENO

Expressão do receptor inflamatório *PTGER4* e dos receptores endocanabinóides CNR1 e CNR2 em pacientes com anemia falciforme

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto - SP, para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

Coorientador(a): Prof. Me Lucas Ramos Pereira

São José do Rio Preto - SP

2025

B928e

Bueno, Beatriz Vitória de Brito

Expressão do receptor inflamatório PTGER4 e dos receptores endocanabinoides
CNR1 e CNR2 em pacientes com anemia falciforme / Beatriz Vitória de Brito Bueno. --
São José do Rio Preto, 2025

47 f.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade
Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José
do Rio Preto

Orientadora: Claudia Regina Bonini-Domingos

Coorientador: Lucas Ramos Pereira

1. Genética Humana. 2. Hemoglobinopatias. 3. Anemia Falciforme. 4. Via PTGS2. 5.
Receptores endocanabinoides. I. Título.

BEATRIZ VITÓRIA DE BRITO BUENO

Expressão do receptor inflamatório PTGER4 e dos endocanabinoides CNR1 e CNR2 em pacientes com anemia falciforme

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto - SP, para obtenção do título de bacharelado em Ciências Biológicas.

Data da defesa: 28/11/2025

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos
UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto - SP

MSc. Denny Pamela Malerba
UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto - SP

MSc. Stefanie Oliveira de Sousa
UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto - SP

A todos os sonhos que foram naufragados para a realização deste sonho. Primeira pesquisadora deste solo fértil familiar, que apesar de nunca terem os estudos como projeto de vida, me fizeram tê-lo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por terem me apoiado ao longo de todos os anos da minha graduação, suportando fardos pesados, para que as oportunidades que eu viria a receber fossem diferentes da deles. E a toda a minha família, que também foram essa base sólida para que a construção não ruísse. De maneira especial minha avó, que marca a trajetória de sua geração, do campo para a cidade em busca de oportunidades melhores, e que pode vislumbrar um pouco deste sonho algumas gerações depois.

Gostaria de expressar minha gratidão a Deus e a Nossa Senhora das Graças, que foram fontes de força e milagres, ao longo de toda minha vida. E a todos os santos intelectuais, como Santa Catarina de Siena, Santo Agostinho, e ao monge Gregor Mendel que me inspiraram ao longo desta graduação. Ao meu inestimável intercessor no céu São Padre Pio de Pietrelcina, ao qual devo muito.

A minha irmã, minha melhor amiga, juntas vamos ao infinito e além! Obrigada por me encher de carinho mesmo quando meu cérebro estava prestes a explodir, e por me ensinar a enxergar a vida de forma mais leve. Construimos memórias que carregarei para sempre.

A minha família nada convencional, que eu não poderia deixar de mencionar. Ao meu tio Paulinho, tia Ana, tio Ailton, e ao meu primo Thiago. Ao vivermos juntos criamos uma comunidade, na qual compartilho alegrias e apoio multiplicados. Vocês fazem parte de quem eu sou, e de todo o amor que eu recebo e dou. Amo vocês!

A todas as pessoas que atravessaram minha trajetória acadêmica até aqui, obrigada por me fazerem acreditar que a educação é uma busca pela verdade e um ato de amor. Aos meus amigos da graduação em especial, que compartilho das peripécias e da beleza desta vida, e a todos os meus amigos do Grupo de Oração Unidos no Espírito da Unesp.

A minha orientadora e a todos os amigos e colegas do laboratório. Pela paciência de ensinar, instruir e moldar. A minha querida professora e orientadora, Claudia Bonini, que me lançou na pesquisa, obrigada por enxergar o melhor em mim desde o início. Vocês me ensinaram sobretudo o que é ciência, feita com erros e acertos, e com dignidade. Neste laboratório encontrei uma forma de transformar a vida das pessoas. Minha eterna gratidão!

E a Universidade pública, que molda bons profissionais, cientistas e educadores, e que fornece toda a estrutura para tal. Todas as bolsas recebidas para produção de ciência e permanência foram cruciais para minha formação.

*O que muda na mudança,
se tudo em volta é uma dança
no trajeto da esperança,
junto ao que nunca se alcança?*
Carlos Drummond de Andrade (1942).

RESUMO

A anemia falciforme (AF) resulta de uma mutação no gene *HBB*, que codifica a cadeia de β -globina. Essa alteração ocasiona a falcização de hemácias e altera seu comportamento, dificultando o fluxo sanguíneo e a oxigenação dos tecidos. Essa mutação provoca a substituição de um ácido glutâmico por uma valina na proteína, resultando na formação da Hb S. Essa mutação provoca a substituição de um ácido glutâmico por uma valina na proteína, resultando na formação da Hb S. A partir de exames clínicos é possível obter um espectro de suas principais complicações, e definir tratamentos especializados. As crises de dores enfrentadas por esses indivíduos, é o principal sintoma da doença, consequência da vaso-oclusão. A investigação da expressão gênica das vias envolvidas na inflamação, pode propor novos medicamentos, já que os tratamentos convencionais para AF apresentam complicações. O sistema endocanabinóide (ECS) e a via inflamatória *PTGS2* apresentam papéis relevantes na modulação da dor e inflamação. O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente a expressão do gene *PTGER4*, da via inflamatória *PTGS2*, e os receptores endocanabinóides *CNR1* e *CNR2* em indivíduos do grupo controle e indivíduos com AF pela técnica de RT-qPCR. Foi realizado o método Delta-Delta Ct para calcular a expressão gênica relativa. Posteriormente, esses dados foram utilizados para avaliação da normalidade das distribuições pelo teste de *Shapiro-Wilk* e homoscedasticidade (*Teste de Levene*). Os resultados demonstraram não haver diferença estatística entre a expressão do gene e o genótipo avaliado. Uma hipótese para explicar o fato, pode estar associada ao uso da hidroxiuréia (HU), medicamento caracterizado como anti-inflamatório, prescrito para todos os pacientes incluídos no estudo. Concluímos que a HU possivelmente atenuou a expressão gênica dos pacientes com AF, e que é necessário considerar esse medicamento como modificador da expressão para análises futuras.

Palavras-chave: Hb S; *PTGS2*; hidroxiuréia; receptores canabinóides.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) results from a mutation in the *HBB* gene, which encodes the β -globin chain. This alteration causes the sickling of red blood cells and changes their behavior, hindering blood flow and tissue oxygenation. This mutation causes the substitution of a glutamic acid for a valine in the protein, resulting in the formation of Hb S. Clinical examinations provide a spectrum of the disease's main complications, allowing for the definition of specialized treatments. The pain crises faced by these individuals are the main symptom of the disease, a consequence of vaso-occlusion. Investigating the gene expression of pathways involved in inflammation can propose new medications, given that conventional treatments for SCA present complications. The endocannabinoid system (ECS) and the PTGS2 inflammatory pathway play relevant roles in pain and inflammation modulation. The objective of this study was to comparatively evaluate the expression of the PTGER4 gene (from the PTGS2 inflammatory pathway) and the endocannabinoid receptors CNR1 and CNR2 in control individuals and individuals with SCA using the RT-qPCR technique. The Delta-Delta Ct method was used to calculate relative gene expression. Subsequently, these data were used to assess the normality of distributions (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Levene's test). The results showed no statistical difference in gene expression between the evaluated genotypes. One hypothesis to explain this finding may be associated with the use of hydroxyurea (HU), a drug characterized as an anti-inflammatory, prescribed to all patients included in the study. We conclude that HU possibly attenuated the gene expression of SCA patients, and that it is necessary to consider this medication as an expression modifier for future analyses.

Keywords: Hb S; PTGS2; hydroxyurea; cannabinoid receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura quaternária da hemoglobina S (HbS) com suas subunidades	16
Figura 2 – Esfregaço de sangue de um paciente com anemia falciforme representativo	17
Figura 3 – Fisiopatologia e complicações da anemia falciforme	18
Figura 4 – Expressão dos genes da globina durante o desenvolvimento natalício	20
Figura 5 – Via do metabolismo do ácido araquidônico	20

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados na RT-qPCR	27
Tabela 2 – Dados descritivos dos pacientes com AF e grupo controle do questionário de anamnese	29
Tabela 3 – Valores de delta Ct obtidos para o grupo controle que foram submetidos às análises estatísticas de T-Student.	30
Tabela 4 – Valores de delta Ct obtidos para o grupo caso (AF) que foram submetidos às análises estatísticas de T-Student.	30
Tabela 5 – Valores de <i>fold change</i> obtidos a partir do Método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$).	30
Gráfico 1 – Expressão do receptor inflamatório PTGER-4 e dos endocanabinóides CNR1 e CNR2 em pacientes com AF.	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1.	ANEMIA FALCIFORME E A HEMOGLOBINA S	15
1.2.	EXPRESSÃO DE GENES DA GLOBINA.....	19
1.3.	PROCESSO INFLAMATÓRIO E A VIA INFLAMATÓRIA PTGS2	20
1.4.	SISTEMA ENDOCANABINOIDE.....	24
1.5.	JUSTIFICATIVA.....	25
2	OBJETIVOS.....	25
2.1.	GERAIS.....	25
2.2.	ESPECÍFICOS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1.	CASUÍSTICA.....	26
3.2.	EXTRAÇÃO DE DNA.....	26
3.3.	IDENTIFICAÇÃO DE HBSS E HAPLÓTIPOS	26
3.4.	EXTRAÇÃO DE RNAS	27
3.5.	ANÁLISE DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-PCR)	27
3.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5	CONCLUSÃO.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1. ANEMIA FALCIFORME E A HEMOGLOBINA S

A hemoglobina (Hb) é o principal componente dos glóbulos vermelhos. É uma proteína tetramérica que possui quatro porções heme proteicas responsáveis pelo transporte fisiológico de oxigênio e se manifesta de forma diferente nas fases embrionária, fetal e adulta (Piel et al., 2013; Hartevelde et al., 2022). Em um adulto normal, há três tipos de hemoglobina em circulação: aproximadamente 96 a 98% de Hb A ($\alpha_2\beta_2$); 2,5 a 3,5% de Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e 0 a 1% de Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) (Steinberg, 2020).

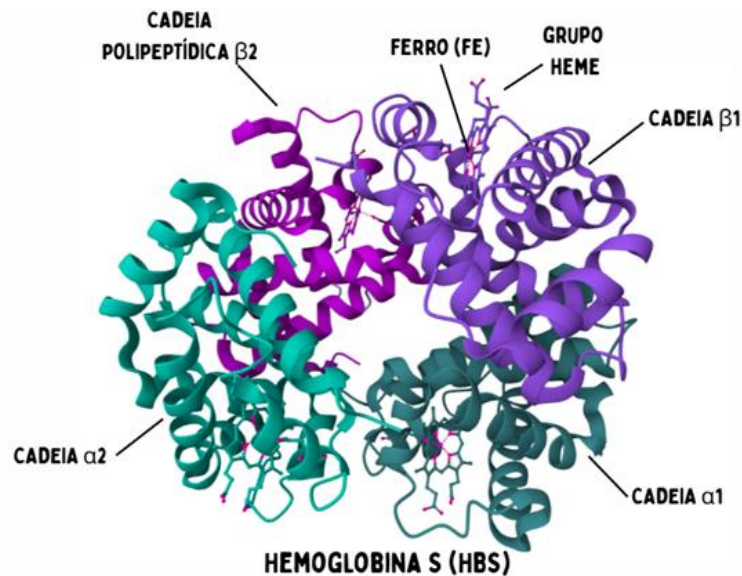
A estrutura da molécula de hemoglobina é formada por quatro subunidades ou globinas, com duas cadeias do tipo alfa e duas cadeias do tipo beta, que caracterizam a proteína. As cadeias alfa e beta são formadas por genes específicos em diferentes cromossomos, e qualquer alteração na produção de cadeias advindo de mutações estruturais e/ou funcionais podem acarretar um perfil hematológico e quadro clínico relevante (Brasil, 2024).

Hemoglobinopatias caracterizam doenças genéticas relacionadas à síntese de hemoglobinas, e são os distúrbios monogênicos mais comuns no mundo (Hartevelde et al., 2022). Os estudos acerca deste tema, vem sendo bem investigados devido ao seu impacto na saúde pública, especialmente em áreas com alta miscigenação devido à relação das doenças com fatores étnicos e geográficos. Segundo Naoum (1984), no período colonial no Brasil, a escravidão de africanos trazidos para alguns estados teve grande influência na dispersão das hemoglobinopatias. Já que diversos estudos comprovam que as primeiras mutações de Hb ocorreram no continente africano. Assim, ao longo do processo escravagista, especialmente do Brasil, a miscigenação de diferentes povos contribuiu para a distribuição dos genes anormais de globinas.

A anemia falciforme (AF) resulta de uma mutação no gene da *HBB*, assim como demonstra a Figura 1, que tem como consequência a falcização de hemácias e alteração de seu comportamento, dificultando o fluxo sanguíneo e a oxigenação dos tecidos (Piel; Steinberg; Rees, 2017; Elendu et al., 2023). Essa mutação é de carácter recessivo e a homozigose para o gene beta S (*HBBS*) causa a troca dos aminoácidos (Glu6Val) na proteína HbS (Schechter, 2008). Em portadores de AF, a quantidade produzida de HbA depende do genótipo e de sua associação com outras variantes, é comum que em homozigotos SS a HbA esteja ausente, enquanto em heterozigotos (AS) a HbA esteja em maior quantidade (Mousinho-Ribeiro et al., 2008; Piel; Steinberg; Rees, 2017). A AF ocorre somente quando um indivíduo herda dois genes anormais, de ambos os pais (Hb SS). Mas, a doença falciforme (DF) inclui a associação da HbS com diversas condições, como a hemoglobina C (Hb C) ou Talassemia β , associadas a HbS

resultam em indivíduos Hb SC ou HbS beta-talassemia. Assim, é necessário que haja uma herança HbS de um dos pais e do outro uma hemoglobina variante (Naoum; Bonini-Domingos, 2007; Piel; Steinberg; Rees, 2017).

Figura 1- Representação esquemática da estrutura quaternária da Hemoglobina S (HbS) com suas subunidades e grupo heme



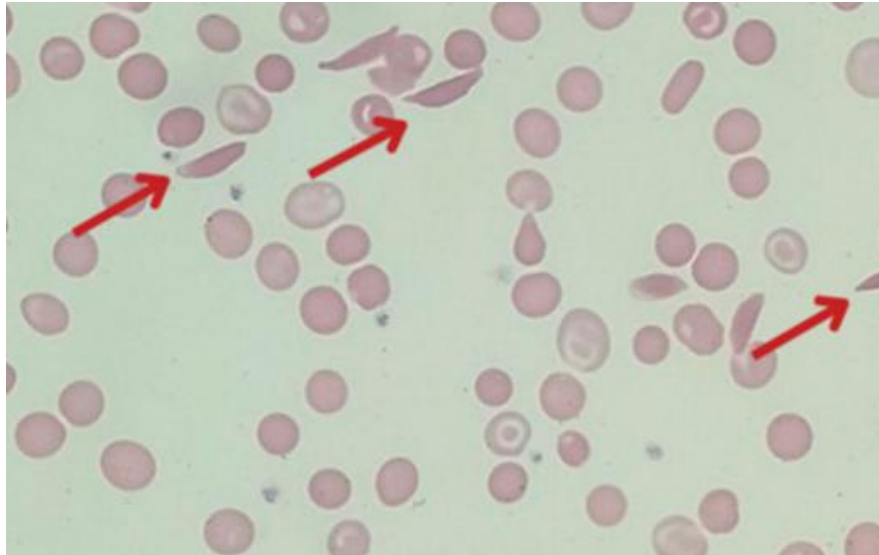
Neste esquema é possível visualizar um esquema molecular da Hemoglobina S, com suas cadeias, subunidades e grupo heme. Elaborado pela autora a partir de dados do Protein Data Bank (PDB), 2025.

A falcização, representada na Figura 2, decorre da desoxigenação da HbS. A HbS resulta de uma mutação pontual no gene *HBB*, que codifica a cadeia β da hemoglobina. A substituição de aminoácidos devido à mutação na posição 6, cria uma região hidrofóbica que favorece a polimerização da HbS com baixa disponibilidade de oxigênio (Nader; Romana; Connes, 2020). A polimerização das moléculas de hemoglobina e os polímeros formados alteram a estrutura da membrana de hemácias (Ingram, 1957). A falcização pode ser reversível pela reoxigenação das hemoglobinas, mas após processos de oxidação e desoxigenação ela se torna irreversível (Kato, 2018).

O traço falciforme também pode ocorrer em um indivíduo, sendo uma herança de somente um dos pais, conhecido como heterozigidade (Hb AS) (Piel; Steinberg; Rees, 2017; Kato, 2018). Segundo Brasil (2015) de acordo com estudos internacionalmente considerados, o traço falciforme não acarreta qualquer sintomatologia clínica, e sua importância é para orientação genética ao portador ou à sua família, baseado no *Consenso brasileiro sobre atividades esportivas e militares e herança falciforme* (Brasil, 2009). Entretanto, o

aconselhamento genético é imprescindível, auxiliando-os na tomada de decisões referentes à reprodução, devido à possibilidade de os descendentes nascerem com a doença, por ser uma herança autossômica recessiva (Guimarães; Coelho, 2010).

Figura 2 - Esfregaço de sangue periférico um paciente com anemia falciforme representativo.

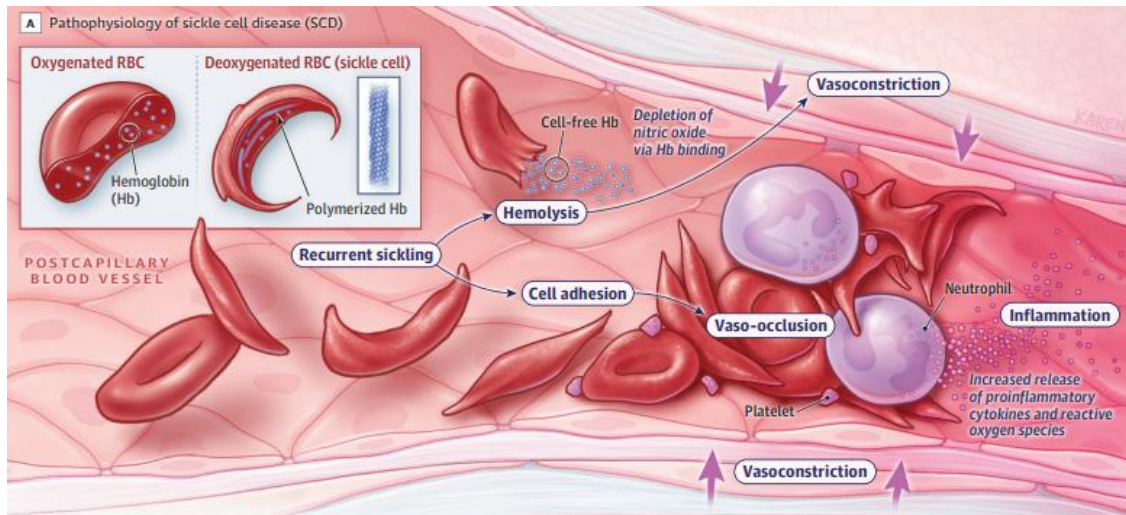


As setas vermelhas indicam as células em formato de foice. A amostra sanguínea é proveniente de um paciente com anemia falciforme. Essa imagem não possui identificação da coloração utilizada e nem aumento. Fonte: Dorneles; De Menezes Mayer e Chies, 2025.

As crises de dor aguda e crônica são uma das principais complicações da AF. A dor aguda, abrupta e intensa, é a mais prevalente nestes pacientes, devido a vaso-oclusão, causadas pelas hemácias falcêmicas, que leva a danos no tecido em diversas partes do corpo, gerando intensas dores em locais diversos. Enquanto, a dor crônica, persistente, é estimulada principalmente pelo estado inflamatório. É importante ressaltar que para o diagnóstico da dor é imprescindível o relato do paciente (Kuner; Kuner, 2020; Brandow; Liem, 2022).

A vaso-oclusão, demonstrada na Figura 3, é uma complicação grave nos portadores de AF e provoca outros eventos patológicos, como a anemia hemolítica (Zuniga, 2018). É resultado da alteração do formato da hemácia, sendo mais rígido, tornando sua passagem no vaso sanguíneo comprometida e dificultando o fluxo sanguíneo, direcionando essas células a hemólise. A elevada destruição precoce das hemácias, chamada de hemólise, leva ao quadro mais grave de anemia hemolítica, em que a medula óssea não consegue suprir a necessidade desta produção de novas hemácias (Elendu *et al.*, 2023). As crises vaso-oclusivas resultam em crises de dores nos pacientes, e quando se trata da DF, em suas variações, também estão presentes (Naoum; Bonini-Domingos, 2007; Piel; Steinberg; Rees, 2017).

Figura 3- Fisiopatologia e complicações da anemia falciforme



Nesta imagem é possível visualizar o vaso sanguíneo humano onde as hemácias falcizadas bloqueiam o fluxo sanguíneo causando a vaso-oclusão. Fonte: Kavanagh et al., 2022.

Os portadores de DF e AF vivem limitados devido ao processo de adoecimento, afetando diretamente o cotidiano, portanto, um diagnóstico precoce resulta em melhora na qualidade de vida, reduzindo os sintomas e complicações (Cordeiro; Ferreira; Santos, 2014; Costa et al., 2024). Uma estratégia que pode contribuir diretamente para a atenuação dos sintomas de dor é a busca por novos tratamentos, além daqueles convencionais. Especificamente sobre os portadores de AF, quadros mais leves ou mais graves podem surgir, associados ou não a outras doenças, sendo importante o diagnóstico médico preciso e a busca por novos tratamentos. Muitas técnicas potenciais são investigadas, as mais conhecidas são: transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e edição genética com CRISPR-CAS9. O TCTH é considerado o único tratamento curativo para pacientes graves com DF, mas ainda tem alta toxicidade e complicações fatais (Pieroni et al, 2007; Bhatia e Sheth, 2015). A técnica CRISPR-CAS9, envolve a clivagem de DNA em regiões específicas para correção das mutações, mas nesse contexto enfrenta barreiras éticas e estudos a longo prazo (Lima et al, 2024).

Quando tratamos dos estudos voltados para a AF entre as hemoglobinopatias, essa doença é marcada por discriminação, apesar de ser um problema de saúde global. Esse cenário se intensificou em função dos movimentos populacionais e até mesmo do tráfico de pessoas para trabalho escravo, que contribuíram para a disseminação da condição em diferentes regiões (Piel *et al*, 2014; Piel; Steinberg; Rees, 2017). Segundo Dorneles, De Menezes Mayer e Chies (2025) por ter se originado em locais onde a malária é endêmica no continente africano, atinge classes econômicas mais baixas e populações negras, com menor impacto em países

desenvolvidos. O capitalismo, é o sistema econômico que move o mercado e interesses de diversos setores, o impacto que a AF causa na sociedade deveria ser levado em consideração para o investimento nas pesquisas, já que existe potencial de inovação de alto custo, como o CRISPR-Cas9.

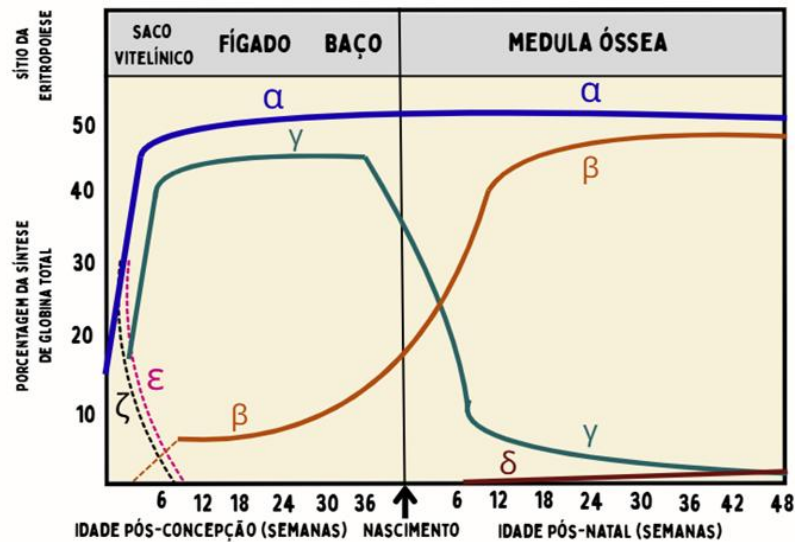
Em 2001, a portaria do Ministério da Saúde determinou a inclusão da AF na lista do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). Dados deste mesmo programa indicaram que o traço falciforme ainda é muito prevalente na população brasileira, sendo possível analisar que, entre 2014 e 2022, houve uma incidência de 1 caso a cada 34 nascimentos, sendo diagnosticados 9.878 crianças com a doença neste mesmo período (Melo et al, 2008; Brasil, 2022; Ferreira et al., 2024).

1.2. EXPRESSÃO DE GENES DA GLOBINA

As manifestações clínicas da AF começam a surgir a partir dos três meses de idade, quando ocorre a diminuição da hemoglobina fetal (Hb F), que no momento do nascimento constitui aproximadamente 70% do total de Hb. Isso ocorre devido à mudança de sítio da eritropoiese, que após o nascimento passa ser na medula óssea, e a síntese de cadeia beta começa ser significativa. A Hb F em altas concentrações inibe a polimerização da Hb S, mas como a mutação da AF ocorre justamente na cadeia β da Hb A, quando a Hb F começa a diminuir, os sintomas são desencadeados (Sant'Ana et al., 2017).

A expressão de genes das globinas durante o desenvolvimento, demonstrado na figura 4, faz com que eles sejam ativados ou silenciados conforme a fase ontogenética - fase embrionária, nascimento e idade pós-natal o que acompanha a mudança de sítio da eritropoiese, e no final do desenvolvimento tem um perfil hemoglobínico adulto. A compreensão dos valores de normalidade é muito importante para o diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias, visto que o conhecimento das concentrações de Hb A, Hb A₂ e Hb F quando fora da normalidade direciona os estudos e a precisão do diagnóstico (Brasil, 2024).

Figura 4- Expressão dos genes da globina durante o desenvolvimento natalício



Neste gráfico é possível observar os genes que são expressos e reprimidos ao longo de todo o desenvolvimento natalício de um humano. O gene zeta (ζ) e épsilon (ϵ) são expressos juntos somente no início da vida embrionária, formando a Gower 1 ($\zeta_2 \zeta_2$) e Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$). Enquanto, a combinação de alguns desses genes resultam na produção de outras hemoglobinas. Fonte: Adaptado de Thompson, J. & Thompson, M., 2016.

1.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO E A VIA INFLAMATÓRIA PTGS2

A inflamação é um mecanismo adaptativo do corpo para responder a injúrias ocasionadas ao tecido e para que o equilíbrio homeostático do organismo mantenha o ambiente interno estável. Sendo um processo que envolve vários sistemas, é a resposta as alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas, e pode se manifestar ao nível local ou sistêmico (Voltarelli, 1994; Twarowski & Herbet, 2023).

Quando ocorre injúria, o organismo responde por mecanismos de defesa liberados pelo sistema imune. Os mediadores químicos são ativados ou sintetizados coordenando a resposta inflamatória nos locais de infecção, e podem ser liberados por muitos tipos celulares, como linfócitos, macrófagos e mastócitos (Oliveira; Portella; Cohen, 2016; Liu et al., 2021). O sistema endocanabinoide regula processos inflamatórios e atenua as crises de dor (Barbosa Neto e Garcia, 2023). Isso ocorre, pois, o sistema endocanabinoide influencia a ativação das células da glia e simultaneamente, é modulado por elas. A função do sistema nervoso central (SNC) é regulado pelo sistema endocanabinoide por meio da função sináptica. A ativação de receptores canabinóides no SNC podem regular diversas funções e comportamentos neurais, a sinalização retrógrada é o modo mais comum de como os endocanabinóides podem interferir na duração da plasticidade (curto e longo) em sinapses excitatórias e inibitórias (Castillo et al., 2012).

Devido a esta característica do sistema endocanabinóide de regular muitas funções neurais, atualmente é uma excelente oportunidade para descoberta de novas intervenções terapêuticas (Ligresti; Petrosino; Di Marzo, 2009). A dor é decorrência de um estado de maior excitação do SNC, que por um processo de plasticidade neural desajustado faz com que a sensibilidade à dor seja maior e amplificada (Van den Hoogen et al., 2022).

A dor e a inflamação estão estreitamente relacionados, embora sejam conceitos diferentes, a primeira indica inflamação na maioria dos casos. Em pacientes com AF, tanto a inflamação exacerbada, quanto a dor caracterizam um cenário disfuncional, devido à comunicação do sistema imunológico ao sistema nervoso (Vallejo et al., 2010).

Os mediadores químicos, também conhecidos como citocinas, podem ser indutores de inflamação (pró-inflamatórios/TH1) relacionados a síndromes dolorosas ou não indutores (anti-inflamatórios/TH2). O que determina a função da citocina em si, de ação pró ou anti-inflamatória, é o microambiente onde estão localizadas. A resposta inflamatória é o resultado da ação da citocina na célula imunológica. Se as citocinas pró-inflamatórias estão em predomínio sobre as anti-inflamatórias, um desbalanceamento nos processos ocorre, o que desencadeia uma cascata de eventos que buscam manter a homeostase (Cianciarullo et al., 2008; Henshaw et al., 2021).

A pleiotropia é um evento que estimula outros eventos em cascata, uma vez que uma única citocina pode agir ou ser secretada por vários tipos de células diferentes, interferindo na transcrição gênica e estimulando células-alvo a produzir mais citocinas (Oliveira *et al*, 2011). Um exemplo clínico dessa dinâmica pode ser observado nos pacientes com AF, que apresentam níveis de expressão maiores de algumas citocinas, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF. Essa ativação ocorre, pois o estímulo dos receptores do tipo Toll (TLRs), que reconhecem padrões associados ao dano celular (DAMPs) e ao patógeno (PAMPs) é respondido pela ativação da via do fator kappa B (NFkB), que desencadeia a produção de citocinas inflamatórias (Tozatto-maio et al, 2024). Assim, é possível observar como a pleiotropia contribui para a amplificação da resposta inflamatória através de mecanismos de sinalização celular.

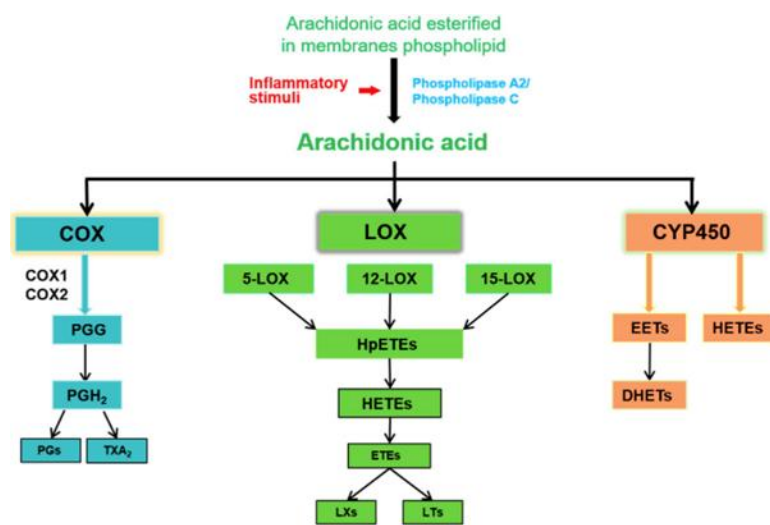
No processo inflamatório, dois tipos de inflamação podem ocorrer: aguda ou crônica. Caracterizando cada uma delas, a inflamação aguda é uma resposta rápida à injúria, ou seja, o organismo recruta células de defesa, neutrófilos e macrófagos ao local para reparação tecidual. A resposta inflamatória se manifesta por todo o organismo se esse evento celular não restabelecer a homeostase (Kumar; Abbas; Aster, 2017). Por sua vez, a crônica, é de resposta longa e persistente, com a presença de linfócitos e macrófagos, os vasos sanguíneos podem

sofrer necrose e fibrose, o que prejudica o funcionamento dos tecidos afetados (Freitas *et al.*, 2019; Sohrab *et al.*, 2023).

A AF é uma doença inflamatória crônica mediada pela imunidade adquirida. Nestes pacientes as células inflamatórias permanecem ativas, o que contribui para a inflamação crônica. Se houver uma alta prevalência de citocinas liberadas pelos leucócitos, esse evento pode resultar em inflamação exacerbada. Essa ativação celular persistente leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando estresse oxidativo. Assim, o estresse oxidativo, agrava os danos teciduais e perpetua o ciclo inflamação-lesão, isso ocorre devido à heme livre e ferro atribuídos a hemólise, que faz com que as propriedades reológicas dos glóbulos vermelhos sejam ainda mais afetadas (Nader; Romana; Connes, 2020; Elendu *et al.*, 2023).

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poli-insaturado e está presente na membrana celular na forma de fosfolípídeos. Podem ser liberados como AA livres quando as células estão sob estresse, pois certas enzimas como: a fosfolipase A₂ (PLA₂) e a fosfolipase C (PLC) quebram as ligações que antes os prendiam na forma de fosfolípídeos. Assim, eles dão origem a outras reações químicas para produção de mediadores pró-inflamatórios por intermédio de três vias: Via da ciclooxygenase (COX-1 e COX-2), Via da lipoxigenase (LOX) e Via do citocromo P450 (CYP450) como demonstrado na figura 5 (Wang *et al.*, 2019).

Figura 5- Vias do metabolismo do Ácido araquidônico



Nessa imagem é possível observar as três vias que produzem mediadores pró-inflamatórios a partir do ácido araquidônico Fonte: Retirado de Wang *et al.*, em 2019.

Através dessas três vias são gerados metabólitos de AA (eicosanoides) que atuam como mediadores autócrinos ou parácrinos (atuam na própria célula que os produziu ou na célula vizinha) envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos, como inflamação, dor ou vasodilatação (Wang et al, 2019; Kopp et al, 2019). A Ciclooxygenase 2 (COX-2) é uma enzima codificada pelo gene *PTGS2* (*Prostaglandina Endoperoxidase Sintase 2*) que catalisa a síntese de prostaglandinas (PGs) a partir do AA, eficientes mediadores inflamatórios (NCBI, 2025). Assim é de suma importância sua investigação associada a outras patologias, como a AF. Existem isoformas principais de COXs (PTGS1/COX1; PTGS2/COX2 e PTGS3/COX3). A PTGS1/COX1 é uma enzima necessária para manter os níveis basais de PGs para a homeostase da célula. Enquanto a PTGS2/COX2 é regulada e ativa vias relacionadas à inflamação intracelular. Diferentemente dessas isoformas, a COX3/PTGS3, é uma variante de splicing de PTGS1/COX1, que codifica uma proteína sem atividade enzimática (Chandrasekharan et al, 2002; Martin-Vázquez et al, 2023).

Em tecidos normais, a PTGS2/COX2 não se expressa em altos níveis, mas é induzida por citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, ou seja, sua produção é aumentada em resposta a estímulos inflamatórios, e o principal produto da ativação da PTGS2/COX2 é a prostaglandina E2 (PGE₂) (Sheppe e Edelmann, 2021; Martin-Vázquez et al, 2023). A COX2 atua nos endocanabinoides 2-araquidonilglicerol (2-AG) e a anandamida (AEA) gerando ésteres de glicerol de prostaglandina (PG-G) e etanolaminas (PG-EA). Embora sejam conhecidos seus efeitos não foram elucidados, um cruzamento entre sistema endocanabinóide e via de prostaglandinas é passível de investigação neste contexto (Kozak et al, 2002; Alhouayek et al, 2014).

A prostaglandina E2 (PGE₂) atua em quatro subtipos de receptores associados à proteína G, um deles é o PTGER4, que possui uma alta afinidade pela PGE₂, que pode ter um efeito pró ou anti inflamatório dependendo do contexto patológico (Martín-Vázquez et al, 2023). Esse receptor já foi estudado em outros contextos fisiopatológicos, e tem papel protetor contra a toxicidade aliada a outros receptores, estando aumentado quando PTGS2 e PGE₂ estão elevados em carcinoma endometrial (Catalano et al, 2011; Vennemann et al, 2012).

Processos fisiológicos como dor e febre também envolvem a via PTGS2. Os prostanóides, mediadores lipídicos, se utilizam de mecanismos durante a resposta imune para aumentar a sinalização das citocinas, entre eles, a atração de células T auxiliares pró-inflamatórias (Th1, Th17 e macrófagos), e maior envolvimento da resposta imune inata (PAMPs e DAMPs), além da ativação de genes pró-inflamatórios (Leuti et al., 2020; Lyndin et al., 2022).

1.4. SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O Sistema endocanabinóide (ECS) está distribuído por todo o corpo, é um sistema neuromodulador responsável por regular processos fisiológicos importantes, alguns exemplos são a dor, resposta imunológica e inflamação. É composto de receptores canabinóides, endocanabinóides, e enzimas que sintetizam e degradam os endocanabinóides (Lu & Mackie, 2016a; Lu & Mackie, 2021b).

Os principais receptores do sistema endocanabinóide CB1 e CB2, são sítios de ligação presentes nas células do corpo que modulam a atuação destes receptores, sendo que cada um deles possui sua função e local de atuação específicos, que permite seu estudo para fins terapêuticos. De modo geral, os receptores canabinóides são acoplados à proteína G (GPCRs), sendo CB1 (codificado pelo gene CNR1) o mais abundante no SNC humano, enquanto CB2 está relacionado com o sistema imunológico (codificado pelo gene CNR2) (Munro et al, 1993; Costa et al, 2011; Lu & Mackie, 2021).

Medicamentos opioides são prescritos para o tratamento de pacientes que convivem com a dor crônica e AF, no entanto, ao longo do tempo sua utilização eleva os estímulos dolorosos, necessitando que ocorra aumento da dosagem, entre outros riscos como overdose e dependência. Assim, outros alvos terapêuticos que minimizem os riscos dos pacientes precisam ser estudados (Ballantyne e Shin, 2008; Okusanya et al, 2020).

A hidroxiureia (HU) é um medicamento utilizado para os pacientes com DF, e com AF. Medicamentos como este buscam melhorar o fluxo sanguíneo e as crises de dor, além das complicações da doença, como a crise vaso-oclusiva e infecções (Brasil, 2022). Este medicamento é o mais eficaz, efetivo e seguro para o tratamento desses pacientes, pois aumenta a produção da HbF, e reduz os níveis de HbS e, conseqüentemente, a falcização de hemácias e vaso-oclusão (Brasil, 2024). No paciente é esperado a melhora nos episódios de dor, contagem de neutrófilos, redução de episódios de síndrome torácica aguda (STA) e necessidade de transfusão sanguínea (Nevitt e Howard, 2017).

Outros medicamentos são recomendados pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) da Doença Falciforme (2018) para o tratamento profilático com fenoximetilpenicilina potássica, benzilpenicilina benzatina ou eritromicina para infecções bacterianas na DF (Brasil, 2018). A segurança da HU a longo prazo demonstrou em um estudo ESCORT-HU (NCT02516579) que o tratamento de pacientes com DF por 45 meses trouxe efeitos adversos como, neutropenia e trombocitopenia (Rigano et al, 2018).

A Sociedade Americana de Hematologia (2020), sugere tratamento à base de opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) para o manejo da dor aguda e crônica da

DF, mas a descoberta de novos medicamentos ainda é investigada, tendo em vista, a limitação e efeitos adversos dos que estão sendo utilizados.

A cannabis, um alvo terapêutico, aliada aos opióides pode aumentar a capacidade do paciente de não perceber a dor, devido aos receptores opióides, que são potencializados quando os receptores kappa e delta-opióides do THC são estimulados. A proteína G, responsável por respostas celulares a hormônios e neurotransmissores, acopla tanto receptores de opióides, quanto canabinóides, o que reduz a produção de AMPc induzindo mudanças conformacionais (Pantoja-Ruiza *et al*, 2022).

Estudos anteriores já associaram a relação benéfica que pode advir do uso de Cannabis medicinal em pacientes que convivem com a dor crônica, sendo uma alternativa terapêutica para o tratamento desta doença e o óleo ainda é recomendado como intermediário. Produtos com quantidades equilibradas de THC e CBD, tiveram resultados favoráveis nestes pacientes, encorajando o contínuo estudo nessa área (Grotenhermen & Muller-Vahl, 2012; Fine & Rosenfeld, 2013; Finn *et al.*, 2021; Zeng *et al.*, 2021).

1.5. JUSTIFICATIVA

Considerando a fisiopatologia da AF e a inflamação crônica decorrente da hemólise, entender as vias envolvidas neste processo é de fundamental importância. Para este projeto avaliamos a expressão gênica da via inflamatória *PTGS2* e seus receptores em indivíduos com AF e clinicamente saudáveis. A fim de contribuir para a identificação de alternativas terapêuticas para tratar a dor crônica enfrentada por esses pacientes, como uma alternativa aos opióides.

2 OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Avaliar a expressão de genes da via inflamatória *PTGS2* e os receptores endocanabinóides em pacientes com anemia falciforme e indivíduos clinicamente saudáveis pela técnica de RT-qPCR.

2.2. ESPECÍFICOS

A. Avaliar a expressão do gene *PTGER4* da via *PTGS2* e dos receptores endocanabinóides CNR1 e CNR2 por meio da técnica de RT-qPCR.

B. Comparar os resultados entre pacientes com AF e indivíduos saudáveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Neste estudo, pacientes adultos com anemia falciforme (AF) dos dois sexos foram incluídos. Cinco pacientes foram selecionados na cidade de São José do Rio Preto - SP, com a supervisão do Dr. Alexandre Lorenzetti, que realizou o atendimento no HEMOCENTRO Rio Preto. As informações referentes aos diferentes níveis de dor, uso de opioides no controle da dor e Hidroxiureia (HU) foram levantadas para compreensão dos casos clínicos.

Crítérios de exclusão: Foram excluídos do estudo pacientes com uso regular de anti-inflamatório. Desses pacientes foram extraídos 15ml de sangue e a partir dessa amostra foi obtido:

1. DNA, submetido à técnica de PCR-RFLP para identificar os perfis genotípicos da HbS;
2. RNA, submetido a técnica de RT-qPCR para compararmos a expressão de genes da via PTGS2 e dos receptores *CNR1* e *CNR2*;

Os dados coletados a partir dos pacientes com AF foram comparados com um grupo controle formado por 5 indivíduos que não possuem anemia falciforme, também adultos do sexo feminino.

Esse projeto foi realizado vinculado ao aluno MSc. Lucas Ramos Pereira do Programa de Pós-Graduação em Biociências, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, Área Genética e Biologia Evolutiva da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de São José do Rio Preto. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNESP de São José do Rio Preto, parecer nº 5.529.179/ e o Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido pelo responsável pela pesquisa (*Apêndice A*).

3.2. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído a partir de 1 ml de sangue periférico pela técnica de precipitação salina ou *salting out* baseada em Miller e colaboradores (1988).

3.3. IDENTIFICAÇÃO DE HBSS E HAPLÓTIPOS

As amostras dos pacientes com AF passaram por uma triagem básica de hemoglobinopatias no Laboratório de Hemoglobinas e Genética de Doenças Hematológicas (LHGDH). A triagem é composta por Resistência Osmótica por NaCl 0,36%, Morfologia Eritrocitária, Eletroforese em pH alcalino (8,6) e pH ácido (6,2), e cromatografia líquida de alta performance – HPLC (*Premier Resolution*© - Trinity Biotech) para identificação de hemoglobinopatias, com diagnóstico confirmado a partir de biologia molecular por PCR-RFLP.

Essas técnicas dão seguridade aos casos e demonstram associações ou não entre as hemoglobinopatias.

3.4. EXTRAÇÃO DE RNAS

O RNA foi extraído usando o reagente TRIzol seguindo protocolo *ThermoFischer*® e tratado com DNase. A síntese do cDNA foi realizada usando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA), conforme descrito pelo fabricante.

3.5. ANÁLISE DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-PCR)

As reações para os genes da cascata inflamatória *PTGS2*, e receptores endocanabinóides *CRN1* e *CNR2* possuem seus respectivos iniciadores listados na *Tabela 1*, e foram realizadas em termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Todas as reações foram preparadas em triplicata, incluindo controle endógeno *GAPDH* utilizado como normalizador, e processadas em volume final de 20uL contendo 200 ng de cDNA, SYBR Green PCR Master Mix e 100 nM de cada primer, segundo protocolo Applied Biosystems®.

Assim, os valores de expressão gênica obtidos nas análises foram normalizados pelo resultado da quantificação da amostra controle, escolhida como calibrador de todas as amostras. Foi utilizado o método de Pfaffl, 2001 para os cálculos de análise comparativa.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados na RT-qPCR

GENES	SEQUÊNCIA
<i>PTGS2 sense</i>	5'- ATTCCCTTCCTTCGAAATGC - 3'
<i>PTGS2 anti-sense</i>	5'- AGAAGGCTTCCCAGCTTTTG - 3'
<i>CNR1 sense</i>	5'- CACCCAGCTCTGTCTTGGTA - 3'
<i>CNR1 anti-sense</i>	5'- AACCCAGAGCAAAGGAGAGA- 3'
<i>CNR2 sense</i>	5'-ACCTGTTCATTGGCAGCTTG - 3'
<i>CNR2 anti-sense</i>	5'-CTGCATGCAAAGACCACACT - 3'
<i>GADPH sense</i>	5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT - 3'
<i>GADPH anti-sense</i>	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA - 3'

Elaborada pelo autor, 2025.

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de expressão gênica obtidos pelo RT-qPCR foram avaliados estatisticamente para comparar os níveis de expressão do gene (*PTGER4*) e dos receptores (*CNR1* e *CNR2*) entre o grupo controle e AF. Para isso, foi utilizado o método Delta-Delta Ct para calcular a expressão gênica relativa. Posteriormente, esses dados foram utilizados para avaliação da normalidade das distribuições pelo teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade (Teste de Levene). Uma vez caracterizados, foram encontradas variáveis com distribuição normal, com aplicação do teste T de Student para duas amostras independentes. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os softwares BioEstat 5.3 e o Statistica 7.0.0, foram utilizados para a aplicação dos testes, comparação dos grupos e representação gráfica dos resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram comparados cinco indivíduos AA e cinco indivíduos SS a fim de determinar a diferença entre a expressão dos receptores *PTGER4*, *CNR1* e *CNR2* do grupo controle e grupo com anemia falciforme. Todos os indivíduos incluídos no grupo controle eram do sexo feminino e na triagem do laboratório, os resultados foram negativos para qualquer hemoglobinopatia. No hemocentro, muitos pacientes foram atendidos com diversos fenótipos associados à comorbidades, sendo selecionados para o estudo pacientes com genótipos SS equivalentes ao número de pacientes incluídos no grupo controle.

Todos os pacientes incluídos no estudo (*Tabela 2*) responderam a um questionário de anamnese (*Apêndice B*) elaborado como parte do projeto de doutorado do Lucas Ramos Pereira, aprovado pelo Comitê de Ética da UNESP de São José do Rio Preto e com Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (CAAE nº 57755422.0.0000.5466). Com esses dados foi possível identificar quais medicamentos eram usuais, as associadas a AF, uso de analgésicos e anti-inflamatórios e transfusões sanguíneas.

Os pacientes com genótipo SS, fazem uso de Hidroxiuréia (HU) há pelo menos dois anos, uso de Ácido fólico, tramadol ou Paco (Paracetamol e Fosfato de codeína) regularmente. Esses medicamentos são considerados opióides e interferem no principal sintoma da AF, as crises de dor, que foram relatados em todos os pacientes, com relativa frequência.

A partir da técnica de qPCR utilizada para avaliar a expressão do gene da via *PTGS2* (*PTGER4*) e dos receptores endocanabinóides *CNR1* e *CNR2* entre os indivíduos, os dados obtidos foram submetidos ao Método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) para calcular a expressão gênica relativa (%), e posteriormente os valores do delta Ct (ΔCt) (Ct gene alvo – Ct gene de referência)

foram utilizados para a realização das análises estatísticas, pois, as variações técnicas são removidas (*Tabela 3 e 4*).

A normalidade das amostras foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$). Todos os dados apresentaram distribuição normal, uma vez que os valores de p foram superiores a 0,05. E foram confirmados como homocedásticos pelo Teste de Levene, o que indica que as variâncias entre os grupos comparados são estatisticamente iguais. Assim, foi realizado o Teste de T-Student, teste paramétrico para duas amostras independentes.

Tabela 2 - Dados descritivos dos pacientes com AF e grupo controle do questionário de anamnese.

Indivíduos	Genótipo	Sexo	HU	Medicamentos	Comorbidades da AF
C1	AA	F	Não	Dipirona/ Buscopan	-
C2	AA	F	Não	Dipirona	-
C3	AA	F	Não	Paracetamol	-
C4	AA	F	Não	Paracetamol	-
C5	AA	F	Não	Dipirona	-
S1	SS	M	10+ anos	Paco/Tramal/Ácido Fólico	Crise de dor Síndrome Torácica Aguda (STA)
S2	SS	M	2+ anos	Tramal/ Ácido Fólico	Crise de dor Osteonecrose
S3	SS	M	20+ anos	Tramal/ Ácido Fólico	Crise de dor
S4	SS	F	2+ anos	Tramal/ Ácido Fólico	Crise de dor
S5	SS	M	20+ anos	Tramal/Dipirona/ Paco/Ácido Fólico	Crise de dor

Fonte: Autoria Própria, 2025. Os indivíduos do grupo controle são identificados com a letra (C), enquanto os pacientes com anemia falciforme são simbolizados com a letra (S).

Os valores de p do T-Student para *PTGER4*, *CNR1* e *CNR2* ($p \geq 0,29$; $p \geq 0,66$ e $p \geq 0,14$) demonstram que não há diferença estatística entre os valores, ou seja, não há diferença estatística entre a expressão do gene e o genótipo avaliado.

Tabela 3. Valores de delta Ct obtidos para o grupo controle que foram submetidos às análises estatísticas de T-student.

Genes	Grupo Controle (ΔCt)					Média \pm desvio-padrão (DP)
	C1	C2	C3	C4	C5	
<i>PTGER4</i>	13,20	12,11	13,18	12,68	12,46	12,72 \pm 0,47
<i>CNR1</i>	3,55	2,54	4,50	4,81	4,43	3,96 \pm 0,92
<i>CNR2</i>	4,50	5,23	4,86	5,47	4,63	4,93 \pm 0,41

Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

Tabela 4. Valores de delta Ct obtidos para o grupo caso (AF) que foram submetidos às análises estatísticas de T-student.

Genes	Grupo AF (ΔCt)					Média \pm desvio-padrão (DP)
	S1	S2	S3	S4	S5	
<i>PTGER4</i>	7,83	12,42	13,19	14,69	12,86	12,20 \pm 0,98
<i>CNR1</i>	3,25	4,19	4,09	5,12	4,34	4,2 \pm 0,67
<i>CNR2</i>	4,17	4,68	4,15	5,18	4,32	4,5 \pm 0,43

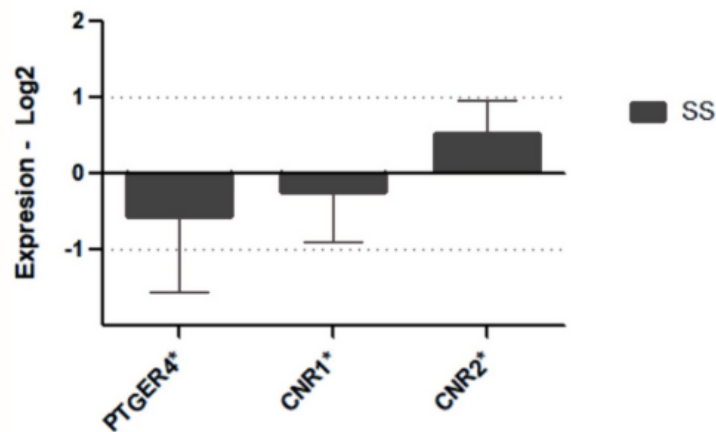
Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

Tabela 5- Valores de *fold change* obtidos a partir do Método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$).

Pacientes	Fold Change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
	<i>PTGER4</i>	<i>CNR1</i>	<i>CNR2</i>
S1	29,84*	1,64	1,70
S2	1,24	0,86	1,19
S3	0,73	0,92	1,72
S4	0,26	0,45	0,84
S5	0,91	0,77	1,54

Fonte: Elaborado pela Autora, 2025. O valor com (*) está discrepante dos outros resultados, sendo um valor atípico e desconsiderado no estudo.

Gráfico 1- Expressão do receptor inflamatório PTGER-4 e dos receptores endocanabinoides CNR1 e CNR2 em pacientes com AF.



Fonte: Autoria Própria, 2025. A quantificação de expressão gênica foi realizada por RT-qPCR em tempo real, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e transformação em \log_2 para interpretação da variação de expressão, normalizada por gene de referência (GADPH). As barras representam média \pm erro padrão (SEM). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os receptores avaliados pelo Teste T-student.

Transformando os dados do Método $\Delta\Delta Ct$ para \log_2 o Gráfico 1 se apresenta, linearizando as diferenças de expressão. Existe uma modulação diferencial destes receptores nos indivíduos, mas não foi possível identificar uma expressão significativa a partir das nossas análises, ou seja, não é possível inferir que houve uma maior ou menor expressão de algum deles. O esperado era que os receptores PTGER4, CNR1 e CNR2 estariam mais expressos nos pacientes com AF por estarem envolvidos na inflamação, no entanto, a partir das análises

realizadas, foi possível observar que, *PTEGER4* e *CNR1* não se expressaram significativamente. Segundo Martín-Vázquez (2023), a atuação do *PTEGER4* se dá quando a PGE_2 atua sobre ele, o que pode resultar em um efeito pró ou anti inflamatório dependendo do contexto fisiológico e patológico. Dois estudos trazem efeitos contraditórios sobre o papel destes receptores. O estudo de Vennemann (2012) que investigou a via *PTGS-2* e um dos seus receptores *PTGER4* contra a toxicidade diabetogênica em camundongos, concluiu que ao criar modelos animais com estreptozotocina, destruindo as células beta do pâncreas, um ambiente inflamado é gerado e a expressão de *PTGS-2* é induzida e a indução de PGE_2 também. O papel protetor desempenhado pela PGE_2 é mediado pelo receptor *PTGER2* e *PTGER4* em conjunto, suprimindo a citotoxicidade. Outro estudo de Catalano (2011) que investigou o adenocarcinoma endometrial e alguns receptores prostanóides, demonstrou que o *PTGER4* influenciou a taxa de crescimento tumoral significativamente e que vias independentes poderiam interferir na expressão deste receptor.

A expressão de *CNR2* também não foi significativa em pacientes com AF. Sabemos que este receptor está relacionado com o sistema imunológico (codificado pelo gene *CNR2*), mesmo não sendo o receptor endocanabinóide mais presente no corpo humano. Nos pacientes com AF, este receptor endocanabinóide que faz parte do sistema que regula processos como dor, resposta imunológica e inflamação, e já é confirmado através de outros estudos que pacientes com AF apresentam níveis de expressão maiores de algumas citocinas, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF (Tozatto-maio et al, 2024). Um estudo sobre a expressão dos receptores canabinoides (*CNR1* e *CNR2*) e carcinomas papilíferos (Doyuran e Eronat, 2023) revelou que a expressão destes dois receptores estava aumentada em pacientes com esta condição, levantando discussões de como estes receptores podem contribuir para o gerenciamento da doença e precisão no diagnóstico.

A expressão não significativa de *CNR1*, não era esperada, por ser também um receptor do sistema endocanabinóide. Estudos que tratam diretamente sobre a expressão deste receptor nos pacientes com AF, são pouco encontrados. Um estudo recente de Berti et al (2024) apresentou a primeira associação de variantes de nucleotídeo único (SNVs) do sistema endocanabinóide no contexto da AF, neste estudo foi demonstrado que o polimorfismo rs35761398 do gene *CNR2* possui um efeito protetor na ocorrência de um dos sintomas da AF, o priapismo, enquanto para o polimorfismo do gene *CNR1* investigado, nada foi encontrado. Este estudo ressalta a importância da investigação da atividade dos genes *CNR1* e *CNR2* na

AF, além de suscitar novas perspectivas. Embora neste caso se tenha estudado o gene e não o receptor, alvo desta pesquisa, estudos como esse servem de base para novas investigações.

Todos os pacientes com AF inseridos neste estudo faziam o uso regular de HU. Segundo Brasil (2024) esse medicamento aumenta a HbF, e reduz HbS. É um dos medicamentos mais utilizados para intervir na falcização de hemácias, vaso-oclusão, e no estado de inflamação crônica. O estudo de Guarda et al (2019), concluiu que a HU modula o sistema imune na AF, diminuindo os monócitos inflamatórios, a capacidade das células produzirem citocinas e fator tecidual o que atenua os eventos da AF, ou seja, a droga exerce um efeito anti-inflamatório. O uso deste medicamento nos pacientes incluídos no estudo pode ter atenuado as diferenças de expressão gênica estudadas, pois afeta vias inflamatórias mediadas pela PGE_2 . Uma revisão mais recente de Rubio et al. (2024), correlacionou a HU com a queda no número de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias, e demonstrou o uso do medicamento como redutor da resposta inflamatória sistêmica que favorece o dano endotelial.

Os outros medicamentos como Tramadol, dipirona e Ácido Fólico utilizados pelos pacientes com AF não interferem diretamente na via inflamatória $PTGS2$. O tramadol é um opioide frequentemente utilizado para manejo de dor intensa. Segundo Borgerding et al. (2013) em pacientes com AF em que se foi administrado Tramadol, as crises de dores foram reduzidas e doses de morfina foram menos administradas para as crises de dores. Outro estudo de Buccellati et al. (2000) demonstrou que o efeito anti-inflamatório do Tramadol não está relacionado com o efeito inibidor direto sobre a formação dos prostanóides, quando se avaliou a atividade da via $PTGS2$.

O Dipirona é um medicamento analgésico e antipirético comum, e no contexto da AF, as crises de dores também são reduzidas (De Araújo et al, 1994). Um estudo propõe o bloqueio seletivo da via $PTGS2$ para o controle da dor (Sadler e Stucky, 2019), mas até então, o uso dipirona relacionado a expressão da $PTGS2$ ainda não foi investigado. Já o ácido fólico é um suplemento contínuo para prevenir deficiências de folato, estimular o organismo a produzir novas hemácias, e para crises de dor, porém a investigação deste medicamento associado a mediadores prostanóides ainda não foi realizada (Agbor et al., 2024).

Uma diferença importante a ser mencionada é que neste estudo o grupo controle foi completamente composto por indivíduos do sexo feminino, enquanto a maioria dos pacientes com AF incluídos eram do sexo masculino. Existem evidências que comprovam que o sexo influencia a expressão de genes associados à dor, inflamação e sinalização endocanabinóide. Se tratando do $PTGER4$ (receptor celular no qual PGE_2 liga), em mulheres eles estão mais ativados, pois os estrogênios modulam as prostaglandinas e a expressão da via $PTGS2$. Esta

observação já foi realizada anteriormente, como no estudo de Hertrampf et al. (2005) que demonstrou que em ratos ovariectomizados ocorria uma regulação tecidual da via PTGS2 pelo estrogênio. Ademais, os receptores endocanabinóides (CNR1 e CNR2) também podem ser modulados por hormônios sexuais (estrogênio/ testosterona) e respostas a dor. Estudos como de Hill et al., 2007 e Tanaka et al., 2022 apresentam que o estrogênio recruta o sistema endocanabinóide para modular a dor, e que a expressão do sistema varia ao longo do ciclo menstrual, enquanto a testosterona regula o receptor CNR1 via receptor de androgênio (Lee et al., 2013).

5 CONCLUSÃO

A investigação da expressão gênica dos receptores *PTGER4*, CNR1 e CNR2 por RT-qPCR nos dois grupos demonstrou que não há diferença estatística entre a expressão dos genes e o genótipo avaliado. Alguns fatores podem ter contribuído para que a modulação diferencial dos receptores analisados não se apresentasse, como uso contínuo de hidroxiureia (HU) pelos pacientes e o sexo dos indivíduos analisados. Esse estudo levanta a importância de considerar a HU como modificador da expressão do receptor inflamatório *PTGER4* e dos receptores endocanabinóides CNR1 e CNR2 para análises futuras, contribuindo para suscitar a busca de novas alternativas terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- AGBOR**, Divine Besong Arrey et al. Folic acid in the treatment of sickle cell disease: A systematic review. **Cureus**, v. 16, n. 4, p. e57962, 2024.
- ALHOUAYEK**, Mireille; **MUCCIOLI**, Giulio G. COX-2-derived endocannabinoid metabolites as novel inflammatory mediators. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 6, p. 284-292, 2014.
- BALLANTYNE**, Jane C.; **SHIN**, Naomi S. Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence. **The Clinical Journal of Pain**, v. 24, n. 6, p. 469-478, 2008.
- BARBOSA NETO**, José Osvaldo; **GARCIA**, João Batista Santos. Função da glia no sistema endocanabinoide: revisão narrativa. **BrJP**, v. 6, p. 27-30, 2023.
- BHATIA**, Monica; **SHETH**, Sujit. Hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease: patient selection and special considerations. **Journal of Blood Medicine**, p. 229-238, 2015.
- BRANDOW**, A. M.; **LIEM**, R. I. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, p. 20, 2022.
- BRANDOW**, A. M. et al. American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: Management of acute and chronic pain. **Blood Advances**, v. 4, n. 10, p. 2656–701, 2020.
- BRASIL**. Ministério da Saúde. Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. **Relatório anual de dados do PNTN, 2014-2022**. Brasília, DF: MS, 2022.
- BRASIL**. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Doença falciforme: Diretrizes básicas da linha de cuidado**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BRASIL**. Ministério da Saúde. Portaria Conjunta nº 5, de 19 de fevereiro de 2018. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/protocolos-e-diretrizes>. Acesso em: 03 nov. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Consenso brasileiro sobre atividades esportivas e militares e herança falciforme.** Brasília, 2009c. 95 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). **Monitoramento do Horizonte Tecnológico (MHT) – Medicamentos para o tratamento de Doença Falciforme.** Brasília: Ministério da Saúde, set. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/radar/2022/20221011_mht_doenca-falciforme.pdf.

Acesso em: 03 nov. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias** [recurso eletrônico]. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <vsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diagnostico_laboratorial_hemoglobinopatias.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2025.

BUCCELLATI, Carola et al. Tramadol anti-inflammatory activity is not related to a direct inhibitory action on prostaglandin endoperoxide synthases. **European Journal of Pain**, v. 4, n. 4, p. 413-415, 2000.

BORGERDING, Mary P.; **ABSHER,** Randall K.; **SO,** Tsz-Yin. Tramadol use in pediatric sickle cell disease patients with vaso-occlusive crisis. **World Journal of Clinical Pediatrics**, v. 2, n. 4, p. 65, 2013.

BERTI, Amanda Cristina Meneguetti et al. The endocannabinoid system's genetic polymorphisms in sickle cell anemia patients. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 31562, 2024.

CASTILLO, Pablo E. et al. Endocannabinoid signaling and synaptic function. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 70-81, 2012.

CATALANO, Rob D. et al. Hypoxia and prostaglandin E receptor 4 signalling pathways synergise to promote endometrial adenocarcinoma cell proliferation and tumour growth. **PloS One**, v. 6, n. 5, p. e19209, 2011.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.

CIANCIARULLO, Marco Antonio et al. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. **Journal of Human Growth and Development**, v. 18, n. 2, p. 135-147, 2008.

CORDEIRO, Rosa Cândida; **FERREIRA**, Sílvia Lúcia; **SANTOS**, Ane Caroline da Cruz. Experiências do adoecimento de pessoas com anemia falciforme e estratégias de autocuidado. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 27, p. 499-504, 2014.

COSTA, J. L. G. P. et al. Neurobiologia da *Cannabis*: do sistema endocanabinoide aos transtornos por uso de *Cannabis*. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 60, n. 2, p. 111–122, 2011.

DE ARAUJO, J. T. et al. Treatment of sickle cell anemia crisis with dipyrrone, hydrocortisone, and fluid therapy. **Revista Hospital das Clínicas**, v. 49, n. 1, p. 13-16, 1994.

DORNELES, Jessica; **DE MENEZES MAYER**, Amanda; **CHIES**, José Artur Bogo. Sickle Cell Anemia and Inflammation: A Review of Stones and Landmarks Paving the Road in the Last 25 Years. **Hematology Reports**, v. 17, n. 1, p. 2, 2025.

DOYURAN, Damla Zeynep; **ERONAT**, Ömer. The clinical and pathological significance of increased expression of the cannabinoid receptors CB-1R and CB-2R in patients with papillary thyroid carcinomas compared to benign thyroid lesions. **The International Journal of Biological Markers**, v. 38, n. 3-4, p. 233-242, 2023.

ELENDU, Chukwuka et al. Understanding sickle cell disease: causes, symptoms, and treatment options. **Medicine**, v. 102, n. 38, p. e35237, 2023.

FERREIRA, T. N. et al. Prevalência da doença falciforme no Brasil após a implementação do programa de triagem neonatal nacional. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 46, p. S679, 2024.

FINE, Perry G.; **ROSENFELD**, Mark J. The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 4, n. 4, 2013.

FINN, David P. et al. Cannabinoids, the endocannabinoid system, and pain: a review of preclinical studies. **Pain**, v. 162, p. S5-S25, 2021.

GROTENHERMEN, Franjo; **MÜLLER-VAHL**, Kirsten. The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 109, n. 29-30, p. 495, 2012.

GUARDA, Caroline C. et al. Hydroxyurea alters circulating monocyte subsets and dampens its inflammatory potential in sickle cell anemia patients. **Scientific Reports**, v. 9, n. 14829, p. 1–12, 2019.

GUIMARÃES, Cíntia Tavares Leal; **COELHO**, Gabriela Ortega. A importância do aconselhamento genético na anemia falciforme. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1733-1740, 2010.

HARTEVELD, C. L. et al. The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 44, n. S1, p. 28–36, set. 2022.

HENSHAW, Frances R. et al. The effects of cannabinoids on pro-and anti-inflammatory cytokines: a systematic review of in vivo studies. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 6, n. 3, p. 177-195, 2021.

HERTRAMPF, T. et al. Tissue-specific modulation of cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the uterus and the v. cava by estrogens and phytoestrogens. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 243, n. 1-2, p. 51-57, 2005.

HILL, Matthew N.; **KARACABEYLI**, Eda S.; **GORZALKA**, Boris B. Estrogen recruits the endocannabinoid system to modulate emotionality. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 4, p. 350-357, 2007.

INGRAM, Vernon M. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. **Nature**, v. 180, n. 4581, p. 326-328, 1957.

KATO, Gregory J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-22, 2018.

KAVANAGH, Patricia L.; **FASIPE**, Titilope A.; **WUN**, Ted. Sickle cell disease: review. **JAMA**, v. 328, n. 1, p. 57-68, 2022.

KOPP, Benjamin T. et al. Secondhand smoke alters arachidonic acid metabolism and inflammation in infants and children with cystic fibrosis. **Thorax**, v. 74, n. 3, p. 237-246, 2019.

KOZAK, Kevin R. et al. Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 44877-44885, 2002.

KUMAR, Vinay; **ABBAS**, Abul K.; **ASTER**, Jon C. **Robbins and Kumar Basic Pathology: First South Asia Edition-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2017.

KUNER, Rohini; **KUNER**, Thomas. Cellular circuits in the brain and their modulation in acute and chronic pain. **Physiological Reviews**, 2020.

LEE, K. S. et al. The role of the androgen receptor in transcriptional modulation of cannabinoid receptor type 1 gene in rat trigeminal ganglia. **Neuroscience**, v. 254, p. 395-403, 2013.

LEUTI, Alessandro et al. Bioactive lipids, inflammation, and chronic diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 159, p. 133-169, 2020.

LIGRESTI, Alessia; **PETROSINO**, Stefania; **DI MARZO**, Vincenzo. From endocannabinoid profiling to 'endocannabinoid therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, n. 3, p. 321-331, 2009.

LIMA, Stephane Raquel Barreto et al. Aplicação da técnica de CRISPR-cas9 para o tratamento da anemia falciforme. **Caderno Pedagógico**, v. 21, n. 7, p. e5917-e5917, 2024.

LIU, Chao et al. Cytokines: From clinical significance to quantification. **Advanced Science**, v. 8, n. 15, p. 2004433, 2021.

LÓPEZ RUBIO, Montserrat; **ARGÜELLO MARINA**, María. The current role of hydroxyurea in the treatment of sickle cell anemia. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 21, p. 6404, 2024.

LU, Hui-Chen; **MACKIE**, Ken. An introduction to the endogenous cannabinoid system. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 7, p. 516-525, 2016.

LU, Hui-Chen; **MACKIE**, Ken. Review of the endocannabinoid system. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, p. 607-615, 2021.

LYNDIN, M. et al. COX2 Effects on endometriais carcinomas progression. **Pathology-Research and Practice**, v. 238, p. 154082, 2022.

MARTÍN-VÁZQUEZ, Eugenia et al. The PTGS2/COX2-PGE2 signaling cascade in inflammation: Pro or anti? A case study with type 1 diabetes mellitus. **International Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 13, p. 4157, 2023.

MELO, Luciane et al. Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnóstico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 12-17, 2008.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). **Relatório de Recomendação nº 873 – Hidroxiureia para o tratamento de pacientes com doença falciforme (SS, S β 0 e SD Punjab), entre 9 e 24 meses de idade, sem sintomas e complicações**. Brasília: Ministério da Saúde, fev. 2024. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/ptbr/midias/relatorios/2024/20240307_Relatrio_873_Hidroxiureia_500mg_DOENAFALCIFORME.pdf. Acesso em: 03 nov. 2025.

MOUSINHO-RIBEIRO, Rita de Cassia et al. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 136-141, 2008.

MUNRO, Sean; THOMAS, Kerrie L.; ABU-SHAAR, Muna. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

NADER, Elie; ROMANA, Marc; CONNES, Philippe. O círculo vicioso de inflamação eritrocitária na anemia falciforme. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 454, 2020.

NAOUM, P. C. Anemias imigrantes. Origens das anemias hereditárias no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 3, n. 14, p. 58-64, 1984.

NAOUM, Paulo Cesar; BONINI-DOMINGOS, Claudia R. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 226-228, 2007.

National Center for Biotechnology information. PTGS2 prostaglandin-endoperoxide synthase 2 [Homo sapiens (human)]. NCBI Gene, Bethesda: NCBI, atualizado em 19 ago. 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5743>. Acesso em: 20 out. 2025.

NEVITT, S. J.; JONES, A. P.; HOWARD, J. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 2017, n. 1, 2017.

OKUSANYA, Babasola O. et al. Medical cannabis for the reduction of opioid dosage in the treatment of non-cancer chronic pain: a systematic review. **Systematic Reviews**, v. 9, n. 1, p. 167, 2020.

OLIVEIRA, C. M. B. DE. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 260–265, mar. 2011.

OLIVEIRA JÚNIOR, José Oswaldo de; PORTELLA JUNIOR, Caio Sander Andrade; COHEN, Cláudia Panossian. Mediadores inflamatórios na dor neuropática. **Revista Dor**, v. 17, p. 35-42, 2016.

PANTOJA-RUIZA, Camila et al. Cannabis e dor: uma revisão de escopo. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 72, n. 1, p. 142-151, 2022.

PIEL, Frederic B. et al. Global burden of sickle cell anemia in children under five, 2010–2050: modeling based on demographics, excess mortality, and interventions. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 7, p. e1001484, 2013.

PIEL, Frédéric B. et al. Global migration and the changing distribution of sickle hemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. **Lancet Global Health**, v. 2, n. 2, p. e80-e89, 2014.

PIEL, Frédéric B.; STEINBERG, Martin H.; REES, David C. Sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561-1573, 2017.

PIERONI, Fabiano et al. Transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) em doenças falciformes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 327-330, 2007.

RIGANO, Paolo et al. Real-life experience with hydroxyurea in sickle cell disease: A multicenter study in a cohort of patients with heterogeneous descent. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 69, p. 82-89, 2018.

SADLER, Katelyn E.; **STUCKY**, Cheryl L. Blocking COX-2 for sickle cell pain relief. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 18, p. 1924-1925, 2019.

SANT'ANA, Phelipe Gabriel dos Santos et al. Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 40-45, 2017.

SCHECHTER, Alan N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.

SHEPPE, Austin EF; **EDELMANN**, Mariola J. Roles of eicosanoids in regulating inflammation and neutrophil migration as an innate host response to bacterial infections. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 8, 2021.

SOHRAB, Sayed Sartaj et al. Chronic inflammation transformation to cancer: a nanotherapeutic paradigm. **Molecules**, v. 28, n. 11, p. 4413, 2023.

STEINBERG, Martin H. Fetal hemoglobin in sickle hemoglobinopathies: high HbF genotypes and phenotypes. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 11, p. 3782, 2020.

TANAKA, Keisuke et al. Gene expression of the endocannabinoid system in endometrium through menstrual cycle. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9400, 2022.

THOMPSON, J. S.; **THOMPSON**, M. W. **Genética médica**. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2016.

TOZATTO-MAIO, Karina et al. Inflammatory pathways and anti-inflammatory therapies in sickle cell disease. **HemaSphere**, v. 8, n. 12, p. e70032, 2024.

TWAROWSKI, Bartosz; **HERBET**, Mariola. Inflammatory processes in alzheimer's disease—pathomechanism, diagnosis and treatment: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6518, 2023.

- VALLEJO**, Ricardo et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain Practice**, v. 10, n. 3, p. 167-184, 2010.
- VAN DEN HOOGEN**, Nynke J. et al. Cannabinoids in chronic pain: therapeutic potential through microglia modulation. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 15, p. 816747, 2022.
- VENNEMANN**, Antje et al. PTGS-2–PTGER2/4 Signaling Pathway Partially Protects From Diabetogenic Toxicity of Streptozotocin in Mice. **Diabetes**, v. 61, n. 7, p. 1879-1887, 2012.
- VOLTARELLI**, Júlio C. Febre e inflamação. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1/2, p. 7-48, 1994.
- WANG**, Tianqi et al. Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3683, 2019.
- ZENG**, Linan et al. Values and preferences towards medical cannabis among people living with chronic pain: a mixed-methods systematic review. **BMJ Open**, v. 11, n. 9, p. e050831, 2021.
- ZÚÑIGA**, Pamela et al. Enfermedad de células falciformes: Un diagnóstico para tener presente. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 89, n. 4, p. 525-529, 2018.

APENDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/2012/Resolução 510/2016)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa *Marcadores da via inflamatória PTGS2 com o uso de óleo de Cannabis sativa full spectrum na doença falciforme* sob responsabilidade do pesquisador Lucas Ramos Pereira. O estudo será realizado com três tubos de amostra de sangue (15mL), tratamento com óleo de *Cannabis* e, após o término do tratamento (quatro meses), mais três tubos de sangue. Haverá um risco para saúde física decorrente da coleta de sangue, caracterizado por alterações temporárias na pressão sanguínea, coordenação motora e equilíbrio, e do tratamento com o óleo, caracterizado por náusea e alteração no paladar, sendo fortemente recomendado seguir todas as orientações de prescrição do médico. Caso sinta dor durante esse período, poderá fazer uso das medicações usuais para dor, caso necessário. O estudo não será interrompido caso sinta dor durante esse período. No caso de aparecimento de efeitos colaterais (náusea e alteração no paladar ou outro sintoma) o tratamento deve ser interrompido e a amostra de sangue será excluída da pesquisa, assim como o paciente em tratamento. Ressaltamos que o tratamento convencional se manterá à sua disposição.

Os benefícios que você terá serão *diretos*, por meio de uma possível analgesia proporcionada pelo medicamento e *indiretos*, pois contribuirá para avanço do conhecimento relacionado ao processo de inflamação na anemia falciforme e maneiras alternativas de proporcionar analgesia em crises de dor.

O pesquisador estará à sua disposição para esclarecer qualquer dúvida relativa à sua participação na pesquisa. Sua participação é voluntária, o que significa que escolherá se quer ou não participar, assim como poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo ou penalidade.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão arquivados em local seguro e a divulgação dos resultados em congressos e/ou publicações em revistas científicas será feita de forma a não identificar os participantes.

Se você sofrer qualquer dano resultante de sua participação neste estudo, sendo ele imediato ou tardio, previsto ou não, você tem direito a assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, e o direito de buscar indenização, nos casos de danos decorrentes de sua participação na pesquisa, o que é garantido pelo Código Civil, Lei 10.406 de 2002, Artigos 927 e 954 e Resolução CNS nº 510 de 2016, Artigo 9º, inciso 6.

Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato de estes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa, nem custos pessoais.

Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para um novo tratamento para o quadro clínico da Anemia Falciforme.

Segundo Resolução 466/12 item IV.5, este documento foi elaborado em duas vias que deverão ser rubricadas em todas as suas páginas e assinadas por você e pelo pesquisador ao final do documento, ficando uma via com cada um de nós.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos, ou seja, o CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Declaro que, tendo lido as informações aqui contidas, compreendi o objetivo desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e estou plenamente de acordo com a minha participação e de que o pesquisador terá acesso aos prontuários médicos relacionados ao tratamento para Anemia Falciforme. Também declaro estar ciente de poder desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem quaisquer penalidades. Assim, autorizo a participação nesta pesquisa, o acesso aos prontuários médicos e concordo plenamente com a utilização de todos os registros obtidos para fins de ensino e pesquisa, além da publicação em revistas científicas e/ou apresentação em congressos, uma vez que é assegurada a confidencialidade dos dados.

Nome: _____ R.G. _____

Endereço: _____

Fone: _____

_____, _____ de _____ de 20__

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador(a) responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao participante e a outra ao pesquisador.

Nome Pesquisador(a): Lucas Ramos Pereira	Cargo/Função: Pesquisador
Instituição: Universidade Estadual Paulista – IBILCE/UNESP	
Endereço: Laboratório de Hemoglobinas - R. Cristóvão Colombo, 2265, Jd. Nazareth.	
Telefone: (17) 98815-8391	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP	
Rua Cristóvão Colombo, 2265. Bairro: Jardim Nazareth.	
São José do Rio Preto/SP – Fone 17-3221.2480 e 3221.2545	

APENDICE B – QUESTIONÁRIO DE ANAMNESE DOS PACIENTES

Questionário de Anamnese

Marcadores da via inflamatória PTGS2 com o uso de óleo de *Cannabis sativa full spectrum* na doença falciforme

Projeto Doutorado – Lucas Ramos Pereira

Esse questionário tem como objetivo investigar a situação clínica do paciente com Anemia Falciforme (HbSS) atendido no sistema básico de saúde do Hemocentro de São José do Rio Preto – SP.

A sua participação é voluntária e você pode responder com sinceridade e liberdade, pois são garantidos o anonimato e a confidencialidade de todas as suas respostas.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE-UNESP conforme estabelece a legislação e sob nº CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 57755422.0.0000.5466.

Dados Gerais

Nome completo (ou social): _____

Data de Nascimento: _____ Sexo biológico: _____

Origem étnica: _____

Telefone: _____

Email: _____

Disponibilidade para a tele consulta: _____

Quadro Clínico

Genótipo: _____

Em uso de hidroxiuréia: () Sim () Não Se sim, a quanto tempo? _____

Uso regular de anti-inflamatório? () Sim () Não Se sim, qual? _____

Uso regular de analgésicos? () Sim () Não Se sim, qual? _____ Frequência? _____

Histórico de Doença Psiquiátrica (ansiedade, depressão, esquizofrenia, etc)? () Sim () Não

Se sim, qual? _____

Uso de medicamento regular? () Sim () Não Se sim, qual? _____

Faz uso recreativo de *Cannabis sativa*? () Sim () Não

Fez transfusão sanguínea nos últimos 3 meses? () Sim () Não

Crises de dor nos últimos doze meses? () Sim () Não Se sim, em média quantas? _____

De zero a 10, sendo zero sem dor e 10 dor incapacitante, como classificaria essa dor? _____

Apresenta úlcera de perna? () Sim () Não Data da última crise: _____

Alguma outra complicação clínica decorrente da Anemia Falciforme?

() Síndrome Torácica Aguda () Retinopatia () Sequestro Esplênico

() Priapismo () Acidente Vascular Cerebral () Outro: _____

Internação nos últimos 6 meses? () Sim () Não Data da última internação: _____

Causa da última internação: _____

Algum outro problema de saúde que queira relatar? _____