

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/12/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Amanda Cristina Meneguetti Berti

**Influência de variantes genéticas do sistema endocanabinoide
sobre os subfenótipos de hemólise e de vasculopatia na anemia
falciforme**

São José do Rio Preto
2023

Amanda Cristina Meneguetti Berti

**Influência de variantes genéticas do sistema endocanabinoide
sobre os subfenótipos de hemólise e de vasculopatia na anemia
falciforme**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Orientador: Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Edis Belini Júnior

São José do Rio Preto
2023

B543i

Berti, Amanda Cristina Meneguetti

Influência de variantes genéticas do sistema endocanabinoide sobre os subfenótipos de hemólise e de vasculopatia na anemia falciforme / Amanda Cristina Meneguetti Berti. -- São José do Rio Preto, 2023

55 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Danilo Grünig Humberto da Silva

Coorientador: Edis Belini Júnior

1. Genética molecular humana. 2. Anemia falciforme. 3. Endocanabinoides. I. Título.

Amanda Cristina Meneguetti Berti

**Influência de variantes genéticas do sistema endocanabinoide
sobre os subfenótipos de hemólise e de vasculopatia na anemia
falciforme**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Rizzatti Luizon
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Anderson Cunha da Silva
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

São José do Rio Preto
05 de dezembro de 2023

Dedico esse trabalho à minha amada família.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Altair e Silvia, e ao meu irmão, João Vitor, por sempre apoiarem minha caminhada. A vocês e ao seu infinito amor, sou eternamente grata.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva, e ao meu coorientador, Prof. Dr. Edis Belini Júnior, por todo o apoio prestado. Obrigada por todos os ensinamentos e por me mostrarem que pesquisa e orientação não andam separadas de respeito e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM), em especial à minha querida amiga Dra. Vanessa Ramos, por tornarem minha rotina mais leve e feliz.

Ao Prof. Dr. Lucas Gazarini por, entre xícaras de café e boas conversas, sempre contribuir com seus riquíssimos conhecimentos.

A todos os professores de graduação e pós-graduação, por exercerem o mais lindo papel de educadores.

Ao meu melhor amigo desde o primeiro dia de graduação, Luis Júnior, sem o qual nada disso seria possível.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp/Ibilce) e à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), por permitirem o desenvolvimento da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001, à qual agradeço pelo financiamento.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A anemia falciforme (AF) resulta da homozigose para a mutação no gene da beta-globina que leva a inúmeras complicações clínicas como resultado de mecanismos fisiopatológicos complexos. Os fenótipos clínicos da AF estão associados a modificadores genéticos e o sistema endocanabinoide (ECS) pode ser um candidato para modular as complicações da AF. O ECS está associado com a hematopoiese, na agregação plaquetária e nas respostas imunitárias. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação de polimorfismos de base única (SNPs) relacionados ao ECS com os subfenótipos hemolíticos em pessoas com AF, bem como verificar a influência das variáveis bioquímicas de hemólise, concentração de hemoglobina (Hb) fetal (Hb F) e presença de alfa talassemia ($\alpha^{-3,7\text{ kb}}$). Os grupos estudados foram compostos por (1) 73 pessoas com acidente vascular encefálico (AVE), (2) 80 pessoas com priapismo e (3) 144 pessoas como grupo controle (para priapismo, 58). O fenótipo da AF foi diagnosticado por HPLC e confirmado por PCR-RE. A mutação da $\alpha^{-3,7\text{ kb}}$ talassemia foi detectada por GAP-PCR e a genotipagem dos SNPs de *FAAH* rs324420, *MAGL* rs604300, *CNR1* rs7766029 e *CNR2* rs35761398 foi realizada com ensaios TaqMan. Os dados laboratoriais de hemoglobina (Hb) total, bilirrubina indireta (BI), contagem total de reticulócitos e lactato desidrogenase (LDH) foram obtidos a partir dos registros médicos. Níveis mais baixos de Hb F foram associados ao AVE ($P < 0,001$), e frequência mais baixa da mutação $\alpha^{-3,7\text{ kb}}$ -talassemia foi associada ao priapismo ($P < 0,001$). Em análises multivariadas com ajuste para $\alpha^{-3,7\text{ kb}}$ -talassemia, o *CNR2* rs35761398 foi associado a uma menor chance de desenvolver priapismo (OR = 0,386 [0,175-0,854], $P = 0,019$), independentemente da mutação $\alpha^{-3,7\text{ kb}}$ -talassemia (OR = 0,148 [0,059-0,375], $P < 0,001$) como covariável, e não houve associação estatística entre os SNPs e AVE. O priapismo isquêmico é um subfenótipo hemolítico da SCA que envolve vias desequilibradas de vasodilatação/vasoconstrição nos corpos cavernosos, como a diminuição da sinalização envolvida na via vasoconstritora das proteínas RhoA/Rho-kinase (ROCK), resultando no relaxamento dos corpos cavernosos e maior suscetibilidade ao priapismo. Uma vez que a ativação do receptor canabinoide tipo 2 (CB2) está envolvida na diminuição da ativação de RhoA, sugerimos, com base em nossos resultados, que o genótipo TT-CC para o SNP de *CNR2* analisado resulta no nível basal de ativação desse receptor, desempenhando

um papel na manutenção da via RhoA/ROCK normal e reduzindo as chances de desenvolver priapismo.

Palavras-chave: Priapismo isquêmico; *CNR2* rs35761398; Marcadores prognósticos; Receptor canabinoide tipo 2.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) results from homozygosity for a mutation in the beta-globin gene that leads to numerous clinical complications due to complex pathophysiological mechanisms. The clinical phenotypes of SCA are associated with genetic modifiers, and the endocannabinoid system (ECS) may be a candidate for modulating the complications of SCA. The ECS is associated with several physiological pathways and impacts on hematopoiesis, platelet aggregation and immune responses. Therefore, this study aimed to evaluate the association of single base polymorphisms (SNPs) related to the ECS with hemolytic subphenotypes in patients with SCA, as well to verify the influence of the biochemical variables of hemolysis, fetal hemoglobin (Hb) concentration (Hb F) and the presence of alpha-thalassemia ($-\alpha^{-3.7\text{ kb}}$) on the subphenotypes isolated or associated with the polymorphisms. The groups studied consisted of (1) 73 stroke patients, (2) 80 priapism patients and (3) 144 patients designated as the control group (for priapism, 58). The SCA phenotype was initially diagnosed by HPLC, and PCR-RE confirmed it. The $\alpha^{-3.7\text{ kb}}$ thalassemia mutation was detected by GAP-PCR, and genotyping of the SNPs FAAH rs324420, MAGL rs604300, CNR1 rs7766029, and CNR2 rs35761398 was carried out using TaqMan genotyping assays. Laboratory data on total hemoglobin (Hb), indirect bilirubin (IB), total reticulocyte count, and lactate dehydrogenase (LDH) were obtained from the medical records. Lower Hb F levels were associated with stroke ($P < 0.001$), and a lower frequency of the $\alpha^{-3.7\text{ kb}}$ -thalassemia mutation was associated with priapism ($P < 0.001$). In multivariate analyses with adjustment for $\alpha^{-3.7\text{ kb}}$ -thalassemia, CNR2 rs35761398 was associated with a lower chance of developing priapism (OR = 0.386 [0.175-0.854], $P = 0.019$), independently of the $\alpha^{-3.7\text{ kb}}$ -thalassemia mutation (OR = 0.148 [0.059-0.375], $P < 0.001$) as a covariate, and there was no statistical association between SNPs and stroke. Ischemic priapism is a hemolytic subphenotype of SCA that involves unbalanced vasodilation/vasoconstriction pathways in the corpora cavernosa, such as decreased signaling involved in the RhoA/Rho-kinase (ROCK) protein vasoconstrictor pathway, resulting in relaxation of the corpora cavernosa and increased susceptibility to priapism. Since activation of the type 2 cannabinoid receptor (CB2) is involved in decreasing RhoA activation, we suggest, based on our results, that the TT-CC genotype for the CNR2 SNP analyzed results in the basal level of activation of this

receptor, playing a role in maintaining the normal RhoA/ROCK pathway and reducing the chances of developing priapism.

Keywords: Ischemic priapism; *CNR2* rs35761398; Prognostic markers; Cannabinoid receptor type 2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1 – Fisiopatologia molecular da anemia falciforme (AF)	21
Figura 2 – Principais vias de síntese e degradação da anandamida (AEA) e do 2-araquidonoilglicerol (2-AG)	24
Figura 3 - Principais vias de sinalização moduladas pela ativação dos receptores canabinoides	26

Manuscrito “Association of single nucleotide variants (SNVs) of the endocannabinoid system with sickle cell anemia hemolytic subphenotypes”

Fig. 1 Relative genotype frequencies in stroke and control groups for rs324420, rs604300, rs7766029, and rs35761398	35
Fig. 2 Relative genotype frequencies in priapism and control groups for rs324420, rs604300, rs7766029, and rs35761398	36
Fig. 3 Forest plot of multiple binary logistic regression analysis of selected SNPs and (1) priapism vs. control group and (2) stroke vs. control group	37

LISTA DE TABELAS

Manuscrito “Association of single nucleotide variants (SNVs) of the endocannabinoid system with sickle cell anemia hemolytic subphenotypes”

Table 1 - Association analysis of SCA hemolytic subphenotypes with genetics and laboratory variables 34

Table S1 – Association analysis of the SNPs overdominant models with laboratory variables 47

Table S2 – Association analysis of the SNPs dominant models with laboratory variables 47

Table S3 – Association analysis of the SNPs recessive models with laboratory variables 48

Table S4 - Association analysis of the SNPs codominant models with laboratory variables 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ^9 -THC - Delta⁹-tetrahydrocannabinol

2-AG - 2-araquidonoilglicerol

7-TM - Sete domínios transmembranares, do inglês "*Seven-transmembrane domains*"

A – Adenina

AA – Ácido araquidônico

AC – Adenilato ciclase

AEA – Anandamida

AF – Anemia falciforme

Arg – Arginina

AVE – Acidente vascular encefálico

cAMP - Monofosfato cíclico de adenosina, do inglês "*cyclic adenosine monophosphate*"

CB1 – Receptor canabinoide tipo 1, do inglês "*cannabinoid receptor type 1*"

CB2 – Receptor canabinoide tipo 2, do inglês "*cannabinoid receptor type 2*"

CBD – Canabidiol

CBRs – receptores canabinoides, do inglês "*cannabinoid receptors*"

cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina, do inglês "*cyclic gua monophosphate*"

CI – Intervalo de confiança, do inglês "*confidence interval*"

CNR1 – Gene do receptor canabinoide tipo 1

CNR2 – Gene do receptor canabinoide tipo 2

DAG – 1,2-diacil glicerol

DAGL - Diacil glicerol lipase

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos, do inglês "*damage-associated molecular patterns*"

DF – Doença falciforme

ECs – Endocanabinoides

ECS – Sistema endocanabinoide, do inglês "*endocannabinoid system*"

EMT - Transportadores endocanabinoides de membrana, do inglês "*endocannabinoid membrane transporters*"

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FAAH - Amida hidrolase de ácidos graxos, do inglês "*fatty acid amide hydrolase*"

GABA - Ácido gama-aminobutírico, do inglês "*gamma-amino butyric acid*"

Gln – Glutamina

Glu – Ácido glutâmico

GPCRs - receptores acoplados à proteína G, do inglês "*G-protein-coupled receptors*"

Hb – Hemoglobina

HBB – Gene da beta globina, do inglês "*hemoglobin subunit beta*"

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance, do inglês "*high performance liquid chromatography*"

HU – Hidroxiuréia, do inglês "*hydroxyurea*"

IB – Bilirrubina indireta, do inglês "*indirect bilirubin*"

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1, do inglês "*intercellular adhesion molecule-1*"

IL – Interleucinas

LDH – Lactato desidrogenase, do inglês "*lactate dehydrogenase*"

MAGL - lipase de monoacilglicerol, do inglês "*monoacylglycerol lipase*"

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês "*mitogen-activated protein kinase*"

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos 1, do inglês "*monocyte chemoattractant protein-1*"

NADA - Dopamina N-araquidonoil

NAEs - N-aciletanolaminas

NAPE-PLD - N-acil-fosfatidiletanolamina-específica fosfolipase D

NArPE - N-araquidonoil PE

NAT - N-acil transferase

NETs – Armadilhas extracelulares de neutrófilos, do inglês "*neutrophil extracellular traps*"

NF- κ B - Fator nuclear kappa beta, do inglês "*nuclear factor kappa beta*"

NO – óxido nítrico

OR – Razão de chances, do inglês "*odds ratio*"

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês "*polimerase chain reaction*"

PDE5 - Fosfodiesterase 5, do inglês "*phosphodiesterase type 5*"

PE – Fosfatidiletanolamina

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase, do inglês "*phosphoinositide 3-kinase*"

PKA – Proteína quinase A, do inglês "*protein kinase A*"

PKB/Akt – Proteína quinase B, do inglês “*protein kinase B*”

PKG – Proteína quinase G, do inglês “*protein kinase G*”

PLC – fosfolipase C, do inglês “*phospholipase C*”

PPARs - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, do inglês “*peroxisome proliferators-activated receptors*”

Pro – Prolina

Ret – Reticulócitos, do inglês “*reticulocytes*”

RhoA – Do inglês, “*Ras homolog family member A*”

ROCK – Rho quinase, do inglês “*Rho-kinase*”

SCA – Anemia falciforme, do inglês “*sickle cell anemia*”

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

SNPs – Polimorfismos de nucleotídeo único, do inglês “*single nucleotide polymorphisms*”

SNV – variantes de nucleotídeo único, do inglês “*single nucleotide variants*”

T – Timina

Thr – Treonina

TLR4 – Receptores do tipo toll 4, do inglês “*toll-like receptors 4*”

TNF – Fator de necrose tumoral, do inglês “*tumor necrosis factor*”

TRPV1 - Receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1, do inglês “*transient receptor potential vanilloid 1*”

Val – Valina

VCAM-1 – Molécula de adesão vascular-1, do inglês “*vascular adhesion molecule-1*”

VGCC - Canais de cálcio dependentes de voltagem, do inglês “*voltage-gated calcium channels*”

VOC – vaso-oclusão

XO – Xantina oxidase

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

γ - Gama

Δ - Delta

K - Kappa

SUMÁRIO

PREFÁCIO.....	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. ANEMIA FALCIFORME	19
1.2. SISTEMA ENDOCANABINOIDE	22
1.2.1. Endocanabinoides.....	22
1.2.2. Receptores endocanabinoides.....	24
1.2.3. Polimorfismos genéticos do sistema endocanabinoide	27
1.3. ANEMIA FALCIFORME E SISTEMA ENDOCANABINOIDE	28
2. OBJETIVOS	29
2.1. OBJETIVO GERAL.....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. ASSOCIATION OF SINGLE NUCLEOTIDE VARIANTS (SNVS) OF THE ENDOCANNABINOID SYSTEM WITH SICKLE CELL ANEMIA HEMOLYTIC SUBPHENOTYPES	30
4. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS.....	50

PREFÁCIO

A presente dissertação está sendo apresentada na forma de manuscrito a ser submetido em revista internacional indexada, intitulado “Association of single nucleotide variants (SNVs) of the endocannabinoid system with sickle cell anemia hemolytic subphenotypes”. O referido manuscrito será submetido na revista “*Annals of Hematology*”, com fator de impacto (2022) 3,5 e Qualis/CAPES – Ciências Biológicas I A3.

A introdução apresenta uma revisão da literatura sobre a fisiopatologia da anemia falciforme (AF), os componentes do sistema endocanabinoide (ECS) e seu modo de ação, e mecanismos fisiológicos relacionados à patologia da AF que podem ser modulados pelo ECS. Em sequência, apresentamos o objetivo geral e os objetivos específicos do trabalho. A metodologia, os resultados e as discussões dos dados são apresentados no manuscrito, em língua inglesa, seguindo as normas de formatação recomendadas pela revista. Por fim, descrevemos nossas conclusões.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ANEMIA FALCIFORME

A doença falciforme (DF) é a afecção monogênica hematológica mais frequente no mundo, com incidência global em 2021 de 382 a cada 100 mil nascidos vivos e prevalência de 7,74 milhões de casos ao redor do mundo. Nas últimas duas décadas, o total global de mortes por DF apresentou um aumento de 43,4%, de 262 mil em 2000 para 376 mil em 2021 (Thomson *et al.*, 2023). No Brasil, de 2015 a 2019 a incidência da DF foi estimada em 1.362 novos casos ao ano, sendo a prevalência de aproximadamente 60 mil casos e a taxa de mortalidade (somente considerando óbitos com DF como causa primária) de 0,25 a cada 100 mil óbitos (Cançado *et al.*, 2023).

A DF é caracterizada pela presença de uma hemoglobina (Hb) com características bioquímicas diferentes da Hb normal, denominada Hb S. A alteração gênica é proveniente de uma troca de adenina (A) por timina (T) na posição 20 do gene da beta-globina (*HBB*), levando à troca de ácido glutâmico (Glu) por valina (Val) na sexta posição da cadeia beta(β)-globínica (*HBB*; β^S GAG→GTG; glu6val). A presença do alelo mutante (β^S) em homozigose resulta na anemia falciforme (AF), e a heterozigose composta com outras mutações no gene *HBB* resulta em diferentes fenótipos que juntos com a AF formam o grupo da DF (Kato *et al.*, 2018; Ware *et al.*, 2017).

A fisiopatologia da AF é complexa e envolve várias alterações moleculares, celulares e bioquímicas. A polimerização da Hb S é o principal evento que caracteriza a patogênese molecular da AF, dando início a uma série de mecanismos que se retroalimentam. Quando em condição de hipóxia, os tetrâmeros de Hb S expõem seus resíduos hidrofóbicos de valina e formam polímeros rígidos, deformando e danificando a membrana e o citoesqueleto dos eritrócitos. A polimerização é reversível, uma vez que as fibras se desfazem na presença de oxigênio e o eritrócito retorna ao formato discoide. No entanto, ciclos de falcização levam a danos repetidos na membrana, resultando em eritrócitos irreversivelmente falciformes e hemólise intra- e extravascular. A hemólise e a falcização eritrocitária geram consequências significativas, como a disfunção do endotélio vascular, a vasculopatia e a vaso-oclusão (Barabino; Platt; Kaul, 2010; Kato; Steinberg; Gladwin, 2017; Williams; Thein, 2018; Sundd; Gladwin; Novelli, 2019).

A hemólise intravascular resulta na liberação do conteúdo intraeritrocitário nos vasos sanguíneos, aumentando a concentração de Hb livre, grupo heme e de espécies reativas de oxigênio (ERO), como os radicais hidroxila ($\text{HO}\bullet$) e superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), que depletam o óxido nítrico (NO) e formam outros oxidantes potentes, tais como o peroxinitrito (ONOO^-) e dióxido de nitrogênio (NO_2) (Voskou *et al.*, 2015). A hemólise também libera a arginase -1, que por sua vez, metaboliza o mesmo substrato que a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) utiliza para a produção de NO, a L-arginina. A diminuição de NO e o aumento de ERO contribuem para a vasoconstrição, vasculopatia, ativação de moléculas de adesão endotelial e na produção de vasoconstritores potentes (Nader *et al.*, 2021).

Os leucócitos, em resposta a esses eventos, aumentam a expressão de mediadores inflamatórios, tais como interleucina (IL) - 6, IL-1 β , IL-8 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), após ativação da via de sinalização do fator nuclear kappa beta (NF- κ B) por meio da interação do grupo heme e de outras moléculas de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que ativam o sistema imune inato via receptores do tipo toll 4 (TLR4) (Zhang *et al.*, 2016; Allali *et al.*, 2020; Vona *et al.*, 2021). Tais consequências promovem estado inflamatório, ativação endotelial com a exposição de proteínas de adesão (molécula de adesão intercelular-1 - ICAM-1, molécula de adesão vascular 1 - VCAM-1, P-selectina e E-selectina), recrutamento e adesão de plaquetas e outros leucócitos e disfunção endotelial (Nader *et al.*, 2021; Wang; Zennadi, 2021). A consequência dos eventos hemolíticos reflete em processos de interação dinâmica entre eritrócitos falciformes e o endotélio vascular aprisionando eritrócitos, leucócitos e plaquetas na microcirculação levando a obstrução vascular e isquemia tecidual, chamado de vaso-oclusão (VOC) (Figura 1) (Williams; Thein, 2018; Sundd; Gladwin; Novelli, 2019).

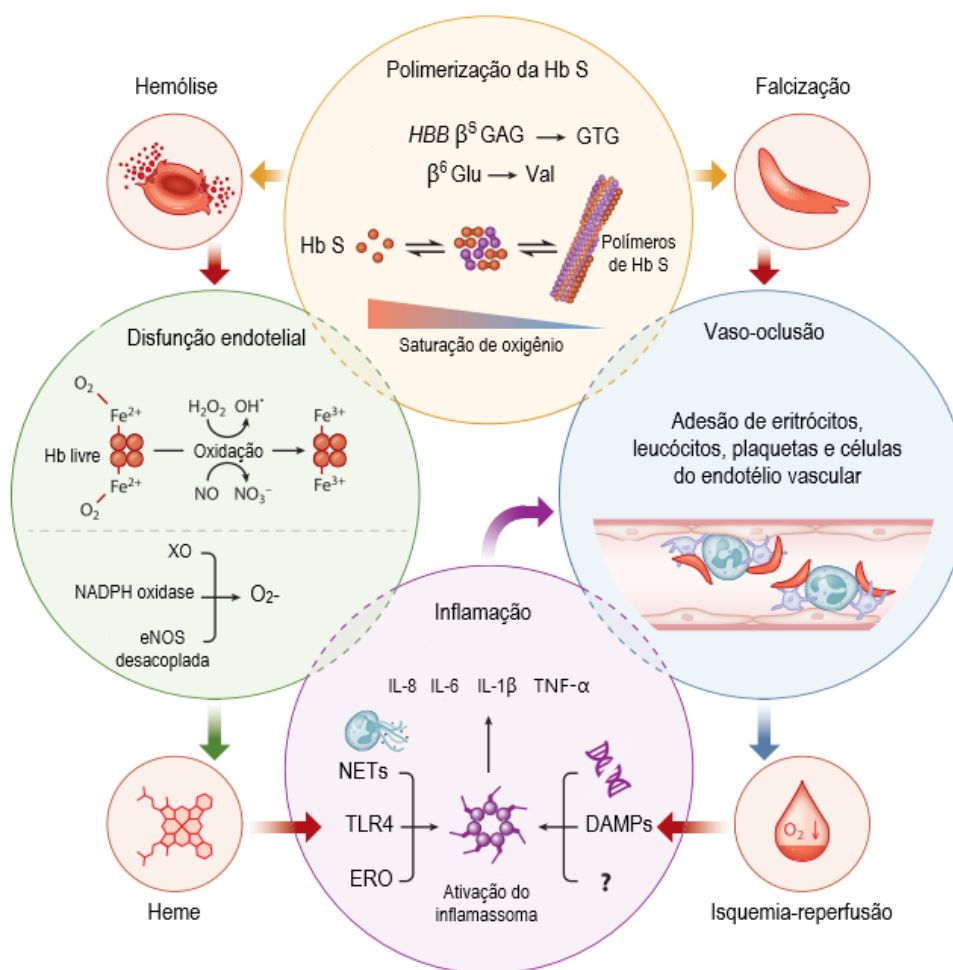


Figura 1. Fisiopatologia molecular da anemia falciforme (AF). A mutação no gene *HBB* ocasiona a substituição de um ácido glutâmico por uma valina na sexta posição da cadeia β globínica, resultando na formação da Hb S. Os rígidos polímeros de Hb S formados em hipóxia levam à falcização do eritrócito, com consequente formação de agregados de eritrócitos falcêmicos, leucócitos, plaquetas e células endoteliais, obstruindo o fluxo sanguíneo. Esse evento é referido como vaso-oclusão (VOC), o qual promove a lesão por isquemia-reperfusão. Os polímeros de Hb S também ocasionam a hemólise, a qual libera Hb na circulação sanguínea. A Hb livre promove disfunção endotelial por depletar o NO, formando EROs, e liberar o grupo heme, o qual juntamente com outras DAMPs ativam o inflamassoma. EROs são também produzidas pelas enzimas NADPH oxidase, XO e eNOS desacoplada. Por fim, o inflamassoma ativado por ERO, TLR4 e NETs (formadas por neutrófilos ativados), leva à produção de interleucinas e citocinas pró-inflamatórias. Os eventos são retroalimentados e constituem a complexa fisiopatologia da AF. DAMPs – padrões moleculares associados a dano; eNOS – óxido nítrico sintase endotelial; ERO – espécie reativa de oxigênio; Glu – ácido glutâmico; Hb – hemoglobina; *HBB* – gene da beta globina; IL – interleucina; NETs – armadilhas extracelulares de neutrófilos; NO – óxido nítrico; TLR4 – receptores tipo toll 4; TNF – fator de necrose tumoral; Val – valina; XO – xantina oxidase. Fonte: (Adaptado de Sundd; Gladwin; Novelli, 2019).

Como mencionado, a base molecular para a formação da Hb S é conhecida, mas somente esse mecanismo não é suficiente para explicar toda a diversidade fenotípica e a gravidade clínica variável encontrada nas pessoas com AF. Neste sentido, vários estudos têm sido propostos para a identificação de moduladores genéticos e bioquímicos a fim de relacioná-los com os mecanismos fisiopatológicos, estabelecer prognósticos mais precisos e, também, orientar o desenvolvimento de terapias mais específicas e eficazes (Belini-Júnior *et al.*, 2015; Habara; Steinberg, 2016; Pincez *et al.*, 2022).

1.2. SISTEMA ENDOCANABINOIDE

Os componentes químicos da *Cannabis sativa* L. começaram a ser identificados nas décadas de 50 e 60, sendo o canabidiol (CBD) e o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) os primeiros a serem quimicamente caracterizados (Loewe, 1950; Mechoulam; Shvo, 1963; Gaoni; Mechoulam, 1964). Na década de 90, os receptores canabinoides tipo 1 e tipo 2 (CB1 e CB2) foram identificados como alvos do Δ^9 -THC (Matsuda *et al.*, 1990; Munro; Thomas; Abu-Shaar, 1993). A partir da identificação do CB1 e do CB2, foram isolados e caracterizados ligantes endógenos desses receptores - os quais foram denominados endocanabinoides (ECs) - e as principais enzimas responsáveis pela biossíntese e degradação desses compostos (Devane *et al.*, 1992; Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995; Di Marzo & Fontana, 1995; Okamoto *et al.*, 2004). O sistema de sinalização composto pelos ECs, seus dois principais receptores e enzimas responsáveis pelo seu metabolismo foi denominado sistema endocanabinoide (ECS), o qual está envolvido em diversos aspectos – se não todos - da fisiologia de mamíferos (Ligresti; De Petrocellis; Di Marzo, 2016).

1.2.1. Endocanabinoides

Os ECs são lipídeos de sinalização endógenos, derivados de ácidos graxos e capazes de ativar os receptores canabinoides. Há ao menos 15 ECs com ligação ortostérica ou alostérica aos receptores CB1 e CB2, sendo exemplos ortostéricos o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), a etanolamina N-araquidonoil (anandamida - AEA), a etanolamina O-araquidonoil (virandamida), a oleamida, a dopamina N-araquidonoil (NADA) e o éter glicerol 2-araquidonoil (noladina) (Pertwee, 2015); e exemplos alostéricos a lipoxina A4 (Pamplona *et al.*, 2012) e o pepcan-12 (Petrucci *et al.*, 2017).

Os ECs são considerados transmissores atípicos por não serem estocados em vesículas e por atuarem a partir de um mecanismo de sinalização retrógrado, sendo sintetizados sob demanda no neurônio pós-sináptico e liberados imediatamente após sua síntese, ligando-se a receptores do neurônio pré-sináptico (Giacobbe *et al.*, 2021).

A síntese e a degradação dos ECs envolvem diferentes enzimas, sendo as vias do metabolismo da AEA e do 2-AG as mais estudadas. A AEA pertence ao grupo das N-aciletanolaminas (NAEs), e sua biossíntese inicia-se com a ligação de ácido araquidônico (AA) e fosfatidiletanolamina (PE), catalisada por uma N-acil transferase (NAT), formando o N-araquidonoil PE (NArPE). A enzima N-acil-fosfatidiletanolamina-específica fosfolipase D (NAPE-PLD) converte o NArPE em AEA (Biringer, 2021). A principal via de síntese do 2-AG, por sua vez, inicia-se a partir da degradação de fosfolipídeos de membrana pela enzima fosfolipase C (PLC), formando o 1,2-diácil glicerol (DAG). O DAG é então convertido em 2-AG a partir da enzima diácil glicerol lipase (DAGL) (Murataeva; Straiker; Mackie, 2014; Rezende *et al.*, 2023). Após serem liberados na fenda sináptica e interagirem com os receptores canabinoides (ou outros receptores), os ECs são reabsorvidos pelas células por um mecanismo envolvendo transportadores endocanabinoides de membrana (EMT), seguido por degradação intracelular. As principais enzimas envolvidas na hidrólise intracelular da AEA e do 2-AG são a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e a lipase de monoacilglicerol (MAGL), respectivamente (Rezende *et al.*, 2023) (Figura 2).

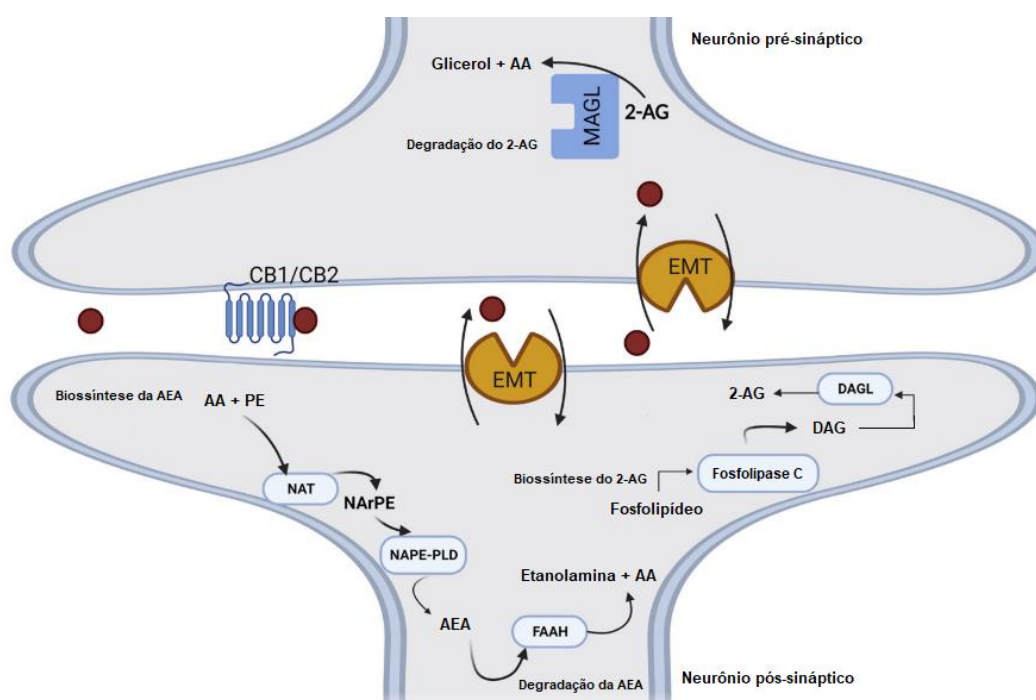


Figura 2. Principais vias de síntese e degradação da anandamida (AEA) e do 2-araquidonoilglicerol (2-AG). AA – ácido araquidônico; AEA – anandamida; 2-AG – 2-araquidonoilglicerol; DAG - 1,2-diacil glicerol; DAGL - diacil glicerol lipase; EMT – transportadores endocanabinoides de membrana; FAAH - amida hidrolase de ácidos graxos; MAGL - lipase de monoacilglicerol; NAPE-PLD - N-acil-fosfatidiletanolamina-específica fosfolipase D; NArPE - N-araquidonoil fosfatidiletanolamina; NAT - N-acil transferase; PE – fosfatidiletanolamina. Fonte: (Adaptado de Rezende *et al.*, 2023).

1.2.2. Receptores endocanabinoides

Os dois receptores clássicos do ECS são o CB1 e o CB2, os quais compartilham 44% de homologia entre si (Munro, Thomas, Abu-Shaar, 1993). Ambos são receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e membros da superfamília de receptores de 7 domínios transmembranares (7-TM), com um domínio amino-terminal extracelular, 7 domínios transmembranares hidrofóbicos, três *loops* extracelulares e três intracelulares e 1 domínio carboxi-terminal intracelular. (Sharma *et al.*, 2021). O CB1 é altamente conservado entre humanos e outras espécies (97% de homologia com ratos e camundongos), e também encontrado em alguns invertebrados deuterostômios. O CB2, por sua vez, apresenta menor homologia; CB2 de humanos e camundongos, por exemplo, compartilham somente 82% da sequência de aminoácidos (Howlett; Abood, 2017).

O CB1 é, possivelmente, o GPCR mais abundante no cérebro de mamíferos e é amplamente encontrado no sistema nervoso central (SNC), com as maiores concentrações em regiões responsáveis por processos fisiológicos e mentais, como hipocampo, córtex cerebral, cerebelo, gânglio basal, hipotálamo e amígdala (Zou & Kumar, 2018; Sharma *et al.*, 2021). Sua expressão em terminais pré-sinápticos sugere seu mecanismo de sinalização retrógrado, inibindo a liberação de neurotransmissores como norepinefrina, dopamina, acetilcolina, glutamato, e ácido γ -aminobutírico (GABA). O CB1 é também expresso por astrócitos, oligodendrócitos e em células da micróglia, ainda que em menor concentração em comparação a neurônios, e no sistema nervoso periférico (SNP) é altamente expresso por terminais nervosos simpáticos (Rezende *et al.*, 2023). Além dos SNC e SNP, o CB1 é encontrado (em menor concentração) no fígado, no trato gastrointestinal, no sistema cardiovascular, no endotélio vascular, na musculatura lisa e esquelética, no sistema imune e outros órgãos e tecidos (Zou & Kumar, 2018). O CB2 é principalmente expresso por órgãos

e células do sistema imune, como baço, tonsilas, timo, medula óssea, monócitos, macrófagos, mastócitos e linfócitos T e B. Nas células do sistema imune, o CB2 modula a ativação e migração das mesmas e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Iannotti; Di Marzo; Petrosino, 2016). Em concentrações bem menores em relação ao CB1, é encontrado também em neurônios do SNC e SNP e em células ativadas da micróglia (Di Marzo, 2018).

A ativação dos receptores canabinoides inicia uma via de sinalização que envolve, principalmente, a ligação do receptor às proteínas inibitórias Gi e Go (Gi/o), resultando na dissociação de seus heterodímeros e liberação das suas subunidades α e $\beta\gamma$ (Lu *et al.*, 2018). A subunidade $G_i\alpha$ inibe a atividade da enzima adenilato ciclase (AC) e, consequentemente, diminui os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (Lu *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2021). A redução de cAMP afeta a ativação da proteína quinase A (PKA), a qual está associada a várias vias de sinalização relacionadas à proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Iannotti; Di Marzo; Petrosino, 2016; Rezende *et al.*, 2023). A subunidade $\beta\gamma$ estimula as vias da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (PKB/Akt) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), envolvidas em processos de proliferação, sobrevivência e morte celular (Lu *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2021). Além disso, a ativação dos receptores canabinoides é capaz de suprimir o influxo de cálcio (Ca^{2+}) para as células através da inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCC) (Zou; Kumar, 2018) (Figura 3).

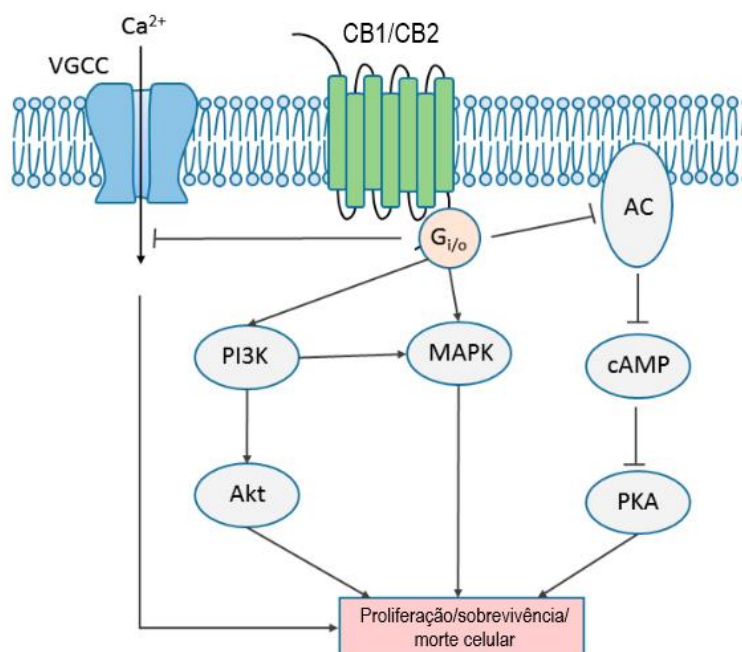


Figura 3. Principais vias de sinalização moduladas pela ativação dos receptores canabinoides.

AC – adenilato ciclase; Akt – proteína quinase B; cAMP - monofosfato cíclico de adenosina; CB1 – receptor canabinoide 1; CB2 – receptor canabinoide 2; MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno; PI3K - fosfatidilinositol-3-quinase; PKA – proteína quinase A; VGCC - canais de cálcio dependentes de voltagem. Fonte: (Adaptado de Zou; Kumar, 2018).

Além do CB1 e do CB2, outros GPCRs foram considerados possíveis receptores canabinoides; no entanto, até o momento somente os receptores GPR55 e GPR18 são alvos evidentes de uma ampla gama de ligantes canabinoides. O GPR55 apresenta baixa homologia de sequência com os receptores CB1 e CB2 (13% e 14%, respectivamente) e é amplamente expresso no cérebro e no SNP, coexistindo com esses receptores em vários tecidos. O GPR18 também apresenta baixa homologia com os receptores clássicos (13% com CB1 e 8% com CB2), sendo expresso principalmente em tecidos linfoides (Morales; Reggio, 2017). O receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1) e outros cinco da superfamília dos receptores de potencial transitório (TRP) são também modulados por canabinoides e constituem os chamados “receptores canabinoides ionotrópicos” (Di Marzo; De Petrocellis, 2010; Muller; Morales; Reggio, 2019). Por fim, os canabinoides são também capazes de ativar os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), especialmente as isoformas α e γ , modulando respostas metabólicas, anti-inflamatórias e neuroprotetivas (Ianotti; Vitale, 2021). A capacidade de interagir com diversos receptores em diferentes tipos celulares confere aos canabinoides,

especialmente aos ECs, um efeito pleiotrópico, atuando em diversas vias fisiológicas e estados patológicos (Ligresti; De Petrocellis; Di Marzo, 2016).

1.2.3. Polimorfismos genéticos do sistema endocanabinoide

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) envolvidos em genes que codificam receptores canabinoides e enzimas que catabolizam os ECs podem alterar o padrão de sinalização e a metabolização dessas moléculas, possivelmente interferindo em diversas vias celulares e processos fisiopatológicos de diversas doenças. A função de SNPs relacionados ao gene *CNR1*, responsável por codificar o receptor CB1, bem como seus efeitos na expressão gênica e na atividade do receptor ainda não foram totalmente elucidados. Possivelmente, os SNPs envolvidos nesse gene, como o rs7766029, poderiam estar relacionados a uma diminuição na estabilidade do mRNA transcrito e, portanto, contribuiriam para uma redução da expressão de CB1 e sinalização de ECs que interagem com esse receptor (Domschke *et al.*, 2008; Gonda *et al.*, 2019). O SNP rs35761398 do gene *CNR2*, o qual codifica o receptor CB2, é responsável por uma substituição de uma arginina (Arg) por glutamina (Gln) na posição 63 da cadeia polipeptídica (Arg63>Gln) e afeta a resposta do CB2 aos ECs, interferindo na sinalização dessas moléculas e em processos associados, como a modulação do sistema imune (Carrasquer *et al.*, 2010).

O SNP rs324420 do gene *FAAH*, que codifica a enzima responsável pela hidrólise da AEA, resulta em uma mutação *missense* na posição 385 do gene (385C>A) que converte um resíduo conservado de prolina (Pro) em uma treonina (Thr) (Pro129>Thr), produzindo uma enzima com propriedades catalíticas normais, porém mais suscetível à degradação proteolítica (Sipe *et al.*, 2002). O genótipo A/A desse SNP é associado a um aumento da sinalização da AEA (Conzelmann *et al.*, 2012) e a níveis reduzidos de FAAH quando comparado ao genótipo C/C (Chiang *et al.*, 2004). O SNP rs604300, relacionado à MAGL, enzima responsável pela hidrólise do 2-AG, reside em uma região intrônica do gene *MAGL* próximo a uma sequência acentuadora da expressão do gene regulada por modificações epigenéticas relacionadas às histonas. Há evidências que a regulação epigenética nessa região pode exercer papel na transcrição do gene, produzindo níveis diferenciais de MAGL e influenciando na metabolização do 2-AG (Carey *et al.*, 2015).

1.3. ANEMIA FALCIFORME E SISTEMA ENDOCANABINOIDE

Na busca de novas perspectivas sobre a fisiopatologia e terapias na AF, o ECS pode apresentar avanços promissores por ter demonstrado papel importante na atuação em várias vias bioquímicas e fisiológicas envolvidas na patologia da doença. Em cultura de células endoteliais da artéria coronária humana, agonistas sintéticos do CB2 diminuíram a expressão de proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) induzida por TNF- α , a ativação de NF- κ B e a adesão e migração transendotelial de monócitos. No mesmo estudo, a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 induzida por TNF- α foi atenuada, e em camundongos a adesão de monócitos ao endotélio aórtico foi mitigada (Rajesh *et al.*, 2013). A diminuição da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina e E-selectina) mediada pela ativação de CB1/CB2 já havia sido demonstrada em modelo animal de aterosclerose (Zhao *et al.*, 2010); assim como a quimiotaxia de macrófagos murinos para sítios de inflamação, modulada por CB2 (Raborn *et al.*, 2008). O tratamento com um agonista de CB1/CB2 (CP55,940) reduziu a ativação de mastócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-6, TNF- α e MCP-1), bem como preveniu a falcização dos eritrócitos induzida por hipóxia em camundongos falcêmicos (Vicent *et al.*, 2016).

Em relação aos ECs, há evidências de que a AEA participa na estimulação da hematopoiese e tem papel na sobrevivência e fisiologia eritrocitária, além de diminuir a resposta inflamatória de macrófagos e células tronco mesenquimais (Bentzen; Lang, 2007; Gasperi *et al.*, 2015; Ruhl *et al.*, 2021). Tanto a AEA quanto o 2-AG são capazes de interagir com plaquetas, mas somente o 2-AG é um agonista verdadeiro de plaquetas humanas. Há evidências, no entanto, de que a AEA é capaz de prolongar o tempo de vida de plaquetas, reduzir sua agregação e de estimular a atividade da eNOS, aumentando a produção de NO e, conseqüentemente, a sobrevivência plaquetária (De Angelis *et al.*, 2014; Gasperi *et al.*, 2015). O 2-AG, em contrapartida, leva à ativação e à agregação plaquetária (Gasperi *et al.*, 2015).

Portanto, a relação entre os mecanismos fisiopatológicos da AF e o ECS fundamenta a importância de estudos nesta área, contribuindo com a expansão da compreensão do impacto dos ECs em vias de interesse para potenciais terapias na AF, bem como no entendimento da influência de variantes genéticas desse complexo sistema em subfenótipos da doença.

4. CONCLUSÕES

- O presente estudo forneceu, pela primeira vez, uma associação entre polimorfismos do sistema endocanabinoide (ECS) e a anemia falciforme (AF);
- Os polimorfismos analisados (*FAAH* rs324420, *MAGL* rs604300, *CNR1* rs7766029, e *CNR2* rs35761398) não foram bons preditores para o desenvolvimento de acidente vascular encefálico (AVE); no entanto, há evidências crescentes de que tais genes do ECS são bons candidatos à modulação da AF;
- O genótipo TT-CC do polimorfismo *CNR2* rs35761398 conferiu efeito protetor ao desenvolvimento de priapismo, e, portanto, sugerimos uma nova abordagem na fisiopatologia desse subfenótipo da AF envolvendo o receptor canabinoide tipo 2 (CB2);
- Nossos dados devem ser considerados com cautela, uma vez que consequências funcionais do polimorfismo *CNR2* rs35761398 na atividade do CB2 ainda precisam ser completamente estabelecidas.

REFERÊNCIAS

ALLALI, S. et al. Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. *Haematologica*, v. 105, n. 2, p. 273-283, 9 jan. 2020. Ferrata Storti Foundation (Haematologica). <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2019.229989>.

BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle Cell Biomechanics. **Annual Review Of Biomedical Engineering**, v. 12, n. 1, p. 345-367, jul. 2010. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-bioeng-070909-105339>.

BELINI-JUNIOR, E. et al. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: severity scores and feasibility of the bayesian network model use. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, v. 54, n. 4, p. 321-327, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmed.2015.01.011>.

BENTZEN, P. J.; LANG, F. Effect of Anandamide on Erythrocyte Survival. **Cellular Physiology And Biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 1033-1042, 2007. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000110714>.

BIRINGER, R. G. The rise and fall of anandamide: processes that control synthesis, degradation, and storage. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 476, n. 7, p. 2753-2775, 13 mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-021-04121-5>.

CANÇADO, R. D. et al. Estimated mortality rates of individuals with sickle cell disease in Brazil: real-world evidence. **Blood Advances**, v. 7, n. 15, p. 3783-3792, 26 jul. 2023. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008938>.

CAREY, C. E. et al. Monoacylglycerol lipase (MGLL) polymorphism rs604300 interacts with childhood adversity to predict cannabis dependence symptoms and amygdala habituation: evidence from an endocannabinoid system-level analysis. **Journal Of Abnormal Psychology**, v. 124, n. 4, p. 860-877, nov. 2015. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/abn0000079>.

CARRASQUER, A. et al. Functional consequences of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the CB2 cannabinoid receptor. **Pharmacogenetics And Genomics**, v. 20, n. 3, p. 157-166, mar. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/fpc.0b013e3283367c6b>.

CHIANG, K. P. et al. Reduced cellular expression and activity of the P129T mutant of human fatty acid amide hydrolase: evidence for a link between defects in the endocannabinoid system and problem drug use. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 18, p. 2113-2119, 21 jul. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddh216>.

CONZELMANN, A. et al. A polymorphism in the gene of the endocannabinoid-degrading enzyme FAAH (FAAH C385A) is associated with emotional–motivational reactivity. **Psychopharmacology**, v. 224, n. 4, p. 573-579, 10 jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-012-2785-y>.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 18 dez. 1992. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1470919>.

DE ANGELIS, V. et al. Endocannabinoids Control Platelet Activation and Limit Aggregate Formation under Flow. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. 108282-1, 29 set. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0108282>.

DI MARZO, V. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 9, p. 623-639, 17 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2018.115>.

DI MARZO, V.; FONTANA, A. Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'. **Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids**, v. 53, n. 1, p. 1-11, jul. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0952-3278\(95\)90077-2](http://dx.doi.org/10.1016/0952-3278(95)90077-2).

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L. Endocannabinoids as Regulators of Transient Receptor Potential (TRP) Channels: a further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 1430-1449, 1 mai. 2010. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/092986710790980078>.

DOMSCHKE, K. et al. Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 10, p. 751-759, out. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.05.003>.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, p. 1646-1647, 20 abr. 1964.

GASPERI, V. et al. 2-Arachidonoylglycerol modulates human endothelial cell/leukocyte interactions by controlling selectin expression through CB1 and CB2 receptors. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 51, p. 79-88, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.028>.

GIACOBBE, J. et al. A systematic, integrative review of the effects of the endocannabinoid system on inflammation and neurogenesis in animal models of affective disorders. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 93, p. 353-367, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.024>.

GONDA, X. et al. Effects of Different Stressors Are Modulated by Different Neurobiological Systems: the role of gaba-a versus cb1 receptor gene variants in anxiety and depression. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, v. 13, 9 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2019.00138>.

HABARA, A.; STEINBERG, M. H. Minireview: genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental Biology And Medicine**, v. 241, n. 7, p. 689-696, 1 mar. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1535370216636726>.

HOWLETT, A. C.; ABOOD, M. E. CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. In: KENDALL, David; ALEXANDER, Stephen. **Cannabinoid Pharmacology**. Academic Press, 2017. Cap. 5. p. 169-206. (Advances in Pharmacology). <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.007>.

IANNOTTI, F. A.; DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: targets, metabolism and role in neurological disorders. **Progress In Lipid Research**, v. 62, p. 107-128, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2016.02.002>.

IANNOTTI, F. A.; VITALE, R. M. The Endocannabinoid System and PPARs: focus on their signalling crosstalk, action and transcriptional regulation. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 586, 7 mar. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10030586>.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-22, 15 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <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**, v. 127, n. 3, p. 750-760, 1 mar. 2017. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci89741>.

LIGRESTI, A.; DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: pleiotropic physiological and pathological roles through complex pharmacology. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1593-1659, out. 2016. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00002.2016>.

LU, D. et al. Translational potential of allosteric modulators targeting the cannabinoid CB1 receptor. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 324-335, 17 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-018-0164-x>.

LOEWE S. Active principals of the cannabis and the pharmacology of the cannabinoids. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 211, n. 2, p. 175–193, 1950.

MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-564, 9 ago. 1990. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/346561a0>.

MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50,

n. 1, p. 83-90, jun. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-d](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-d).

MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish-I: The structure of Cannabidiol. **Tetrahedron**, v. 19, n. 12, p. 2073-2078, jan. 1963. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(63\)85022-x](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(63)85022-x).

MORALES, P.; REGGIO, P. H. An Update on Non-CB1, Non-CB2 Cannabinoid Related G-Protein-Coupled Receptors. **Cannabis And Cannabinoid Research**, v. 2, n. 1, p. 265-273, jan. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/can.2017.0036>.

MULLER, C.; MORALES, P.; REGGIO, P. H. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 1-15, 15 jan. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2018.00487>.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-65, set. 1993. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/365061a0>.

MURATAEVA, N.; STRAIKER A.; MACKIE, K. Parsing the players: 2: arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. **British Journal Of Pharmacology**, v. 171, n. 6, p. 1379-1391, mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12411>.

NADER, E. et al. Vasculopathy in Sickel Cell Disease: from red blood cell sickling to vascular dysfunction. **Comprehensive Physiology**, p. 1785-1803, abr. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c200024>.

OKAMOTO, Y. et al. Molecular Characterization of a Phospholipase D Generating Anandamide and Its Congeners. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 279, n. 7, p. 5298-5305, fev. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m306642200>.

PAMPLONA, F. A. et al. Anti-inflammatory lipoxin A 4 is an endogenous allosteric enhancer of CB 1 cannabinoid receptor. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 109, n. 51, p. 21134-21139, 12 nov. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1202906109>.

PERTWEE, R. G. Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. Handbook Of Experimental Pharmacology, p. 1-37, 2015. **Springer International Publishing**. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_1.

PETRUCCI, V. et al. Pepcan-12 (RVD-hemopressin) is a CB2 receptor positive allosteric modulator constitutively secreted by adrenals and in liver upon tissue damage. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 25 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09808-8>.

PINCEZ, T. et al. Genetic Modifiers of Sickel Cell Disease. **Hematology/Oncology Clinics Of North America**, v. 36, n. 6, p. 1097-1124, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2022.06.006>.

RABORN, E. S. et al. The Cannabinoid Delta-9-tetrahydrocannabinol Mediates Inhibition of Macrophage Chemotaxis to RANTES/CCL5: linkage to the cb2 receptor. **Journal Of Neuroimmune Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 117-129, 11 jul. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11481-007-9077-z>.

RAJESH, M. et al. CB2-receptor stimulation attenuates TNF- α -induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, v. 293, n. 4, p. 2210-2218, out. 2007. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00688.2007>.

REZENDE, B. et al. Endocannabinoid System: chemical characteristics and biological activity. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 2, p. 148, 19 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph16020148>.

RUHL, T. et al. The immunosuppressive effect of the endocannabinoid system on the inflammatory phenotypes of macrophages and mesenchymal stromal cells: a comparative study. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 1, p. 143-153, 7 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s43440-020-00166-3>.

SHARMA, D. S. et al. Endocannabinoid system: role in blood cell development, neuroimmune interactions and associated disorders. **Journal Of Neuroimmunology**, v. 353, p. 577501, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2021.577501>.

SIPE, J. C. et al. A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 99, n. 12, p. 8394-8399, 11 jun. 2002. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.082235799>.

SUNDD, P. et al. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 263-292, 24 jan. 2019. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838>.

SUGIURA, T. et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 215, n. 1, p. 89-97, out. 1995. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>.

THOMSON, A. M. et al. Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000–2021: a systematic analysis from the global burden of disease study 2021. **The Lancet Haematology**, v. 10, n. 8, p. 585-599, ago. 2023. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3026\(23\)00118-7](http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3026(23)00118-7).

VINCENT, L. et al. Cannabinoid receptor-specific mechanisms to alleviate pain in sickle cell anemia via inhibition of mast cell activation and neurogenic inflammation. **Haematologica**, v. 101, n. 5, p. 566-577, 24 dez. 2015. Ferrata Storti Foundation (Haematologica). <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2015.136523>.

VONA, R. et al. Sickel Cell Disease: role of oxidative stress and antioxidant therapy. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 296, 16 fev. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10020296>.

VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. **Redox Biology**, v. 6, p. 226-239, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.018>.

WANG, Q.; ZENNADI, R. The Role of RBC Oxidative Stress in Sickel Cell Disease: from the molecular basis to pathologic implications. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1608, 13 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10101608>.

WARE, R. E. et al. Sickel cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311-323, jul. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30193-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30193-9).

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

ZHANG, D. et al. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 801-809, 18 fev. 2016. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-09-618538>.

ZHAO, Y. et al. Activation of Cannabinoid CB2 Receptor Ameliorates Atherosclerosis Associated With Suppression of Adhesion Molecules. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 292-298, mar. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/fjc.0b013e3181d2644d>.

ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: signaling and function in the central nervous system. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 833, 13 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030833>.