

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

BRISA MACHADO PEREIRA

**PERFIS HEMATOLÓGICO, LIPÍDICO E INFLAMATÓRIO E ANÁLISES COM O
POLIMORFISMO RS3918226 DO GENE *NOS3* NA ANEMIA FALCIFORME.**

Governador Valadares – Minas Gerais

2019

BRISA MACHADO PEREIRA

**PERFIS HEMATOLÓGICO, LIPÍDICO E INFLAMATÓRIO E ANÁLISES COM O
POLIMORFISMO RS3918226 DO GENE *NOS3* NA ANEMIA FALCIFORME.**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado no formato de artigo ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.
Orientadora: Prof^a Dr^a Cibele Velloso Rodrigues.

Governador Valadares – Minas Gerais

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PEREIRA, Brisa Machado Pereira.

PERFIS HEMATOLÓGICO, LIPÍDICO E INFLAMATÓRIO E ANÁLISES COM O POLIMORFISMO RS3918226 DO GENE NOS3 NA ANEMIA FALCIFORME. / Brisa Machado Pereira PEREIRA. -- 2019.

45 p.

Orientadora: Cibele Velloso Rodrigues VELLOSO-RODRIGUES
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV, 2019.

1. anemia falciforme. 2. inflamação. 3. lipídios. 4. polimorfismo. 5. gene NOS3. I. VELLOSO-RODRIGUES, Cibele Velloso Rodrigues, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tornar tudo possível, pois se hoje completo mais uma etapa da minha vida, foi tudo graças a Ele com sua bondade e infinita misericórdia. Sou grata a toda força, coragem e determinação que Ele me forneceu para enfrentar as batalhas diárias.

Agradeço imensamente aos meus pais, Elizete e Antônio por todo amor, cuidado, zelo, incentivo e apoio. Eles sempre estiveram presentes e nunca mediram esforços para que tudo isso fosse possível, graças a seus ensinamentos consegui me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Aos meus irmãos, Santiago e Serena por todo amor e carinho.

As amizades que aqui estabeleci e o quanto foram importantes em minha vida. Em especial as amigas e companheiras de curso, Keilla, Brendha, Larissa e Fernanda, as quais tornaram meus dias mais leves, dividiram todos os momentos bons e os sufocos que por aqui passei. Guardo também muito carinho pela Natália e Cris as quais foram minha segunda família aqui em GV. As amigas, Bruna e Marluce que mesmo distantes estiveram sempre presentes dando apoio, incentivo e vibrando a cada conquista.

A minha orientadora, Cibele, por me receber em 2015 em seu grupo de pesquisa, obrigada pela oportunidade, conhecimento e experiência compartilhada. Assim como todo Núcleo de Apoio e Orientação em Genética e Nutrição, especialmente a Thaísa e Nilcemar.

À Universidade Federal de Juiz de Fora campus GV, por ter me concedido um ensino de excelência e me proporcionado diversas oportunidades durante a graduação. Aos professores e técnicos e profissionais da saúde envolvidos em minha formação.

E a todos que de alguma forma, me ajudaram a chegar até aqui.

RESUMO

Introdução: A anemia falciforme (AF) hemoglobinopatia hereditária em homozigose do alelo S (p.Glu6Val) no gene *HBB* é caracterizada por eritrócitos falcizados, hemólise, inflamação e vaso-occlusão acarretando manifestações fisiopatológicas. **Objetivo:** Avaliar os perfis hematológico, lipídico e inflamatório, influência da hidroxiureia e do polimorfismo rs3918226 do gene *NOS3* em indivíduos com anemia falciforme. **Métodos:** Foram coletados dados dos prontuários, exames bioquímicos e genotipagens do polimorfismo rs3918226 do gene *NOS3*. Verificaram-se relações entre as variáveis laboratoriais e genéticas pelos testes de T de Student e de Mann Whitney com significância $P < 0,05$. **Resultados:** A população foi de 126 indivíduos com AF, idade média de 11,90 anos e 71 (56,3%) em terapia de Hidroxiuréia (HU). HDL-C baixo (< 40 mg/dL) foi observado em 80% dos indivíduos. Parâmetros lipídicos apresentaram maiores médias em meninas. Nos pacientes que usavam HU as médias dos parâmetros hematológicos, exceto leucócitos totais, e lipídios estavam maiores e os níveis de bilirrubinas e LDH estavam menores. Os genótipos do SNP rs3918226 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg com frequência do alelo de risco T de 0,05. Os níveis de ferro e ferritina nos participantes do sexo feminino de genótipo CT estavam reduzidos e os níveis de plaquetas aumentados. A baixa expressão de *NOS3* provavelmente induzida pela presença do alelo T no genótipo leva a baixa disponibilidade do NO e isso poderia refletir nos níveis desses parâmetros. Pacientes de genótipo CT que faziam uso de HU mostraram que apenas a contagem de reticulócitos estava menor que os de genótipo CC. **Conclusão:** Nós observamos que significativa proporção dos pacientes com AF apresentou dislipidemia caracterizada pelos baixos níveis de HDL-C, o uso de hidroxiureia diminuiu os marcadores de hemólise e de inflamação e que nas meninas de genótipo CT de rs3918226/*NOS3* havia menores níveis de ferritina e maior contagem de plaquetas.

Palavras-chave: anemia falciforme; inflamação; lipídios; polimorfismo; gene *NOS3*.

ABSTRACT

Introduction: Sickle cell anemia (SCA) hereditary hemoglobinopathy in homozygosis of the S allele (p.Glu6Val) in the HBB gene is characterized by sickle cell, hemolysis, inflammation and vaso-occlusion causing pathophysiological manifestations. Objective: To evaluate hematological, lipid and inflammatory profiles, influence of hydroxyurea and rs3918226 polymorphism of the NOS3 gene in individuals with sickle cell anemia. **Methods:** Data from medical records, biochemical tests and genotyping of polymorphism rs3918226 of the NOS3 gene were collected. There were relationships between laboratory and genetic variables by student and Mann Whitney T tests with significance $P < 0.05$. **Results:** The population was 126 individuals with PA, mean age of 11.90 years and 71 (56.3%) hydroxyurea therapy (HU). low HDL-C (< 40 mg/dL) was observed in 80% of individuals. Lipid parameters presented higher means in girls. In patients using HU the means of hematological parameters, except total leukocytes, and lipids were higher and bilirubin and LDH levels were lower. SNP genotypes rs3918226 were in Hardy-Weinberg equilibrium with 0.05 risk allele frequency. Iron and ferritin levels in female participants of CT genotype were reduced and platelet levels increased. The low expression of NOS3 probably induced by the presence of the T alleles in the genotype leads to low availability of NO and this could reflect on the levels of these parameters. CT genotype patients using HU showed that only the reticulocytes count was lower than those of CC genotype. **Conclusion:** We observed that a significant proportion of patients with SCA presented dyslipidemia characterized by low HDL-C levels, the use of hydroxyurea decreased the markers of hemolysis and inflammation and that in girls of GENOTYPE CT of rs3918226/NOS3 there were lower levels of ferritin and higher platelet count.

Keywords: sickle cell anemia; inflammation; lipids; polymorphism; NOS3 gene.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
<i>População estudada e aspectos éticos</i>	10
<i>Exames coletados dos prontuários</i>	10
<i>Exames bioquímicos</i>	11
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
APÊNDICES	29
Apêndice A	29
Apêndice B.....	34
ANEXOS	38
Anexo I	38
Anexo II.....	42

Perfis hematológico, lipídico e inflamatório e análises com o polimorfismo rs3918226 do gene NOS3 na anemia falciforme

Hematological, lipidic and inflammatory profiles and analysis with the NOS3 gene rs3918226 polymorphism in sickle cell anemia

Perfis laboratoriais e NOS3 na anemia falciforme

Área de Conhecimento: Ciências da saúde
Subárea: Farmácia

Brisa Machado Pereira¹
Thaiza Netto Souza Valente-Frossard²
Nilcemar Rodrigues Carvalho Cruz³
Antônio Frederico de Freitas Gomides²
Cibele Velloso-Rodrigues²

¹ Curso de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora campus Governador Valadares, Brasil.

² Departamento de Ciências Básicas da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora campus Governador Valadares, Brasil.

³ Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Juiz de Fora campus Governador Valadares, Brasil

Autor para correspondência: Cibele Velloso Rodrigues
Endereço: R. São Paulo, 745 - Centro, Gov. Valadares - MG, 35010-180.
E-mail: cibele.velloso@ufjf.edu.br
Tel: (31) 98803-2353

Estrutura do manuscrito: artigo científico original
Número de palavras do resumo: 297
Número de palavras-chave: 5
Número de palavras do corpo de texto: 3017
Número de figuras: 1
Número de tabelas: 7

Perfis hematológico, lipídico e inflamatório e análises com o polimorfismo rs3918226 do gene *NOS3* na anemia falciforme

INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é caracterizada como um problema de saúde pública no mundo devido às altas taxas de incidência e mortalidade. Em Minas Gerais, Brasil, a incidência da doença é de 1:1400 nascidos vivos e a taxa de mortalidade em crianças é de aproximadamente 5,8%^{1,2}. Trata-se da hemoglobinopatia hereditária mais grave dentre as formas de doença falciforme (DF), caracterizada por mais de 50% da hemoglobina S (HbS) que leva a formação de eritrócitos em forma de foice³⁻⁵. A HbS origina-se da substituição de aminoácido ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia da beta-globina, devido a uma mutação de transversão, não sinônima no exon 1 (c.20A>T; rs334) no gene *HBB* (locus 11p15.4; MIM 141900). Tal mutação em homozigose (HbSS) leva a uma modificação físico-química na molécula de Hb⁵⁻⁷.

A fisiopatologia da AF está relacionada à polimerização da HbS que acarreta uma série de eventos relacionados à hemólise, inflamação e vasculopatia. A hemólise e disfunção endotelial são ocasionadas pela meia vida curta das hemácias. A vaso-oclusão ocorre devido formato e rigidez das hemácias levando ao recrutamento de células inflamatórias, ativação e adesão plaquetária, que vão ocasionar isquemia e hipóxia dos tecidos⁷⁻⁹. Estes subfenótipos levam a complicações clínicas multissistêmicas e com ampla variação na gravidade da doença tais como episódios de dor, síndrome torácica aguda, infartos cerebrais, hipertensão pulmonar, priapismo dentre outros¹⁰.

A dislipidemia na AF é caracterizada pelo aumento nos níveis de triglicerídeos (TG) e redução de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e lipoproteína de baixa densidade (LDL-C)¹¹⁻¹³. A hipocolesterolemia tem sido relacionada com possível gravidade na AF. Porém essa relação ainda não está bem estabelecida e pode estar relacionada a variantes genéticas¹³⁻¹⁶. Estudos mostram que as variações das complicações da AF podem ser explicadas por marcadores genéticos, tais como as deleções

no gene alfa-globina¹⁰, variantes genéticas que afetam a produção de Hemoglobina fetal (HbF) e genes de resposta a hidroxiureia¹⁷ polimorfismos nos genes *UGT1A1* e *G6PD*¹⁸.

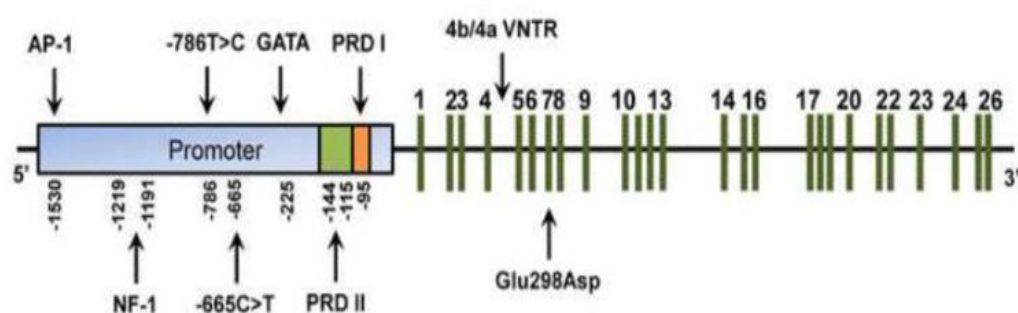
A hidroxiureia (HU) é a única terapia medicamentosa autorizada no Brasil para tratamento da anemia falciforme. Tem sido utilizada como fármaco de escolha por aumentar a síntese de HbF reduzindo a gravidade da doença, diminuindo os níveis de hemoglobinas S. Com a diminuição da Hemoglobina S, há uma menor polimerização, menor falcização dos eritrócitos diminuindo as crises vaso-oclusivas e hemólise^{19,20}.

Sabe-se que com o aumento da hemólise e, conseqüentemente a liberação do heme e do ferro livre no plasma, há produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ocasionando estresse oxidativo na AF^{6,21}. O óxido nítrico (NO) é responsável pelo consumo desses radicais de oxigênio e o heme. Com o aumento da hemólise há um maior consumo de NO, diminuindo sua biodisponibilidade para desempenhar sua função na regulação do tônus vascular (vasodilatação) e inibição do recrutamento de leucócitos e da adesão plaquetária (ação anti-inflamatória)²¹⁻²³.

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) é a responsável por oxidar a L-arginina que é convertida em L-citrulina e NO^{24,25}. A enzima eNOS3 expressada no endotélio é codificada pelo gene *NOS3* (7q35-7q36) (Figura 1). Alguns polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) do gene *NOS3* são considerados funcionais, ou seja, afetam a expressão ou a atividade da enzima. O SNP de transição na região promotora g.-665C>T rs3918226 tem sido associado a alguns fenótipos clínicos tais como hipertensão e doenças cardiovasculares em várias populações²⁶⁻³⁰. O alelo de risco T leva a diminuição transcricional do gene eNOS3²⁹ e o alelo C ao aumento da expressão de NOS3 no tecido pulmonar³¹. Foi também mostrado que a presença do alelo T no genótipo diminui os níveis de nitrito após uso do anestésico propofol²⁸. Na doença falciforme estudos de polimorfismos no gene *NOS3* mostraram resultados contraditórios. Char et al³², Sharan et al³³ e Yousry et al³⁴ reportaram associação do alelo -786C de NOS3 com o aumento da suscetibilidade à síndrome torácica aguda. Por outro lado, Vargas et al³⁵ em uma população

brasileira com DF não observaram essa associação. Nishank et al³⁶ estudaram três variantes no gene NOS3 na população indiana e mostraram que o haplótipo H2 (4a-T-C) era mais frequente em pacientes de maior gravidade da DF. No entanto, Thakur et al³⁷ não relataram tal associação. Tais contradições poderiam ser devidas à distribuição geográfica das variantes de NOS3^{37,34}.

Figura 1: Esquema da localização dos SNPs do gene *NOS3*



Fonte: < <http://europepmc.org/articles/PMC6728140>> acesso em 03/11/2019²⁸

Como a baixa biodisponibilidade de NO leva ao estresse oxidativo e consequentemente predispõe a vaso-oclusão e/ou inflamação é interessante pesquisar se há alguma correlação entre as variantes de NOS3 e parâmetros laboratoriais, as complicações, agravos ou mortalidade associadas a doença falciforme.

Portanto o presente estudo tem como objetivo caracterizar os perfis hematológico, lipídico e inflamatório, bem como avaliar se existe influência da hidroxiureia e do polimorfismo rs3918226 do gene *NOS3* em indivíduos com anemia falciforme.

MATERIAL E MÉTODOS

População estudada e aspectos éticos

Tratou-se de um estudo retrospectivo transversal realizado entre 2015 e 2018 em uma população pediátrica com AF (HbSS) diagnosticada pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais (PETN-MG) e acompanhada nos Hemocentros Regionais de Governador Valadares e Uberaba da Fundação Hemominas. Foram selecionados para o estudo todos os indivíduos com AF em estado de saúde estável, nascidos entre 01 de janeiro de 1998 e 31 de dezembro de 2014, faixa etária de 3 a 19 anos. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) e o Termo de Assentimento (Apêndice B) foram assinados pelos responsáveis e por participantes maiores de 12 anos, respectivamente. Foram excluídos da pesquisa os sujeitos que haviam sido submetidos à transfusão sanguínea a menos de três meses antes da coleta para análises laboratoriais; aqueles que os responsáveis não consentiram a participação na pesquisa; a presença de comprometimento crônico de órgãos que poderia interferir nos parâmetros avaliados; diabetes mellitus; infecções graves como hepatite, sífilis e HIV; indivíduos com outros subtipos de DF ($S\beta^+$ -talassemia, $S\beta^0$ -talassemia, doença SD, SJ); gestação; doença neurológica e crianças/adolescentes que não foram encontradas durante o período de realização do estudo. O estudo foi registrado e aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (número de CAAE 36767114.1.0000.5147) e da Fundação Hemominas (parecer nº 933.478; CAAE 36767114.1.3001.5118) (Anexo I). Após o consentimento do indivíduo, foi feita análise do prontuário médico e a coleta de dados para avaliar se o participante possuía algum dos critérios de exclusão.

Exames coletados dos prontuários

Foram extraídos dos prontuários médicos dos participantes exames bioquímicos e hematológicos incluindo aqueles antes e após o uso de hidroxureia - HU (hemoglobina total - Hb, hemoglobina corpuscular média - HCM, volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina fetal - HbF, reticulócitos,

leucograma com leucometria global - LG, segmentados neutrófilos e monócitos, plaquetograma, níveis de ferro sérico e dosagem de ferritina) e registrados em formulário específico (Apêndice C). Posteriormente, foram calculadas as médias dos valores respeitando a terapia com HU. Foram desconsiderados os exames bioquímicos e hematológicos cujos resultados estavam dentro de um período de 90 dias após transfusões sanguíneas ou de eventos clínicos significativos (crise de dor, infecção grave, sequestro esplênico agudo e crise aplástica). Os dados foram adicionados num banco de dados no programa SPSS criado especialmente para a pesquisa.

Exames bioquímicos

O sangue do participante em jejum de 10-12h foi coletado em tubo contendo 4,5ml de sangue venoso. O soro foi imediatamente separado por centrifugação. As informações gerais sobre os exames bioquímicos estão descritas na tabela 1.

Genotipagem do polimorfismo rs3918226 do gene NOS3

O sangue periférico foi coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA. Os leucócitos foram separados por centrifugação a 3000 rpm por 5 min e utilizados para extração do DNA genômico (gDNA) utilizando o kit comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®), de acordo com instruções do fabricante. A quantificação e o grau de pureza do gDNA foram determinados no espectrofotômetro Nano Vue plus (GE®).

Para a genotipagem do SNP rs3918226 do gene *NOS3* (Tabela 2) utilizou-se a metodologia de discriminação alélica pela Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) com auxílio de sondas TaqMan M GB e um par de iniciadores validados (ThermoFisher® referência 4351379). Estes ensaios em duplicatas foram desenvolvidos na plataforma do sistema da 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems®).

Tabela 1: Informações dos exames laboratoriais do estudo

Exame	Metodologia/Kit ou equipamento	Valores de referência
Ferro sérico	Espectrofotométrica/ WIENER®	Ferro: homem: 65 a 175 µg/dL; mulher: 50 a 170 µg/dL
Ferritina	Turbidimétrica/ EBRAM®	Ferritina: 6 meses a 15 anos: 7-1 µg/L
hemoglobina Fetal	Cromatografia líquida de alta eficiência/ BIORAD®	-----
Hemoglobina		11,00-16,5 g/dL
VCM		80-97 fL
HCM		26,5-33,5 pg
Leucócitos totais	Tecnologia de impedância e fotometria ABX Micros 60 - HORIBA®	3500-10000 /mm ³
Neutrófilos		595-4800/mm ³
Monócitos		300-800/mm ³
Plaquetas		150000- 390000/mm ³
Reticulócitos	Coloração com azul de cresil brilhante 1% Microscópio óptico Olympus®	0,5-1,5%
Apolipoproteína A1	Imunoturbidimetria	Homem 1-12 anos: 93-172 mg/dL; mulher 1-12 anos: 86-179 mg/dL; homem 12-60 anos: 95-186 mg/dL; mulher 12-60 anos: 101-223 mg/dL
Apolipoproteína B	Imunoturbidimetria	homem 1-12 anos: 48-125 mg/dL; mulher 1-12 anos: 51-126 mg/dL; homem 12-60 anos:49-173; mulher 12- 60 anos: 53-182 mg/dL
Colesterol Total	método enzimático colesterol oxidase/peroxidase em espectrofotómetro	≥ 150 mg/dL
Não-HDL-C	Colesterol total - HDL	≥ 130 mg/dL
HDL-C	método reativo precipitante	< 45 mg/dL
Triglicérideo	método enzimático	0-9 anos: ≥ 100 mg/dL; 10-19 anos: ≥ 130 mg/dL
Bilirrubina Total BT	método de Sims/ Horn	< 1,20 mg/dL
Bilirrubina Direta BD	método de Sims/ Horn	< 0,4 mg/dL
Bilirrubina Indireta	BI=BT- BD	0,60- 0,90 mg/dL
LDH	Enzimático colorimétrico	2-15 anos: 125,00 a 220,00 U/L

Tabela 2: Dados do polimorfismo rs3918226 do gene *NOS3*

Gene	rs	Localização do SNP	Tipo e local da mutação
<i>NOS3</i>	rs3918226	7:150993088	[C/T] transição, região promotora

Dados extraídos de: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3918226>> acesso em 22/10/2019⁴¹ SNP: polimorfismo de um único nucleotídeo; *NOS3*: nitric oxide synthase 3.

Os resultados dos exames bioquímicos, hematológicos e das análises moleculares foram registrados em banco de dados do software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 22.0. Dados descritivos categóricos foram apresentados utilizando frequências e dados quantitativos em média e desvio padrão (Dp).

O tipo de distribuição dos dados quantitativos, normal ou não normal, foi verificado antes de cada análise de associação, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro Wilk.

O teste T de Student e teste U de Mann Whitney foram aplicados para investigar se os parâmetros hematológicos, lipídicos e inflamatórios diferiram quanto ao gênero (feminino e masculino), hidroxíureia (uso e não uso) e genótipo (C/T).

Para cálculo da frequência alélica foi utilizado o teste do qui-quadrado. Para todos os testes realizados a significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

RESULTADOS

O estudo envolveu a participação de 126 crianças e adolescentes com anemia falciforme, sendo 92,2% (n = 116) do hemocentro de Governador Valadares e 7,8% (n = 10) do hemocentro de Uberaba. A idade média dos participantes foi de 11,90 (dp = 3,97) anos, mediana: 12,44, sendo 52,7% (n = 68) do sexo masculino. Estavam em terapia de hidroxíureia (HU) 56,34% dos pacientes (n = 71).

Nas análises das médias dos dados hematológicos, lipídicos e inflamatórios de acordo com o sexo observou-se diferença significativa apenas nos lipídios. Em meninas os parâmetros ApoB e LDL-C e não-HDL-C apresentaram maiores médias se comparados aos meninos (Tabela 3). Mais de 80% dos pacientes apresentavam baixos níveis de HDL-C (< 40 mg/dL). Triglicérideo aumentado estava presente em 3,48% da população estudada.

Ao avaliar os dados hematológicos e lipídicos (Tabela 4), observou-se que no grupo de pacientes que usavam a terapia de HU as médias dos parâmetros de HCM, VCM, Hb Fetal, ApoB, CT, LDL-C, não-HDL-C estavam maiores e a contagem de Leucócitos totais e neutrófilos e os níveis de bilirrubinas e LDH estavam menores que o grupo de pacientes que não usavam o medicamento.

A genotipagem do SNP rs3918226 do gene *NOS3* mostrou que as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) (Tabela 5). Não foram detectados indivíduos com o genótipo homozigoto do alelo de menor frequência (T) na população estudada.

Tabela 3. Dados hematológicos, lipídicos e inflamatórios de pacientes com anemia falciforme de acordo com o sexo.

Parâmetro	Masculino		Feminino			N	Média/mediana total	Dp	p	
	N	Média/mediana	Dp	N	Média/mediana					Dp
Hb g/dL ^a	67	8,20	1,43	59	8,36	1,02	126	8,26	1,25	0,183
HCM pg ^b	67	30,81	3,40	59	31,17	3,79	126	30,97	3,57	0,560
VCM fL ^b	67	92,45	8,87	59	94,13	11,39	126	93,23	10,13	0,360
Hb Fetal % ^a	55	11,87	6,50	48	13,95	7,91	103	12,84	7,24	0,270
Reticulócitos% ^a	67	5,22	3,03	58	5,16	3,3	125	5,20	3,13	0,562
Leucócitos totais/mm ^{3b}	67	11504,23	3445,91	59	10907,63	2949,21	126	11224,88	3224,08	0,302
Neutrófilos/mm ^{3b}	67	6074,54	2134,12	59	6019,14	2245,62	126	6048,59	2178,39	0,887
Monócitos/mm ^{3a}	67	490,11	319,45	59	445,17	362,79	126	469,07	340,04	0,239
Plaquetas/mm ^{3x10^{#b}}	67	488	138	58	466	131	125	478	135	0,363
Ferro µg/dL ^a	61	89,22	39,91	55	96,51	44,62	116	92,69	42,18	0,445
Ferritina µg/dL ^a	62	246,08	328,12	56	269,79	354,47	118	257,33	339,62	0,501
ApoA1 mg/dL ^a	43	103,84	11,15	33	105,32	15,16	76	104,48	12,98	0,929
ApoB mg/dL ^b	43	58,07	15,57	33	68,76	18,23	76	62,71	17,49	0,007*
C mg/dL ^a	48	119,3	18,21	38	127,1	22,08	86	122,74	20,27	0,106
HDL- mg/dL ^b	48	38,76	7,31	38	37,61	3,33	86	38,25	6,87	0,292
LDL-C mg/dL ^b	41	62,06	15,52	33	73,82	21,39	74	67,31	19,16	0,008*
Não-HDL-C mg/dL ^a	44	80,86	18,42	33	90,85	22,93	77	85,14	20,94	0,033*
TG mg/dL ^a	48	88,38	45,60	38	83,16	23,31	86	86,07	37,34	0,557
BT mg/dL ^a	39	2,67	1,65	31	2,31	1,17	70	2,51	1,47	0,615
BD mg/dL ^b	39	0,54	0,19	31	0,49	0,15	70	0,52	0,16	0,415
BI mg/dL ^a	39	2,12	1,55	31	1,81	1,09	70	1,99	1,36	0,582
LDH U/L ^a	30	571,95	202,53	32	512,33	174,79	71	545,08	191,47	0,138

Fonte: próprio autor. N – número de pacientes; Hb: hemoglobina; HbF: hemoglobina Fetal; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; APOA1: apolipoproteína A1; APOB: apolipoproteína B; CT: colesterol total; HDL-C: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; Não-HDL-C = colesterol total - HDL-C; TG: triglicerídeos; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: lactato desidrogenase. a: Teste U de Mann-Whitney; b: Teste T de Students; N: Número de participantes; Dp: desvio padrão; p: valor de p; *: diferença significativa (P<0,05)

Tabela 4. Parâmetros hematológicos, lipídicos e inflamatórios de indivíduos com anemia falciforme de acordo com a terapia de hidroxiureia.

Parâmetro	Uso de HU			Sem uso de HU			P
	N	Média/mediana	Dp	N	Média/mediana	Dp	
Hemoglobina g/dL ^b	71	8,44	1,13	55	8,05	1,36	0,098
HCM pg ^b	71	31,12	3,52	55	29,51	3,11	<0,001*
VCM fL ^b	71	97,36	9,79	55	87,93	7,87	<0,001*
Hb Fetal % ^a	69	14,03	7,14	34	10,44	6,91	0,005*
Reticulócitos % ^a	70	5,05	2,98	55	5,39	3,36	0,628
Leucócitos totais/mm ^{3b}	71	10579,00	3131,93	55	12058,71	3176,47	0,010*
Neutrófilos/mm ^{3b}	71	5575,00	2278,12	55	6659,84	1892,57	0,005*
Monócitos/mm ^{3a}	71	426,60	309,93	55	523,85	371,06	0,079
Plaquetas/mm ³ x 10 ^{3b}	71	482,70	147,14	54	471,77	117,99	0,655
Ferro µg /dL ^a	66	89,12	43,32	50	97,37	40,62	0,136
Ferritina µg /dL ^a	68	274,70	332,44	50	233,78	351,15	0,471
ApoA1 mg/dL ^b	43	106,40	12,94	33	102,05	12,80	0,155
ApoB mg/dL ^b	43	66,78	17,96	33	57,38	15,53	0,019*
Colesterol total mg/dL ^a	50	126,80	20,78	36	117,16	18,38	0,021*
HDL-C mg/dL ^a	50	39,15	6,32	36	37,00	7,48	0,073
LDL-C mg/dL ^a	41	72,55	18,97	33	60,80	17,58	0,003*
Não-HDL-C mg/dL ^a	44	89,20	21,80	33	79,73	18,69	0,044*
Triglicerídeos mg/dL ^a	50	81,46	25,93	36	92,46	48,69	0,739
Bilirrubina total mg/dL ^a	40	1,83	0,91	30	3,42	1,57	<0,001*
Bilirrubina direta mg/dL ^b	40	0,45	0,16	30	0,60	0,17	0,001*
Bilirrubina indireta mg/dL ^a	40	1,35	0,82	30	2,81	1,50	<0,001*
LDH U/L ^b	40	494,80	151,41	31	610,00	219,10	0,011*

Fonte: próprio autor. N – número de pacientes; HU- hidroxiureia; HbF: hemoglobina Fetal; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média;; APOA1: apolipoproteína A1; APOB: apolipoproteína B; HDL-C: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; Não-HDL-C = colesterol total - HDL-C.; LDH: lactato desidrogenase; a: Teste U de Mann-Whitney; b: Teste T de Students; N: Número de participantes; Dp: desvio padrão; P: valor de P; *: diferença significativa (P <0,05).

Tabela 5. Frequências genótípicas e alélicas do SNP rs3918226 de *NOS3*
Anemia Falciforme N = 125

Genótipos do gene <i>NOS3</i> rs3918226 (C/T)	Frequência	N	P
CC	0,904	113	0,572
CT	0,096	12	
TT	0	0	
TT x (CC + CT)	0 x 0,904	0 x 113	
CC x (TT + CT)	0,904 x 0,096	113 x 12	
<i>Alélos</i>			
C	0,952	226	
T	0,048	12	

Fonte: próprio autor. N: números de indivíduos que realizaram a análise. Teste Qui-quadrado $P > 0,05$.

As análises de distribuição entre os parâmetros hematológicos, lipídicos e inflamatórios de todos os participantes com anemia falciforme de acordo com genótipo da variante rs3918226 *NOS3* mostrou que não houve diferença entre as médias dos parâmetros laboratoriais. No entanto, diferenças significativas foram observadas nos parâmetros hematológicos e lipídicos para os genótipos do SNP rs3918226 nos participantes do sexo feminino (Tabela 6). Os níveis de ferro e ferritina nos participantes do sexo feminino de genótipo CT estavam reduzidos e os níveis de plaquetas estavam aumentados se comparados ao genótipo CC. Embora nos meninos esse tenha sido também o comportamento dessas variáveis, as diferenças não alcançaram significância.

As análises de distribuição dos genótipos do polimorfismo rs3918226 em relação à terapia com hidroxiureia e dados hematológicos, lipídicos e inflamatórios mostraram que, em indivíduos de genótipo CT que faziam uso de HU, havia menor contagem de reticulócitos (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição dos genótipos do SNP rs3918226 NOS3 por sexo e parâmetros laboratoriais de indivíduos com anemia falciforme.

Parâmetro	Masculino						p	Feminino						P
	CC			CT				CC			CT			
Gênero	N	Média/mediana	Dp	N	Média/mediana	Dp	N	Média/mediana	Dp	N	Média/mediana	Dp		
Hemoglobina g/dL ^{ab}	60	8,15	1,42	7	8,64	1,46	0,259	53	8,34	1,05	5	8,56	0,83	0,653
HCM pg ^{bb}	60	30,96	3,40	7	29,38	3,13	0,247	53	31,24	3,79	5	30,98	4,47	0,881
VCM fL ^{bb}	60	92,62	9,13	7	90,99	6,75	0,646	53	94,18	11,38	5	95,60	13,17	0,791
Hb Fetal % ^{aa}	50	11,82	6,76	5	12,56	3,20	0,367	45	13,87	8,05	3	15,17	6,13	0,489
Reticulócitos % ^{aa}	60	5,29	3,04	7	4,47	3,05	0,545	53	5,30	3,33	4	4,08	3,29	0,279
Leucócitos totais/mm ^{3bb}	60	11487,00	3304,20	7	11654,00	4819,50	0,904	53	11014,00	2931,90	5	9999,00	3591,60	0,470
Neutrófilos/mm ^{3bb}	60	6159,10	2138,30	7	5350,20	2110,30	0,347	53	6048,10	2277,06	5	5881,00	2345,50	0,876
Monócitos/mm ^{3aa}	60	480,39	320,05	7	573,39	331,15	0,436	53	457,65	379,02	5	297,30	99,07	0,483
Plaquetas x 10 ³ /mm ^{3bb}	60	495,68	135,00	7	424,35	160,65	0,199	52	452,58	121,36	5	571,78	181,75	0,049*
Ferro µg /dL ^{bb}	55	89,00	40,47	6	91,31	37,87	0,894	51	100,18	43,64	4	49,78	30,86	0,028*
Ferritina µg /dL ^{-aa}	55	244,05	342,46	7	262,12	196,77	0,714	51	272,52	369,74	5	241,70	133,13	0,020*
ApoA1 mg/dL ^{ba}	38	103,70	10,82	5	104,80	15,01	0,84	28	104,68	14,60	5	109,00	19,51	0,715
ApoB mg/dL ^{bb}	38	56,83	15,56	5	67,40	13,49	0,156	28	68,29	19,15	5	71,40	13,00	0,731
CT mg/dL ^{aa}	42	118,54	18,36	6	124,75	17,63	0,29	33	125,92	22,84	5	134,80	15,85	0,310
HDL-C mg/dL ^{ba}	42	39,06	7,70	6	36,67	3,13	0,457	33	37,05	4,95	5	41,20	12,56	0,675
LDL-C mg/dL ^{ba}	36	60,82	15,77	5	70,88	10,88	0,178	28	73,04	22,19	5	78,28	17,68	0,509
Não-HDL-C mg/dL ^{aa}	39	79,79	18,34	5	89,20	18,82	0,26	28	90,36	23,72	5	93,60	19,96	0,643
TG mg/dL ^{ab}	42	88,25	46,57	6	89,17	42,13	0,988	33	84,14	24,38	5	76,60	14,49	0,507
BT mg/dL ^{aa}	35	2,66	1,62	4	2,64	2,21	0,738	26	2,22	1,19	5	2,77	1,03	0,335
BD mg/dL ^{bb}	35	0,52	0,18	4	0,57	0,10	0,724	26	0,48	0,16	5	0,53	0,093	0,547
BI mg/dL ^{aa}	35	2,14	1,49	4	2,07	2,17	0,639	26	1,71	1,11	5	2,23	0,94	0,159
LDH ^{ba}	35	588,49	203,42	4	427,25	139,85	0,133	27	506,89	187,98	5	541,80	72,25	0,183

Fonte: próprio autor. N – número de pacientes; HbF: hemoglobina Fetal; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; APOA1: apolipoproteína A1; APOB: apolipoproteína B; CT: colesterol total; HDL-C: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; Não-HDL-C = colesterol total - HDL-C; TG: triglicerídeos; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: lactato desidrogenase; .a: Teste U de Mann-Whitney; b: Teste T de Students; N: Número de participantes; Dp: desvio padrão; P: valor de P. Significância P<0,05

Tabela 7. Distribuição dos genótipos do SNP rs3918226 gene *NOS3* com parâmetros laboratoriais de indivíduos com anemia falciforme de acordo com a terapia de hidroxiureia

Parâmetro	Uso HU						p	Sem uso de HU						P
	CC			CT				CC			CT			
	N	Média/ mediana	Dp	N	Média/ mediana	Dp	N	Média/ mediana	Dp	N	Média/ mediana	Dp		
Hemoglobina g/dL ^{ba}	64	8,37	1,18	7	8,92	0,66	0,228	49	8,05	1,36	5	8,13	1,65	0,908
HCM pg ^{bb}	64	32,27	3,44	7	30,74	4,26	0,281	49	29,59	3,20	5	29,10	2,66	0,742
VCM fL ^{bb}	64	97,46	9,77	7	96,43	10,70	0,797	49	88,00	8,17	5	87,98	5,76	0,994
Hb Fetal % ^b	62	14,01	7,44	7	14,37	3,88	0,899	33	10,51	7,00	0	-	-	-
Reticulócitos % ^{aa}	64	5,23	2,96	6	3,12	2,48	0,041*	49	5,40	3,41	5	5,8	3,11	0,707
Leucócitos totais/mm ^{3bb}	64	10576	2980,18	7	10607,62	4602,27	0,98	49	12164,87	3121,97	5	11463,5	4175,34	0,644
Neutrófilos/mm ^{3ab}	64	5648,1	2299,28	7	4908,2	2112,33	0,325	49	6706,45	1912,64	5	6500,2	1961,28	0,82
Monócitos/mm ^{3aa}	64	421,17	309,51	7	476,51	334,18	0,576	49	533,16	385,83	5	432,95	246,95	0,772
Plaquetas x 10 ³ /mm ^{3ba}	64	481,73	144,29	7	491,62	184,00	0,867	48	467,59	109,24	5	477,61	191,48	0,304
Ferro µg /dL ^{ab}	61	90,71	42,70	5	69,94	51,44	0,285	45	99,38	41,48	5	79,45	28,98	0,303
Ferritina µg /dL ^{aa}	61	275,94	344,96	7	263,24	209,61	0,60	45	233,07	369,37	5	240,19	99,10	0,108
ApoA mg/dL ^{bb}	38	106,79	13,55	5	103	6,60	0,545	28	100,50	9,91	5	110,80	23,12	0,098
ApoB mg/dL ^{bb}	38	65,91	18,41	5	73,4	13,75	0,388	28	55,95	15,9	5	65,40	11,49	0,216
CT mg/dL ^{aa}	44	126,08	21,06	6	131,75	19,43	0,421	31	115,67	18,69	5	126,40	14,73	0,175
HDL-C mg/dL ^{aa}	44	39,60	6,51	6	35,82	3,42	0,21	31	36,15	6,42	5	42,20	11,89	0,175
LDL-C mg/dL ^{aa}	36	71,45	19,36	5	80,44	15,2	0,217	28	59,39	18,18	5	68,72	12,16	0,093
Não HDL-C mg/dL ^{aa}	39	87,98	22,01	5	98,60	19,39	0,189	28	78,93	19,27	5	84,20	16,12	0,575
TG mg/dL ^{aa}	44	80,50	25,34	6	88,50	31,49	0,53	31	94,89	50,61	5	77,40	34,82	0,396
BT mg/dL ^{ab}	35	1,81	0,9	5	1,97	1,10	0,781	26	3,37	1,61	4	3,66	1,61	0,753
BD mg/dL ^{bb}	35	0,46	0,17	5	0,52	0,11	0,436	26	0,60	0,18	4	0,60	0,07	0,97
BI mg/dL ^{aa}	35	1,34	0,82	5	1,45	1,03	0,843	26	2,79	1,51	4	3,06	1,59	0,617
LDH U/dL ^{bb}	35	490,7	155,76	5	523,2	127,07	0,659	25	633,63	222,83	1	450,50	103,91	0,12

N – número de pacientes; HU- hidroxiureia; HbF: hemoglobina Fetal; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média;; APOA1: apolipoproteína A1; APOB: apolipoproteína B; Não-HDL-C: não lipoproteína de alta densidade; HDL-C: lipoproteína de alta densidade; LDH: lactato desidrogenase; a: Teste U de Mann-Whitney; b: Teste T de Students; N: Número de participantes; Dp: desvio padrão; p: valor de P; significância P<0,05.

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito da terapia de hidroxiureia e do polimorfismo rs3918226 do gene *NOS3* nos parâmetros hematológicos, lipídicos e inflamatórios em crianças e adolescentes com anemia falciforme.

A presença de HDL-C (< 40 mg/dL) baixo foi observado em mais de 80% dos indivíduos estudados, condizente com outros estudos^{13,16,42,43}. Triglicerídeo aumentado estava presente em apenas 3,48% da população estudada. Um dos principais achados nos pacientes com anemia falciforme é o fenótipo da dislipidemia, caracterizada pela hipocolesterolemia e hipertrigliceridemia. Baixos níveis de HDL-C foram associados com marcadores laboratoriais de gravidade e crise vaso-oclusiva na doença falciforme¹², mas seu mecanismo ou o impacto dele nas complicações da doença ainda permanecem inconclusivos. Foi proposto que a hipocolesterolemia associada a anemia falciforme é consequência da própria anemia e não devido a eritropoiese aumentada¹⁶. Como os glóbulos vermelhos não sintetizam o colesterol, é provável que uma redução na remoção do colesterol da membrana ou na troca de lipoproteínas plasmáticas⁴⁴ seja provavelmente devida a alterações causadas na membrana pela desoxigenação das células sanguíneas⁴⁵. Por outro lado, a hipocolesterolemia caracterizada pelo baixo HDL-C, como observado neste trabalho em pacientes com DF, pode ser um reflexo do aumento da captação de colesterol pelos glóbulos vermelhos e da transferência reduzida de colesterol para o HDL-C circulante⁴⁶. Mais recentemente, foi sugerido que a tríade persistente de hemólise, estresse oxidativo e inflamação na DF poderiam causar mudança estrutural e consequente disfunção no HDL-C. Assim, tal situação levaria a uma redução no transporte reverso de colesterol, contribuindo para a hipocolesterolemia na DF⁴⁷.

Na população pediátrica estudada, os níveis de APOB, LDL-C e não-HDL-C foram significativamente maiores em meninas, semelhante ao que foi observado em população adulta⁴⁸. Poderia ser investigado se estas diferenças encontradas nas meninas permanecerão na idade adulta e se refletirão nas complicações da anemia falciforme.

A hidroxiureia aumenta a síntese de HbF reduzindo a gravidade da doença, diminuindo os níveis de hemoglobinas S. Com a diminuição da Hemoglobina S, há uma menor polimerização, menor falcização dos eritrócitos diminuindo as crises vaso-oclusivas e hemólise^{19,20}. A terapia com o uso de HU afetou os níveis de HCM, VCM, HbF que se mostraram maiores naqueles que faziam uso do medicamento. Os marcadores de hemólise e inflamação (leucócitos totais, neutrófilos, bilirrubinas e LDH) também sofreram redução com o uso da HU. Nossos dados foram semelhantes aos de Ware et al⁴⁹ que também mostraram que a HU aumentou o VCM, HbF e reduziu os leucócitos totais e neutrófilos. O mecanismo de ação da HU consiste em inibir a síntese e o reparo do DNA nas células e, conseqüentemente a divisão celular por meio da enzima ribonucleotídeo redutase impedindo a conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos^{50,51}. Desse modo, o achado de maiores níveis de HbF era esperado nos pacientes que fazem uso dessa terapia. Sabe-se que altos níveis de HbF são responsáveis por reduzir a gravidade da doença falciforme, diminuindo os níveis de HbS²⁰. A diminuição de HbS leva a menor polimerização, desencadeando menor falcização das hemácias, o que acarreta menos crises vaso-oclusivas e hemólise. Deste modo, justificam-se os menores índices de mediadores inflamatórios (neutrófilos e leucócitos totais) e hemolíticos (bilirrubinas e LDH) encontrados neste estudo nos pacientes que utilizavam a HU.

Os níveis dos lipídios CT, LDL-C, não-HDL-C, e ApoB estavam aumentados nos pacientes que faziam terapia de HU. O estudo desenvolvido por Yahouédéhou et al⁵² mostrou que o uso de HU reduziu os níveis de CT, LDL-C e TG mas, os níveis de HDL-C estavam aumentados. Porém, nos estudos de Daak et al⁴⁶ e Teixeira e t al⁵³ não foram encontradas diferenças nos níveis lipídicos de pacientes em uso e não uso de HU. Como o mecanismo de HU não está diretamente implicado na alteração do metabolismo de lipídios, os resultados, aparentemente contraditórios, poderiam ser reflexos da mudança de estado nutricional ao qual os pacientes experimentam diante do uso do medicamento e outros fatores ambientais e genéticos envolvidos na resposta ao fármaco.

Avaliando conjuntamente os marcadores de hemólise e de inflamação com os de lipídios nos grupos que usavam ou não HU notou-se que a gravidade hemolítica e inflamatória acompanhou a hipocolesterolemia nos pacientes que não usavam HU. Portanto, o medicamento diminui a gravidade da anemia e, conseqüentemente, poderia influenciar na homeostase dos lipídios.

Muitas variantes foram descritas no gene *NOS3* e nós avaliamos um SNP de transição na região promotora g.-665C>T rs3918226. A genotipagem do SNP rs3918226 de *NOS3* mostrou que a frequência do alelo T na nossa população com DF foi de 0,05. A frequência desse alelo varia entre as populações de 0,029 a 0,085⁴¹. Na população europeia a frequência deste alelo foi de 13,8% e 8,9% de casos e controles, respectivamente⁵⁴.

Na população total do estudo não foram encontradas diferenças entre os genótipos CC e CT de rs3918226 e as médias dos parâmetros laboratoriais, mas nas meninas de genótipo CT os níveis de ferro e ferritina estavam menores e a contagem de plaquetas aumentada. Embora os parâmetros de ferritina indiquem menor grau de inflamação, a presença do alelo T que está relacionado à menor expressão de *NOS3* e, portanto, a baixa síntese de NO poderia levar a menor expressão de ferritina o que está de acordo com dados da literatura⁵⁵. Por sua vez, o maior número de plaquetas observado poderia ser explicado também pela baixa disponibilidade de NO causada pela presença da variante T do SNP rs3918226 uma vez que NO reduz a ativação de plaquetas e trombose⁵⁶.

Embora a contagem média de reticulócitos não tenha sido afetada pelo uso de HU, foi observado que esses estavam mais altos em indivíduos de genótipo CC e que faziam uso de HU. Ou seja, nos seis pacientes de genótipo CT que faziam uso de HU o número de reticulócitos foi menor que nos de genótipo CC e no grupo que não fazia uso da HU não houve diferença. Nós não encontramos relatos do efeito desse polimorfismo com reticulócitos. Embora seja esperado que o uso de HU melhore os parâmetros laboratoriais de hemólise na DF e, portanto, haja uma diminuição nos níveis de reticulócitos, a relação entre o genótipo CT de rs3918226 com essas células jovens pode não

refletir o efeito da expressão de NOS3 e ser um resultado espúrio ou relacionado ao tamanho da amostra visto que outros parâmetros que poderiam estar associados à biodisponibilidade de NO não foram modificados com a terapia ou não com HU. Finalmente, o gene NOS3 ainda não foi implicado no metabolismo de hidroxíureia⁵².

As limitações do presente estudo estão relacionadas ao tamanho da amostra que contribuiu para não encontrarmos indivíduos homocigotos para a variante T do SNP rs3918226 e assim avaliar se há relações com os parâmetros laboratoriais. Dados das complicações clínicas da anemia falciforme poderiam também agregar mais informações aos estudos de associação da variante de NOS3.

CONCLUSÃO

Nosso estudo com crianças e adolescentes com anemia falciforme mostrou que uma significativa proporção apresenta dislipidemia com baixos níveis de HDL-C, que o uso de hidroxíureia não influenciou o perfil lipídico, diminuiu o grau de hemólise e de inflamação e que o genótipo CT do polimorfismo de rs3918226 em meninas é mais frequente naquelas com menores níveis de ferritina e maior contagem de plaquetas.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG; www.fapemig.br); Ministério da Saúde do Brasil e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; <http://www.cnpq.br/>) (número da concessão: CDS / APQ 03522/13); Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP; <http://www.finep.gov.br/>).

Conflito de interesse

Os autores declaram não ter interesses conflitantes em relação à publicação deste artigo.

REFERÊNCIAS

- 1- Sabarense AP, Lima GO, Silva LML, Viana MB. Characterization of mortality in children with sickle cell disease diagnosed through the Newborn Screening Program. *J. Pediatr.* 2015; 91(3): 242-7.
- 2- Yanni E, Grosse SD, Yang Q, Olney RS. Trends in pediatric sickle cell disease-related mortality in the United States, 1983-2002. *The Journal of pediatrics.* 2009; 154(4): 541-545.
- 3- Amaral JL, Almeida NA, Santos PS, Oliveira PP, Lanza FM. Perfil sociodemográfico, econômico e de saúde de adultos com doença falciforme. *Rev Rene.* 2015; 16(3): 296-305.
- 4- Carvalho SC, Carvalho LC, Fernandes JG, Santos MJS. Em busca da equidade no sistema de saúde brasileiro: o caso da doença falciforme. *Saúde e Sociedade.* 2014; 23 (2): 711-718.
- 5- Ware RE, Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *Lancet.* 2017; 390: 311-23.
- 6- Renoux C, Joly P, Faes C, Mury P, Eglenen B, Turkay M3, et al. Association between Oxidative Stress, Genetic Factors, and Clinical Severity in Children with Sickle Cell Anemia. *The Journal of pediatrics.* 2018; 195: 228-235.
- 7- Williams TN, Thein SL. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 2018; 19: 4.1-4.35.
- 8- Conran N, Belcher JD. Inflammation in Sickle Cell Disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018; 68 (2-3): 263-299.
- 9- Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *The Journal of Clinical Investigation.* 2017; 127(3): 750-760.
- 10- Habara A, Steinberg MH. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease." *Experimental biology and medicine (Maywood).* 2016; 241(7): 689-96.
- 11- Aleluia MM, Guarda CC, Santiago RP, Fonseca TCC, Neves FI, Souza RQ, et al. Association of classical markers and establishment of the dyslipidemic sub-phenotype of sickle cell anemia. *Lipids in health and disease.* 2017; 16 (1): 16-74.
- 12- Emokpae AM, Kuliya-Gwarzo A. The Influence of Decreased Levels of High Density Lipoprotein Cholesterol on Hematological Indices in Sickle Cell Disease Patients. *Ann Med Health Sci Res.* 2014; 4(2): 157-161.
- 13- Ephraim RKD, Adu P, Ake E, Agbodzakey H, Adoba P, Cudjoe O, et al. Normal non-HDL cholesterol, low Total cholesterol, and HDL cholesterol levels in sickle cell disease patients in the steady state: a case-control study of Tema Metropolis. *Journal of lipids.* 2016; 2016.
- 14- Chang M.H, Yesupriya A, Ned RM, Mueller PW, Dowling NF. Genetic variants associated with fasting blood lipids in the U.S. population: third National Health and Nutrition Examination Survey. *BMC Medical Genetics.* 2010; 11 (62).

- 15- Seixas MO, Rocha LC, Carvalho MB, Menezes JF, Lyra IM, Nascimento VML, et al. Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. *Lipids in health and disease*. 2010; 9 (1): 91.
- 16- Zorca S, Freeman L, Hildesheim M, Allen D, Remaley AT, James G. Taylor JG, et al. Lipid levels in sickle-cell disease associated with hemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. *British journal of haematology*. 2010; 149 (3): 436.
- 17- Green NS, Sandra B. "Genetic modifiers of HbF and response to hydroxyurea in sickle cell disease." *Pediatric blood câncer*. 2011; 56(2): 177-81.
- 18- Sheehan VA, Luo Z, Flanagan JM, Howard TA, Thompson BW, Wang WC, et al. Genetic modifiers of sickle cell anemia in the BABY HUG cohort: influence on laboratory and clinical phenotypes. *Am J Hematol*. 2013; 88(7): 571-6.
- 19- Silva MC, Shimauti ELT. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2006; 28 (2): 144-148.
- 20- Steinberg M.H. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(13): 1021-30.
- 21- Dasgupta T, Hebbel RP, Kaul DK. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radical Biology Medicine*. 2006; 41: 1771-1780.
- 22- Ahluwalia A, Foster P, Scotland RS, McLean PG, Mathur A, Perretti M, et al. Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. *PNAS*. 2004; 101 (5): 1386-1391.
- 23- Sirirat K, Sriwantana T, Kaewchuchuen J, Paiboonsukwong K, Fucharoen S, Ritthidej G, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single dose of inhaled nebulized sodium nitrite in healthy and hemoglobin E/ β -thalassemia subjects. *Nitric Oxide*. 2019; 93: 6-14.
- 24- Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. 1993; 268 (17): 12231-4.
- 25- Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2003; 39 (4): 343-350.
- 26- Aguiar M, Matos A, Gil A, Afonso C, Braga L, et al. Sickle cell anemia – Nitric oxide related 2 genetic modifiers of hematological 3 and biochemical parameters. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2016; 64(4): 957-963.
- 27- Malik R, Rannikmäe K, Traylor M, Georgakis MK, Sargurupremraj M, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 3 novel loci associated with stroke. *Ann Neurol*. 2018, 84(6): 934-939.
- 28- Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene*. 2016; 575(2-3): 584-99.
- 29- Salvi E, Kutalik Z, Glorioso N, Benaglio P, Frau F, Kuznetsova T, et al. Genome-wide association study using a high-density SNP-array and case-control design identifies a novel essential hypertension

- susceptibility locus in the promoter region of eNOS. *Hypertension*. 2012; 59(2): 248–255.
- 30- Zhang X, Lynch AI, Davis BR, Ford CE, Boerwinkle E, et al. Pharmacogenetic association of NOS3 variants with cardiovascular disease in patients with hypertension: the GenHAT study. *PLoS One*. 2012; 7(3): 34217.
 - 31- Emdin CA, Khera AV, Klarin D, Natarajan P, Zekavat S, Nomura A, et al. Phenotypic Consequences of a Genetic Predisposition to Enhanced Nitric Oxide Signaling. *Circulation*. 2018; 137(3): 222–232.
 - 32- Chaar V, Tarer V, Etienne-Julan, M, Diara, J. P., Elion, J. & Romana, M. ET-1 and eNOS gene polymorphisms and susceptibility to acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crises in children with sickle cell disease. *Hematologica* . 2006; 91: 1277–1278.
 - 33- Sharan K, Surrey S, Ballas S, Borowski M, Devoto M, Wang KF, et al. Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *Br J Haematol* .2004; 124 (2): 240–3.
 - 34- Yousry SM, Ellithy HN, Shahin GH. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of vasculopathy in sickle cell disease. *Hematology*.2016 ;21 (6): 359-67.
 - 35- Vargas AE, da Silva MAL, Silla L, Chies JA B. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue Antigens*. 2005; 66(6): 683–690.
 - 36- Nishank SS, Singh MPSS, Yadav R, Gupta R. B, Gadge VS, Gwal A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with sickle cell disease patients in India. *Journal of Human Genetics*. 2013; 58(12): 775–779. doi:10.1038/jhg.2013.99
 - 37- Thakur TJ, Guindo A, Cullifer LR, Yi L, Ikhide GI, Dapa AD, et al. Endothelin-1 but not Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism is Associated with Sickle Cell Disease in Africa. *Gene Regul Syst Bio*. 2014; 8:119–126. doi:10.4137/GRSB.S14836
 - 38- Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC. *Pediatric Reference Intervals*. 6th.2007
 - 39- Wiener lab. Fer-color. Para a determinação de ferro sérico. 2000 Rosario – Argentina. Disponível em: <https://bit.ly/2QfLKFb>
 - 40- Daniels SR, Benuck I, Christakis DA, Dennison BA, Gidding SS, Gillman MW, et al. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents. National Heart, Lung, and Blood 178 Institute, NIH Publication N. 12-7486a, 2012. Disponível em: https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/peds_guidelines_sum.pdf , acesso em: 04 de março de 2018
 - 41- Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs 3918226. HapMap. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3918226> . Acesso em 22 de outubro de 2019.
 - 42- Rahimi Z, Merat A, Haghshenass M, Madani H, Rezaei M, et al. Plasma lipids in Iranians with sickle cell disease: hypocholesterolemia in sickle cell anemia and increase of HDLcholesterolin sickle cell trait. *Clin Chim Acta*. 2006; 365: 217–220.

- 43- Shores J, Peterson J, VanderJagt D, Glew RH, et al. Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease. *J Natl Med Assoc.* 2003; 95, (9): 813-7.
- 44- Niesor EJ, Benghozi R, Amouyel P, Ferdinand KC, Schwartz GG. Adenylyl Cyclase 9 Polymorphisms Reveal Potential Link to HDL Function and Cardiovascular Events in Multiple Pathologies: Potential Implications in Sickle Cell Disease. *Cardiovascular Drugs and Therapy.* 2015; 29 (6): 563-572.
- 45- Kavecansky J, Schroeder F, Joiner CH. Deoxygenation-induced alterations in sickle cell membrane cholesterol exchange. *Am J Phys.* 1995; 269: C1105-11.
- 46- Daak AA, Ghebremeskel K, Elbashir MI, Bakhita A, Hassan Z, Crawford MA. Hydroxyurea therapy mobilises arachidonic Acid from inner cell membrane aminophospholipids in patients with homozygous sickle cell disease. *J Lipids.* 2011; 2011.
- 47- Norata GD, Grigore L, Raselli S, Seccomandi PM, Hamsten A, Maggi FM, et al. Triglyceride-rich lipoproteins from hypertriglyceridemic subjects induce a pro-inflammatory response in the endothelium: Molecular mechanisms and gene expression studies. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2006; 40 (4): 484-494.
- 48- Lalanne-Mistrih M, Connes P, Lamarre Y, Lemonne N, Hardy-Dessources MD, Tarer V, et al. Lipid profiles in French West Indies sickle cell disease cohorts, and their general population. *Lipids in health and disease.* 2018; 17 (1): 38.
- 49- Ware RE, Zimmerman AS, Sylvestre PB, Mortier NA, Davis JS, Treem WR, Schultz, WH. Prevention of secondary stroke and resolution of transfusional iron overload in children with sickle cell anemia using hydroxyurea and phlebotomy. *J Pediatr* 2004; 145: 346-52.
- 50- Galli A, Schiestl RH. Hydroxyurea induces recombination in dividing but not in G1 or G2 cell cycle arrested yeast cells. *Mutation Research.* 1996; 354: 69-75
- 51- Sakano K, Oikawa S, Hasegawa K, Kawanishi S, et al. Hydroxyurea induces site-specific DNA damage via formation of hydrogen peroxide and nitric oxide. *Jpn J Cancer Res.* 2001; 92(11):1166-74.
- 52- Yahouédéhou SCMA, Carvalho MOS, Oliveira RM, Santiago RP, Guarda CC, Carvalho SP, et al. Sickle Cell Anemia Patients in Use of Hydroxyurea: Association between Polymorphisms in Genes Encoding Metabolizing Drug Enzymes and Laboratory Parameters. *Disease Markers.* 2018; 2018.
- 53- Teixeira RS, Terse-Ramos R, Ferreira TA, Machado VR, Perdiz MI, Lyra IM, et al. Associations between endothelial dysfunction and clinical and laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. *PloS one.* 2017; 12 (9): e0184076.
- 54- Salvi E, Kutalik Z, Glorioso N, Benaglio P, Frau F, Kuznetsova T, et al. Genome wide Association Study Using a High-Density Single Nucleotide Polymorphism Array and Case-Control Design Identifies a Novel Essential Hypertension Susceptibility Locus in the Promoter Region of Endothelial NO Synthase. *Hypertension.* 2012; 59(2): 248-255.

- 55- Recalcati S, Taramelli D, Conte D and Cairo G. Nitric oxide-mediated induction of ferritin synthesis in J774 macrophages by inflammatory cytokines: role of selective iron regulatory protein-2 downregulation. *Blood*. 1998; 91 (3): 1059–1066.
- 56- Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. Nitric oxide pathology and therapeutics in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018; 68(2-3): 223–237.

APÊNDICES

Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar do projeto de pesquisa "*Estudos diagnóstico e avaliativo de biomarcadores de dislipidemias em indivíduos com doença falciforme (genótipos HbSS e HbSC) acompanhados nos Hemocentros de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas*". O motivo que nos leva a desenvolver este projeto é que queremos saber se a quantidade de gorduras está relacionada à doença falciforme; se o paciente tem também a alfa-talassemia (uma outra forma de anemia hereditária) além da doença falciforme e se algum quadro clínico apresentado está relacionado a estes exames.

Para esta pesquisa nós precisamos de sua autorização para: 1. coletar seus dados pessoais, os resultados de exames laboratoriais e clínicos incluindo o de Doppler transcraniano e outras informações que o médico da Fundação Hemominas escreveu no prontuário; 2. Coletar sangue para fazer estudos em laboratório tais como exame genético, gorduras do sangue e outras substâncias; 3. realizar medidas do corpo tais como: peso, altura, quantidade da gordura do corpo, sendo gordura total além da gordura braço e das costas, 4. conhecer alimentação do menor; 5. coletar informações da situação social e econômica de sua família. Todas as avaliações serão feitas no Hemocentro de Governador Valadares da Fundação Hemominas no dia agendado da consulta médica.

Para estes objetivos nós adotaremos os seguintes procedimentos com o menor:

1. Coletaremos um tubo de 4,5mL de sangue para separar o material genético, o DNA, e fazer estudos genéticos relacionados a doença falciforme. Em outro momento será coletado um tubo de 4,5 mL para as análises de gorduras e outras substâncias tais como vitaminas e

minerais. Se necessário será coletado um outro tubo de 4,5mL para complementar as análises. Cada análise será realizada somente uma vez. As coletas de sangue vão acontecer durante a coleta de exames de rotina por um profissional da Hemominas, sendo apenas um tubo por vez.

2. Pesagem em balança, medida da altura em um estadiômetro, medidas do seu braço utilizando uma fita métrica e avaliação da gordura do braço e das costas utilizando um aparelho chamado adipômetro. O menor deverá estar sem sapatos e levantar a blusa para as medidas na sua presença. Também iremos realizar um exame chamado bioimpedância. Neste exame o menor deverá deitar em uma maca e serão ligados dois fios chamados eletrodos nos pés e dois nas mãos.
3. Avaliação da alimentação por entrevista com sua participação em três momentos diferentes, sendo sempre no dia das consultas médicas na Fundação Hemominas a pedido do médico que o acompanha. Para esta avaliação será utilizado um kit de medidas caseiras composto por copo, concha, colher e prato. Além disso, um livro ajudará a definir as porções consumidas através da apresentação de imagens com tamanhos diferentes de porções
4. Avaliação da situação socioeconômica da família feita por entrevista com você para obter informações relacionadas a quanto tempo de estudo tem o responsável pelo menor ou o chefe da família, quantos aparelhos domésticos eletroeletrônicos tem na casa dentre outras. Não será investigada a renda familiar.

Serão necessários em média vinte minutos para realizar cada procedimento descrito acima.

Para participar deste projeto, o menor sob sua responsabilidade não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, ele tem assegurado direito à indenização. Ele será esclarecido(a) em qualquer

aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Você, como responsável pelo menor, poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação dele a qualquer momento, mesmo assinando o presente termo. A participação dele é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador que irá tratar a identidade do menor com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade. O menor não será identificado em nenhuma publicação.

Este projeto apresenta poucos riscos para o menor e podemos citar: no exame de bioimpedância não há nenhum desconforto, mas em caso de uso de marcapasso pode afetar sua atividade elétrica. Além disso, existem poucos estudos utilizando a bioimpedância em gestantes. Por esta razão esta avaliação não poderá ser realizada nestas duas situações, inclusive em casos de risco de gestação, mesmo se ainda não comprovada. Assim, você e o menor a partir de 12 anos deverão assinar uma declaração sobre esta situação no dia da avaliação. O risco de quebra de confidencialidade será diminuído com a utilização de códigos alfanuméricos para identificar as informações de sua avaliação, as quais serão incluídas no banco de dados que estará em um único computador com acesso protegido por senha onde somente os pesquisadores terão acesso. Caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você terá assegurado o direito à indenização.

Em relação aos benefícios deste projeto podemos citar: os resultados poderão ajudar o médico a tratar melhor a doença falciforme; pois pode trazer novos conhecimentos da doença. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizado. Se houver alterações significativas, você e o menor serão orientados a buscar ajuda profissional e receberão orientações através de material impresso. Orientações diretas com um dos membros da equipe também poderão ser solicitadas através dos contatos disponibilizados neste documento.

Os dados e os instrumentos utilizados no projeto ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento de duas páginas encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Declaração de consentimento

Eu, _____,
 portador(a) do documento de Identidade _____,
responsável pelo menor _____,
 prontuário _____, residente no endereço (Rua/Av)
 _____ Nº. _____ complemento _____ Bairro
 _____ Cidade _____ (MG), fone de
 contato () _____ fui informado(a) dos objetivos do
 presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei
 que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar a
 decisão do menor sob minha responsabilidade de participar, se assim o
 desejar. Declaro que concordo com a participação do menor. Recebi uma via
 original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a
 oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Local: Governador Valadares, ____ de _____ de 20____.

Nome e Assinatura do(a) Responsável

Nome e Assinatura do(a) Pesquisador(a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa/UFJF

Campus Universitário da UFJF

Pró-Reitoria de Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

CEP-Comitê de Ética em Pesquisa/Hemominas

Alameda Ezequiel Dias,321–Santa Efigênia–Belo Horizonte –Minas Gerais.

CEP30130-110

Fone:(31)3768-4587

Pesquisador Responsável: CIBELE VELLOSO RODRIGUES

Endereço: Av. Dr. Raimundo Monteiro Rezende, 330-Centro, CEP: 35010-177

Governador Valadares/ MG, Fone: (33) 91506745,

E-mail: cibele.velloso@ufjf.edu.br

Apêndice B

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você.....
está sendo convidado(a) como **voluntário(a)** a participar do projeto de pesquisa "*Estudos diagnóstico e avaliativo de biomarcadores de dislipidemias em indivíduos com doença falciforme (genótipos HbSS e HbSC) acompanhados nos Hemocentros de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas*".

Para esta pesquisa nós precisamos de sua autorização para: 1. coletar seus dados pessoais, os resultados de exames laboratoriais e clínicos incluindo o de Doppler transcraniano e outras informações que o médico que o atende na Fundação Hemominas escreveu no seu prontuário médico; 2. Coletar um pouco do seu sangue para fazer estudos em laboratório tais como gorduras do sangue e outras substâncias; 3. realizar medidas do seu corpo tais como: peso, altura, quantidade da gordura do corpo, sendo gordura total além da gordura braço e das costas, 4. conhecer sua alimentação; 5. coletar informações da situação social e econômica de sua família. Todas as avaliações serão feitas no Hemocentro de Governador Valadares da Fundação Hemominas no dia agendado de sua consulta médica.

Os procedimentos que serão realizados com sua participação serão:

1. Coleta de um tubo de 4,5 mL de sangue para separar o material genético, o DNA, e fazer estudos genéticos relacionados a doença falciforme. Em outro momento será coletado um tubo de 4,5 mL para as análises de gorduras e outras substâncias tais como vitaminas e minerais. Se necessário será coletado um outro tubo de 4,5mL para complementar as análises. Cada análise será realizada somente uma vez. As coletas de sangue vão acontecer durante a coleta de exames de rotina por um profissional da Hemominas, sendo apenas um tubo por vez.

2. Medidas do corpo: pesagem em balança, medida da sua altura em um estadiômetro, medidas do seu braço utilizando uma fita métrica e avaliação da

gordura do braço e das costas utilizando um aparelho chamado adipômetro. Você deverá estar sem sapatos e levantar a blusa para as medidas na presença de seu responsável. Também iremos realizar um exame chamado bioimpedância. Neste exame você deverá se deitar em uma maca e serão ligados dois fios chamados eletrodos nos seus pés e dois nas suas mãos.

3. Avaliação da alimentação através de entrevista com você e com o seu responsável em três momentos diferentes, sendo sempre no dia das consultas médicas na Fundação Hemominas a pedido do médico que o acompanha. Para esta avaliação será utilizado um kit de medidas caseiras composto por copo, concha, colher e prato. Além disso, um livro ajudará a definir as porções consumidas através da apresentação de imagens com tamanhos diferentes de porções.

4. Avaliação da situação socioeconômica de sua família feita por entrevista com o responsável por você para obter informações relacionadas a quanto tempo de estudo tem seu responsável ou chefe da família, quantos aparelhos domésticos eletroeletrônicos tem na casa dentre outras. Não será investigada a renda familiar.

Serão necessários em média vinte minutos para realizar cada procedimento descrito acima.

A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador que irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum gasto, nem receberá qualquer dinheiro. Você será esclarecido(a) de qualquer coisa que desejar saber e pode aceitar participar ou não. Você e o seu responsável poderão retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, mesmo assinando o presente termo. Você não será identificado em nenhuma publicação.

Este projeto apresenta poucos riscos para você e podemos citar: dor no local da picada e formação de uma mancha roxa, o hematoma, no local da picada. O sangue será coletado por profissional experiente que atende na Fundação

Hemominas durante a coleta de sangue para exames de rotina; a mancha roxa desaparece em alguns dias. O exame da bioimpedância não causa nenhum desconforto, mas em caso de uso de marcapasso pode afetar sua atividade elétrica e, em caso de gestantes, existem poucos estudos que utilizaram este aparelho. Por esta razão esta avaliação não poderá ser realizada nestas duas situações, inclusive em casos de risco de gestação, mesmo se ainda não comprovada. Assim, você e seu responsável deverão assinar uma declaração sobre esta situação no dia da avaliação. O risco de quebra de confidencialidade será diminuído com a utilização de códigos alfanuméricos para identificar as informações de sua avaliação, as quais serão incluídas no banco de dados que estará em um único computador com acesso protegido por senha onde somente os pesquisadores terão acesso. Caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você terá assegurado o direito à indenização.

Em relação aos benefícios deste projeto podemos citar: os resultados poderão ajudar o seu médico a tratar melhor a doença falciforme; pois pode trazer novos conhecimentos da doença. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizado. Se houver alterações significativas, você e o seu responsável serão orientados a buscar ajuda profissional e receberão orientações através de material impresso. Orientações diretas com um dos membros da equipe também poderão ser solicitadas através dos contatos disponibilizados neste documento.

Os dados e instrumentos utilizados no projeto ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento de duas páginas encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Declaração de consentimento

Eu, _____,
 portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver
 documento), nascido em ____/____/____ com idade de _____anos,
 prontuário _____, residente no endereço (Rua/Av)
 _____ Nº. _____
 complemento _____ Bairro _____ Cidade
 _____ (MG), fone de contato () _____

fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e
 detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei
 solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão
 de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável
 já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi uma
 cópia deste termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e
 esclarecer as minhas dúvidas.

Local: _____, Data: _____ de _____ de 20____.

 Assinatura do (a) menor

 Assinatura do (a) pesquisador (a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá
 consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa/UFJF

Campus Universitário da UFJF

Pró-Reitoria de Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

CEP-Comitê de Ética em Pesquisa/Hemominas

Alameda Ezequiel Dias,321–Santa Efigênia–Belo Horizonte –Minas Gerais. CEP30130-
 110

Fone:(31)3768-4587

Pesquisador Responsável em GOVERNADOR VALADARES: CIBELE VELLOSO
 RODRIGUES

Endereço: Av. Dr. Raimundo Monteiro Rezende, 330-Centro, CEP: 35010-177 –
 Governador Valadares/ MG

Fone: (33) 91506745 -

E-mail: cibelevelloso@ufjf.edu.br

ANEXOS

Anexo I

PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudos diagnóstico e avaliativo de biomarcadores de dislipidemias em indivíduos com doença falciforme (genótipos HbSS e HbSC) acompanhados nos Hemocentros de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas.

Pesquisador: Cibele Velloso Rodrigues

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 8

CAAE: 36767114.1.0000.5147

Instituição Proponente: Universidade Federal de Juiz de Fora - ICB

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.146.315

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa visando estudo diagnóstico e avaliativo de dislipidemia em indivíduos com doença falciforme.


Este projeto foi anteriormente aprovado (3a. versão) e, depois, julgado pendente ao retornar com emenda em sua 4a. e 5a. versões. Aprovado na 6a. versão e 7a. versões com emendas exigidas pelo CEP da Fundação Hemominas, retorna em 8a. versão com emenda para incorporar novos membros à equipe. Apresentação do projeto esta clara, detalhada de forma objetiva, descreve as bases científicas que justificam o estudo, de acordo com as disposições da Resolução CNS 466/12 de 2012, item III.

Objetivo da Pesquisa:

Mantido o objetivo geral de projeto aprovado e atendidas as adequações especificadas em pareceres anteriores. O objetivo da pesquisa está bem delineado, apresenta clareza e compatibilidade com a proposta, tendo adequação da metodologia aos objetivos pretendidos, de acordo com o que prevê a Norma Operacional CNS 001 de 2013, item 3.4.1 - 4.

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br

UFJF - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE JUIZ DE FORA -
MG



continuação do Parecer: 2.148.315

Ausência	TACONTROLEESCOLARadendo2.pdf	02/05/2017 18:06:23	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisaadendo2.pdf	02/05/2017 18:02:52	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto Projeto Estudos diagnostico e avaliativo.PDF	27/09/2014 16:30:58		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

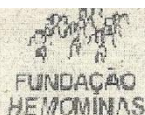
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

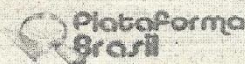
JUIZ DE FORA, 29 de Junho de 2017

Assinado por:
Patrícia Aparecida Fontes Vieira
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-900
UF: MG Município: JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufff.edu.br



FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudos diagnóstico e avaliativo de biomarcadores de dislipidemias em indivíduos com doença falciforme (genótipos HbSS e HbSC) acompanhados nos Hemocentros de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas.

Pesquisador: Cibele Velloso Rodrigues

Área Temática: Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 367671.14.1.3001.5118

Instituição Proponente: Universidade Federal de Juiz de Fora - ICB

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.137.657

Data da Relatoria: 04/02/2015

Apresentação do Projeto:

As complicações clínicas em indivíduos com doença falciforme (DF), principalmente na anemia falciforme (HbSS), embora primariamente decorrentes de uma mutação única no gene da B-globina, são pleiotrópicas e acarretam uma significativa redução da qualidade e expectativa de vida. Além disto, geram aumento considerável de custo para o tratamento e acompanhamento ambulatorial dos acometidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Além do amplo espectro de manifestações clínicas, diferenças marcantes no nível de gravidade entre os indivíduos acometidos caracterizam a DF, pois genes modificadores e fatores não genéticos estão também implicados no fenótipo da doença. Vários marcadores clínicos, laboratoriais e genéticos já foram caracterizados na DF e o diagnóstico destes marcadores deve ser realizado e suas informações aplicadas em populações cuja correlação esteja significativamente associada ao prognóstico clínico da doença. Embora vários relatos confirmem que há um quadro de dislipidemia [hipocolesterolemia e hipertrigliceridemia (HTG)], prevalente nos pacientes com DF em diferentes populações e etnias, há poucos relatos de associação de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) de genes relacionados ao metabolismo de lipídios. A HTG na DF foi fortemente correlacionada com marcadores de

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321

Bairro: Santa Eligênia

CEP: 30.130-110

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3768-4587

Fax: (31)3768-4600


E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br


SIGED



00026888 2321 2015

Anote abaixo o número do SIPRO

 FUNDAÇÃO HEMOMINAS		DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	CCD:
1. Título do Projeto de Pesquisa: Estudos diagnóstico e avaliativo de biomarcadores de dislipidemias em indivíduos com doença falciforme (genótipos HbSS e HbSC) acompanhados nos Hemocentros de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas.			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL:			
2. Nome: Cibele Velloso Rodrigues			
3. Instituição a que pertence: Universidade Federal de Juiz de Fora - ICB			
4. Endereço: Rua Israel Pinheiro, 2000, Campus da Univale II, Bairro São Pedro. CEP 35.020-220. Governador Valadares.			
5. Telefone: (031) 98803-2353 / (033) 991506745		6. E-mail: cibele.veloso@ufjf.edu.br	
EQUIPE AUTORIZADA PARA CONSULTA DOS PRONTUÁRIOS MÉDICOS:			
7. Nomes: Cibele Velloso Rodrigues Antônio Frederico de Freitas Gomides Hélio Moraes de Souza André Rolim Belisário Maria Anete Santana Valente Renata Andréia Volpe Stela Brener Vertchenko Ana Paula Pinho Santos			
PRAZO DO ESTUDO:			
8. Data de aprovação no CEP: 03/07/2015			
9. Data de Início: 23/02/2015		10. Data de Término: 28/02/2020	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP:			
11. Comentário:			
12. Coordenador do CEP: Daniel Gonçalves Chaves			12/06/2017 Data


 Daniel Gonçalves Chaves
 Chefe do Serviço de Pesquisa
 MASP: 1263172-7 CRB 04932-6
 Fundação Hemominas

Anexo II
MANUAL REVISTA HU

Link das normas da revista:

<https://periodicos.ufjf.br/public/journals/1/Diretrizesparaautores2019.pdf>