



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA *CAMPUS* GOVERNADOR
VALADARES
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

KÊNIA DE ASSIS BOY

**AVALIAÇÃO FARMACOGENÉTICA DE RESPOSTA AO USO DA
HIDROXIUREIA EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME ATENDIDOS
NO HEMOCENTRO REGIONAL DE GOVERNADOR VALADARES**

**GOVERNADOR VALADARES -MG
2018**

KÊNIA DE ASSIS BOY

**AVALIAÇÃO FARMACOGENÉTICA DE RESPOSTA AO USO DA
HIDROXIUREIA EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME ATENDIDOS
NO HEMOCENTRO REGIONAL DE GOVERNADOR VALADARES**

A apresentação dessa dissertação é requisito parcial do Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora - *Campus* Governador Valadares, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Pâmela Souza Almeida Silva Gerheim

Coorientador: Prof^o Dr^o Ivarne Luís Santos Tersariol

Governador Valadares
2018

KÊNIA DE ASSIS BOY

**AVALIAÇÃO FARMACOGENÉTICA DE RESPOSTA AO USO DA
HIDROXIUREIA EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME ATENDIDOS
NO HEMOCENTRO REGIONAL DE GOVERNADOR VALADARES**

Dissertação de curso de pós graduação apresentada ao Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora - *Campus* Governador Valadares como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Vanessa de Almeida Belo
Faculdade de Medicina de Barbacena

Prof^a. Dr^a. Cibele Velloso Rodrigues
Universidade Federal de Juiz de Fora – *Campus* Governador Valadares

Prof^a. Dr^a. Pâmela Souza Almeida Silva Gerheim – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esse trabalho a todas as pessoas com doença falciforme pois compreendo que as dificuldades são muitas e as lutas são diárias

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo cuidado e proteção permanente em minha vida, além da permissão em concluir esse desafio pessoal e profissional.

Ao meu querido marido **Simonton** por se flexibilizar em atender o meu desejo e por muitas vezes suprir a minha ausência com as crianças.

Aos meus amados filhos **Davi, Alice e Elisa** por tornarem a caminhada mais leve, encherem os meus dias de alegria e completarem de amor meu coração.

À tia **Madalena**, vovó **Rose**, vovó **Águida**, vovó **Cleuza**, tio **Tales** e titia **Fátima** por serem “mães” enquanto não estive presente.

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Pâmela Souza Almeida Silva Gerheim** pela brilhante orientação e por me conduzir com tanta sabedoria e paciência pelos caminhos técnicos e científicos, um exemplo profissional e pessoal.

Aos amigos e parceiros do Hemocentro de Governador Valadares especialmente a técnica de enfermagem **Socorro**, enfermeira **Mirna**, médica **Ana Paula** e secretários **Juliano** e **Denisson**, sem a ajuda de vocês não seria possível a conclusão deste trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica **Cleonice, Luisa, Daniel, Jéssica, Paula, Brisa, Olívia, Leda** e **Ana Carolina** pelo valioso apoio; onde agradeço também o companheirismo e auxílio das amigas de turma e laboratório **Tháisa** e **Nilcemar**, além das amigas de caminhada **Jenifer, Mariany, Kátia e Elaine**.

Aos dedicados professores **Dr^a Raquel Tognon Ribeiro, Dr^a Regina Gendzelevski Kelmann** e **Dr^o Leonardo Meneghin Mendonça** pela parceria e suporte técnico no decorrer da pesquisa.

Às professoras **Dr^a Vanessa de Almeida Belo** e **Dr^a Cibele Velloso Rodrigues** por gentilmente aceitarem o convite em compor a banca avaliadora.

Ao Laboratório Integrado de Pesquisa do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do ICB da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da UFJF - *campus* Governador Valadares (PMBqBM/UFJF-GV) pela oportunidade e parceria.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto de pesquisa (Processos APQ-02608-14, APQ-03560-13) e à Fundação Hemominas, pela parceria para realização da presente pesquisa.

*“... valeu falciforme,
por acabar com a minha vida,
me tirando a oportunidade
de ter uma vida!
Me tirando as oportunidades
de ter um trabalho fixo,
ter uma estrutura
financeira, carreira,
destruindo os meus sonhos...
Uma vida inteira de dor,
frustração e desilusão.”*

(Trecho do depoimento de uma jovem com anemia falciforme)

RESUMO

A doença falciforme (DF) é um grave problema de saúde pública mundial, com grande impacto na morbimortalidade da população acometida. Até o momento, a hidroxiureia (HU) é considerada a terapia farmacológica de maior sucesso para a DF, pois promove redução do número e gravidade dos eventos falcêmicos, melhora os parâmetros hematológicos, reduz o número de internações e aumenta a expectativa e qualidade de vida dos pacientes. Ainda que sejam evidentes os benefícios do tratamento com HU, existe grande variabilidade interindividual de resposta farmacológica e os fatores genéticos parecem estar associados, em parte, a essa variação. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar se polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em quatro genes candidatos relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica da HU afetam a resposta hematológica a tal fármaco. Para tanto, foram avaliados 185 pacientes com DF tratados (n=93) ou não tratados (n=92) com HU. Os níveis médios de hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct), reticulócitos (Rtc) e leucometria global (LG) foram medidos em cinco diferentes tempos ao longo de 18 meses, enquanto a concentração de hemoglobina fetal (HbF) foi analisada antes e após o tratamento farmacológico. Os pacientes foram agrupados como “respondedores” à HU se os níveis de HbF estivessem maiores que 20%, enquanto aqueles pacientes com níveis inferiores a esse foram considerados como “não respondedores”. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total e amostras foram então genotipadas por PCR em tempo real (qPCR) para os polimorfismos G>T (rs1799983) e T>C (rs2070744) no gene da *eNOS*, C>T (rs17599586) da *ARG1*, A>C (rs766432) e G>A (rs4671393) do *BCL11A* e G>A (rs9960464) do gene do *UTA*. As análises de associação entre as variáveis categóricas foram feitas pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Para as variáveis contínuas com distribuição normal, as análises foram realizadas utilizando ANOVA seguido pelo teste t não pareado e as variáveis que não seguiram distribuição normal foram analisadas pelos testes de Wilcoxon, Kruskal-Wallis seguidos por Mann-Whitney. As análises por regressão multivariada e logística foram realizadas através do método *stepwise* pelo *software* R. A população estudada apresentou idade de $15,8 \pm 11,3$ anos e foi constituída de 54% de voluntários do sexo masculino. As frequências genotípica e alélica para os seis SNPs estudados apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg e foram semelhantes àquelas encontradas em outras populações. Pacientes com o genótipo GT para o polimorfismo no rs1799983 do gene da *eNOS* apresentaram maiores valores de Hb quando comparados aos homozigotos para o alelo G ($r=0,364$; $p=0,033$). Adicionalmente, a frequência dos genótipos AC e CC no gene *BCL11A* (polimorfismo A>C rs766432) foi maior entre os pacientes respondedores quando comparado ao grupo dos não respondedores ($p=0,03$). Além disso, pacientes com o genótipo GA para o polimorfismo no gene *UTA* também responderam melhor à terapia com HU quando comparados àqueles com o genótipo GG ($p=0,005$). Não foram encontradas outras influências significativas nos demais polimorfismos avaliados após análise por regressão logística. Em conclusão, este trabalho é pioneiro ao avaliar a influência de polimorfismos nos genes da *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA* na resposta à HU em pacientes com doença falciforme em Minas Gerais. Os achados nos sugerem que pacientes com genótipo GT no rs1799983 do gene da *eNOS* apresentam maiores valores de Hb quando comparados com genótipo GG. Os polimorfismos A>C (rs766432) no gene do *BCL11A* ($p=0,001$) e G>A (rs9960464) do gene *UTA* ($p=0,005$) parecem afetar a resposta hematológica à HU, sendo que pacientes que possuem pelo menos uma cópia do alelo de menor frequência possivelmente apresentam maior chance de resposta ao tratamento farmacológico.

Palavras-chave: Doença Falciforme. Hidroxiureia. Polimorfismo. Farmacogenética.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a serious global public health problem, with great impact on the morbidity and mortality of the affected population. To date, hydroxyurea (HU) is considered the most successful pharmacological therapy for SCD since it promotes a reduction in the number and severity of sickle cell events, improves hematological parameters, reduces the number of hospitalizations and increases the expectation and quality of life of the patients. Although the benefits of the treatment with HU are evident, there is a large inter-individual variability of pharmacological response and genetic factors seem to be partially associated with this variation. Thus, the aim of the present study is to investigate whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in four candidate genes related to the pharmacokinetics and pharmacodynamics of HU affect the hematological response to such a drug. For this, 185 patients were evaluated with SCD, treated with HU (93) or untreated (92). The mean hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), reticulocytes (Rct) and global leukometry (LG) levels were measured at five different times over 18 months, while fetal hemoglobin (HbF) levels were analyzed before and after pharmacological treatment. Patients were grouped as "responders" to HU if HbF levels were higher than 20%, while those patients with levels below this value were considered "non-responders". Genomic DNA was extracted from the whole blood and samples were then genotyped by real-time PCR (qPCR) for the polymorphisms G>T (rs1799983) and T>C (rs2070744) on the *eNOS* gene, C>T (rs17599586) of *ARG1* gene, A>C (rs766432) and G>A (rs4671393) of the gene *BCL11A* and G>A (rs9960464) of the *UTA* gene. The analysis of the association between the categorical variables was done by chi-square test or Fisher's exact test. For continuous variables with normal distribution, analyses were performed using ANOVA followed by the unpaired t-test and the variables that did not follow normal distribution were analyzed by the Wilcoxon, Kruskal-Wallis tests followed by Mann-Whitney. The multivariate and logistic regression analyses were performed through the stepwise method by software R. The population studied presented a mean age of 15.8 ± 11.3 years and was made up of 54% of male volunteers. The genotypic and allelic frequencies for the six SNPs studied were in Hardy-Weinberg equilibrium and were similar to those found in other populations. Patients with the GT genotype for rs1799983 polymorphism of the *eNOS* gene showed higher Hb values when compared to patients homozygous for the G allele ($r=0,364$; $p=0,033$). In addition, the frequency of AC and CC genotypes in the *BCL11A* gene (A>C polymorphism rs766432) was higher among the responders when compared to the non-responders group ($p=0,03$). In addition, patients with the GA genotype for the *UTA* gene polymorphism also responded better to HU therapy when compared to those with the GG genotype ($p=0,005$). No other significant influences were found in the other polymorphisms evaluated after logistic regression analysis. In conclusion, this work is a pioneer in evaluating the influence of polymorphisms in *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* and *UTA* genes in the response to HU in patients with sickle cell disease in Minas Gerais. The findings suggest that patients with the GT genotype for rs1799983 of the *eNOS* gene showed higher Hb values when compared to GG genotype. The A> C polymorphisms (rs766432) in the *BCL11A* ($p=0,001$) and G> A gene (rs9960464) of the *UTA* gene ($p=0,005$) appear to affect the hematological response to HU, and patients who have at least one copy of less frequent allele may present higher chance of respond to pharmacological treatment.

Keywords: Sickle Cell Disease. Hydroxyurea. Polymorphism. Pharmacogenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência da Doença Falciforme(*) em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde (DRS) - Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais - 1998/2001	16
Figura 2: Ontogênese das cadeias globínicas e locus do gene da β -globina	21
Figura 3: Representação esquemática do processo de polimerização da HbS	26
Figura 4: Disfunção endotelial causada pela hemólise	29
Figura 5: Representação esquemática dos benefícios da Hidroxiureia na doença falciforme	39
Figura 6: Associação dos níveis de hemoglobina e os genótipos para o rs1799983 no gene da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) em pacientes com doença falciforme tratados com Hidroxiureia (n=93)	59
Figura 7: Avaliação dos níveis de hemoglobina (painel A), hematócrito (painel B), leucometria global (painel C) e reticulócitos (painel D) ao longo de 5 momentos em pacientes não tratados (controle) ou tratados com Hidroxiureia (HU)	63
Figura 8: Frequências de distribuição dos genótipos (%) para os polimorfismos nos genes da eNOS, ARG1, BCL11A e UTA em pacientes com doença falciforme classificados como respondedores (n=23) ou não respondedores (n=70) à Hidroxiureia	64
Figura 9: Valor esperado e intervalo de 95% de confiança para a probabilidade de resposta de pacientes com doença falciforme tratados com Hidroxiureia (n=93) conforme modelo de regressão logística selecionado via método stepwise	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Incidência de nascidos vivos com anemia ou traço falciforme em alguns estados brasileiros que realizam a triagem neonatal	15
Tabela 2: Gene, referência do SNP, localização do cromossomo, localização no gene, troca de base nitrogenada e identificação dos ensaios utilizados	52
Tabela 3: Caracterização dos 185 pacientes com doença falciforme em uso ou não de Hidroxiureia (HU) acompanhados pelo Hemocentro Regional de Governador Valadares.....	55
Tabela 4: Frequência dos SNPs para os genes da eNOS, ARG1, BCL11A e UTA em pacientes com doença falciforme atendidos no Hemocentro Regional de Governador Valadares	56
Tabela 5: Frequência dos seis SNPs para os genes eNOS, ARG1, BCL11A e UTA em pacientes agrupados conforme hemoglobinopatia SS e SC atendidos no Hemocentro Regional de Governado Valadares	57
Tabela 6: Parâmetros hematológicos conforme os genótipos para os SNPs nos genes da eNOS, ARG1, BCL11A e UTA em pacientes com doença falciforme não tratados com Hidroxiureia atendidos no Hemocentro Regional de Governador Valadares	58
Tabela 7: Modelo multivariado associando os níveis de hemoglobina em pacientes com doença falciforme tratados com Hidroxiureia.....	59
Tabela 8: Associação dos biomarcadores bioquímicos em 83 pacientes com anemia falciforme tratados com HU com genótipos para o rs1799983 no gene da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS).....	61
Tabela 9: Avaliação dos parâmetros hematológicos dos pacientes com doença falciforme (n=93) antes e após o tratamento com Hidroxiureia (HU)	62
Tabela 10: Tabela de análise de deviance, via método stepwise do modelo de regressão logística, para as variáveis preditoras do perfil de resposta à Hidroxiureia em pacientes com doença falciforme (n=93)	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 DA HEMOGLOBINA NORMAL ÀS HEMOGLOBINAS VARIANTES	19
2.1.1 A molécula de hemoglobina	19
2.1.2 Hemoglobinopatias e a Doença Falciforme	22
2.1.3 A geografia da HbS	23
2.2 A FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME.....	24
2.2.1 A falcização da HbS.....	24
2.2.2 A patogenia da vaso-oclusão.....	27
2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA FALCIFORME.....	30
2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME	34
2.4.1 A farmacologia da Hidroxiureia (HU).....	36
2.5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA A HU	42
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL.....	47
3.1.1 Objetivos específicos.....	47
4 METODOLOGIA e CASUÍSTICA	48
4.1 CASUÍSTICA.....	48
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.2.1 Coleta de sangue periférico e separação do camada leucocitária	49
4.2.2 Extração e quantificação do gDNA.....	50
4.2.3 Genotipagem	51
4.2.4 Análises estatísticas	52
5 RESULTADOS	55
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICE	97
ANEXOS	104

Abreviaturas, siglas e símbolos

A	Base nitrogenada adenina
AF	Anemia falciforme
ARAB	Haplótipo Árabe Indiano
<i>ARG1</i>	Gene que codifica a arginase do tipo 1
Asp	Aminoácido aspartato
AUC	Área sobre a curva
<i>BCL11A</i>	Gene <i>B cel lymphoma 11A</i>
BEN	Haplótipo Benin
C	Base nitrogenada citosina
CAM	Haplótipo Camarões
CAR	Haplótipo da República Centro Africana
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
C _{máx}	Concentração plasmática máxima
eNOS	Sintase do óxido nítrico constitutiva
CO ₂	Dióxido de carbono
DF	Doença falciforme
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTM	Dose tolerada máxima
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
<i>eNOS</i>	Gene que codifica a sintase do óxido nítrico endotelial
G	Base nitrogenada guanina
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genômico
Glu	Aminoácido glutamato (ácido glutâmico)
GM-CSF	Fator estimulador de granulócitos e macrófagos
GSH-Px	Glutationa peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina normal do adulto A
HbA2	Hemoglobina variante da hemoglobina normal A
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina variante S

HbSA	Genótipo heterozigoto para hemoglobina S (traço falciforme)
HbSC	Genótipo heterozigoto composto, hemoglobinopatia do tipo SC
HbSD _{Punjab}	Genótipo heterozigoto composto, hemoglobinopatia S com D Punjab
HbSS	Genótipo homozigoto para hemoglobina S (anemia falciforme)
HbS β^+ -talassemia	Genótipo heterozigoto composto, hemoglobinopatia S com talassemia beta mais
HbS β^0 -talassemia	Genótipo heterozigoto composto, hemoglobinopatia S com beta talassemia beta zero
<i>HBA</i>	Gene da alfa globina
<i>HBB</i>	Gene da beta globina
<i>HBD</i>	Gene da delta globina
<i>HBG</i>	Gene da gama globina
<i>HBZ</i>	Gene da zeta globina
Hct	Hematócrito
HO	Hidroxila
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HU	Hidroxiureia
HWE	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível
LCR	Região controladora de locus
LG	Leucograma
mRNA	Mensageiro de ácido ribonucleico
nNOS	Sintase do óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PETN	Programa Estadual de Triagem Neonatal
PHHF	Persistência hereditária de hemoglobina fetal
PNADF	Programa Nacional de Atenção a Doença Falciforme
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RNA	Ácido ribonucleico
RNM	Ressonância nuclear magnética
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
Rtc	Reticulócito
SEN	Haplótipo Senegal
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SOD	Superóxido dismutase
STA	Síndrome torácica aguda
T	Base nitrogenada timina
TCTH	Transplante de células tronco hematopoéticas
TGF- β	Fator de crescimento de células T do tipo beta
T _{máx}	Tempo para concentração plasmática máxima
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UTA	Gene que codifica transportadores de ureia A
Val	Aminoácido valina
VCAM	Moléculas de adesão celular-vascular
vWF	Fator de von Willebrand
α	Alfa
β	Beta
β^S	Alelo variante beta S
γ	Gama
δ	Delta
ϵ	Épsilon
ζ	Zeta

1 INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é uma hemoglobinopatia, a qual se apresenta como um grave problema de saúde pública mundial, com grande impacto na morbimortalidade da população acometida. Trata-se de um termo que abarca um conjunto de desordens genéticas, caracterizadas pela presença de pelo menos um alelo variante da hemoglobina S (HbS) do gene HBB. A presença desse alelo variante β^S leva a defeitos estruturais na molécula da hemoglobina, tornando sua estrutura polimerizada e rígida quando desoxigenada, adquirindo um formato semelhante a uma foice (equivalente ao termo em inglês *sickle*) (BENDER, 2017).

Os genótipos HbSS, HbSC, HbS β^+ -talassemia, HbS β^0 -talassemia e HbSD_{Punjab} destacam-se como os de maior importância em Minas Gerais (SABARENSE, 2014). Dentre esses, os pacientes que possuem a variante S em homozigose (genótipo HbSS) apresentam o quadro de anemia falciforme (AF), que revela maior gravidade clínica e hematológica dentre os pacientes com DF (FERNANDES et al., 2010). Por outro lado, pacientes com o genótipo heterozigoto apresentando a hemoglobina normal A (HbA) e a forma variante S (HbS) são denominados de traço falciforme (HbAS), sendo comumente assintomáticos em condições fisiológicas (BRASIL, 2015).

Além de anemias que podem variar de intensidade moderada a grave, pacientes com AF apresentam episódios dolorosos e frequentes de vaso-oclusão, risco permanente de infecções, de síndrome torácica aguda (STA), de acidente vascular cerebral (AVC), de priapismo e retinopatia, além de hipertensão pulmonar e danos cumulativos em múltiplos órgãos (BENDER, 2017).

Conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 270 milhões de pessoas, o equivalente à 7% da população mundial, carregam genes que codificam para uma hemoglobina variante (GOMES; CALDEIRA, 2010; SIMÕES et al., 2010). No que se refere à AF, há estimativas de 250 mil nascimentos anuais, o que corresponde a uma frequência de 2,4 crianças afetadas para cada mil nascimentos no mundo (AYGUN; ODAME, 2012).

No Brasil, o alelo β^S foi difundido ao longo de 300 anos de tráfico de escravos, da migração interna e da diferente miscigenação entre as regiões, apresentando distribuição bastante heterogênea entre os estados (Tabela 1). Estima-se que o número de indivíduos com traço falciforme seja de mais de 7 milhões, com prevalência na população geral entre 2 e 8% (FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010). Adicionalmente, a estimativa da prevalência de indivíduos

com DF no Brasil é de 25 a 30 mil, com uma incidência de 3,5 mil casos a cada ano (BRASIL, 2012).

Na Bahia é observada a maior frequência da DF, em torno de 9,8% de pessoas com traço falciforme (HbAS), o que corresponde a incidência de 1:17, enquanto são observados 0,2% de homozigotos (HbSS) correspondente a 1:650 nascidos vivos (Tabela 1). Em contrapartida, Santa Catarina e Paraná apresentam a menor frequência de novos casos SS e traço falciforme, com incidência proporcional de 1:13.500 e 1:65, respectivamente (Tabela 1) (ALELUIA et al., 2017).

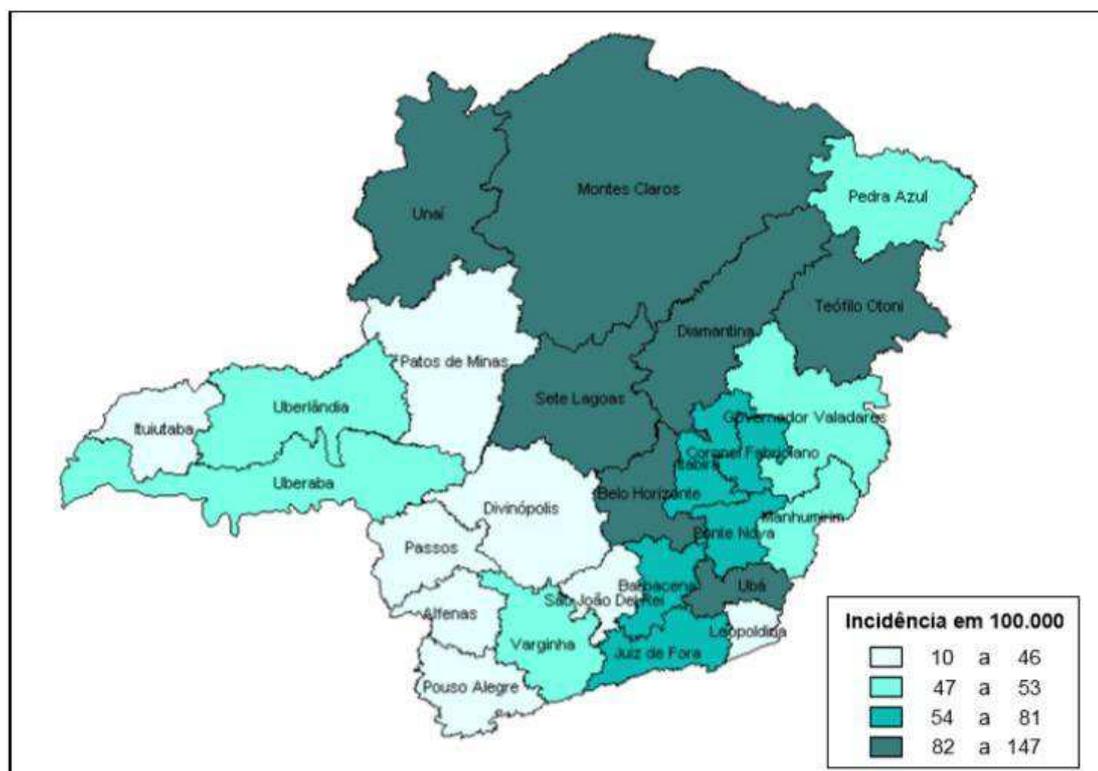
Tabela 1: Incidência de nascidos vivos com anemia ou traço falciforme em alguns estados brasileiros que realizam a triagem neonatal

Estados	Incidência Anemia Falciforme	Incidência Traço Falciforme
Bahia	1:650	1:17
Rio de Janeiro	1:1.300	1:20
Minas Gerais, Pernambuco, Maranhão e Goiás	1:1.400	1:23
Espírito Santo	1:1.800	1:28
São Paulo	1:4.000	1:30
Rio Grande do Sul	1:11.000	1:35
Santa Catarina e Paraná	1: 13.500	1:65

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (2012)

Em Minas Gerais, a prevalência do traço falciforme é de 3,3%, com incidência de 1:30, enquanto para a AF é de, aproximadamente, 1:1.400 recém-nascidos vivos (Tabela 1). Adicionalmente, a distribuição da DF não é uniforme em todo o estado de Minas Gerais, sendo a incidência maior para as regiões norte e nordeste (Figura 1).

Figura 1: Incidência da Doença Falciforme(*) em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde (DRS) - Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais - 1998/2001



(*) Inclui fenótipos: HbSS, Hb SC, Hb S/ β^0 tal, Hb S/ β^+ tal, HbS/D_{Punjab}. Fonte: Januário (2002)

Diante do reconhecimento que a DF é prevalente e impactante na saúde pública, em 2001, a pesquisa de hemoglobinopatias foi incluída através do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), por meio da Portaria nº 822/01, sendo precedido pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal da Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais, que implantou de forma pioneira a triagem para hemoglobinopatias desde março de 1998 (SABARENSE et al., 2015). O PETN-MG abrange todos os municípios do estado, e sua cobertura atual é de 94% de nascidos vivos (ERIDANI; MOSCA, 2011).

Um relevante estudo surgiu a partir de dados obtidos do referido programa mineiro, o qual comparou a ocorrência de óbitos em crianças com DF em dois diferentes períodos do PETN-MG: entre os anos de 1998 e 2004 (os primeiros seis anos do programa) e entre os anos de 2006 e 2012 (SABARENSE, 2014). Importaneamente, a maioria das crianças com DF foi triada até 8 dias de vida, revelando o aperfeiçoamento do Programa e a maior conscientização dos pais quanto ao diagnóstico precoce. Apesar disso, não houve redução da taxa de mortalidade até sete anos entre os dois períodos avaliados, sendo que essas foram de 5,43% para crianças

nascidas entre 1998-2005 e de 5,12% para aquelas nascidas entre 2005-2012 (SABARENSE et al., 2015). Pouco mais da metade de todos os óbitos registrados concentraram-se na faixa etária até dois anos de idade e 75% ocorreram até cinco anos, sendo a infecção a principal causa atribuída ao desfecho. Adicionalmente, a maioria dos óbitos (79,3%) ocorreram em crianças com perfil SS. A sobrevida estimada para essas crianças aos 3 anos foi de 91,4%, com redução para 90% aos 5 anos durante os anos iniciais de existência do PETN-MG, não havendo diferença estatística significativa em relação a esse percentual de sobrevivência quando comparado aos seis anos posteriores. Tais achados refletem que, apesar dos avanços relacionados ao diagnóstico precoce, não houve significativo incremento da sobrevivência desses pacientes (SABARENSE, 2014; SABARENSE et al., 2015). Tais taxas de mortalidade apontadas no estudo são superiores à média mundial, na qual as hemoglobinopatias representam 3,4% dos óbitos em crianças abaixo de 5 anos, aproximando-se da taxa de mortalidade encontrada na África, que atinge 5% (ARDUINI et al., 2017).

Dados mais recentes obtidos no estado do Rio de Janeiro apontam que 56,5% das mortes por DF ocorrem em crianças com até 2 anos de idade e esse índice pode chegar a 76,7% se considerar crianças até 5 anos (ARDUINI et al., 2017). Diante desse cenário, faz-se importante destacar que a expectativa de vida do brasileiro com AF é reduzida à 53 anos, enquanto a média nacional é de 75 anos de idade (ARDUINI et al., 2017; LERVOLINO et al., 2011; LOBO et al., 2017).

Seguindo na tentativa de ampliar o cuidado, de melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida dessa população, o Ministério da Saúde instituiu a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias, mediante Portaria nº 1018/05. Nessa mesma lógica, foi aprovado o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para o tratamento da Doença Falciforme através da Portaria da Secretaria de Atenção à Saúde/ Ministério da Saúde nº 55/10, o qual fornece orientações capazes de nortear e subsidiar o manejo desses pacientes (BRASIL, 2012).

Nesse contexto, a hidroxiureia (HU) constitui o principal agente farmacológico utilizado no tratamento dos indivíduos com DF, diminuindo a morbidade e a mortalidade da doença em adultos e crianças (BRASIL, 2010). Apesar desses benefícios clínicos, o mecanismo através do qual a HU os exerce não são completamente conhecidos. Tal fármaco é um inibidor da ribonucleotídeo redutase, usado também no tratamento de uma série de desordens mieloproliferativas. A eficácia da HU é atribuída em parte à sua capacidade de estimular a

produção de hemoglobina Hb fetal (HbF), diminuir a concentração de HbS e com isso reduzir o número de episódios de crises álgicas (ALGIRAIGRI; KASSAM 2017). A capacidade de a HU em aumentar a HbF varia entre os pacientes, o que sugere que a HU possa beneficiá-los através de mecanismos adicionais. Esses incluem a redução do número de células brancas, plaquetas e reticulócitos; a redução na adesão das células falciformes mediada pela diminuição da expressão de moléculas de adesão; além da indução da formação de óxido nítrico (GRAVIA et al., 2014; RAHIM et al., 2013).

Apesar dos evidentes benefícios do tratamento com a HU, existe grande variabilidade de resposta farmacológica, sendo que aproximadamente 25% das pessoas não apresentam resposta satisfatória ao fármaco (QUINN et al., 2010; TEINBERG et al., 2003). Sabe-se que parte dessa falha na resposta farmacológica deve-se a fatores genéticos. No entanto, poucos ainda são os estudos nessa área. Por essa razão, o presente trabalho tem por objetivo ampliar o conhecimento acerca da influência dos polimorfismos em genes candidatos relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica da HU em pacientes com doença falciforme atendidos no Hemocentro Regional de Governador Valadares, ampliando assim os dados referentes à população brasileira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DA HEMOGLOBINA NORMAL ÀS HEMOGLOBINAS VARIANTES

2.1.1 A molécula de hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular oligomérica que está presente nos eritrócitos (hemácias) sendo constituída de quatro subunidades: duas cadeias do tipo alfa-globina (α) e duas cadeias do tipo beta-globina (β), mantidas em um quaternário proteico por ligações não covalentes (LUBERT, 2014; PERUTZ, et al., 1960). A estrutura tetramérica de formato globular são as mesmas nas hemoglobinas embrionárias (Gower-1, Gower-2 e Portland), nas hemoglobinas Fetal (HbF), HbA e HbA2 (BANK, 2006).

O peso molecular da Hb humana é de aproximadamente 64.500 daltons, com discretas variações entre os diferentes tipos, apresentando o diâmetro aproximado de 5,5 nm, com uma configuração globular e ligeiramente achatada. Todas as moléculas de Hb, seja embrionária, fetal ou pós nascimento, possuem 574 aminoácidos, onde 282 compõem as globinas α (141 aminoácidos por globina) e 292 na composição globínica β (146 aminoácidos por globina) (NELSON; COX, 2014).

Além das cadeias globínicas, a molécula de Hb contém o grupo heme, formado pelo grupamento prostético protoporfirina IX que se liga ao átomo de ferro em estado ferroso (Fe^{+2}), onde o O_2 vai se ligar. O grupamento heme possui sítios de ligação para facilitar a associação e a liberação de O_2 para os tecidos e, para cada molécula de Hb, é possível a combinação entre quatro moléculas de O_2 simultaneamente. A síntese do grupo heme ocorre nas mitocôndrias ao mesmo tempo em que são produzidas as globinas α e β (LUBERT, 2014).

A estabilidade molecular das diferentes hemoglobinas (embrionárias, fetal, A e A2) dependem do arranjo estrutural que compõe as duas cadeias globínicas (α e β) e, apesar das sequências de aminoácidos dessas cadeias serem diferentes, as estruturas tridimensionais desses dois grupos são muito parecidas. A conformação globular se deve à extensa disposição helicoidal dos polipeptídeos que compõem as globinas e representa 75% do total da sua estrutura (CHINELATO, 2014; CHINELATO; CARROCINI; BONINI-DOMINGOS, 2011).

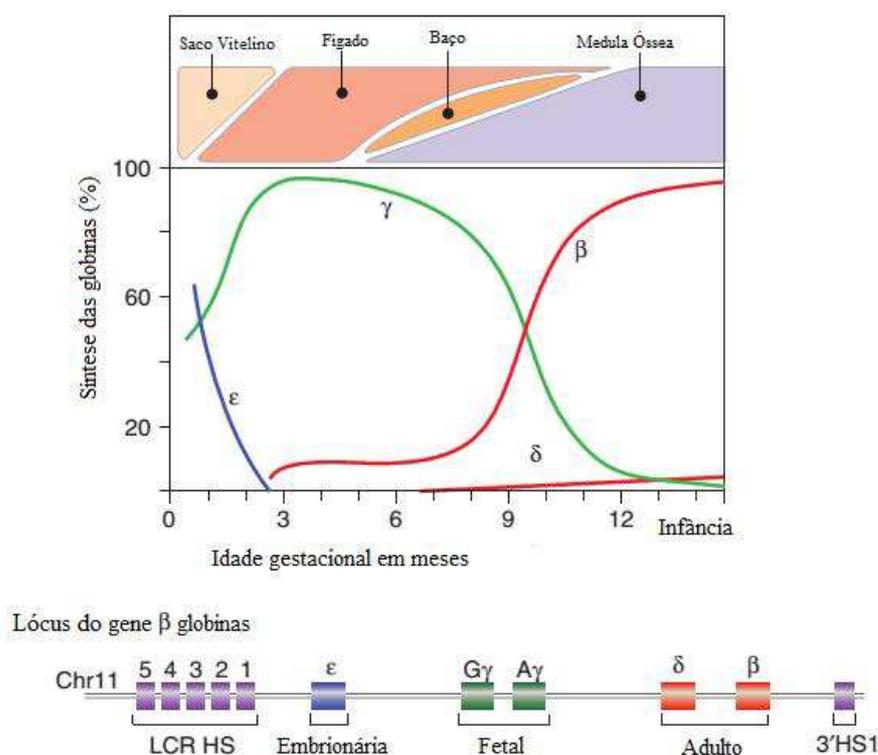
A síntese das cadeias globínicas requer um rigoroso controle genético, sendo que os genes responsáveis estão separados em dois agrupamentos (*clusters*). No *cluster* α se encontram o gene *HBA* que codifica cadeias do tipo alfa e o gene *HBZ* responsável por codificar globinas do tipo ζ (zeta), estes se encontram na região telomérica do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) em um segmento de 40 kilobases (kb) do DNA. Por outro lado, a produção de globinas do tipo γ (gama) é controlada pelo gene *HBG*, globinas do tipo δ (delta) pelo gene *HBD*, globinas do tipo ϵ (épsilon) pelo gene *HBE* e o gene *HBB* codifica as globinas β , esses constituem o *cluster* β que se situa no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) em um segmento de DNA de 60 kb (Figura 2) (FRIEDRISCH, 2015).

Existe um complexo sistema de supressão e ativação gênica que determina a ontogenia humana e é responsável pelas combinações de diferentes cadeias globínicas (Figura 2). A hematopoese se inicia no saco vitelino, durante o período embrionário, com predomínio de hemoglobinas do tipo Gower-1 ($\delta 2\epsilon 2$), Portland-1 ($\delta 2\gamma 2$), Gower-2 ($\alpha 2\epsilon 2$) e Portland-2 ($\delta 2\beta 2$), que permanece até o terceiro mês de gestação. A partir daí, observa-se uma produção elevada de cadeias α e γ ainda intra útero para formar a hemoglobina fetal (HbF - $\alpha 2\gamma 2$) (SANKARAN et al., 2010).

A baixa afinidade pelo O_2 presente nas hemoglobinas Gower-1 e 2 permite uma rápida liberação de O_2 nas fases embrionárias iniciais. A Hb do tipo Portland-1 por apresentar globina γ em sua composição possui maior afinidade pelo O_2 e sua presença está na transição entre embrião e feto. Na fase fetal, há predomínio da HbF, com alta afinidade pelo O_2 que é muito requerido nessa fase do desenvolvimento (BANAN, 2013).

A HbF predomina durante a maior parte do período fetal e ainda no recém-nascido, com um declínio para pequenas concentrações até o primeiro ano de vida em indivíduos sem disfunções. Por sua vez, enquanto a HbF é suprimida, ocorre a síntese de HbA ($\alpha 2\beta 2$) e HbA2 ($\alpha 2\delta 2$), que permanecem pela vida adulta. Após o primeiro ano de nascimento ocorre a prevalência de HbA que compõe mais de 95% de Hb totais, enquanto a HbA2 fica em torno de 3% e a HbF quase desaparece com índice inferior a 2% (Figura 2) (SANKARAN; ORKIN, 2012).

Figura 2: Ontogênese das cadeias globínicas e lócus do gene da β -globina



Representação esquemática das fases do desenvolvimento ontogênico das cadeias globínicas desde o período pré nascimento até a primeira infância, com os principais sítios de eritropoese e distribuição dos níveis das diferentes globinas em porcentagem. Logo abaixo o *Cluster* de genes da β -globina (ϵ , γ , δ , e β) com sua respectiva região controladora do *locus* (LCR) importante regulador na expressão desses genes, localizados no cromossomo 11. Fonte: Adaptado de Sankaran; Orkin (2012)

A HbA é a molécula mais representativa após o nascimento e evolutivamente a mais capaz para desempenhar funções como o transporte de gases e a participação no controle do pH sanguíneo (equilíbrio ácido-básico). A HbA é considerada o padrão físico-químico, genético e molecular e, a partir dela, todos os outros tipos de Hb, quer sejam normais, variantes ou instáveis, têm suas estruturas moleculares e demais atividades a ela comparada (NAOUM; NAOUM, 2004).

Apesar das diferentes funções apresentadas pelas diferentes moléculas de hemoglobina ao longo do desenvolvimento humano, as cadeias globínicas apresentam estruturas bastante similares, o que sugere que tenham vindo de um ancestral comum (NAGEL et al., 2003).

2.1.2 Hemoglobinopatias e a Doença Falciforme

Hemoglobinopatias são alterações que afetam as hemoglobinas e tanto podem envolver a síntese estrutural ou quantitativa dos aminoácidos que formam as cadeias globínicas, ou mesmo as moléculas e enzimas que participam da formação do grupo heme. As alterações globínicas muitas vezes acontecem por modificações nos genes responsáveis pela sequência, estrutura ou regulação na síntese equilibrada dos *clusters* de globinas do tipo α e β (LIMA et al., 2003).

Alterações em genes que determinam o ritmo de síntese das cadeias globínicas podem gerar uma deficiência quantitativa parcial ou total na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas da globina. Tal fato determina as hemoglobinopatias conhecidas como talassemias que podem ser do tipo α ou do tipo β consoante a cadeia cuja síntese esteja afetada (α -talassemias ou β -talassemias), respectivamente (BORG et al., 2012).

Já nas hemoglobinopatias de origem estrutural podem ocorrer, caso algum gene responsável pela codificação de globinas apresente substituição ou troca em alguma de suas bases nitrogenadas. Isso poderá acarretar a formação de moléculas de Hb com características bioquímicas distintas do padrão, ou seja, da HbA, e por essas alterações, denominam-se como hemoglobinas variantes. Já foram identificados diversos tipos de hemoglobinas variantes, sendo as de maior frequência e importância clínica a HbS, HbC, HbD e a HbE (SILVA, 2012). Dentre essas, a HbS apresenta maior relevância, sendo seu surgimento proveniente da troca da base nitrogenada adenina (A) pela timina (T) no sexto códon do gene da β globina (GAG para GTG), provocando a troca do aminoácido ácido glutâmico (polar) pela valina (apolar) (BRASIL, 2002; ZAMARO et al., 2006).

As moléculas de HbS possuem a mesma capacidade de ligação ao O_2 , porém essa alteração de base nitrogenada gera um motivo hidrofóbico nessa Hb e quando se encontra desoxigenada leva à ligação entre duas cadeias β de duas moléculas diferentes de Hb. Tal ligação favorece a formação de polímeros que se estendem, precipitam e preenchem todo o eritrócito, alterando sua arquitetura, flexibilidade e, principalmente, sua forma, de globular para rígidas e não deformáveis adquirindo um formato semelhante a uma foice (eritrócitos falcizados) (XU et al., 2009).

Quando a HbS se polimeriza dentro dos eritrócitos gera alterações celulares, como o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e a interferência na ligação da membrana com as proteínas do citoesqueleto. Com isso, muitas alterações moleculares podem ocorrer, como: aumento de adesão de eritrócitos ao endotélio vascular, geração de processos inflamatórios, ativação de coagulação, enrijecimento da membrana celular que favorece a vaso-occlusão, lesões vasculares, além de hemólise precoce (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

Dentre as hemoglobinopatias estruturais, a presença da hemoglobina S é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias. Em alterações onde pelo menos um gene codifica para a HbS, ou seja, há apresentação da HbS em heterozigose e denomina-se doença falciforme (DF). Nessa situação, podem combinar com outras alterações hereditárias das hemoglobinas, como a hemoglobina C (genótipo HbSC) e a hemoglobina D (genótipo HbSD). Por outro lado, a apresentação da HbS em sua forma homozigótica (genótipo HbSS) é denominada anemia falciforme (AF) (CHAUFFAILLE et al., 2016; ZAMARO et al., 2006).

2.1.3 A geografia da HbS

A AF foi primeiramente descrita de forma científica pelo cardiologista James Bryan, em 1910 em Chicago. O médico descreveu os eritrócitos falcizados no sangue periférico de um jovem afrodescendente, estudante de odontologia, que manifestava anemia, icterícia, úlceras nos membros inferiores e complicações pulmonares. Durante os anos que se seguiram vários casos foram descritos baseados na ideia de se tratar de uma nova condição nosológica (DRISS et al., 2009).

Porém, somente em 1949, Linus Pauling e colaboradores, através da técnica de eletroforese, elucidaram a diferença estrutural da HbA e HbS e evidenciaram que existe uma diferença no número ou no tipo dos grupos ionizáveis das duas hemoglobinas. Caracterizaram a AF como a “primeira doença molecular humana”. Nesse mesmo ano, foi descoberto em se tratar de uma doença autossômica recessiva (FRENETTE; ATWEH, 2007).

Posteriormente, eventos mutacionais distintos, localizados em sítios polimórficos do DNA em genes da β globina, permitiram a identificação de diferentes haplótipos. O haplótipo primeiramente identificado na região do Senegal é conhecido como (SEN); outro identificado na República Centro Africana e sudeste da África, foi nomeado como haplótipo CAR (*Central*

African Republica) ou Bantu; na região central, norte e oeste da África, identificou-se o haplótipo Benin (BEN); na região de Camarões reconheceu o haplótipo Camarões (CAM) enquanto na região da Arábia Saudita e Índia (região central e sudeste) foi caracterizado o haplótipo Árabe-Indiano (ARAB). Mais tarde, haplótipos atípicos também foram descritos (BERNAUDIN et al., 2018; LOGGETTO et al., 2013;).

Estudos que utilizam os haplótipos como marcadores biológicos, possibilitaram estabelecer as possíveis rotas do gene da Hb S (ZAGO, 2007). De forma bastante heterogênea, o gene da HbS foi difundido no Brasil ao longo de 300 anos de tráfico de escravos, de migração interna e miscigenação, que possivelmente foi diferente para cada região. No país o principal haplótipo do gene da β globina é o CAR, seguido pelo BEN (SILVA et al., 2014). Em conformidade com a origem histórica da população afrodescendente, o haplótipo CAR é o mais comum nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará, Pará e Minas Gerais (BELISÁRIO, 2015; LEAL et. al., 2016; LOGGETTO, 2013; VIEIRA, 2000).

Por outro lado, o haplótipo BEN é mais frequente na Bahia (LOGGETTO, 2013). Estudos com pacientes com AF de diferentes regiões desse estado confirmou o haplótipo BEN como predominante (47,9%), seguido do CAR (45%) (ADORNO et al., 2008).

Tais haplótipos da β^S -globina são correlacionados a aspectos hematológicos e clínicos distintos. Os haplótipos CAR e BEN são considerados de maior gravidade, enquanto indivíduos com os haplótipos SEN e ARAB apresentam menor número de manifestações clínicas da DF, com menor ocorrência de dano em órgãos alvo (ALELUIA et al., 2017; LOGGETTO, 2013). Foi encontrada alta frequência de eventos clínicos entre pacientes do Triângulo Mineiro que possuíam no mínimo um cromossomo com o haplótipo CAR (LEAL et al., 2016). Adicionalmente, nesse mesmo estudo, uma significativa associação foi encontrada entre os menores níveis de HbF e pacientes homozigotos CAR/CAR quando comparado às demais combinações, fato que reforça a gravidade do quadro em pacientes com tal haplótipo, bem como a heterogeneidade clínica da doença falciforme e a complexidade de sua fisiopatologia.

2.2 A FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME

2.2.1 A falcização da HbS

Para a compreensão das consequências do fenômeno de falcização eritrocitária faz-se necessário que se compare ao eritrócito normal. A evolução dos eritrócitos fez com que esta célula se tornasse discoide, bicôncava, flexível, permeável à água e a compostos iônicos para com isso realizar com eficiência as trocas gasosas e se tornar uma célula especializada no transporte de gases. Um eritrócito normal dispõe de milhões de moléculas de Hb individualizadas e solubilizadas no líquido intraeritrocitário, fatores esses que mantêm as estruturas celulares saudáveis e viáveis por cerca de 120 dias (KOURY; RHODES, 2012).

A alteração genética que codifica a Hb variante S determinará a origem de células falciformes no início da eritropoese, onde os proeritroblastos possuem a composição genética alterada para globina β e sintetizam Hb do tipo S que gradualmente ocupam os espaços intraeritrocitários. Entende-se que as lesões dos eritrócitos falciformes se iniciam nas primeiras fases de sua formação e decorre de forma gradual e cumulativa, o que causa alterações moleculares, morfológicas e funcionais nesses eritrócitos. Além do seu tempo médio de vida cair para cerca de 7 a 25 dias (KASSIM; SHARMA, 2017).

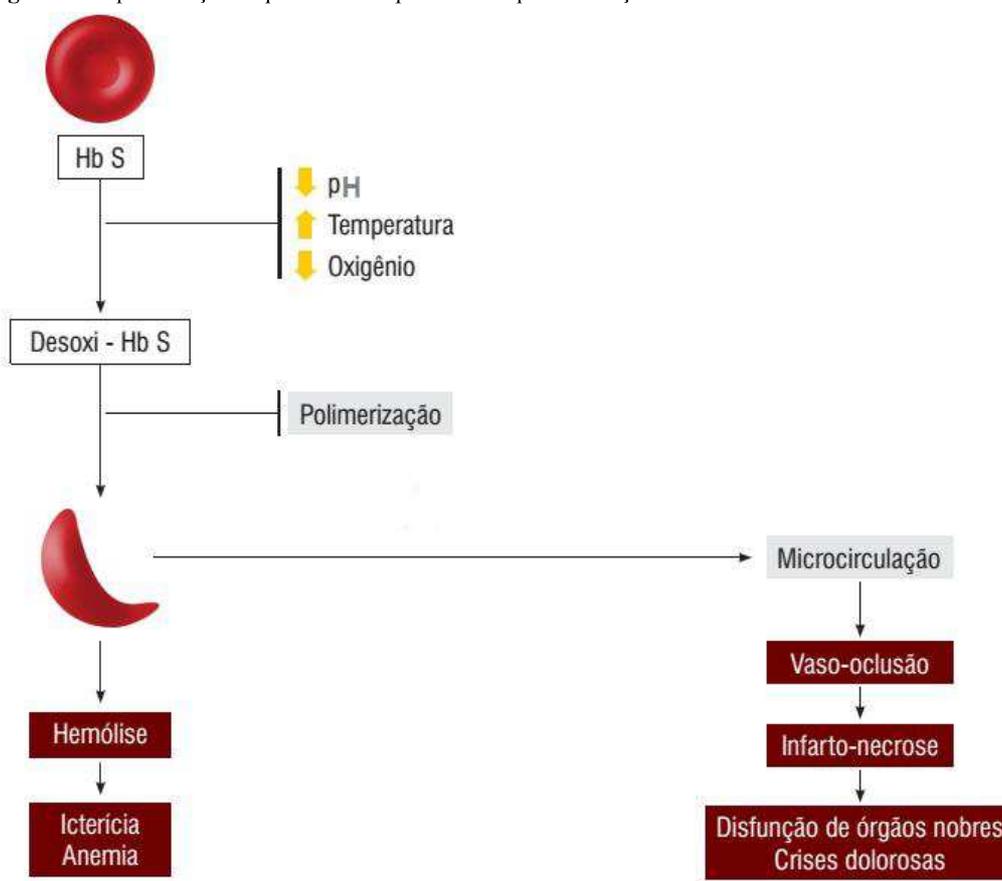
A mudança bioquímica e geneticamente pontual na globina β não compromete sua estrutura, porém quando uma HbS perde o O_2 e se torna desoxi-HbS expõe componentes carbonados de valina (variante) que se interagem com componentes químicos da fenilalanina na posição 85 da globina β bem como com a leucina da posição 88 da mesma globina. Essas interações darão início à agregação entre moléculas de HbS desoxigenadas. Quando 30 desses tetrâmeros estão agregados, um núcleo crítico é formado e sobre esse núcleo outros tetrâmeros se aderem e formam um polímero. Forma-se uma estrutura longitudinal de aproximadamente 20 nm, helicoidal, com 14 fibras, sendo 10 delas dispostas externamente e 4 internamente (ARNONE, 1972; KIEFER et al., 2008).

Os polímeros formados fornecem uma área que favorece a agregação de fibras adicionais que formam feixes paralelos conhecidos como tactóides, responsáveis pelo crescimento exponencial dos polímeros que transformam a forma discoide dos eritrócitos em uma estrutura afoçada. Os tactóides favorecem a mudança do estado líquido (solúvel) para o sólido (insolúvel) no interior do eritrócito, o que altera sua viscosidade intracelular e induz sua precipitação em cristais de HbS (MACEDO, 2013).

O O_2 é crucial no processo de falcização do eritrócito, pois somente a desoxi-HbS se polimeriza, sendo que qualquer fator que estabilize o estado desoxi favorece a polimerização (Figura 3). Dentre esses fatores, destacam-se a queda do pH, que reduz a afinidade da

hemoglobina pelo oxigênio e o aumento da concentração do 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG), uma enzima capaz de enfraquecer a ligação oxigênio-hemoglobina e permite que o oxigênio saia com menor pressão para os tecidos. Além desses, contribuem também para tal processo o aumento da temperatura acima de 37°C e as concentrações aumentadas de HbS corpuscular média (CHCM) (STYPULKOWSKI; MANFREDINI, 2010). A forma falcizada do eritrócito desoxigenado reduz sua deformabilidade e contribui para processos vaso-oclusivos, além de um quadro de hemólise crônica (Figura 3).

Figura 3: Representação esquemática do processo de polimerização da HbS



Fonte: Ministério da Saúde (2015)

Variações adicionais associadas à HbS podem afetar a estabilidade de seus polímeros, podendo contribuir para o aumento ou redução desses. Uma importante variação é a interação com a HbF, que não se incorpora ao polímero de HbS por ter alta afinidade ao O₂, inibindo a polimerização da HbS. Esse processo de inibição induzido pela presença aumentada de HbF é

percebido na persistência hereditária de Hb fetal (PHHF). Tal situação, na qual a concentração da HbF oscila entre 15 e 30%, raramente faz com que a pessoa apresente o fenótipo para DF. Essa relação entre o fenótipo clínico e a polimerização da HbS, sustenta a importância da HbF na fisiopatologia da DF (SANTOS, 2011; SOLOVIEFF et al., 2009; THEIN et al., 2009).

Grande número de estudos mostram que os níveis elevados de HbF reduzem a intensidade e a gravidade das complicações na DF, fato que parece ser explicado pela maior afinidade deste tipo de Hb pelo O₂, o que interfere na polimerização da HbS. Por essa razão a indução na produção de HbF é uma importante estratégia terapêutica na melhoria da qualidade de vida e na redução da gravidade na DF (FRENETTE; ATWEH, 2007).

A constatação que níveis elevados de HbF amenizam os eventos clínicos causados na DF despertou o interesse de pesquisadores. Estudos de associação entre níveis de HbF e o genoma, mostraram que polimorfismos genéticos ou até mesmo modificadores epigenéticos são determinantes diretos na regulação de genes relacionados à HbF (HABARA; STEINBERG, 2016). Tais achados ajudam a esclarecer a grande variação individual nos níveis de HbF e essa variação ajuda a explicar a diversidade fenotípica no curso clínico da DF (SANT'ANA et al., 2017).

2.2.2 A patogenia da vaso-oclusão

O processo vaso-oclusivo causado pelos polímeros de HbS é considerado a base das complicações na DF (BRASIL, 2010). Porém, a compreensão desse processo tem evoluído ao longo dos anos e sabe-se que não somente a forma falcizada e rígida dos eritrócitos são responsáveis pela oclusão dos vasos de forma mecânica, mas outros fatores exercem papel relevante nos desdobramentos dessa doença (KATO et al., 2009).

Os eritrócitos falcizados, com todas as suas alterações morfo-funcionais, interferem diretamente com os vasos sanguíneos em que circulam, induzindo a mudanças na fisiologia vasomotora e em fatores humorais da região afetada (LETTRE; BAUER, 2016). Tais fatores influenciam a tendência das células falciformes em aderirem ao endotélio e a provocar a oclusão vascular. A agregação das células falciformes entre si e suas adesões ao endotélio incluem a participação de plaquetas, leucócitos e fatores hemostáticos (MACEDO, 2013).

As alterações funcionais que ocorrem na célula falciforme são desencadeadas pela desoxi-HbS e, embora esses fenômenos possam ser revertidos com a reoxigenação, quando

repetidos, essas alterações são exacerbadas e a célula se torna irreversivelmente falcizada. O tempo de falcização varia entre 2 a 4 minutos (REZENDE et al., 2009). A vasoconstrição da circulação capilar induz a estase e ao aumento do tempo de contato do eritrócito com áreas de baixo teor de oxigênio, o que acentua o processo de formação de células falcizadas (REES et al., 2010).

As pessoas que apresentam genótipo em homozigose (HbSS) costumam apresentar em torno de 44% de eritrócitos falciformes irreversíveis na circulação periférica. De forma relativa, esse número costuma ser constante em um mesmo indivíduo e está relacionado com a vida celular média determinada pelos diferentes graus de hemólise (PEREIRA, 2013).

O aumento no quadro de hemólise decorrente da formação de desoxi-Hb promove liberação do O₂ que o torna vulnerável ao ataque de elétrons do interior da célula e favorece a formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS). O ânion superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a hidroxila (HO), podem desnaturar as proteínas da membrana eritrocitária, além de se acumularem e interferir nas funções celulares, sendo capazes de causar oxidação da Hb (TORRES et al., 2012).

Em um eritrócito normal também ocorre a autoxidação da Hb com geração de espécies reativas ao oxigênio dentro da célula, os quais são controlados pelas defesas antioxidantes dos eritrócitos. A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) atua no sentido de transformar o O₂⁻ para H₂O₂, esse que também é ROS, sofre a ação antioxidante de outras duas enzimas eritrocitárias: a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a catalase, transformando-o em água. A menor sobrevivência de eritrócitos falcizados intensifica esse processo, gera desequilíbrio nas defesas antioxidantes e eleva o estresse oxidativo (FENECH, 2007).

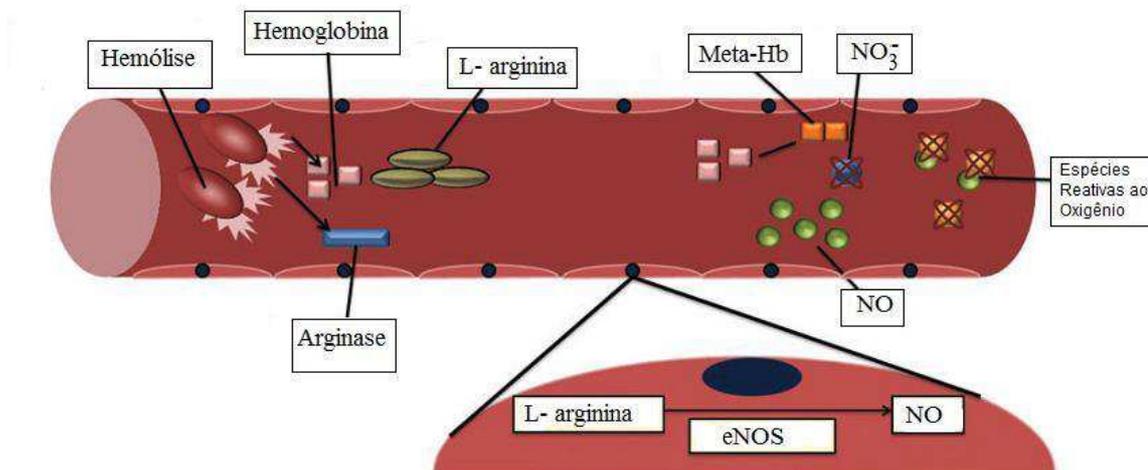
O acesso de ROS ou moléculas de água no interior do grupo heme podem deslocar elétrons do ferro e formarem a metahemoglobina (meta-Hb) onde o ferro se encontra no estado férrico (Fe³⁺) e não ferroso (Fe²⁺) incapaz de transportar O₂. A molécula de meta-Hb é mais instável e se degrada, as globinas livres se acumulam, precipitam e formam os chamados corpos de Heinz o que aumenta a rigidez e a hemólise do eritrócito (THAKUR et al., 2014).

Adicionalmente, esse quadro de hemólise observado na DF compromete os efeitos vasodilatadores do óxido nítrico (NO). Este gás, com meia vida de aproximadamente 10 segundos, é um potente regulador do tônus endotelial, sendo produzido a partir do aminoácido L-arginina convertido pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS) (Figura 4). O NO produzido no endotélio ativa a guanilato ciclase solúvel a formar guanosina monofosfato cíclica (GMPc),

responsável pela vasodilatação nas células da musculatura lisa vascular. Além da regulação do tônus vascular, o NO, que também pode ser produzido por outros tipos celulares, incluindo monócitos e macrófagos, atua na resposta imunológica inata e age como mediador de citotoxicidade e defesa não específica contra microrganismos (VONK et al., 2010).

De fato, o NO se apresenta diminuído na patologia vascular da DF, uma vez que a hemólise intra-vascular libera Hb e ferro livres que reagem com o NO para formar nitrato e favorecer a conversão de Hb em meta-Hb (HABARA; STEINBERG, 2016). O NO também sofre a ação das enzimas xantina oxidase e fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase liberados por neutrófilos hipóxicos e se degrada a peroxinitrito. Também, observa-se a escassez do substrato arginina que se degrada em ornitina pela ação da arginase liberada na lise eritrocitária. Toda essa depleção dos níveis de NO e a redução na sua biodisponibilidade está relacionada a uma maior tendência à vasoconstrição com grandes impactos nas crises vaso-oclusivas e complicações na DF (Figura 4) (ALBRECHT et al., 2003).

Figura 4: Disfunção endotelial causada pela hemólise



A disfunção endotelial provocada pela hemólise intravascular libera hemoglobina e arginase, que livre degrada a L-arginina, substrato para a produção de óxido nítrico (NO) pela sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS), enquanto a hemoglobina livre interage com o NO para formar a meta-Hb. Além do mecanismo adicional de produção de espécies reativas ao oxigênio com a oxidação do NO. Fonte: Adaptada de Habara; Steinberg (2016)

Outro fator que contribui para a vaso-oclusão é a exposição da fosfatidilserina na superfície externa dos eritrócitos, o que favorece sua adesão ao endotélio vascular (NAOUM; NAOUM, 2004). As células falciformes podem se aderir às células endoteliais pela superfície de antígenos como o *cluster of differentiation 36* (CD36) e *cluster of differentiation 34* (CD44).

Adicionalmente, proteínas plasmáticas como o fator de von Willebrand (vWF), trombospondina (TSP), fibrinogênio (FB) e fibronectina (FN) são intermediários para a célula falcizada interagir com moléculas das células endoteliais como a laminina, glicoproteína Ib (GPIb), integrinas, moléculas de adesão celular-vascular (VCAM) e receptor Fc (Fc-R) (CONRAN; COSTA, 2009).

Essas adesão das células falciformes ao endotélio também é favorecida pela densidade celular aumentada como consequência da desidratação do eritrócito e a presença dos mediadores químicos de adesão ao endotélio vascular (SANTOS, 2013). Neutrófilos e monócitos interagem com as células endoteliais desta região, desencadeando uma sinalização inflamatória, onde acontece intensa síntese de citocinas como do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), de interleucina 1 (IL-1) e de fator de crescimento de células T do tipo beta (TGF- β). Essas interações ainda estimulam o endotélio a liberar mais IL-1 e IL-6, além de fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). A liberação dessas citocinas tem grande influência na síntese de outros fatores humorais como anticorpos, que contribuem para o estado inflamatório, febre e por vezes choque (CONRAN; COSTA, 2009; PARISE; TELEN, 2013).

Assim, como fica evidente, os eventos vaso-oclusivos originados pela desoxi-HbS não são os únicos responsáveis pelas complicações decorrentes da DF, sendo que complexos e articulados mecanismos adicionais ajudam a justificar as manifestações clínicas observadas no curso da doença.

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA FALCIFORME

A clínica da DF se apresenta de forma heterogênea por vezes dentro de dois genótipos idênticos, o que confirma as outras interações que modulam sua fisiopatologia. No caso da AF, principalmente, o fenótipo clínico se manifesta próximo ao terceiro mês de vida, quando acontece uma queda fisiológica da concentração de HbF que vai sendo substituída pela HbS (BELISÁRIO et al., 2016; CONRAN; COSTA, 2009).

A maior concentração de eritrócitos contendo a HbS gera frequentes crises vaso-oclusivas que podem afetar diferentes tecidos e órgãos e normalmente são acompanhadas com intensa dor. As manifestações clínicas da AF mais características são apresentadas a seguir:

1. Síndrome mão e pé ou dactilite falcêmica: edema de dor intensa que acomete principalmente as articulações dos dedos das mãos, pés, punhos e tornozelos. Pode ser

acompanhado de febre alta e leucocitose. Ao exame radiológico percebe edema de partes moles, afinamento de osso cortical que pode progredir para destruição de ossos metacarpianos, metatarsianos e falanges. Comumente ocorrem dos 6 meses ao 3º ano de idade (ALMEIDA et al., 2015).

2. Crise Hemolítica: anemia acentuada e súbita sem crise de vaso-oclusão podendo causar insuficiência cardíaca e óbito em poucas horas (BALLAS et al., 2009).
3. Crises de dor óssea e em articulações: a ocorrência de falcização nos eritrócitos gera isquemia na circulação da medula óssea. O infarto ósseo após o primeiro ano de vida causa crises de dor que atingem os ossos longos, coluna, costelas e articulações. Quadro comum é a necrose asséptica uni ou bilateral do colo do fêmur e úmero (BENDER, 2017).
4. Crise de dor abdominal: pequenos infartos mesentéricos ou de vísceras abdominais que podem desencadear diversas complicações com quadro de dor aguda (BRASIL, 2012).
5. Crise de sequestro esplênico: com alto risco de óbito, decorre do súbito aprisionamento de sangue no baço com agravamento da anemia (queda de 2g/dL de Hb) e esplenomegalia. Geralmente ocorre em crianças pequenas de seis meses a dois anos antes que os infartos e as fibroses causem asplenia. Essas crises tendem a ser recorrentes e manifestarem com infecção, comumente respiratória. Leva a um quadro de choque hipovolêmico que pode levar a morte em algumas horas (STUART; NAGEL, 2004).
6. Síndrome torácica aguda (STA): dor torácica, taquipneia, leucocitose, febre com infiltrado pulmonar, consiste na causa mais comum de óbito entre as pessoas com AF. Com componentes embólico, infeccioso e isquêmico envolvidos em sua etiologia (CHARACHE et al., 1995).
7. Doença pulmonar crônica: relacionada aos repetidos episódios de trombose, infarto, embolia, vasculopatia e infecções. Caracteriza-se por um processo de fibrose crônica, com proliferação da musculatura lisa dos vasos e espessamento da íntima. Tais alterações diminuem de forma moderada a grave a função pulmonar, o que determina doença pulmonar restritiva, obstrutiva ou combinadas com redução das trocas gasosas, hipoxemia, hipertensão da artéria pulmonar e diminuição da capacidade vital (KAUL; FABRY, 2004).
8. Crise de sequestro hepático: hepatomegalia causada pelo aprisionamento de sangue no fígado, com piora da anemia, o que pode gerar choque hipovolêmico. Trata-se de um quadro menos grave que o sequestro esplênico (BERRY et al., 2007).

9. Doença hepática crônica: a hepatomegalia em pessoas com AF é comum a partir do primeiro ano até a vida adulta, com perda gradual da função hepática devido a infartos sub-capsulares e intra-parequimatosos. Os quadros de hepatite crônica e cirrose são comuns, além de icterícia pelo excesso de bilirrubina circulante não processada pelo fígado, decorrente do aumento da hemólise (CONRAN; COSTA, 2009).
10. Comprometimentos do Sistema Cardiovascular: o quadro de anemia crônica, repetidas oclusões de arteríolas pulmonares e hemossiderose podem causar cardiomegalia por sobrecarga cardíaca. O desempenho físico apresenta-se seriamente comprometido e pode-se manifestar insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (BALLAS et al., 2009).
11. Comprometimentos do Sistema Nervoso Central (SNC): o acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico (mais comum na infância) ou hemorrágico (mais comum em adultos) tanto em vasos de pequeno quanto em vasos de grande calibre são frequentes. Crianças com AF tem o risco de AVC aumentado em 200 vezes em comparação a uma criança sem a doença. Em exames de ressonância nuclear magnética (RNM), aos oito anos de idade um terço das crianças com AF tem evidências de infartos ou alterações cerebrais que podem gerar deformidades físicas e neuropsíquicas, com baixo rendimento escolar (BELISÁRIO, 2015).
12. Rins: sintomas como hipostenúria, nictúria, poliúria e enurese são alterações comuns da função renal na AF. Vaso-occlusões glomerulares com infartos corticais podem causar hematúria, além de proteinúria, que ocorre em 29 a 50% dos pacientes acima de 10 anos de idade; com comum evolução para insuficiência renal crônica de prognóstico ruim (MAGALHÃES, 2007).
13. Olhos: a vaso-occlusão também está presente na microvasculatura ocular, quando ocorre em tecidos sensíveis à hipóxia como a retina pode acarretar lesões visuais significativas (VILELA, 2007).
14. Úlceras de membros inferiores (MMII): o aparecimento de escoriações mínimas, principalmente em MMII, evoluem para lesões crônicas devido a hipóxia tecidual causada pelos fenômenos de vaso-occlusão, além de a estase circulatória impossibilitar a cicatrização. A frequência dessas lesões chegam a 75% dos pacientes adultos (PALADINO, 2007).
15. Crise aplástica: complicação frequente que promove uma parada transitória da hematopoese e rápida queda na Hb circulante. Geralmente ocorre após um processo infeccioso causado

pelo parvovírus B19, caracterizando-se por episódios auto limitados, com duração média de 10 dias. É um evento mais comum em crianças (BRASIL, 2012).

16. Crise megaloblástica: depressão medular por deficiência de ácido fólico ou vitamina B12.
17. Infecções: a diminuição da função esplênica constitui as bases fisiopatológicas para a grande suscetibilidade para as agressivas e diversas infecções. A infecção aguda é a principal causa de internações na AF. Em crianças até cinco anos as infecções causadas pelo *Streptococcus pneumoniae* é 30 a 100 vezes mais frequente do que em crianças sem AF (BRASIL, 2016).
18. Deficiência no crescimento e desenvolvimento: recém nascidos com AF apresentam medidas antropométricas iguais a crianças que não possuem a doença, porém a puericultura demonstra curvas de crescimento mais baixa para as crianças com AF, além de puberdade tardia e menarca atrasada em cerca de três anos. Adultos com AF tendem a apresentar peso e altura quase sempre nos limites inferiores da normalidade (BENDER, 2017).
19. Priapismo: complicação frequente na AF onde ocorre uma ereção dolorosa pelo aprisionamento de sangue nos corpos cavernosos e sinusóides do pênis. Pode ocorrer durante uma ereção normal ou durante o sono e a recorrência de tal evento pode causar fibrose e impotência (BRASIL, 2002).

Em geral, quanto maior a quantidade de HbS, mais graves são as manifestações clínicas. Em decorrência desse fato, os pacientes com AF, que são homozigóticos para HbS, têm quadro clínico mais grave que os pacientes com os genótipos para hemoglobinopatias do tipo SC, S β^+ -talassemia, S β^0 -talassemia e SD_{Punjab} (ZAMARO, 2010). A influência sobre a polimerização da HbS varia com o tipo de hemoglobina não-S, que está presente dentro da célula, e por sua vez, a hemoglobina que menos participa do polímero é a hemoglobina fetal. Com isso a associação com persistência hereditária de hemoglobina fetal confere melhor prognóstico à doença (BELISÁRIO et al., 2017; BRASIL, 2015; BREVEGLIERI, 2017; FRENETTE, 2007; SANTOS, 2011).

Assim, diante do reconhecimento que a DF é um grave problema de saúde é fundamental que se faça o diagnóstico correto e precoce de tal condição, no sentido de se estabelecer estratégias corretas de acompanhamento e intervenção, visando uma melhor qualidade de vida e aumento nas taxas de sobrevivência desses indivíduos (ARDUINI et al., 2017; BRASIL, 2002; SABARENSE et al., 2015).

2.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOENÇA FALCIFORME

O diagnóstico da AF é simples, confiável e se baseia principalmente na carga elétrica das hemoglobinas variantes. Os métodos mais utilizados para segregar as moléculas e realizar suas caracterizações são eletroforese em gel com focalização isoelétrica e ainda a cromatografia líquida de alta performance de troca catiônica (HPLC). Testes de solubilidade e falcização da desoxi-HbS podem ser realizados em tampão fosfato de alta molaridade para triagem ou confirmação de pessoas que possuem a HbS (CHAUFFAILLE, 2016).

Qualquer que seja o método de escolha para identificação da Hb variante, é muito importante a coleta de dados referente ao histórico familiar que contribui para que se estabeleça o diagnóstico. Outro fator importante é a detecção precoce, com o objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade associada à DF. Nesse contexto, grande efetividade é observada por meio do Programa Nacional de Triagem Neonatal, através do Programa Estadual de Triagem Neonatal ou “Teste do Pezinho” (RODRIGUES, 2010; SABARENSE, 2014).

Os Programas Estaduais de Triagem Neonatal (PETN) são os responsáveis pela triagem da DF de acordo com regulamentação do Sistema Único de Saúde (SUS) Portaria GM/MS nº 822, de 06 de junho de 2001. Após a detecção, os pacientes são acompanhados de acordo com a Portaria nº 1.391/GM/MS, de 16 de agosto de 2005, que institui, no âmbito do SUS, as diretrizes para a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme (BRASIL, 2002; 2015).

Diante da legislação vigente, as famílias deverão receber orientação sobre o diagnóstico, o tratamento e serem encaminhadas para aconselhamento genético. A continuidade do atendimento deverá seguir o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para a Doença Falciforme (PCDT), Portaria SAS/MS nº 55/2010, em centro de referência mais próximo da residência do paciente (BRASIL, 2010). O diagnóstico precoce e o acompanhamento imediato reduzem os eventos falcêmicos agudos e consequentemente previne desfechos fatais que normalmente são precedidos desses episódios agudos (ARDUINI, 2017; BRASIL, 2016).

Sendo assim, as medidas gerais de tratamento para a DF visam minimizar as crises de falcização responsáveis pelos eventos agudos e dolorosos, bem como a anemia crônica e a susceptibilidade às infecções (BRASIL, 2015; VARGAS, 2005). A prevenção das crises e

complicações da DF é feita principalmente através da administração do fármaco Hidroxiureia (HU). No entanto, outras estratégias farmacológicas são utilizadas, como a antibioticoterapia profilática e o uso de adjuvantes. Além do tratamento não medicamentoso que inclui o transplante de medula óssea e transfusões sanguíneas (BRASIL, 2010; 2016).

A prevenção de infecções é feita principalmente através da administração de penicilina por via oral (Penicilina V) ou parenteral (Penicilina benzatina). Esta deve ser realizada de forma profilática por prevenir até 80% das sepseas por *Streptococcus pneumoniae* em crianças com DF até os três anos de idade. O impacto dessa profilaxia apoia-se em diversas evidências clínicas, sendo por isso, indicado a partir dos 3 meses de vida até a criança completar 5 anos de idade (BRASIL, 2010). Adicionalmente, o tratamento adjuvante inclui outros medicamentos que auxiliam na prevenção de complicações e intercorrências, como o ácido fólico, analgésicos e anti-inflamatórios. Quelantes de ferro também são frequentemente prescritos, indicados para o tratamento da sobrecarga de ferro. Por outro lado, o uso de alfaepoetina é avaliada individualmente, não havendo concordância quanto aos seus benefícios clínicos (BRASIL, 2015).

Dentre as estratégias não farmacológicas, a transfusão sanguínea compreende o tratamento mais frequente. Aproximadamente 60% dos pacientes com DF recebem transfusão sanguínea, e esta necessidade varia de 0 a 95% de acordo com a idade, o sexo e o genótipo. Os pacientes SS são transfundidos com maior frequência (ADAMS et al., 2005). A transfusão de sangue em pacientes com doença falciforme diminui, por diluição, a fração de células que contém HbS, aumenta o hematócrito, reduz a eritropoese e diminui a circulação da hemoglobina S. O objetivo principal é melhorar a capacidade do transporte de O₂ e/ou prevenir as manifestações vasoclusivas decorrentes da doença. Evidências mostraram que o uso de transfusões profiláticas reduziu a incidência de AVC em crianças (WANG et al., 2011; WARE et al., 2016).

Ademais, o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) é uma alternativa possível, porém pouco frequente em função do risco associado (KASSIM; SHARMA, 2017). Conhecido genericamente por transplante de medula, consiste na substituição da medula óssea do indivíduo com DF por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstruir a hematopoese. O transplante pode ser autogênico, quando a medula ou as células precursoras de medula óssea provêm do próprio indivíduo transplantado (receptor), ou alogênico, quando as células provêm de outro indivíduo (doador). O procedimento também pode ser feito a partir de

células precursoras de medula óssea obtidas do sangue circulante de um doador, do sangue de cordão umbilical ou da própria medula óssea, retirada por meio de punção aspirativa (MATTHES-MARTINS et al., 2013).

2.4.1 A farmacologia da Hidroxiureia (HU)

Oficialmente, a HU é o agente farmacológico com indicação mais consolidada no manejo dos indivíduos com DF, apresentando maior eficácia. No Brasil, foi introduzida nos protocolos de tratamento da DF a partir do ano 2002 com o Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes, no entanto, consolidou-se apenas a partir do PCDT da Doença Falciforme em 2010. De forma geral, o esquema de administração inclui pacientes a partir dos dois anos de idade, com uma dose inicial única de 15mg/Kg/dia, sendo incrementada ao longo do tempo até a Dose Tolerada Máxima (DTM), que é definida como a maior dose capaz de promover a melhora mais proeminente no curso clínico e laboratorial da doença, sem ocorrência de toxicidade hematológica, não devendo ser superior à 35mg/Kg/dia (BRASIL, 2010).

Além de ser usado no tratamento da DF, tal fármaco é aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento de leucemia mielóide crônica e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço em combinação com outras terapias (GWILT; TRACEWELL, 1998).

A Hidroxiureia ou hidroxycarbamida é um fármaco citostático e antineoplásico, potente inibidor da enzima ribonucleotídeo redutase, específica da fase S do ciclo celular, reduzindo a disponibilidade intracelular de deoxinucleotídeos trifosfato, inibindo assim a síntese de DNA (WARE et al., 2011). A atividade da enzima é inibida pelo fármaco através do bloqueio de sua subunidade M₂, e ao que parece, a enzima inativada pode se regenerar espontaneamente após a remoção do fármaco (WARE, 2010). Diante desse mecanismo, eventual citotoxicidade celular pode ser observada, sendo a mielossupressão a principal reação adversa do tratamento contínuo (BRASIL, 2010).

Com uma estrutura molecular semelhante à da ureia, que se difere apenas na hidroxila ligada ao nitrogênio adjacente à cetona, parte da HU administrada por via oral atravessa a

parede intestinal por difusão passiva. Um estudo em pacientes com câncer encontrou 79% de HU na circulação sistêmica após a ingestão por via oral, confirmando sua boa biodisponibilidade por tal via (WARE, 2010). Outros estudos de farmacocinética encontraram volume de distribuição próximo ao da água corporal total, alcançando diversos tecidos, inclusive o cerebral. Ainda, o fármaco apresenta-se moderadamente ligado a proteínas plasmáticas, com fração de ligação entre 75 e 80% (WARE et al., 2011).

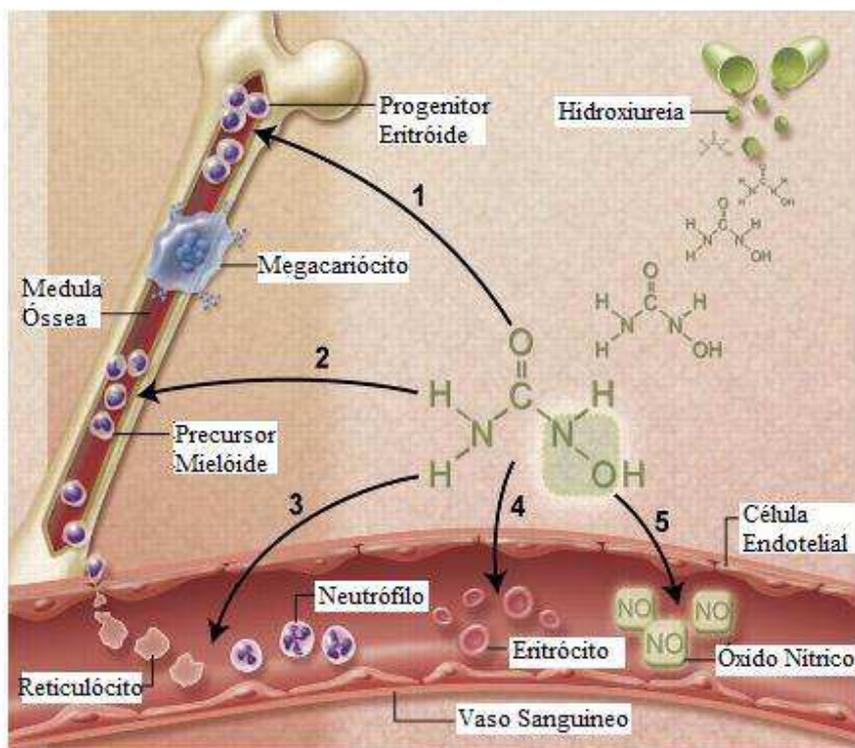
A depuração da HU é rápida e sua meia vida varia de 2 a 4,5 horas. Estudos farmacocinéticos mostraram que após a ingestão oral de dose única de 20mg/Kg de HU, os níveis séricos podem atingir pico de 26µg/mL, com declínio rápido (NEVITT et al., 2017). Vale ressaltar um interessante estudo farmacocinético conduzido por Ware e colaboradores (2011), no qual foi observado coeficiente de variação de 30% inter-paciente com fenótipo de absorção variável e binário, sendo que a maioria dos pacientes apresentou perfil de absorção "rápido" definido como o tempo para concentração plasmática máxima (T_{max}) de 15 a 30 minutos, enquanto cerca de 40% deles tiveram um perfil de absorção classificado como "lento" T_{max} de 60 a 120 minutos. Comparado com o fenótipo lento de absorção, as pessoas com o fenótipo rápido tiveram uma concentração plasmática máxima (C_{max}) significativamente superior 28,9 µg/mL versus 22,2 µg/mL. (WARE et al., 2011).

Cerca de 60% da dose oral ingerida sofre conversão pelo metabolismo hepático mediado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP450). Outra via de metabolização possível, porém com menor impacto, pode ser a degradação a ácido acetohidroxâmico pela urease encontrada em bactérias intestinais (GWILT; TRACEWELL, 1998).

O modelo farmacocinético mais apropriado descreve que a excreção da HU seja majoritariamente renal, sendo cerca de 40% em sua forma inalterada. No tecido renal, o transporte de ureia pelas membranas celulares é facilitado por um grupo de proteínas facilitadoras (transportadoras de ureia) codificadas pelo gene *UTA* (*Urea Transporter A*), que além de carregarem a ureia podem transportar a HU por consistir em substrato análogo (WALKER et al., 2011). A difusão facilitada de HU pelas proteínas transportadoras de ureia nos rins parece possuir movimento bidirecional e tanto podem elevar sua excreção pela via renal quanto reabsorvê-la para a circulação (WALKER et al., 2011). Adicionalmente, parece muito provável que a disfunção renal afete a farmacocinética da HU, dado o contributo dos rins para a eliminação desse fármaco (GWILT; TRACEWELL, 1998).

Estudos de farmacodinâmica que envolvem a HU fixam como ponto de análise os mecanismos pelos quais se observa o incremento nos níveis de HbF. Existe um grau de resposta substancialmente variado entre os pacientes, sendo que tais mecanismos ainda não são completamente conhecidos (PLATT et al., 1984). Atualmente, a opção mais aceita é a mielossupressão, onde a inibição de precursores eritróides com ciclagem mais rápida favoreçam precursores mais primitivos e de ciclagem mais lenta, quiescentes, no caso a HbF (Figura 5) (WARE, 2010). No entanto, estudos mais recentes mostram que a HU pode percorrer diferentes vias para o resultado final de elevar a HbF, Pule e colaboradores (2016) demonstraram *in vitro* que entre 6 e 12 h após o tratamento com HU foi observada elevação dobrada nos níveis de HbF correspondente à menor expressão do gene *BCL11A* (*B Cell Lymphoma 11A*). Nesse mesmo sentido, em eritroblastos cultivados a partir do sangue periférico de células CD34⁺ de pacientes com anemia falciforme responsivos à HU, foi encontrado que tal fármaco aumentou os níveis do ativador GATA-2 e drasticamente reduziu o nível das proteínas repressoras GATA-1, TR4, MYB e BCL11A, ativando assim a transcrição do *HBG* e, com isso, aumentando a síntese de HbF. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas nessas proteínas em eritroblastos cultivados a partir do sangue dos pacientes pouco ou não respondedores à HU (ZHU et al., 2017).

Figura 5: Representação esquemática dos benefícios da Hidroxiureia na doença falciforme



1) Indução na síntese de HbF por precursores eritróides. **2)** Citotoxicidade medular com redução na produção de células sanguíneas. **3)** Redução no sangue periférico de neutrófilos, reticulócitos e outras moléculas de adesão. **4)** Redução da hemólise por conter eritrócitos mais hidratados, com maior quantidade de HbF e menos células falcizadas. **5)** Favorece liberação de NO com consequente vasodilatação local e melhora da resposta vascular.
 Fonte: Ilustração adaptada de Ware (2010)

Outra parcela dos efeitos benéficos da HU pode ser mediada pelo NO (Figura 5), o qual apresenta considerável interesse no tratamento da DF (KING et al., 2004). A redução de NO agrava as disfunções endoteliais e os processos vaso-oclusivos da DF, portanto, o aumento da biodisponibilidade de NO promovida pelo fármaco desempenha importante papel na melhora clínica observada durante o tratamento (KING, 2004; WARE, 2010). A molécula de HU contém em sua estrutura nitrogênio e oxigênio ligados e, pelo menos *in vitro*, pode liberar diretamente o NO ou espécies relacionadas ao NO por processos metabólicos ainda não completamente elucidados (KING, 2004; WARE, 2010). Acredita-se que tal propriedade é particularmente importante para os efeitos vasculares e reológicos promovidos pelo fármaco. Adicionalmente, o tratamento com HU também parece ser capaz de induzir a produção de NO através da ativação da enzima NOS. Eritrócitos de coelho expostos ao tratamento com HU

exibiram aumento da produção de NO, acompanhado pelo influxo de cálcio dentro da célula (RATHTHAGALA et al., 2010). Interessantemente, esse efeito da HU foi abolido quando as células foram tratadas com L-NAME, um inibidor seletivo da NOS, sugerindo que a produção de NO pelas células vermelhas desempenha papel relevante no mecanismo de ação do fármaco.

Adicionalmente, foi demonstrado que pacientes com DF apresentam significativo aumento dos níveis plasmáticos de arginase, enzima que consome o mesmo substrato da NOS, quando comparados a pacientes com o genótipo HbAA (MOREIRA et al., 2016). Também, foi observada uma relação inversa entre os níveis de arginase e HbF (BARBOSA et al., 2017; KATO, 2014; MOREIRA et al., 2016). No entanto, os níveis dessa enzima foram reduzidos de forma significativa após o tratamento com HU, o que sugere melhora da biodisponibilidade de NO, com redução dos sintomas da DF (MOREIRA et al., 2016).

Em soma, a elevação dos níveis de NO, além dos efeitos reológicos e vasculares, também promove indução de HbF (Ware, 2010). Tal mecanismo envolve a via cíclica de guanosina monofosfato (GMPc). O NO atua como segundo mensageiro e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) a converter a guanosina trifosfato (GTP) em GMPc, que na dependência de proteína quinase (PKG), induz a expressão do mRNA da γ -globina e a consequente geração de HbF (ALMEIDA et al., 2012; ZHU et al., 2017).

Outros mecanismos adicionais parecem estar envolvidos na melhora clínica promovida pela HU. Além da indução da HbF, os efeitos citotóxicos da HU também reduzem a produção medular de neutrófilos e reticulócitos (WARE, 2010). Uma vez que a elevação de células brancas é diretamente associada à morbidade e mortalidade da AF, a redução na contagem de tais células é potencialmente terapêutica (MILLER et al., 2000; WARE, 2010). Em soma, a redução de neutrófilos e reticulócitos é acompanhada pela diminuição dos eventos de vaso-oclusão através do decréscimo da adesão vascular. Adicionalmente, a HU reduz o número absoluto e a expressão de moléculas de adesão celular contribuindo para diminuição da adesão das células falciformes, o que favorece a menor ativação de fatores pró- inflamatórios (HILLERY et al., 2000; SILVA-PINTO, 2013).

De fato, um estudo com crianças com AF mostrou a presença de marcadores inflamatórios mais elevados naquelas que faziam sistema de transfusões sanguíneas ou não eram tratadas com HU enquanto o tratamento com HU reduziu e sustentou em níveis mais baixos esses indicadores de inflamação (PENKERT et al., 2017).

Como pode se observar, o tratamento com HU promove múltiplos benefícios. Uma coorte estudada por 17 anos na França pode ser considerada referência ao uso de HU. O estudo acompanhou pacientes que usaram HU continuamente e por longos períodos. Foi observada redução drástica na frequência das crises algicas graves, redução no número de transfusões e hospitalizações, além de queda na incidência de STA (VOSKARIDOU et al., 2009). Os benefícios do uso da HU têm sido replicados em estudos de diferentes países. Uma pesquisa da Itália mostrou redução de STA, crises de dor por vaso-oclusão, hospitalizações e necrose óssea (RIGANO et al., 2017). No Egito, os pacientes tratados com o fármaco apresentaram elevação dos níveis de Hb, queda de leucócitos, plaquetas e reticulócitos (YOUSSRY et al., 2017). Estudos nacionais também apontam nessa mesma direção dos benefícios da HU (ADEGOKE et al., 2017). Estudo realizado no Rio de Janeiro foi pioneiro ao mostrar a redução da mortalidade em crianças com doença falciforme tratadas com HU (LOBO et al., 2013). Foram observadas 36 mortes dentre as 1.493 crianças com DF não tratadas com o fármaco, enquanto apenas 1 morte foi contabilizada dentre as 267 em tratamento com HU. Em adição, a terapia com HU foi significativamente associada com o aumento da concentração de Hb, HbF, volume corpuscular médio e redução na contagem de plaquetas, reticulócitos e neutrófilos (LOBO et al., 2013). Outro estudo em São Paulo mostrou que, além de elevação dos níveis médios de HbF, os pacientes apresentaram redução na contagem de neutrófilos e reticulócitos (ADEGOKE et al., 2016). Na Bahia, os pacientes tratados com HU apresentaram menos hemólise com consequente melhora clínica (ALELUIA, 2017). Um ensaio clínico multicêntrico randomizado mostrou que crianças que haviam sido triadas como de alto risco pelo exame de doppler transcraniano (TCD) puderam substituir o tratamento padrão com transfusões sanguíneas profiláticas pelo uso contínuo de HU na prevenção de AVC primário (WARE et al., 2016). Tal achado mostrou semelhante resultado em um estudo realizado em São Paulo, onde a HU foi um substituto seguro ao uso de transfusões crônicas na prevenção de AVC em crianças (ADEGOKE et al., 2017).

Apesar dos evidentes benefícios do tratamento com a HU, existe grande variabilidade interindividual de resposta farmacológica e cerca de 25 a 30% das pessoas não apresentam redução significativa dos sintomas da doença falciforme (ALGIRAIGRI; KASSAM, 2017; GREEN et al., 2013). Essa responsividade varia também conforme o parâmetro a ser avaliado, sendo que para a HbF, observa-se alta variabilidade na indução da HbF pela HU, oscilando entre valores baixos de 2% até níveis superiores a 30% (PULE et. al., 2016). As razões para o

amplo espectro de resposta clínica observada durante o tratamento com HU não são totalmente compreendidas, no entanto, parte disso parece ser explicada por interações farmacogenéticas (GRECH; GROSSMAN, 2015).

2.5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA A HU

A variabilidade na resposta farmacológica é um evento multifatorial e complexo. Fatores demográficos como peso, idade, gênero, assim como fatores clínicos como função renal, hepática, hábitos alimentares, tabagismo, etilismo e falhas de adesão ao tratamento são alguns fatores que podem afetar a resposta a medicamentos. Muitos desses fatores ambientais e de desenvolvimento podem interagir entre si e/ou com os fatores genéticos para afetar a resposta a um fármaco (FRANCONI et al., 2007).

Diversos estudos evidenciam que a composição genética tem fundamental papel nas variações observadas na resposta farmacológica e na tolerância aos fármacos (GRECH; GROSSMAN, 2015). Por essa razão, têm sido crescente o número de estudos farmacogenéticos, os quais tem por objetivo determinar como o *background* genético do paciente influencia sua resposta ao medicamento ou a probabilidade no desenvolvimento de reações adversas e toxicidade. Segundo um estudo norte americano, cerca de um terço dos medicamentos em estudo clínico atualmente consideram a associação com um biomarcador genético específico complementar. Isso indica que, os medicamentos aprovados nos próximos anos serão cada vez mais pautados em terapias personalizadas (BUSH; MOORE, 2014).

Dentre os polimorfismos conhecidos, a categoria mais comum decorre da variação na troca de um nucleotídeo por outro, conhecido por *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) ou polimorfismo de nucleotídeo único. O SNP pode estar localizado em várias regiões do gene: promotora, codificadora (éxons) e não codificadora (intron). Estima-se que 1 milhão de SNPs (um para cada mil nucleotídeos) possam existir no genoma humano, dos quais 60 mil estão em regiões codificadoras de proteínas (ARTAC et al., 2010). Os SNPs na região promotora e codificadora têm maior probabilidade de modificar o funcionamento do gene e, conseqüentemente manifestar alterações fenotípicas (CARLOS, 2011).

Um considerável número de evidências experimentais sugerem que SNPs em genes fora do *cluster* da β -globina humana estão significativamente relacionados à resposta ao tratamento

com HU em pacientes com hemoglobinopatias (GRECH; GROSSMAN, 2015). Assim, polimorfismos em genes relacionados à indução de HbF, bem como associados à fisiopatologia da DF e aos mecanismos farmacocinéticos e farmacodinâmicos da HU, tornam-se importantes genes candidatos na busca pelo tratamento mais adequado dos pacientes.

Vários estudos em pacientes com hemoglobinopatias vêm reforçando a associação entre diversos polimorfismos no gene *BCL11A* e as concentrações HbF anteriores e após o tratamento com HU (ALELUIA et al., 2017; FRIEDRISCH, et. al, 2016; GREEN; BARRAL, 2013). O gene do *BCL11A* está localizado na região cromossômica 2q16.1, codificando uma proteína com domínios proteicos em dedo de zinco (*zinc finger*), os quais tem a propriedade de ligarem-se ao DNA em várias regiões no *cluster* da β -globina, atuando como um repressor na síntese de HbF (LETTRE; BAUER, 2016; MENZEL et al., 2007). A presença dos polimorfismos G>A (rs4671393) e A>C (rs766432) no gene *BCL11A* já foram descritos como capazes de influenciar diferentemente a elevação nos níveis de HbF (LETTRE; BAUER, 2016). Pelo fato de o *BCL11A* agir naturalmente como um repressor na síntese de cadeias de γ globinas, indivíduos que apresentam o alelo menos frequente para tais polimorfismos nessa região tendem a manifestar elevação nos níveis de HbF e, conseqüentemente, um melhor fenótipo no curso da DF (JIANG et al., 2016; LAURENTINO, 2016; PEREIRA et al., 2015).

Dois interessantes estudos nacionais também sugerem o efeito de polimorfismos no gene *BCL11A* como modulador da resposta à HU (ALELUIA et al., 2017; FRIEDRISCH, et al., 2016). Dentre os 42 pacientes com o genótipo HbSS em tratamento com HU avaliados, aqueles com o genótipo CC para o polimorfismo A>C (rs766432) apresentaram melhores parâmetros hematológicos, com incremento nos níveis de Hb e hematócrito, quando comparados aos pacientes AA (ALELUIA et al., 2017). Em outro estudo, foi encontrado que o polimorfismo G>A no gene *BCL11A* (rs4671393) esteve associado com o aumento dos níveis de Hb induzido pela HU. Pacientes com AF apresentando o alelo de menor frequência em homozigose tiveram maiores incrementos na concentração de HbF, sendo observada melhor resposta farmacológica (FRIEDRISCH et al., 2016). Por outro lado, uma artigo revisou a associação entre a alta variabilidade relacionada ao incremento de HbF em crianças com DF tratadas com HU e polimorfismos em 13 genes candidatos, incluindo o *BCL11A*, sugere que tal resposta é muito complexa, sendo que as variações genéticas explicam apenas parte da referida variabilidade (GREEN; BARRAL, 2013).

Adicionalmente, a mesma revisão reportou significativa associação entre o incremento de HF induzido pela HU e SNPs em genes envolvendo o metabolismo da arginina a NO (GREEN; BARRAL, 2013). De fato, como já discutido anteriormente, a deficiência de NO tem mostrado desempenhar um importante papel no desenvolvimento de crises vaso-oclusivas, na disfunção endotelial e em outras complicações da DF. Em função disso, parte dos efeitos benéficos do tratamento com HU parecem ser explicados pelo aumento da biodisponibilidade de NO, sintetizado pela NOS. Essa enzima pode existir em três isoformas, agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (cNOS), a qual depende de íons cálcio e de calmodulina, e a NOS induzível (iNOS, tipo II, NOS2), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (DUSSE et al., 2003). As isoformas constitutivas compreendem a NOS neuronal (nNOS, tipo I, NOS1), presente normalmente nos neurônios, e a NOS endotelial (eNOS, tipo 3, NOS3), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas, desempenhando importante efeito vasodilatador (DUSSE et al., 2003).

Diversos estudos funcionais apontam para o fato de que polimorfismos nos genes da NOS podem afetar a atividade da enzima (GODFREY et al., 2007; JOSHI et al., 2007), sendo vários deles associados às variações fenotípicas observadas na DF (ARMENIS et al., 2017; NISHANK et al., 2013; VILAS-BOAS, 2016; SHARAN, 2004). Assim, alguns estudos farmacogenéticos apontam que polimorfismos em genes relacionados à via do NO podem ser associados à resposta à HU (HUSAIN; HARTMAN; DESAI, 2017). Nesse contexto, existem alguns SNPs no gene da *eNOS* associados à variação nos níveis de NO e que parecem modular a resposta de fármacos que ativam tal via. O gene da *eNOS* está localizado na região cromossômica 7q36.1, sendo esta a principal enzima envolvida na produção constitutiva do NO. Dois SNPs no gene são bastante estudados e apresentam grande relevância clínica: o SNP T>C na região promotora do gene (rs2070744), que pode conter uma base T (alelo selvagem) ou C (alelo menos frequente) e um SNP no éxon 7 que ocorre através da substituição do nucleotídeo G pelo nucleotídeo T (G>T) na posição 894 do gene da *eNOS* (rs1799983), resultando na conversão do glutamato para aspartato na posição 298 da enzima (Glu298Asp) (AGUIAR, 2016; ARMENIS et al., 2016; BARBOSA et al., 2017; BOASIAKO, 2014; YOUSRY et al., 2016).

Em relação ao polimorfismo T>C, a ocorrência do alelo C do gene da *eNOS* reduz em mais de 50% a atividade promotora de células *in vitro*, o que reflete a diminuição nos níveis celulares de mRNA para eNOS, e conseqüentemente, de eNOS (NAKAYAMA et al., 1999;

MIYAMOTO et al., 2000). Adicionalmente, foi identificada menor produção plaquetária de NO em indivíduos com o alelo C que em indivíduos que não apresentavam tal alelo (TANUS-SANTOS et al., 2002). Células endoteliais com o genótipo CC tratadas com estatinas, conhecidos fármacos que aumentam a síntese de NO, apresentaram maiores níveis de mRNA para eNOS que as células contendo o genótipo TT (ABE et al., 2005). Além disso, este polimorfismo mostrou ação moduladora sobre o aumento da biodisponibilidade do NO, a diminuição do estresse oxidativo e os efeitos anti-inflamatórios produzidos em pacientes tratados com atorvastatina (NAGASSAKI et al., 2006; SOUZA-COSTA et al., 2007). Tais achados indicam que essa estatina poderia ser mais relevante para a prevenção de eventos cardiovasculares em indivíduos com o genótipo CC do que em indivíduos com genótipo TT (CASAS et al., 2015; KAUFMAN et al., 2015).

Já o polimorfismo G>T está associado à alteração da atividade da eNOS. Células portadoras do alelo menos frequente T apresentam menor disponibilidade da enzima na cavéola, relacionando-se à menor produção de NO (GODFREY et al., 2007; JOSHI et al., 2007). Tal polimorfismo também parece modular a resposta a alguns fármacos (SILVA et al., 2011). A presença do alelo T parece estar associada ao pior padrão de resposta quando comparada a indivíduos carregando o alelo selvagem G (TANUS-SANTOS et al., 2002; EISENHARDT et al., 2003; TURNER et al., 2003). Pacientes homocigotos para o alelo selvagem tratados com hidroclorotiazida mostraram maior redução da pressão arterial quando comparados aos pacientes com o genótipo TT (TURNER et al., 2003).

Além de polimorfismos na *eNOS*, há estudos envolvendo os genes da arginase e a resposta farmacológica (GREEN; BARRAL, 2013; HUSAIN et al., 2017). Ware e colaboradores evidenciaram a associação do incremento de HbF induzido pela HU com polimorfismos nos genes da arginase tipo 1 (*ARG 1*; rs17599586) e tipo 2 (*ARG 2*; rs2295644). Ambas isoformas são metaloenzimas que catalisam a hidrólise da L-arginina, ou seja, elas competem com a NOS pelo mesmo substrato, fato que pode reduzir a produção de NO e agravar o quadro na DF (VONK et al., 2010). Enquanto a ARG1 é citosólica e mais abundantemente expressa no fígado, a ARG 2 é mitocondrial com maior expressão no rim, próstata, trato gastrointestinal e vasos, embora as duas formas sejam encontradas no endotélio e na musculatura lisa vascular (CHOI et al., 2011; PERNOW; JUNG, 2013).

Ainda, foi evidenciada uma associação entre diversos parâmetros farmacocinéticos da HU e SNPs em genes que codificam os transportadores de ureia UTA e UTB, os quais são

capazes de reconhecer a HU como um substrato a ser transportado (WALKER et al., 2011; WARE, 2011). Os transportadores de ureia (UT) fazem parte de uma superfamília de proteínas transportadoras de membrana, sendo responsáveis pelo transporte endógeno de ureia através das membranas celulares, com papel crítico na reciclagem da ureia, concentração de urina e na função renal (WALKER et al., 2011). Por ser a HU um substrato análogo à ureia, variações nesses UTs potencialmente podem afetar a farmacocinética do medicamento. Polimorfismos no gene *UTA* (rs16978449 e rs9960464) parecem afetar a $C_{máx}$ e a biodisponibilidade da HU, medida como a área sob a curva (AUC) de quantificação do fármaco (WARE, 2011). O mesmo estudo mostrou que esse mesmo parâmetro farmacocinético também foi influenciado por dois polimorfismos no gene *UTB* (rs2298720 e rs12605147).

Apesar dos evidentes avanços na área, ainda é pequeno o número de trabalhos realizados sobre o tema, além de apresentarem alguns resultados controversos (ARTAC et al., 2010; GREEN; BARRAL, 2013; HUSAIN; HARTMAN; DESAI, 2017) fato que evidencia a necessidade de realização de mais estudos genéticos relacionados ao tratamento farmacológico das hemoglobinopatias. Nesse sentido, o estudo de polimorfismos em genes relacionados à indução de HbF pela HU, como eNOS, ARG1 e BCL11A, bem como à farmacocinética do medicamento, como variações no gene do transportador UTA, tornam-se importantes candidatos na busca pelo tratamento mais personalizado. Trata-se, portanto, de um estudo pioneiro ao avaliar a influência de polimorfismos genéticos na resposta à HU de pacientes com doença falciforme em Minas Gerais. Assim, é claramente notável que a capacidade de prever o aumento da concentração de HbF em resposta ao tratamento com HU poderá ser útil para a seleção dos pacientes respondedores, além de reduzir potenciais chances de reações adversas ao tratamento com o fármaco em pacientes não respondedores.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre polimorfismos nos genes da *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA* e a resposta hematológica à hidroxiureia (HU) em pacientes com doença falciforme.

3.1.1 Objetivos específicos

- Genotipar e determinar a frequência dos genótipos e alelos para seis polimorfismos nos genes da *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA* dentre os pacientes com doença falciforme atendidos no Hemocentro Regional de Governador Valadares;
- Identificar possíveis associações entre os parâmetros hematológicos com polimorfismos genéticos em voluntários com doença falciforme tratados e não tratados com HU;
- Avaliar possíveis associações entre os polimorfismos genéticos e o perfil de respondedores ou não respondedores à HU em voluntários com doença falciforme.

4 METODOLOGIA E CASUÍSTICA

4.1 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo com recorte longitudinal, realizado no período de agosto de 2015 a janeiro de 2018, onde foram convidados a participar da pesquisa as pessoas com doença falciforme atendidas no Hemocentro Regional de Governador Valadares da Fundação Hemominas, Minas Gerais; acompanhados pela médica Ana Paula Pinho Santos, colaboradora do projeto. A área de abrangência do referido Hemocentro compreende as regiões dos Vales do Aço, Rio Doce, Mucuri, Jequitinhonha e parte da Zona da Mata.

Foram incluídos 185 voluntários com doença falciforme SS ou SC, sendo que desses, 93 estavam em tratamento com hidroxiureia (Grupo Tratamento) e 92 voluntários que não estavam usando tal fármaco (Grupo Controle), após manifestarem o consentimento pela assinatura de termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e/ou Termo de Assentimento (TA), quando apropriado (Anexos A, B, C, D, E e F).

Não foram incluídos no estudo pacientes gestantes, aqueles que apresentaram testes sorológicos positivos para HIV, Hepatite B e C ou aqueles que apresentaram comprometimento hepático ou renal graves. Adicionalmente, foram excluídos pacientes que receberam transfusão sanguínea em período inferior a 100 dias e possuíam o diagnóstico de quaisquer talassemias.

O diagnóstico foi confirmado por exames disponíveis em prontuário, bem como as informações referentes aos dados clínicos, fenotípicos e laboratoriais. Foram coletadas as seguintes informações em formulário próprio: idade, sexo, exames hematológicos, medicamentos utilizados, tempo de tratamento, doses utilizadas, crises álgicas, transfusões, internações, infecções e outras complicações em que houvesse descrição em prontuário (Instrumento de Coleta de Dados; Anexo G).

Foram coletados do prontuário dos voluntários os dados de hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct), reticulócitos (Rtc) e leucograma total (LG) antes do início do tratamento com HU e em intervalos de 3, 6, 12 e 18 meses após o tratamento. Adicionalmente, foram obtidos os dados de hemoglobina fetal (HbF) antes e após terapia com HU. Para pacientes com período superior a 18 meses de tratamento, também foram analisados os dados hematológicos do último acompanhamento.

Conforme os valores de HbF pós-tratamento com tal fármaco, os pacientes foram classificados como “respondedores” à HU se os níveis de HbF estivessem maiores que 20%, enquanto aqueles pacientes com níveis inferiores a esse foram considerados como “não respondedores”. Essa classificação dicotômica entre “respondedores” e “não respondedores” à HU foi anteriormente utilizada em outros estudos farmacogenéticos, uma vez que níveis de HbF superiores a 20% parecem se relacionar aos melhores efeitos terapêuticos do fármaco (BORG et al., 2012; CHALIKIOPOULOU et al., 2016; PATRINOS; GROSVELD, 2008).

A pesquisa seguiu o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (CAAE: 29058814.4.0000.5147, anexo H) e da Fundação Hemominas (CAAE: 29058814.4.3001.51.18, anexo I). Vale ressaltar que a fase de coleta de dados em prontuário perpetuou durante toda a pesquisa e o registro foi feito em uma planilha Excel® criada como um banco de dados que fora constantemente atualizado. Foi desenvolvido um código de identificação para todos os voluntários da pesquisa de conhecimento apenas da pesquisadora, em respeito à ética e ao sigilo dos dados coletados.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coleta de sangue periférico e separação do camada leucocitária

Para a análise dos dados moleculares, foi coletado aproximadamente 5mL de sangue periférico, em tubo estéril a vácuo contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A coleta foi realizada no Hemocentro Regional de Governador Valadares em obediência a demanda interna. Após a coleta, as amostras foram devidamente encaminhadas ao laboratório da Universidade Federal de Juiz de Fora campus Governador Valadares e armazenadas em geladeira de 2° a 8° C. O sangue total coletado foi centrifugado a aproximadamente 2000 RPM por 10 minutos para separação das frações, sendo que o anel de células mononucleares (*buffy coat*, camada leucocitária) foi recolhido e transferido para um microtubo previamente identificado e armazenado a -20° C (conforme normas para o biorrepositório) para posterior extração do DNA genômico (gDNA).

4.2.2 Extração e quantificação do gDNA

A extração de gDNA foi realizada pelo método Qiamp DNA Blood mini kit (Qiagen®) a partir da camada leucocitária na temperatura ambiente, de acordo com o seguinte protocolo: em um microtubo de 1,5 ml foi pipetado 20 μ L de Protease Qiagen e adicionado 200 μ L de Tampão AL; a seguir, foram adicionados 200 μ l de amostra no seu respectivo microtubo já identificado. O microtubo foi agitado em vortex por 15s e incubado a 56°C por 30 min em banho seco com agitação de 750 rpm. Decorrido o tempo, as amostras foram brevemente centrifugadas e ao tubo foram adicionados 200 μ L de etanol 100%, seguido de agitação no vortex por 15 s. Após breve centrifugação, cada amostra foi aplicada em uma coluna de centrifugação (contida no kit de extração) acoplada a um tubo coletor de 2mL, com cuidado para não molhar borda; a seguir, os tubos foram centrifugados à 12.000 RPM por 5 min.; os tubos coletores contendo o líquido foi descartado. O gDNA permaneceu aderido à coluna; a seguir, foi encaixado novo tubo coletor de 2 mL e adicionado 500 μ L do Tampão AW1 à coluna, sem molhar a borda, e novamente centrifugado à 12.000 RPM por 5 min. O tubo coletor foi descartado e novo tubo coletor de 2 mL foi acoplado à coluna. A seguir, foi adicionado 500 μ L do Tampão AW2 à coluna, sem molhar a borda, e centrifugado à 14.000 RPM por 3 min. Novamente, o tubo coletor foi descartado e a coluna foi acoplada à um microtubo de 1,5 ml novo identificado com o nome/número da amostra. Cuidadosamente, a coluna foi aberta e adicionou-se 100 μ L do tampão AE. Após incubação por 5 min, as amostras foram centrifugadas à 10.000 RPM por 3 min. A coluna foi descartada e o líquido eluído no microtubo corresponde à fração contendo o DNA. Este foi estocado em refrigerador à -20°C.

A quantificação do gDNA, bem como avaliação de sua qualidade, foi feita pelo depósito de 2 μ L de gDNA em aparelho de espectrofotometria *NanoVue™ plus* (GE®), calibrado previamente com tampão AE. Os ácidos nucleicos possuem máxima absorbância no comprimento de onda correspondente a 260 nm, região do ultra-violeta (UV), e por isso, a razão entre as medidas a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) indica pureza do gDNA e valores entre 1,7 e 1,9 foram considerados ideais. Valores inferiores podem indicar contaminação por proteínas, fenóis ou outros compostos que absorvem luz próxima a 280 nm (EMBRAPA, 2017). De forma complementar, a razão entre as leituras a 260 nm e 230 nm (A_{260}/A_{230}) também foi realizada a espera de valores entre 1,5 e 2,5, sendo que valores abaixo indicam contaminação por

compostos que absorvem luz a 230 nm como EDTA, carboidratos entre outros (EMBRAPA, 2017).

Adicionalmente, um gel de agarose 2% foi feito para conferência da integridade de algumas amostras aleatórias de gDNA extraídas. Após a corrida eletroforética, as amostras foram coradas com Gel Red® e visualizadas em luz UV, o que revelou perfil com pequeno arraste e sugeriu boa qualidade do gDNA para etapa de genotipagem.

4.2.3 Genotipagem

A técnica de genotipagem dos alelos dos genes selecionados para a pesquisa seguiram protocolo “TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol” da Applied Biosystems®. Os SNPs selecionados para esse estudo foram G>T (rs1799983) e T>C (rs2070744) no gene *eNOS*, C>T no gene *ARG1* (rs17599586), A>C (rs766432) e A>G (rs4671393) no gene *BCL11A* e G>A no gene *UTA* (rs9960464) (Tabela 2).

Em todas as análises supracitadas, foi utilizada a técnica de fluorescência com sondas TaqMan® a partir de ensaios validados pela Thermo Fisher (Tabela 2). As sondas contêm corantes fluorescentes distintos e um par de iniciadores para Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real, qPCR, sendo capazes de detectar os alvos de SNPs específicos que alinham-se exclusivamente com o genoma para proporcionar uma grande especificidade para o alelo de interesse. As sondas foram marcadas com fluoróforos distintos (VIC e FAM) para distinção dos dois alelos do SNP.

As amostras de gDNA foram diluídas para a concentração final de 2ng/uL, sendo utilizado 5uL dessa solução em cada poço de reação, com quantidade final de DNA de 10ng por poço. Para cada reação, foram adicionados os seguintes itens ao mix: 6,25uL de TaqMan™ Genotyping MasterMix (Thermo Fisher); 0,626uL do ensaio TaqMan (20x) e 0,625uL de água ultrapura livre de desoxirribonucleases (DNase) e ribonucleases (RNase) (IDT). O mix das reações foi preparado em Workstation, no escuro. Para preparar o Mix, foi utilizado um microtubo de 1,5mL. Em placas de PCR de 96 poços (MicroAmp® Fast Optical, Thermo Fisher), foram adicionados 7,5uL do mix/poço, e a seguir acrescentados 5uL de solução de DNA (concentração de 2ng/mL), com volume final de reação de 12,5uL. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Após cobertas com filme adesivo (MicroAmp® Optical Adhesive Film,

Thermo Fisher) as placas foram então centrifugadas a 1200rpm por 2 minutos e levadas para reação no equipamento *StepOne Plus Real Time* da ThermoFisher®. Foram consideradas ótimas as seguintes condições de amplificação na PCR em tempo real:

Holdng 60°C - 30seg

95°C - 10min

40 ciclos 95°C - 15seg

60°C - 1min

A análise genotípica dos polimorfismos foi realizada pelo programa *Allelic Discrimination* da Applied Biosystems®.

Tabela 2: Gene, referência do SNP, localização do cromossomo, localização no gene, troca de base nitrogenada e identificação dos ensaios utilizados

Gene	Referência do SNP	Localização do Cromossomo	Localização no Gene	Troca de Base Nitrogenada	Ensaio (Thermo Fisher)
<i>eNOS</i>	rs1799983	7q36.1	Éxon 7	G>T	C__3219460_20
	rs2070744		Região Promotora	T>C	C__15903863_10
<i>ARG1</i>	rs17599586	6q23.2	Íntron	C>T	C__25596209_10
<i>BCL11A</i>	rs4671393	2p16.1	Íntron	G>A	C__25926414_10
	rs766432		Íntron	A>C	C__1025980_10
<i>UTA</i>	rs9960464	18q12.3	Íntron	G>A	C__1381869_10

4.2.4 Análises estatísticas

Os biomarcadores laboratoriais dos voluntários foram expressos como média \pm desvio padrão e a avaliação da distribuição normal foi feita pelo teste de D'Agostino & Pearson. Diferenças na distribuição dos genótipos/alelos e desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliadas pelo teste do χ^2 ou Teste Exato de Fisher, quando apropriado.

As comparações dos parâmetros hematológicos antes e após o tratamento com hidroxiureia para o mesmo paciente foram feitas em uso do teste de Wilcoxon para amostras

pareadas. Para a comparação entre os grupos de pacientes controle e em uso do medicamento para os parâmetros acima, as análises foram conduzidas usando teste t não pareado para valores que seguiram distribuição normal e de Mann Whitney para aqueles que não seguiram a normalidade.

Para verificar a associação entre os genótipos/alelos observados e as variáveis analisadas, foram aplicados os testes abaixo, quando apropriado:

1) Para comparação das variáveis contínuas entre genótipos/alelos: quando as medidas seguiram distribuição normal, foi utilizada a análise de variância ANOVA One-Way, seguido pelo teste t não pareado. O teste Kruskal-Wallis, um teste não paramétrico, foi aplicado para as medidas que não seguiram distribuição normal, seguido pelo teste de MannWhitney.

2) Para os testes de associação entre variáveis categóricas: foi utilizado o teste do X^2 . Nos casos de pequenas amostras, em que a frequência esperada foi menor que cinco em tabela 2x2, foi aplicado o teste Exato de Fisher.

Todas as análises estatísticas acima foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism® versão 6.01 (San Diego, CA), considerado como significativo os valores de $p < 0,05$.

O fato de existirem diversas variáveis preditoras mensuradas nessa pesquisa, foi realizada uma análise de regressão múltipla, na qual foram consideradas individualmente cada um desses parâmetros hematológicos de interesse e a interação com as outras variáveis (como idade, sexo, dose do fármaco, tempo de tratamento, diagnóstico, genótipos, etc). A partir disso, houve uma seleção a fim de sinalizar as variáveis importantes para a explicação da resposta o que resultou em um modelo de regressão parcimonioso. Esta seleção foi realizada através do método *stepwise*, que avalia primeiro a necessidade da inclusão do termo aleatório e em seguida exclui uma a uma as variáveis preditoras que não são significativas até obter o modelo mais enxuto possível.

Todas as variáveis preditoras coletadas foram utilizadas na seleção, incluindo a interação dessas com o tempo. A fim de facilitar a análise, a variável “tempo” foi categorizado em 5 momentos (antes, 3, 6, 12 e 18 meses) e a variável “idade” foi categorizada em três níveis conforme o histograma de distribuição (menor que 20 anos, entre 20 e 40 anos e maior que 40 anos). A variável “leucócitos totais” foi logaritmicada devido ao seu caráter assimétrico.

Duas seleções de variáveis foram realizadas para cada variável resposta: Uma seleção que incluiu dados de todos os pacientes, tanto tratamento, quanto controle e excluiu da seleção a variável preditora “resposta”, pois essa só havia sido mensurada no grupo Tratamento. Outra

seleção incluiu apenas dados dos pacientes tratados, onde a variável “resposta” foi incluída. Tais análises estatísticas foram realizadas através do *software* R versão 3.4.2 (*R Core Team, 2017*).

Adicionalmente, as variáveis preditoras tempo, diagnóstico, dose, idade, sexo e os 6 SNPs foram utilizadas para análise de regressão logística (modelo para resposta dicotômica) resultando em um modelo de regressão parcimonioso. Tal modelo teve por objetivo tentar explicar a probabilidade de um paciente ser respondedor ou não respondedor à HU, incluindo a interação dessas com o tempo antes e depois do tratamento. As variáveis dos perfis hematológicos (Hemoglobina, Hematócrito, Leucócitos Globais, Reticulócitos e Hemoglobina Fetal) não foram consideradas na seleção. A adequação do modelo foi verificada através da *Deviance* residual e do envelope de probabilidade (resultados não mostrados). A tabela de Análise da *Deviance* para modelo foi construída e os principais índices de qualidade do modelo foram calculados: Acurácia, Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo. Tais análises estatísticas foram realizadas através do *software* R versão 3.4.2 (*R Core Team, 2017*).

5 RESULTADOS

A caracterização dos 185 pacientes com doença falciforme incluídos no presente estudo acompanhados pelo Hemocentro Regional de Governador Valadares é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização dos 185 pacientes com doença falciforme em uso ou não de Hidroxiureia (HU) acompanhados pelo Hemocentro Regional de Governador Valadares

	Todos os pacientes (n=185)	Sem uso de HU (n=92)	Em uso de HU (n=93)*	Valor p
Sexo (% masculino)	99 (54%)	54 (59%)	45 (48%)	0,938 ¹
Idade (anos)	15,8 ± 11,3	13,7 ± 10,7	17,9 ± 11,5	0,008 ²
Diagnóstico (%)				
HbSS	134 (72%)	51 (55%)	83 (89%)	<0,0001 ¹
HbSC	51 (28%)	41 (45%)	10 (11%)	
Hemoglobina, g/dL	9,15 ± 1,60	9,27 ± 1,72	9,03 ± 1,47	0,336 ²
Hematócrito, %	27,68 ± 5,07	28,33 ± 5,41	27,03 ± 4,65	0,080 ³
Leucometria Global, x10³ /L	9,99 ± 3,82	10,88 ± 4,42	9,11 ± 2,89	0,009 ²
Reticulócitos, %	2,56 ± 1,47	2,46 ± 1,66	2,67 ± 1,25	0,108 ²

* Referem-se aos valores após tratamento com HU. Os valores em negrito indicam significância de $p < 0,05$ entre pacientes em uso ou não de HU. ¹As análises foram desenvolvidas usando teste X^2 ; ²As análises foram desenvolvidas usando Mann-Whitney; ³As análises foram desenvolvidas usando teste t não pareado. Valores de referência adotado: Hemoglobina – 12 a 16g/dL; Hematócrito – 30 a 45%; Leucometria Global – 4 a 11x10³ /L; Reticulócitos – 0,5 a 2%.

As frequências genotípica e alélica na população estudada para os polimorfismos G>T (rs1799983) e T>C (rs2070744) no gene da *eNOS*, C>T (rs17599586) no gene da *ARG1*, A>C (rs766432) e A>G (rs4671393) no gene *BCL11A* e G>A (rs9960464) no gene *UTA* são descritas na Tabela 4. Todos os seis polimorfismos avaliados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência dos SNPs para os genes da *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA* em pacientes com doença falciforme atendidos no Hemocentro Regional de Governador Valadares

Gene/SNP	Genótipos	Número Absoluto	Frequência Relativa	Frequência dos Alelos	HWE*
<i>eNOS</i> (rs1799983)	GG	112	60,5%	G – 0,76	2,38
	GT	59	31,9%	T – 0,24	
	TT	14	7,6%		
<i>eNOS</i> (rs2070744)	TT	77	41,6%	T – 0,65	0,83
	CT	89	48,1%	C – 0,35	
	CC	19	10,3%		
<i>ARG1</i> (rs17599586)	CC	137	74,1%	C – 0,86	0,10
	CT	45	24,3%	T – 0,14	
	TT	3	1,6%		
<i>BCL11A</i> (rs4671393)	GG	105	58,4%	G – 0,76	0,01
	GA	66	35,7%	A – 0,24	
	AA	10	5,9%		
<i>BCL11A</i> (rs766432)	AA	108	58,3%	A – 0,76	0,27
	AC	65	35,1%	C – 0,24	
	CC	12	6,6%		
<i>UTA</i> (rs996046)	GG	68	36,8%	G – 0,61	0,26
	GA	91	49,2%	A – 0,39	
	AA	26	14,0%		

* Equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando $p=0,05$, significativo se $X^2 \geq 3,84$.

Adicionalmente, não foram encontradas diferença nas frequências genotípica e alélica para nenhum dos seis SNPs avaliados quando os pacientes foram agrupados conforme as hemoglobinopatias SS ou SC (Tabela 5).

Tabela 5: Frequência dos seis SNPs para os genes *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA* em pacientes agrupados conforme hemoglobinopatias SS e SC atendidos no Hemocentro Regional de Governado Valadares

Gene/SNP	Genótipos	Frequência dos genótipos % (n)		<i>p</i>	Frequência dos alelos		<i>p</i>
		HbSS	HbSC		HbSS	HbSC	
<i>eNOS</i> (rs1799983)	GG	61,2 (82)	58,2 (30)	0,76	G – 0,76	G – 0,76	0,99
	GT	30,6 (41)	35,3 (18)		T – 0,24	T – 0,24	
	TT	8,2 (11)	5,9 (3)				
<i>eNOS</i> (rs2070744)	TT	40,3 (54)	45,1 (23)	0,70	T – 0,65	T – 0,67	0,80
	CT	50,0 (67)	43,1 (22)		C – 0,35	C – 0,33	
	CC	9,7 (13)	11,8 (6)				
<i>ARG1</i> (rs17599586)	CC	73,9 (99)	74,5 (38)	0,93 ¹	C – 0,86	C – 0,87	0,72
	CT	23,9 (32)	25,5 (13)		T – 0,14	T – 0,13	
	TT	2,2 (3)	0 (0)				
<i>BCL11A</i> (rs4671393)	GG	57,1 (76)	60,4 (29)	0,86	G – 0,76	G – 0,77	0,82
	GA	37,6 (50)	33,3 (16)		A – 0,24	A – 0,23	
	AA	5,3 (7)	6,3 (3)				
<i>BCL11A</i> (rs766432)	AA	58,2 (78)	58,8 (30)	0,48	A – 0,76	A – 0,75	0,69
	AC	36,6 (49)	31,4 (16)		C – 0,24	C – 0,25	
	CC	5,2 (7)	9,8 (5)				
<i>UTA</i> (rs996046)	GG	34,3 (46)	43,1 (22)	0,52	G – 0,60	G – 0,65	0,41
	GA	51,5 (69)	43,1 (22)		A – 0,40	A – 0,35	
	AA	14,2 (19)	13,8 (7)				

As análises foram desenvolvidas usando teste X² ou Teste exato de Fisher, quando apropriado. 1 Análise de CC x CT+TT.

Não foram observadas associações estatisticamente significativas entre os parâmetros hematológicos com os seis polimorfismos genéticos nos voluntários com doença falciforme sem tratamento com HU (todos $p > 0,05$; Tabela 6). Tal análise incluiu os 185 pacientes, sendo que além dos pacientes nunca tratados com HU, foram incluídos os parâmetros basais dos voluntários tratados com tal fármaco, ou seja, anteriores ao tratamento farmacológico.

Tabela 6: Parâmetros hematológicos conforme os genótipos para os SNPs nos genes da *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA* em pacientes com doença falciforme não tratados com Hidroxiureia atendidos no Hemocentro Regional de Governador Valadares

Parâmetro	Genótipos			Valor <i>p</i>
<i>eNOS</i> (rs1799983)	GG (n=112)	GT (n=59)	TT (n=14)	
Hb, g/dL	8,57 ± 1,77	9,10 ± 1,97	8,74 ± 1,37	0,239 ¹
Hct, %	26,30 ± 5,96	27,32 ± 6,42	27,24 ± 4,67	0,491 ¹
LG, x10 ³ /L	12,27 ± 4,54	10,82 ± 4,67	13,21 ± 4,47	0,080 ²
Rtc, %	3,44 ± 2,08	3,47 ± 2,56	3,29 ± 2,32	0,873 ¹
<i>eNOS</i> (rs2070744)	TT (n=77)	TC (n=89)	CC (n=19)	
Hb, g/dL	8,86 ± 1,94	8,63 ± 1,76	8,90 ± 1,61	0,751 ¹
Hct, %	27,21 ± 6,41	26,26 ± 5,78	26,64 ± 5,58	0,817 ¹
LG, x10 ³ /L	11,58 ± 3,78	12,11 ± 5,26	12,07 ± 4,64	0,751 ²
Rtc, %	3,53 ± 2,20	3,46 ± 2,19	2,91 ± 1,66	0,576 ¹
<i>ARG1</i> (rs17599586)	CC (n=137)	CT (n=45)	TT (n=3)	
Hb, g/dL	8,75 ± 1,79	8,83 ± 1,94	7,70 ± 0,95	0,627 ¹
Hct, %	26,66 ± 6,05	27,04 ± 6,09	23,20 ± 0,72	0,512 ¹
LG, x10 ³ /L	12,19 ± 4,76	10,88 ± 4,19	12,71 ± 1,25	0,244 ²
Rtc, %	3,56 ± 2,23	2,91 ± 1,72	5,63 ± 2,35	0,077 ¹
<i>BCL11A</i> (rs4671393)	GG (n=105)	GA (n=66)	AA (n=10)	
Hb, g/dL	8,68 ± 1,77	8,68 ± 1,86	9,04 ± 1,86	0,721 ¹
Hct, %	26,29 ± 5,88	26,85 ± 6,05	27,30 ± 7,35	0,694 ¹
LG, x10 ³ /L	12,44 ± 4,31	11,42 ± 4,72	11,90 ± 5,47	0,238 ¹
Rtc, %	3,47 ± 2,08	3,55 ± 2,22	3,31 ± 2,33	0,919 ¹
<i>BCL11A</i> (rs766432)	AA (n=108)	AC (n=65)	CC (n=12)	
Hb, g/dL	8,71 ± 1,78	8,69 ± 1,84	9,51 ± 2,03	0,315 ¹
Hct, %	26,36 ± 5,90	26,90 ± 6,00	28,55 ± 7,27	0,478 ¹
LG, x10 ³ /L	12,26 ± 4,45	11,53 ± 4,57	10,40 ± 6,14	0,276 ¹
Rtc, %	3,44 ± 2,10	3,52 ± 2,23	3,03 ± 2,22	0,699 ¹
<i>UTA</i> (rs996046)	GG (n=68)	GA (n=91)	AA (n=26)	
Hb, g/dL	9,04 ± 1,94	8,62 ± 1,71	8,45 ± 1,81	0,323 ¹
Hct, %	27,46 ± 6,45	26,11 ± 5,85	26,74 ± 5,38	0,277 ¹
LG, x10 ³ /L	11,63 ± 4,64	11,94 ± 4,32	12,34 ± 5,63	0,790 ²
Rtc, %	3,38 ± 2,37	3,39 ± 1,95	3,74 ± 2,26	0,593 ¹

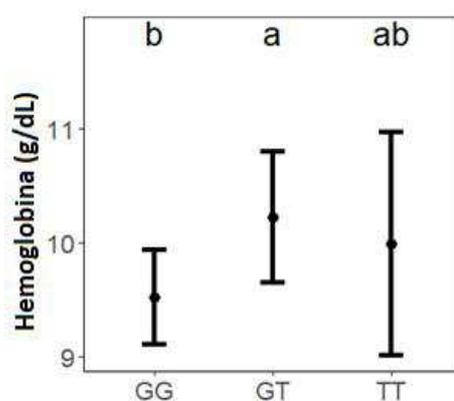
Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; LG: leucometria global; Rtc: reticulócitos. Valores são expressos como média ± desvio padrão. ¹ As análises foram desenvolvidas usando o Kruskal-Wallis test; ² As análises foram desenvolvidas usando ANOVA.

Por outro lado, a análise por regressão múltipla do grupo de pacientes tratados com Hidroxiureia, revelou significativa associação entre os níveis de hemoglobina e o polimorfismo G>T (rs1799983) no gene da *eNOS* (Tabela 7), sendo que os pacientes com o genótipo GT apresentaram maiores valores de Hb quando comparados aos pacientes homocigotos para o alelo G (Figura 6).

Tabela 7: Modelo multivariado associando os níveis de hemoglobina em pacientes com doença falciforme tratados com Hidroxiureia

Variável	Média dos quadrados	Estatística F	Valor p	Valor R ²
Sexo	0,2	0,4	0,523	0,364
Diagnóstico	15,8	41,8	<0,001	
Tempo de tratamento	31,8	84,1	<0,001	
Sexo e tempo de tratamento	1,2	3,2	0,014	
<i>eNOS</i> (rs1799983)	1,3	3,5	0,033	

Figura 6: Associação dos níveis de hemoglobina e os genótipos para o rs1799983 no gene da sintase endotelial do óxido nítrico (*eNOS*) em pacientes com doença falciforme tratados com Hidroxiureia (n=93)



Os grupos que compartilham a mesma letra não possuem as suas respectivas médias diferentes entre si em um nível de significância de 5%. Fonte: R Core Team, 2017.

Como evidenciado na Tabela 7, além do genótipo para o rs1799983 no gene da *eNOS*, as variáveis diagnóstico (SS ou SC), tempo de tratamento e a interação entre tal variável e o sexo, também contribuíram para explicar parte da variação dos níveis de Hb observada ($R^2=0,364$). Diante disso, foram conduzidas análises separadas, considerando exclusivamente os dados dos pacientes com o diagnóstico SS (HbSS) ou SC (HbSC). Para os pacientes SS, foram considerados os parâmetros hematológicos em dois momentos fixos: antes do tratamento com HU (pré-tratamento; níveis basais) e após tratamento com o fármaco (pós-tratamento). Para os pacientes SC, foram considerados os dados obtidos em apenas um momento, uma vez que foram incluídos os pacientes que não estavam em tratamento com HU e os parâmetros basais dos voluntários tratados com tal fármaco. A associação de tais parâmetros nos pacientes com anemia falciforme com os genótipos para o rs1799983 no gene da *eNOS* são mostrados na Tabela 8. Assim como apontado na análise multivariada, os maiores valores basais de Hb também foram encontrados entre os pacientes com genótipo GT quando comparado aos pacientes com duas cópias do alelo G ($p= 0,01$). Adicionalmente, não houve associações dos níveis de Hb com os genótipos para os outros cinco SNPs pesquisados dentre os 83 pacientes com HbSS ($p>0,05$; Tabelas A, B, C, D e E do Apêndice). Também não foram observadas diferenças significativas quanto à associação para tais genótipos e os parâmetros bioquímicos nos pacientes com hemoglobinopatia SC (Tabela F do Apêndice).

Tabela 8: Associação dos biomarcadores bioquímicos em 83 pacientes com anemia falciforme tratados com HU com genótipos para o rs1799983 no gene da sintase endotelial do óxido nítrico (*eNOS*)

	GG (n=49)	GT (n=28)	TT (n=6)	<i>p</i>
Hb, g/dL (pré-tratamento)	7,44 ± 0,86	8,15 ± 1,37 ^a	7,77 ± 0,70	0,030¹
Hb, g/dL (pós-tratamento)	8,52 ± 1,00	9,14 ± 1,31	8,67 ± 1,16	0,074 ²
ΔHb	1,08 ± 0,97	0,99 ± 0,71	0,90 ± 1,44	0,854 ²
Hct, % (pré-tratamento)	22,48 ± 3,18	23,90 ± 4,78	23,78 ± 1,79	0,252 ²
Hct, % (pós-tratamento)	25,42 ± 3,49	27,29 ± 3,93	26,53 ± 3,67	0,099 ²
ΔHct	2,94 ± 3,12	3,39 ± 2,44	2,75 ± 2,87	0,771 ²
LG, x10³/L (pré-tratamento)	14,04 ± 3,73	13,20 ± 4,23	17,35 ± 2,43	0,061 ²
LG, x10³/L (pós-tratamento)	9,69 ± 2,80	8,65 ± 2,52	10,87 ± 1,21	0,101 ²
ΔLG	4,36 ± 3,53	4,55 ± 3,96	6,48 ± 1,85	0,224 ¹
Rtc, % (pré-tratamento)	4,58 ± 1,94	4,99 ± 2,20	4,82 ± 2,50	0,683 ¹
Rtc, % (pós-tratamento)	2,89 ± 1,10	2,53 ± 1,03	2,22 ± 0,89	0,203 ²
ΔRtc	1,61 ± 2,13	2,27 ± 2,48	2,60 ± 2,14	0,440 ¹
HbF, % (pré-tratamento)	6,13 ± 4,52	7,27 ± 5,49	7,10 ± 5,05	0,562 ¹
HbF, % (pós-tratamento)	15,20 ± 7,56	16,75 ± 7,63	14,45 ± 6,36	0,629 ²
ΔHbF	9,16 ± 7,46	9,46 ± 7,15	7,50 ± 3,99	0,831 ²

Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; LG: leucometria global; Rtc: reticulócitos. Valores em negrito indicam significância de $p < 0,05$. ¹ As análises foram desenvolvidas usando o Kruskal-Wallis test; ² As análises foram desenvolvidas usando ANOVA; ^a comparação entre os genótipos GG e GT usando teste de Mann-Whitney ($p=0,0103$). Valores são expressos como média ± desvio padrão. Os valores de delta (Δ) representam a diferença de cada um dos parâmetros hematológicos antes e após o tratamento com a hidroxiureia.

O diagnóstico dos pacientes (SS ou SC) e o tempo de tratamento com HU também foram variáveis significativas para explicar aproximadamente 30% das variações observadas no hematócrito ($R^2=0,291$), na leucometria global ($R^2=0,268$) e na porcentagem de reticulócitos (Tabelas G, H e I do Apêndice). Por essa razão, semelhante à justificativa anterior apresentada para os níveis de hemoglobina, foram feitas análises considerando apenas os pacientes com o diagnóstico de anemia falciforme (HbSS), no pré e pós-tratamento com HU. Adicionalmente,

foi avaliada a diferença entre cada um dos parâmetros hematológicos nesses dois tempos, sendo denominados de valores delta (Δ). Não houve associações para tais parâmetros bioquímicos e valores de Δ avaliados em nenhum dos seis SNPs pesquisados ($p > 0,05$; Tabela 8; Tabelas A, B, C, D e E do Apêndice).

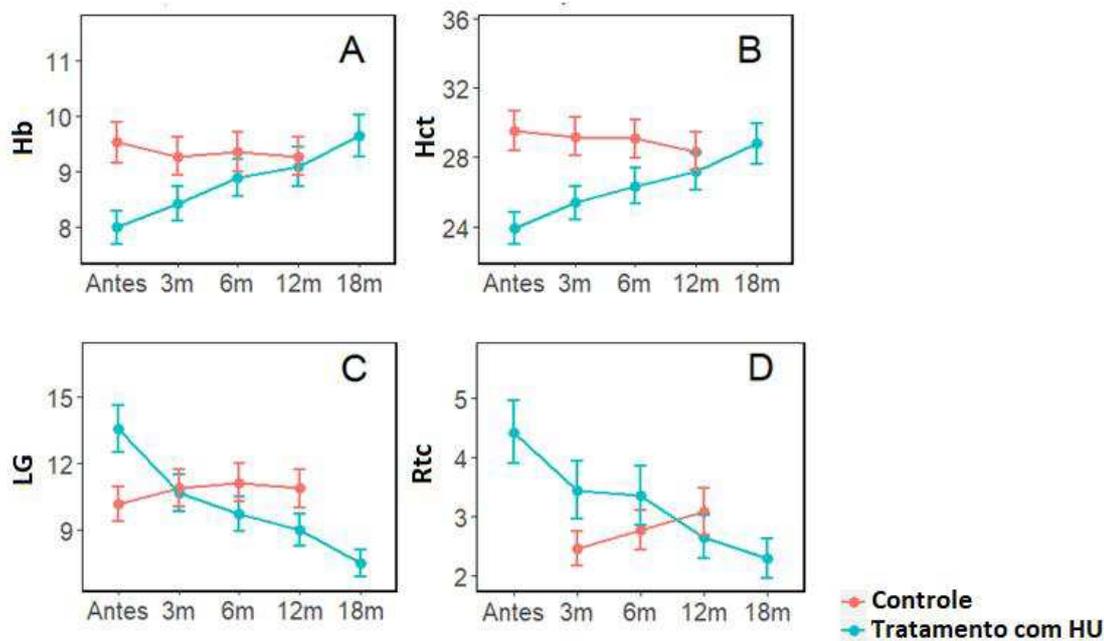
Apesar de não terem sido encontradas associações dos genótipos para os seis SNPs com nenhum dos parâmetros hematológicos avaliados após o tratamento com HU, é evidente que o tratamento farmacológico dos pacientes com doença falciforme promoveu significativa melhora nos níveis de Hb, Hct, LG e reticulócitos ao longo dos tempos avaliados (Tabela 9; Figura 7). Por outro lado, pacientes não tratados com esse fármaco (grupo controle) mantiveram praticamente constantes tais parâmetros ao longo do tempo (Figura 7).

Tabela 9: Avaliação dos parâmetros hematológicos dos pacientes com doença falciforme (n=93) antes e após o tratamento com Hidroxiureia (HU)

Parâmetro	Antes do uso de HU	Após o uso de HU	Valor <i>p</i>
Hemoglobina, g/dL	7,99 ± 1,44	9,03 ± 1,47	<0,0001
Hematócrito, %	23,88 ± 4,57	27,03 ± 4,65	<0,0001
Leucometria Global, x10³ /L	13,57 ± 4,25	9,11 ± 2,89	<0,0001
Reticulócitos, %	4,42 ± 2,14	2,67 ± 1,25	<0,0001
HbF, %	6,14 ± 4,79	14,71 ± 7,79	<0,0001

Valores em negrito indicam significância de $p < 0,05$ entre pacientes antes e após o uso de HU. As análises foram desenvolvidas usando o teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Figura 7: Avaliação dos níveis de hemoglobina (painel A), hematócrito (painel B), leucometria global (painel C) e reticulócitos (painel D) ao longo de 5 momentos em pacientes não tratados (controle) ou tratados com Hidroxiureia (HU)

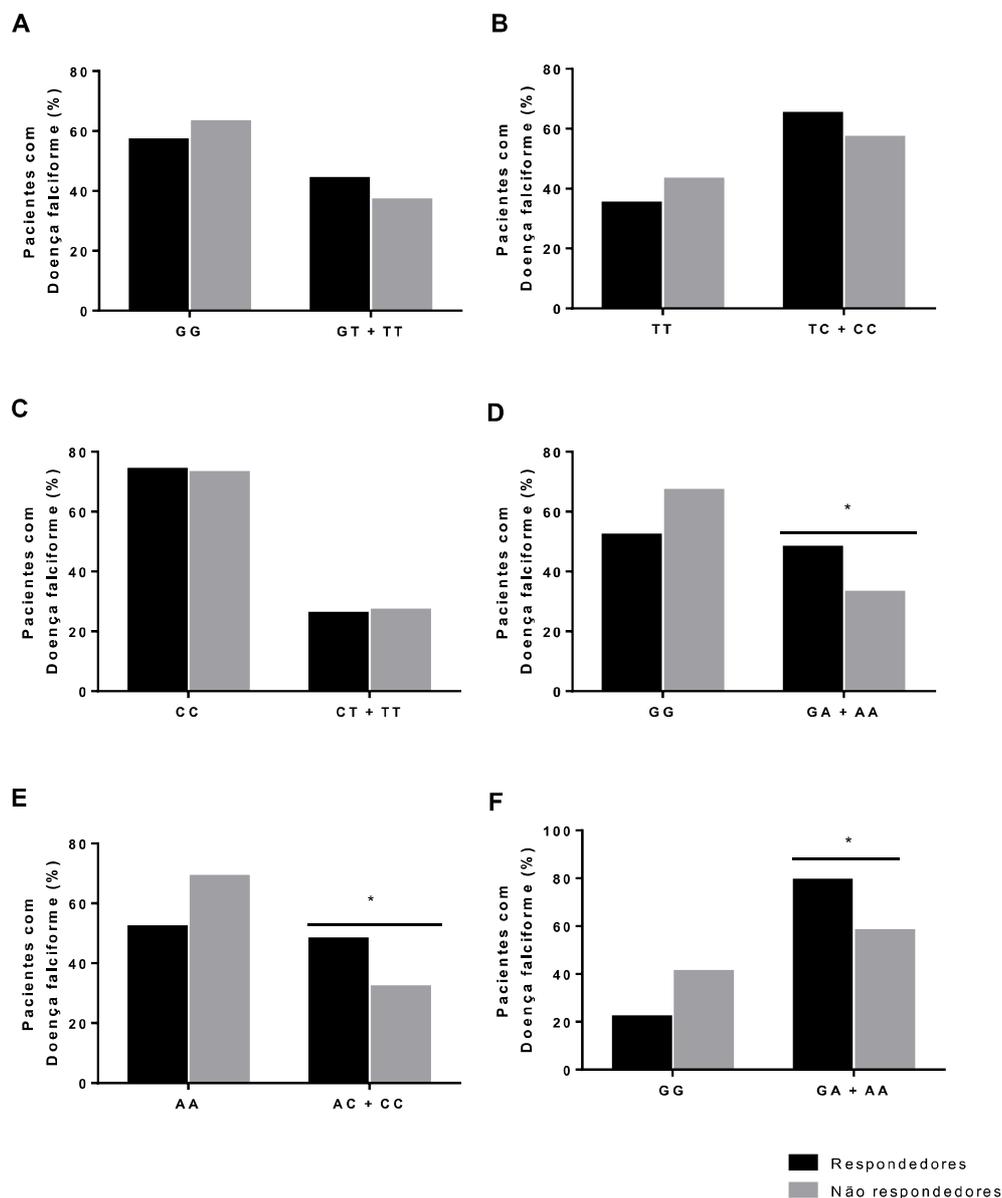


Fonte: R Core Team, 2017.

Em soma, o tratamento farmacológico também promoveu significativo incremento dos níveis de HbF (Tabela 9). A dose de HU utilizada por esses pacientes foi de $19,1 \pm 4,9$ mg/Kg/dia e o tempo médio de uso foi de 47 ± 18 meses (mediana 42 meses; 19-110 meses).

Quando tais pacientes foram agrupados conforme o perfil de resposta ao tratamento farmacológico à HU como “respondedores” ou “não respondedores”, não foram observadas diferenças estatísticas significativas na frequência dos genótipos para os polimorfismos G>T (rs1799983) e T>C (rs2070744) no gene da *eNOS* (Figura 8; Painéis A e B) nem para o polimorfismo C>T (rs17599586) no gene da *ARG1* (Figura 8; Painel C). Por outro lado, a frequência dos genótipos GA e AA para o polimorfismo no rs4671393 no gene *BCL11A* foi maior entre os pacientes que responderam ao tratamento farmacológico ($p=0,04$; Figura 8; Painel D). De forma semelhante, os pacientes com os genótipos heterozigoto e homozigoto de menor frequência para o polimorfismo A>C (rs766432) no gene *BCL11A* ($p=0,03$; Figura 8; Painel E) também responderam melhor ao tratamento. Em adição, a frequência de pacientes com genótipo GA para o polimorfismo G>A (rs9960464) no gene *UTA* foi maior entre o grupo dos pacientes respondedores ($p=0,005$; Figura 8; Painel F).

Figura 8: Frequências de distribuição dos genótipos (%) para os polimorfismos nos genes da *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA* em pacientes com doença falciforme classificados como respondedores (n=23) ou não respondedores (n=70) à Hidroxiureia



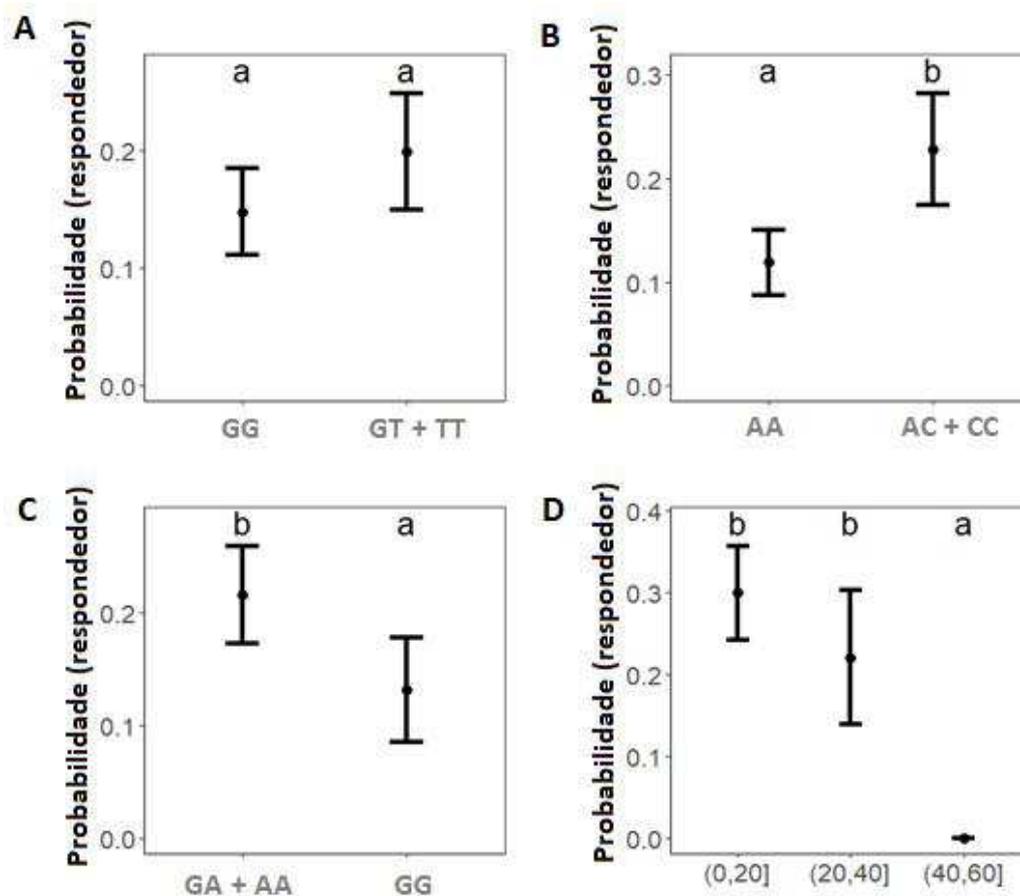
Painel A: Polimorfismo G>T (rs1799983) no gene da *eNOS* ($p=0,34$); **Painel B:** Polimorfismo T>C (rs2070744) no gene da *eNOS* ($p=0,25$); **Painel C:** Polimorfismo C>T (rs17599586) no gene da *ARG1* ($p=0,87$); **Painel D:** Polimorfismo G>A (rs4671393) no gene *BCL11A* ($p=0,03$); **Painel E:** Polimorfismo A>C (rs766432) no gene *BCL11A* ($p=0,01$); **Painel F:** Polimorfismo G>A (rs9960464) no gene *UTA* ($p=0,003$). * $p<0,05$ por Teste de Qui-quadrado. Fonte: GraphPad Prism®

Ainda em relação ao tratamento farmacológico com HU e de acordo com a classificação dicotômica do perfil de resposta, a Tabela 10 mostra a Análise da *Deviance* construída para o melhor modelo proposto por regressão logística. Houve associação significativa no perfil de resposta para a variável idade, além dos polimorfismos G>T rs1799983 no gene da *eNOS* ($p=0,063$), A>C rs766432 no gene *BCL11A* ($p=0,001$) e G>A rs9960464 no gene *UTA* ($p=0,005$). Baseado em tais resultados, seguiu-se a aplicação de um teste de comparação par-a-par para tais variáveis estatisticamente significativas (Figura 9, Painéis A-D). Pacientes que possuem o alelo de menor frequência C para o rs766432 no gene *BCL11A* (Painel B) e/ou o alelo menos frequente A para o rs9960464 no gene *UTA* (Painel C) apresentaram maiores chances de serem bons respondedores à terapia com HU. Apesar de o rs1799983 no gene da *eNOS* estar incluído na seleção por regressão logística com um valor de p marginalmente significativo, não foi verificada diferença significativa entre os dois grupos (GG e GT + TT) na comparação par-a-par (Figura 9, Painel A). Adicionalmente, os indivíduos com idade inferior a 40 anos apresentaram maior chance de resposta, quando comparado aqueles com idade superior (Figura 9, Painel D). Os índices de qualidade referentes à acúria, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo encontrados para a análise do modelo selecionado são mostrados na Tabela J do Apêndice.

Tabela 10: Tabela de análise de *deviance*, via método *stepwise* do modelo de regressão logística, para as variáveis predictoras do perfil de resposta à Hidroxiureia em pacientes com doença falciforme (n=93)

Variável	<i>Deviance</i>	Graus de Lib. Resíduos	<i>Deviance Residual</i>	Valor p
Modelo Nulo	---	464	520,2	---
Idade	19,6	462	500,6	0,001
<i>eNOS</i> (rs1799983)	3,4	459	473,6	0,063
<i>BCL11A</i> (rs766432)	15,6	461	485,0	0,001
<i>UTA</i> (rs9960464)	7,9	460	477,1	0,005

Figura 9: Valor esperado e intervalo de 95% de confiança para a probabilidade de resposta de pacientes com doença falciforme tratados com Hidroxiureia (n=93) conforme modelo de regressão logística selecionado via método *stepwise*



Painel A: Polimorfismo G>T (rs1799983) no gene da *eNOS*; **Painel B:** Polimorfismo A>C (rs766432) no gene *BCL11A*; **Painel C:** Polimorfismo G>A (rs9960464) no gene *UTA*; **Painel D:** Idade categorizada. Teste de comparação par-a-par, indicado pelas letras maiúsculas acima de cada grupo. Grupos que compartilham a mesma letra minúscula não são diferentes entre si no teste de comparação par-a-par em um nível de significância de 5%.
Fonte: R Core Team, 2017

6 DISCUSSÃO

A heterogeneidade nas manifestações laboratoriais, clínicas e na gravidade de cada quadro clínico apresentado pelos pacientes é uma característica que chama a atenção na doença falciforme (ZAGO; PINTO, 2007). Embora a HU comprovadamente ofereça muitos efeitos benéficos a esses pacientes, parte significativa desses não respondem adequadamente a terapia com o fármaco. As bases da falha nessa resposta não são completamente conhecidas, mas recentes achados apontam para o fato de que parte dessa variabilidade individual esteja relacionada a polimorfismos genéticos (GREEN et al., 2013; HUSAI et al., 2017; SHEEHAN et al., 2014; WARE et al., 2010; YOUSRY et al., 2017).

Nesse sentido, o presente estudo é pioneiro ao avaliar a influência de polimorfismos nos genes da *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA* na resposta à HU em pacientes com doença falciforme em Minas Gerais. Tais achados são significativamente importantes em decorrência de o estado apresentar alta incidência da doença, além da grande variabilidade fenotípica entre os pacientes das diferentes regiões brasileiras (ARDUINI et al., 2017; LERVOLINO et al., 2011; LOBO et al., 2017; SABARENSE et al., 2015).

Adicionalmente, pode-se conhecer a frequência desses seis SNPs em uma amostra significativa dos pacientes com doença falciforme atendidos no Hemocentro Regional de Governador Valadares, o qual é responsável pela cobertura das regiões leste e nordeste do estado, que concentra grande incidência dos pacientes com DF de Minas Gerais (JANUÁRIO, 2002). As frequências genotípicas e alélicas encontradas para todos os polimorfismos avaliados (Tabelas 4 e 5) são semelhantes àquelas encontradas para outras populações em estudos nacionais e internacionais (ANGONA et al., 2013; GREEN et al., 2013; HENDRIX et al., 2017; KHATAMI et al., 2017; LACCHINI et al., 2017; MIKOBİ et al., 2016).

Diferentemente do esperado, pacientes não tratados com HU apresentaram níveis semelhantes de Hb, Hct e Rtc àqueles tratados com o fármaco, apesar da diferença dos valores de LG (Tabela 3). Tais achados possivelmente são explicados pelo fato de o grupo não tratado apresentar maior porcentagem de pacientes com genótipo SC quando comparado aos pacientes em tratamento farmacológico ($p < 0,001$; Tabela 3). Como também evidenciado na Figura 7, os pacientes do grupo controle apresentaram os parâmetros bioquímicos praticamente constantes ao longo dos diversos momentos analisados, diferente dos pacientes tratados com HU, os quais exibiram piores parâmetros bioquímicos basais quando comparado ao grupo não tratado, sendo

que houve significativo incremento em tais níveis após o início do tratamento farmacológico. Adicionalmente, a análise multivariada apontou para o fato de que as variações nos níveis desses quatro parâmetros são em parte explicadas pelo diagnóstico dos pacientes (Tabela 7 e Tabelas G, H e I do Apêndice). Achados recentes provenientes de um estudo realizado na Bahia, mostraram que os pacientes com anemia falciforme (HbSS) de fato apresentaram um padrão hemolítico mais proeminente em comparação com pacientes com a hemoglobinopatia SC, os quais apresentaram contagem e concentração de hemoglobina maiores, além de níveis inferiores da leucometria (ALELUIA et al., 2017). A presença da HbC reduz o grau de polimerização da HbS quando comparado aos pacientes SS, promovendo um quadro de anemia hemolítica menos grave com melhores parâmetros hematológicos e clínicos (GROSSE et al., 2011).

Apesar de não haver restrição ao tratamento farmacológico com HU apenas aos pacientes com anemia falciforme (HbSS), possivelmente em função de esses apresentarem mais frequentemente complicações e agravos da doença, recebem em maior número a prescrição do medicamento. Ainda que o PCDT da Doença Falciforme, atualizado e revisado pela CONITEC (2016), inclua no tratamento com HU os pacientes com diagnóstico de DF (HbSS, SC, SD ou S β -talassemia), uma revisão sistemática da Cochrane publicada em 2017 reforça a efetividade da HU em relação aos parâmetros bioquímicos e clínicos em crianças e adultos com os genótipos HbSS e S β -talassemia. Nessa revisão, ficam evidentes os benefícios hematológicos, como incremento Hb, Hct e redução da LG e reticulócitos, além da diminuição da frequência dos episódios de dor, de transfusões sanguíneas, do número de internações e outras complicações agudas, prevenindo também eventos neurológicos de risco, como acidente vascular cerebral (NEVITT et al., 2017). Ainda que as evidências sejam limitadas quanto aos benefícios do uso de HU por indivíduos com genótipo SC, estudos recentes também apontam para essa direção (LUCHTMAN-JONES et al., 2016; NEVITT et al., 2017).

No presente estudo, esses benefícios hematológicos aos pacientes com doença falciforme (SS e SC) provenientes do tratamento com HU estão evidentes na Tabela 9, na qual observa-se o incremento dos níveis de Hb, Hct e HbF, além de redução da LG e reticulócitos (todos $p < 0,0001$) quando comparados os dados do mesmo paciente antes e após o tratamento. Possivelmente, tais benefícios hematológicos provocados pela HU refletem no aumento da qualidade e da expectativa de vida do paciente com DF. O acompanhamento de uma coorte brasileira demonstra, eficácia e segurança do uso a longo prazo da HU em crianças com doença

falciforme. Também foi observada elevação dos níveis de Hb, HbF, hematócrito, queda da leucometria e reticulócitos além da diminuição da gravidade da doença, com redução de 50% nas taxas de internação e queda de 87% na taxa de mortalidade (LOBO et al., 2013). Pesquisas internacionais apresentaram achados semelhantes quanto ao uso contínuo de HU para redução da mortalidade não só em crianças, mas também em adolescentes e adultos (NEVITT et al., 2017; QUINN et al., 2010; STEINBERG, 2010; VOSKARIDOU et al., 2010).

A contribuição da HU em reduzir os níveis médios de reticulócitos evidenciado nesse estudo (Figura 7, painel D) também foi descrita em diversos estudos nacionais e internacionais (ADEGOKE et al., 2017; ALELUIA et al., 2017; VOSKARIDOU et al., 2010; YOUSSEY et al., 2017). Tal redução tem especial importância no controle de eventos cerebrovasculares, complicação comum da população com anemia falciforme. Essa relação foi reforçada por uma revisão recentemente publicada, a qual demonstrou que dentre os biomarcadores, a contagem de reticulócitos no sangue periférico é provavelmente o marcador laboratorial mais importante para prever a ocorrência de acidente vascular cerebral em indivíduos com anemia falciforme (BELISÁRIO et al., 2016; WARE et al., 2016).

Apesar de não terem sido encontradas associações entre os parâmetros hematológicos e os genótipos para os SNPs nos genes da *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA* ao analisarmos todos os pacientes com doença falciforme (Tabela 6), quando avaliados separadamente apenas os pacientes tratados com HU e aqueles com genótipo SS (Tabela 7), houve significativa associação entre os níveis de Hb e o polimorfismo G>T no gene da *eNOS* (rs1799983). Indivíduos em uso de HU com o genótipo GT apresentaram níveis mais elevados de Hb em comparação àqueles com o genótipo GG (Figura 6). Similarmente, pacientes com genótipo heterozigoto apresentaram maior concentração de Hb no pré-tratamento quando comparados aos pacientes com o genótipo selvagem para o mesmo polimorfismo (Tabela 7). A substituição da guanina na posição 894 pela timina (G894T) no exon 7 do gene *eNOS* promove a modificação para o aminoácido glutamina ao invés do aspartato (codificado pelo alelo menos frequente) no resíduo 298 da enzima. Estudos funcionais fortemente sugerem que esse polimorfismo está associado à alteração da atividade da *eNOS* (GODFREY et al., 2007; JOSHI et al., 2007). Células que carregam o alelo T apresentam menor disponibilidade da enzima na cavéola (\downarrow eNOS/Caveolina-1). Uma vez que a localização celular da *eNOS* e sua ligação à caveolina-1 desempenham papel fundamental para ativação da enzima, indivíduos que apresentam o alelo de menor frequência estão associados à menor produção de NO (GODFREY

et al., 2007; JOSHI et al.; 2007). Por outro lado, a eNOS codificada a partir do alelo selvagem G parece ser menos suscetível à clivagem proteolítica, fato que pode resultar em aumento da sua atividade com maior produção de NO, gerando um efeito tóxico devido ao estresse oxidativo (LARRUSKAIN et al., 2017).

Pesquisas em várias partes do mundo têm tentado associar esse polimorfismo G>T no gene da *eNOS* com diferentes doenças, incluindo a DF. Particular importância merecem esses achados, uma vez que tal polimorfismo parece explicar em parte a variação fenotípica dos pacientes com essa hemoglobinopatia. Foi observado que pacientes classificados com DF grave tiveram maior frequência do alelo de menor frequência T (genótipos GT + TT) quando comparados aos pacientes classificados com DF moderada (NISHANK et al., 2013). Por outro lado, corroborando nossos resultados, pacientes com anemia falciforme com o genótipo TT tenderam a apresentar maiores valores de hematócrito e hemoglobina quando comparados aos pacientes com o alelo selvagem (ARMENIS et al., 2017).

Além dos estudos envolvendo a DF, extenso número de trabalhos busca avaliar associações desse polimorfismo com doenças cardiovasculares pela sugestiva alteração nos níveis de NO decorrente dos diferentes genótipos, o que impactaria em suas funções ateroprotetoras. Uma recente meta análise investigou a correlação do referido SNP com a doença circulatória cardíaca precoce. Concluíram a possível associação desse polimorfismo com um risco maior para doença arterial circulatória, especialmente o infarto do miocárdio, sugerindo assim que o teste para tal polimorfismo no gene da *eNOS* pode ser útil para avaliação clínica e predição de infartos prematuros. Adicionalmente, foi encontrada associação do alelo de menor frequência T com a redução de NO, com conseqüente queda de perfusão placentária e aumento nos riscos de defeitos estruturais congênitos do coração fetal (KHATAMI et al., 2017).

Em soma ao polimorfismo no exon 7, outro polimorfismo no gene da *eNOS* amplamente estudado e que apresenta grande relevância clínica é o SNP na região promotora T-786C do gene (rs2070744), que pode conter uma base T (alelo selvagem) ou C (alelo menos frequente). Porém, diferente dos resultados encontrados para o polimorfismo G>T, no presente estudo não foi encontrada associação dos parâmetros bioquímicos dos pacientes com AF e o polimorfismo T>C no gene da *eNOS*. Mas vale ressaltar que esse polimorfismo já foi descrito como influente na doença falciforme. Uma vez que a hemólise intravascular promove redução da biodisponibilidade de NO, polimorfismos que afetam a atividade e a quantidade da enzima eNOS parecem mesmo interferir na gravidade e apresentação da DF. O alelo C foi mais

frequente entre mulheres com AF que apresentaram Síndrome Torácica Aguda (STA) (SHARAN et al., 2004), bem como pacientes com o genótipo CC exibiram o fenótipo clínico mais grave da doença (ARMENIS et al., 2016; NISHANK et al., 2013; THAKUR et al., 2014; VARGAS et al., 2005). Adicionalmente, indivíduos com o alelo menos frequente apresentavam maiores níveis de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), sugerindo a contribuição desse polimorfismo para o estado de inflamação vascular presente na anemia falciforme (VILAS-BOAS et al., 2016).

Outros estudos também sugeriram o impacto desse polimorfismo principalmente em complicações clínicas da DF. Indivíduos com o genótipo CC tenderam a apresentar o quadro de retinopatia com maior frequência que os pacientes com os genótipos TT e TC (ARMENIS et al., 2016). O referido polimorfismo também foi considerado como preditor significativo para a ocorrência de STA, onde os pacientes com genótipo homocigoto de menor frequência tiveram o risco aumentado em dez vezes para tal complicação. Em soma, os pacientes com genótipo selvagem foram associados de forma significativa ao menor risco de hipertensão pulmonar e crises agudas de vaso-oclusão (YOUSRY et al., 2016). Adicionalmente, pacientes com o genótipo carregando o alelo de menor frequência C apresentaram maior frequência de lesões de perna, reforçando que o impacto negativo desse alelo na clínica da DF é significativo mesmo quando não se trata da fase aguda dos eventos clínicos (BOASIAKO, 2014).

Outras doenças além da DF também parecem estar associadas a tais polimorfismos no gene da *eNOS*, como por exemplo diabetes, infertilidade, aterosclerose e esclerose múltipla. Porém, os achados ainda são conflitantes e inconclusivos, por se tratarem de doenças com perfis multifatoriais (BEYNUM et al., 2008; HEIDARI et al., 2017; HENDRIX et al., 2017; KHATAMI et al., 2017; LARRUSKAIN et al., 2017; LI et al., 2015; THAKUR et al., 2014). Alguns estudos correlacionam esse polimorfismo T>C na região promotora do gene com espasmos coronarianos, acidente vascular cerebral isquêmico e pesquisa recente o associou como um fator de influência para a suscetibilidade à hipertensão arterial (GAMIL et al., 2017).

Adicionalmente, a presença do alelo de menor frequência C ainda foi associado à hemorragia de disco óptico em pacientes com glaucoma de tensão normal (JEOUNG et al., 2017). Outro dado interesse relacionado a esse polimorfismo foi publicado em uma meta análise onde, indivíduos com a presença do alelo selvagem T parecem ter maior propensão a se tornarem atletas de ponta. Tais achados em diferentes estudos foram relacionados a uma

diminuição na biodisponibilidade do NO, comum em indivíduos que apresentam o genótipo com a presença do alelo C (HENDRIX et al., 2017; WEYERSTRA et al., 2017).

Além da associação de polimorfismos no gene da *eNOS* com a fisiopatologia de muitas doenças, tal polimorfismo também parece modular a resposta a alguns fármacos (FANG et al., 2014; KAUFMAN et al., 2015). Indivíduos com o alelo de menor frequência T para o polimorfismo G>T no gene da *eNOS* (rs1799983) foram piores respondedores ao tratamento com ácido salivariânico para disfunções cardíacas e também responderam pior ao tratamento quimioterápico para câncer de estômago metastático (CHOI et al., 2009; GENG et al., 2014). Nossos achados referentes ao mesmo polimorfismo sugerem que este também pode influenciar o padrão de resposta ao tratamento com HU ($p=0,063$; Tabela 10), no entanto, a análise par-a-par não demonstrou diferença significativa entre os genótipos (Figura 9, painel A).

Em adição aos polimorfismos no gene da *eNOS*, outro importante candidato investigado no presente estudo foi o gene *BCL11A* o qual codifica fatores transcricionais que regulam negativamente a síntese de HbF e com isso age naturalmente como potente repressor na expressão de HbF (GREEN et al., 2013; JIANG et al., 2016; LETTRE; BAUER, 2016; MIKOBİ et al., 2016). Em função disso, polimorfismos que reduzem a expressão desse gene costumam promover uma elevação nos níveis de HbF, o que impacta positivamente no curso da DF (LETTRE; BAUER, 2016). Apesar de os polimorfismos G>A no rs4671393 e A>C no rs766432 de tal gene não terem apresentado associação com os parâmetros bioquímicos no pré ou pós-tratamento com HU (Tabelas C e D do Apêndice), quando foi considerado o perfil resposta; a frequência dos genótipos contendo o alelo de menor frequência para ambos polimorfismos indica ser mais elevada entre os bons respondedores (Figura 8, painéis D e E). Quando aplicada a análise por regressão logística, o efeito do polimorfismo A>C se manteve (Tabela 10; Figura 9, painel B), sendo que pacientes com os genótipos AC e CC apresentaram maior probabilidade de resposta ao tratamento com HU quando comparados aos pacientes com genótipo selvagem. Esse agrupamento dicotômico entre “respondedores” e “não respondedores” foi utilizado em outros estudos farmacogenéticos, baseados na evidência que níveis de HbF superiores a 20% exercem um melhor efeito terapêutico quanto ao uso de HU (BORG et al., 2012; CHALIKIOPOULOU et al., 2016; PATRINOS; GROSVELD, 2008).

Um estudo recente realizado no estado da Bahia também analisou alguns polimorfismos no gene *BCL11A*. Chama a atenção entre as análises o rs766432 A>C onde indivíduos em uso de HU com genótipo CC também apresentaram bons incrementos nos níveis de HbF, assim

como encontrado em nosso estudo (ALELUIA et al., 2017). Esses achados também foram apontados em outros estudos semelhantes (BAUER et al., 2013, BAUER; ORKIN, 2015; SARAF et al., 2017).

Para o polimorfismo G>A (rs4671393) no gene *BCL11A*, resultados parecidos aos nossos (Figura 8, Painel D) foram encontrados entre pacientes de Porto Alegre, o qual evidenciou que pacientes com o genótipo polimórfico AA apresentam melhores incrementos na concentração de HbF, resultando na melhor resposta ao uso da HU (FRIEDRISCH et al., 2016). Em contrapartida, um estudo revisou a associação entre a alta variabilidade relacionada ao incremento de HbF em crianças com DF tratadas com HU e 19 polimorfismos em genes candidatos (9 no gene *BCL11A*) sugere que trata-se de uma resposta muito complexa que envolve a sobreposição de diversos fatores biológicos, sendo que as variações genéticas explicam apenas parte da referida variabilidade (GREEN; BARRAL, 2013).

Adicionalmente, as mesmas autoras reportaram significantes associações entre o incremento de HbF induzido pela HU e SNPs em genes envolvendo o metabolismo da arginina a NO. Dentre esses, destacam-se aqueles nos genes da arginase tipo 1 e 2. Tais variações parecem afetar a atividade da arginase plasmática e estudos têm relacionado tais polimorfismos nesse gene com a fisiopatogênese de algumas doenças arteriais como infartos do miocárdio e aterosclerose (DUMONT et al., 2007; LACHINI et al., 2015). Estudo farmacogenético mostrou que pacientes com genótipos com alelo T para o rs17599586 (CT + TT) apresentaram reduzida atividade da arginase, no entanto, tal polimorfismo não influenciou a capacidade de resposta ao sildenafil, um fármaco usado para tratamento da disfunção erétil (LACHINI et al., 2017). Similarmente, nosso estudo também não encontrou associação entre os diferentes genótipos para esse polimorfismo e a capacidade de resposta à HU (Figura 8, painel C). Apesar disso, outros autores encontraram associação de polimorfismos na arginase com a responsividade às terapias que são impactadas pelo NO, como o tratamento por agonistas β 2-adrenérgicos e esteroides, além da terapia da AF usando a HU (DUAN et al., 2011; LITONJUA et al., 2008; MA et al., 2007; VONK et al., 2010).

Além dos genes candidatos relacionados ao mecanismo de ação da HU, nosso estudo também buscou avaliar a associação da resposta a esse fármaco com um importante alvo farmacocinético. Ware e colaboradores (2011) mostraram dois perfis farmacocinéticos à HU bem distintos entre pacientes com AF utilizando a mesma dose do fármaco: pacientes com fenótipo lento e com fenótipo rápido. Esses fenótipos foram associados com polimorfismos

genéticos em alguns genes candidatos, incluindo polimorfismos no gene do transportador de ureia (*UTA*). Visto que a HU possui forma estrutural semelhante à ureia, esse fármaco é um substrato para a família de proteínas transportadoras da ureia codificadas pelo gene *UTA*, sendo esses transportadores envolvidos no processo de absorção, distribuição e eliminação da HU (WALKER et al., 2011). Interessantemente, o polimorfismo G>A no rs9960464 desse gene foi significativo em nosso estudo no que se refere à possibilidade de resposta ao fármaco (Figura 8, painel F; Tabela 10; Figura 9, painel C). Pacientes que apresentaram o genótipo com o alelo de menor frequência A para o rs9960464 G>A no gene *UTA* foram melhores respondedores ao tratamento com HU quando comparados àqueles como alelo selvagem G. O efeito desse mesmo polimorfismo no gene *UTA* foi previamente investigado em pacientes com neoplasias mieloproliferativas tratados com HU. Diferente dos nossos achados, os resultados apontaram que houve uma menor probabilidade de se obter resposta molecular ao uso de HU para os genótipos que apresentavam o alelo de menor frequência A em comparação com o alelo selvagem G em homozigose (ANGONA et al., 2013). Vale ressaltar a descrição dos autores do estudo, os quais reconheceram como limitações o tamanho amostral e heterogeneidade da amostra estudada. Apesar de se tratar do mesmo fármaco, a doença investigada apresenta fisiopatologia bastante distinta da doença falciforme, além de tratar-se de uma população espanhola, com perfil genético possivelmente distinto da população brasileira.

Esse polimorfismo G>A no rs9960464 no gene do transportador *UTA* é responsável por uma mutação *missense* (não sinônima), na qual a troca do aminoácido A pelo G promove a alteração na sequência de aminoácidos do transportador, na posição 510, levando à troca de uma Arginina pela Glutamina. Apesar de se supor que essa alteração possa promover alteração da função do transportador visto que arginina é um aminoácido básico, enquanto a glutamina é um aminoácido polar neutro, até o momento, não existem estudos funcionais capazes de explicar as consequências dessa alteração em nível celular.

Além da associação do perfil de resposta com os polimorfismos genéticos, a análise por regressão logística também apresentou a idade como uma preditora do efeito farmacológico (Tabela 10; Figura 9, painel D) e indivíduos mais jovens foram classificados como melhores respondedores. Uma possível explicação pode residir no fato de que a média de idade do grupo de pacientes tratados com HU foi de $17,9 \pm 11,5$ anos (Tabela 3), correspondendo em sua maioria a pacientes jovens. Estudos mostram que indivíduos com doença falciforme com menor idade tendem a manifestar níveis mais elevados de HbF, porém essa elevação declina a partir

do primeiro ano de vida e por volta do 20º ano adquire valores menores, sendo mantidos durante a fase adulta (MA et al., 2007; MEIER et al., 2011). Alguns trabalhos apontam para menores incrementos de HbF induzida por HU de pacientes adultos quando comparados àqueles mais jovens (CHARACHE et al., 1992; VOSKARIDOU et al., 2010; WANG et al., 2011; ZIMMERMAN et al.; 2004). Foram encontrados níveis de HbF de 15% no pós-tratamento de pacientes adultos (idade média de 27,6 anos) que receberam a dose máxima de HU (CHARACHE et al., 1992) e, similarmente, valores de 17,4% foram obtidos no último acompanhamento de pacientes também adultos (idade média de 33 anos) tratados com doses convencionais do mesmo fármaco (VOSKARIDOU et al., 2010). Por outro lado, dados provenientes de um estudo multicêntrico, controlado e randomizado com crianças com AF tratadas com HU (WANG et al., 2011) apontaram valores de HbF que oscilaram entre 25,6 e 22,4% (WANG et al., 2011). Zimmerman e colaboradores (2004) também já haviam observado valores de HbF próximos à 20% entre as crianças tratadas com esse medicamento.

Apesar dos interessantes achados, faz-se importante destacar algumas limitações do presente estudo, onde os dados referentes aos parâmetros bioquímicos laboratoriais dos participantes foram realizados em sua maioria através da coleta em prontuários de forma retrospectiva. Outra limitação foi a falta de aplicação de questionário padronizado para avaliação de adesão ao tratamento farmacológico, apesar de a adesão ser avaliada pelo médico a cada retorno, além de serem registrados os dados no prontuário. Adicionalmente, o tamanho reduzido da população estudada constitui-se em um importante viés, principalmente para os polimorfismos nos quais a frequência do alelo de menor frequência é pequena, como o rs17599586 C>T no gene da arginase.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo é pioneiro ao descrever a frequência de polimorfismos genéticos nos genes da *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA* em uma população de indivíduos com doença falciforme no estado de Minas Gerais, além de avaliar a influência desses polimorfismos quanto a resposta à HU. Significativamente importante em decorrência de o estado apresentar alta incidência da doença, além da grande variabilidade fenotípica entre os pacientes das diferentes regiões brasileiras.

Nossos dados demonstram que o polimorfismo G>T no gene da *eNOS* (rs1799983) parece se associar aos níveis de hemoglobina em pacientes com doença falciforme. Pacientes com o genótipo GT apresentaram maiores valores de Hb quando comparados aos pacientes homocigotos para o alelo G.

Em adição, o polimorfismo A>C no gene *BCL11A* (rs766432) parece modular a resposta à hidroxiureia. Os genótipos AC e CC foram mais frequentes entre os respondedores quando comparado ao grupo dos não respondedores ao fármaco. Somados a esses achados, os pacientes com genótipo GA para o polimorfismo G>A no gene *UTA* (rs9960464) responderam de forma mais efetiva ao tratamento medicamentoso que pacientes com o genótipo GG. Em contrapartida, após análise por regressão logística, não encontramos diferença significativa entre respondedores e não respondedores quanto aos demais polimorfismos investigados (T>C no gene da *eNOS* (rs2070744); C>T no gene da *ARG1* (rs17599586) e G>A no gene *BCL11A* (rs4671393).

REFERÊNCIAS

- ABE K, et al. Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the -786T>C polymorphism. **Pharmacogenet Genomics**, 2005. 15(5): p. 329-36.
- ADAMS, R.J et al. Discontinuing Prophylactic Transfusions Used to Prevent Stroke in Sickle Cell Disease. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 353, n. 26, p.2769-2778, 29 dez. 2005. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa050460>.
- ADEGOKE, Samuel A. et al. Impact of Hydroxyurea on Anthropometry and Serum 25-Hydroxyvitamin D Among Children With Sickle Cell Disease. **Journal Of Pediatric Hematology/oncology**, [s.l.], p.1-4, nov. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mpj.0000000000001002>.
- ADEGOKE, Samuel Ademola et al. Changes in Transcranial Doppler Flow Velocities in Children with Sickle Cell Disease: The Impact of Hydroxyurea Therapy. **Journal Of Stroke And Cerebrovascular Diseases**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.425-431, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.020>.
- ADORNO, E. V. et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n.1, p. 292-298, 2005.
- ADORNO, E.V et al. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 31, 3, 621-625 (2008), Sociedade Brasileira de Genética.
- AGUIAR, Laura et al. Sickle cell anemia – Nitric oxide related genetic modifiers of hematological and biochemical parameters. **Clinical Hemorheology And Microcirculation**, [s.l.], v. 64, n. 4, p.957-963, 2 fev. 2017. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/ch-168008>.
- ALBRECHT, E.W. et al. Protective role of endotelial nitric oxide synthase. **J Pathol**. Jan;199(1)8-17, 2003 doi: 10.1002/path.1250
- ALELUIA, Milena Magalhães et al. Comparative study of sickle cell anemia and hemoglobin SC disease: clinical characterization, laboratory biomarkers and genetic profiles. **Bmc Hematology**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-2, 15 set. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12878-017-0087-7>.
- ALELUIA, Milena Magalhães et al. Genetic modulation of fetal hemoglobin in hydroxyurea-treated sickle cell anemia. **American Journal Of Hematology**, [s.l.], v. 92, n. 5, p.70-72, 10 mar. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.24680>.
- ALGIRAIGRI, Ali H.; KASSAM, Aliya. Hydroxyurea for hemoglobin E/β-thalassemia: a systematic review and meta-analysis. **International Journal Of Hematology**, [s.l.], v. 106, n. 6, p.748-756, 7 ago. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12185-017-2307-0>.

ALMEIDA, C. B. et al. Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea. **Blood**, [s.l.], v. 126, n. 6, p.711-720, 27 maio 2015. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-12-616250>.

ALMEIDA, C.B et al. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. Prepublished online as **Blood** First Edition paper, July 25, 2012; doi 10.1182/blood-2012-02-409524.

ANGONA, Anna et al. Genetic predisposition to molecular response in patients with myeloproliferative neoplasms treated with hydroxycarbamide. **Leukemia Research**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.917-921, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2013.03.013>.

ARAUJO, Olinda Maria Rodrigues de et al. Survival and mortality among users and non-users of hydroxyurea with sickle cell disease. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.67-73, fev. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0104-1169.3385.2526>.

ARDUINI, Giovanna Abadia Oliveira; RODRIGUES, Letícia Pinto; MARQUI, Alessandra Bernadete Trovó de. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.52-56, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.09.008>.

ARMENIS, Iakovos et al. Prognostic value of T786C and G894T eNOS polymorphisms in sickle cell disease. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 62, p.17-23, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2016.11.002>.

ARNONE, Arthur. X-ray Diffraction Study of Binding of 2,3-Diphosphoglycerate to Human Deoxyhaemoglobin. **Nature**, [s.l.], v. 237, n. 5351, p.146-149, maio 1972. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/237146a0>.

ARTAC, M.; KARKABOUNA, S.; LAPPAMANAKOU, C.; MANCHIA, M.; MANOLOPOULOS, V.G., MITRAPOULOS, K. Realities and expectations of pharmacogenomics and personalized medicine: impact of translating genetic knowledge into clinical practice. **Pharmacogenomics**, V. 11(8):1149-1167, 2010 doi: 10.2217/pgs.10.97.

AYGUN, B e ODAME, I. A global perspective on sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. Aug;59(2):386-90. 2012 **Acta Cardiol Sin**. 2017 Jul;33(4):420-428 PMID: PMC5534422

AZEVEDO, Elaine S. et al. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. **American Journal Of Physical Anthropology**, [s.l.], v. 53, n. 4, p.509-512, nov. 1980. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ajpa.1330530407>.

BALLAS, Samir K. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal Of Hematology**, [s.l.], p.1-2, 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21550>.

BANAN, Mehdi. Hydroxyurea treatment in β -thalassemia patients: to respond or not to respond?. **Annals Of Hematology**, [s.l.], v. 92, n. 3, p.289-299, 15 jan. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-012-1671->

BANK, A.. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. **Blood**, [s.l.], v. 107, n. 2, p.435-443, 15 jan. 2006. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-05-2113>.

BANK,A et al. Disorders of human hemoglobin. **Science**.207: 486-493, 1980.

BARBOSA, A.m. et al. Atherosclerosis: analysis of the eNOS (T786C) gene polymorphism. **Genetics And Molecular Research**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.1-2, 2017. Genetics and Molecular Research. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039708>.

BAUER, D. E. et al. An Erythroid Enhancer of BCL11A Subject to Genetic Variation Determines Fetal Hemoglobin Level. **Science**, [s.l.], v. 342, n. 6155, p.253-257, 10 out. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1242088>.

BAUER, Daniel e; ORKIN, Stuart H. Hemoglobin switching's surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin. **Current Opinion In Genetics & Development**, [s.l.], v. 33, p.62-70, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2015.08.001>.

BELISÁRIO, A.R. avaliação da influência de marcadores genéticos, laboratoriais e clínicos na ocorrência de doença cerebrovascular em crianças com anemia falciforme triadas pelo programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas. [**Tese de Doutorado**]. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, 2015.

BELISÁRIO, A.R; SALES, R.R; SILVA, C.M; VELLOSO, C.R; VIANA, M.B. The Natural History of HbS/Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin in 13 Children from the State of Minas Gerais, Brazil. **Hemoglobin**. junho de 2016;40(3):215–9

BELISÁRIO, André Rolim et al. Genetic, laboratory and clinical risk factors in the development of overt ischemic stroke in children with sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], p.7-15, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2017.08.008>.

BENDER, M.A. Sickle Cell Disease. **GeneReviews**[®] [Internet]. Initial Posting: September 15, 2003; Last Update: August 17, 2017. PMID: 20301551

BERNAUDIN, F. et al. Biological impact of α genes, β haplotypes, and G6PD activity in sickle cell anemia at baseline and with hydroxyurea. **Blood Advances**, [s.l.], v. 2, n. 6, p.626-637, 19 mar. 2018. American Society of Hematology.

BERRY, P.A. et al. Hepatic dysfunction in sickle cell disease: a new system of classification based on global assessment. **Clinical Gastroenterology Hepatology**.5.12: 1469-76, 2007.

BEYNUM, I.M et al. Common G894T single nucleotide polymorphism in the gene coding for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of congenital heart defects. **Clin Chem Lab Med** 2008; 46(10): 1369–1375 doi 10.1515/CCLM.2008.271

BITAR, C.M. Suplementação com L-Arginina como terapia complementar aos pacientes com doença falciforme. [**Tese de Doutorado**]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, 2009.

BOASIAKO, C.A. Association of endothelial nitric oxide synthase (enos) gene polymorphism with complications of HbSS in ghanaiian sickle cell disease patients. [**Tese de Doutorado**]. Universidade de Gana, 2014.

BORG, Joseph et al. KLF10 gene expression is associated with high fetal hemoglobin levels and with response to hydroxyurea treatment in β -hemoglobinopathy patients. **Pharmacogenomics**, [s.l.], v. 13, n. 13, p.1487-1500, out. 2012. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/pgs.12.125>

BRASIL, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Manual de Diagnóstico e Tratamentos das Doenças Falciformes, 1ª Edição, 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Curso: Doença Falciforme: Conhecer para cuidar, 2015.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença Falciforme Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – **CONITEC**, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Doença Falciforme. Condutas básicas para tratamento**. Série B. Textos básicos de Saúde, 2012

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença Falciforme**, Portaria SAS/MS nº 55, de 29 de janeiro de 2010.

BREVEGLIERI, Giulia et al. An $A\gamma$ -globin G->A gene polymorphism associated with β 039 thalassemia globin gene and high fetal hemoglobin production. **Bmc Medical Genetics**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-2, 29 ago. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12881-017-0450-3>.

BUSH, R., William S.; MOORE, Jason H.. Bioinformatics Challenges in Genome-Wide Association Studies (GWAS). **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.63-81, 2014. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0847-9_5.

CARLOS, C.D. Polimorfismos nos receptores de adenosina, suas associações com características fisiopatológicas e avaliação de componentes na biossíntese da adenosina em pacientes com doença falciforme. [**Dissertação de Mestrado**]. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2011.

CASAS, J. P.. Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype and Ischemic Heart Disease: Meta-Analysis of 26 Studies Involving 23028 Subjects. **Circulation**, [s.l.], v. 109, n. 11, p.1359-1365, 23 mar. 2004. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.0000121357.76910.a3>.

CHALIKIOPOULOU, C et al. Genomic variants in the ASS1 gene, involved in the nitric oxide biosynthesis and signaling pathway, predict hydroxyurea treatment efficacy in compound sickle cell disease/ β -thalassemia patients. **Pharmacogenomics**. ISSN 1462-2416 10.2217/pgs.16.1 2016 Future Medicine Ltd.

CHARACHE, Samuel et al. Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle Cell Anemia. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 332, n. 20, p.1317-1322, 18 maio 1995. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199505183322001>.

CHAUFFAILLE, M.L. **Diagnósticos em hematologia**. 1ª edição. Editora Manole. São Paulo, 2016.

CHINELATO, I.S. Polimorfismo XmnI e haplótipos do gene beta globina e suas relações com os níveis de hemoglobina Fetal em beta talassemia. [**Dissertação de Mestrado**]. Universidade Estadual Paulista. Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, São José do Rio Preto, SP, 2014.

CHINELATO, Isabela Sandrin; CARROCINI, Gisele Cristine de Souza; BONINI-DOMINGOS, Claudia Regina. XmnI polymorphism frequency in heterozygote beta thalassemia subjects and its relation to Fetal hemoglobin levels. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 33, n. 6, p.483-483, 2011. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (RBHH). <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20110128>.

CHOI, J.-y. et al. Nitric Oxide Synthase Variants and Disease-Free Survival among Treated and Untreated Breast Cancer Patients in a Southwest Oncology Group Clinical Trial. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 15, n. 16, p.5258-5266, 11 ago. 2009. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-0685>.

CHOI, Sungyoung et al. Immunohistochemical study of arginase 1 and 2 in various tissues of rats. **Acta Histochemica**, [s.l.], v. 114, n. 5, p.487-494, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2011.09.002>.

CONRAN, Nicola; COSTA, Fernando F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. **Clinical Biochemistry**, [s.l.], v. 42, n. 18, p.1824-1838, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.06.024>.

COSTA, Flávia C. et al. Induction of Fetal Hemoglobin In Vivo Mediated by a Synthetic-globin Zinc Finger Activator. **Anemia**, [s.l.], v. 2012, p.1-8, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/507894>.

DASGUPTA, Sudeshna et al. Association analysis of PON2 genetic variants with serum paraoxonase activity and systemic lupus erythematosus. **Bmc Medical Genetics**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-5, 11 jan. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2350-12-7>.

DIAS, C.C. Polimorfismos nos receptores de adenosina suas associações com características fisiopatológicas e avaliação de componentes na biossíntese da adenosina em pacientes com doença falciforme. **[Dissertação/mestrado]**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. USP, 2011.

DRISS, A et al. Sickle cell disease in the post genomic era: a monogenic disease wit polygenic phenotype. Review. **Genomics Insights**. 2009 Jul 30;2009(2):23-48

DUAN, Qing Ling et al. Regulatory Haplotypes inARG1Are Associated with Altered Bronchodilator Response. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 183, n. 4, p.449-454, 15 fev. 2011. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201005-0758oc>.

DUMONT, J. et al. Association of arginase 1 gene polymorphisms with the risk of myocardial infarction and common carotid intima media thickness. **Journal Of Medical Genetics**, [s.l.], v. 44, n. 8, p.526-531, 16 mar. 2007. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2006.047449>.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.39, n.4,2003.

EISENHARDT, A. et al. ACE gene I/D and NOS3 G894T polymorphisms and response to sildenafil in men with erectile dysfunction. **Urology**, 2003. 62(1): p. 152-7.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Protocolo de extração de RNA total de *Arachis* spp. e avaliação do efeito de contaminantes por meio de análises espectrofotométricas. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento online 2015**. <http://www.embrapa.br/semiarido> [acesso em dezembro de 2017].

ERIDANI, S.; MOSCA, A. Fetal hemoglobin reactivation and cell engineering in the treatment of sickle cell anemia. **Journal of Blood Medicine**. doi: 10.2147/JBM.S14942 2 23:30, 2011.

FANG, Chao et al. Effects ofeNOSrs1799983 andACers4646994 polymorphisms on the therapeutic efficacy of salvianolate injection in Chinese patients with coronary heart disease. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, [s.l.], v. 41, n. 8, p.558-564, ago. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/1440-1681.12257>.

FELIX, AA; SOUZA, H.M; RIBEIRO, S.B.F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. [online]. 2010, vol.32, n.3, pp.203-208. Epub June 25, 2010. ISSN 1516-8484. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842010005000072>.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc**, v. 2 (5):1084-1104, doi: 10.1038/nprot.2007.77 (2007).

FERNANDES, Ana Paula Pinheiro Chagas et al. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], p.1-2, 27 maio 2010. *Jornal de Pediatria*. <http://dx.doi.org/10.2223/jped.2005>.

FERREIRA, E.M.C.D. Factores genéticos moduladores do fenótipo da drepanocitose. **Dissertação (Mestrado)** em Biologia Humana e Ambiente, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 58f, 2011.

FERTRIN, Kleber Yotsumoto; COSTA, Fernando Ferreira. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Review Of Hematology**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.443-458, ago. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/ehm.10.44>

FRANCONI, F et al. Gender differences in drug responses. Review. **Pharmacological Research** 55 (2007) 81–95 PMID: 17129734

FRENETTE, Paul S.; ATWEH, George F.. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 117, n. 4, p.850-858, 2 abr. 2007. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci30920>.

FRIEDRISCH, J.R. Polimorfismos do DNA nos loci BCL11A, HMIP – 2, EXMN1 – HBG2 e sua correlação com os níveis de hemoglobina fetal em pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiureia. **[Tese de Doutorado]**. Faculdade de Medicina. Universidade do Rio Grande do Sul. UFRGS, 2015.

FRIEDRISCH, João Ricardo et al. The role of BCL11A and HMIP-2 polymorphisms on endogenous and hydroxyurea induced levels of fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients from southern Brazil. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, [s.l.], v. 62, p.32-37, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.11.002>.

GALLI, A.; SCHIEST, R.H. Hydroxyurea induces recombination in diiding but not in G1 or G2 cells cycle arrested yeast cells. **Mutat Res**, 1996 PMID: 8692208.

GAMIL, Sahar et al. Association of NOS3 gene polymorphisms with essential hypertension in Sudanese patients: a case control study. **Bmc Medical Genetics**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-2, 13 nov. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12881-017-0491-7>.

GAO, Jie et al. The Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism is Associated with the Susceptibility to Immunoglobulin a Nephropathy in Chinese Population. **Kidney And Blood Pressure Research**, [s.l.], v. 42, n. 3, p.608-616, 2017. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000481421>.

GENG, Ruixuan et al. Oxidative Stress-Related Genetic Polymorphisms Are Associated with the Prognosis of Metastatic Gastric Cancer Patients Treated with Epirubicin, Oxaliplatin and 5-Fluorouracil Combination Chemotherapy. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.116027-116045, 29 dez. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116027>.

GODFREY, V et al. The Functional Consequence of the Glu298Asp Polymorphism of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Young Healthy Volunteers. **Cardiovascular Drug Reviews** Vol. 25, No. 3, pp. 280–288, 2007.

GOMES, L.M.X e CALDEIRA, A.P. Avaliação da qualidade da assistência à criança com doença falciforme na atenção primária no Norte de Minas Gerais, Brasil. Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, 2010.

GONÇALVES, M.s. et al. β S-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [s.l.], v. 36, n. 10, p.1283-1288, out. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2003001000001>.

GRAVIA, Aikaterini et al. Individualizing fetal hemoglobin augmenting therapy for β -type hemoglobinopathies patients. **Pharmacogenomics**, [s.l.], v. 15, n. 10, p.1355-1364, jul. 2014. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/pgs.14.101>.

GRECH, G.; GROSSMAN, I. Preventive and predictive genetics: towards personalised medicine. Volume 9. Series Editor: Olga Golubnitschaja. **Springer International**, 2015.

GREEN, N.S et al. Candidate Sequence Variants and Fetal Hemoglobin in Children with Sickle Cell Disease Treated with Hydroxyurea. **Plos One**, v.8 (2), in press. doi: 10.1371/journal.pone.0055709, 2013.

GREEN, Nancy S.; BARRAL, Sandra. Genetic modifiers of HbF and response to hydroxyurea in sickle cell disease. **Pediatric Blood & Cancer**, [s.l.], v. 56, n. 2, p.177-181, 9 set. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.22754>.

GROSSE, Scott D. et al. Sickle Cell Disease in Africa. **American Journal Of Preventive Medicine**, [s.l.], v. 41, n. 6, p.398-405, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amepre.2011.09.013>.

GWILT, Peter R.; TRACEWELL, William G. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Hydroxyurea. **Clinical Pharmacokinetics**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.347-358, 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.2165/00003088-199834050-00002>.

HABARA, Alawi; STEINBERG, Martin H. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental Biology And Medicine**, [s.l.], v. 241, n. 7, p.689-696, mar. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1535370216636726>.

HEBBEL, Robert P. et al. Abnormal Adherence of Sickle Erythrocytes to Cultured Vascular Endothelium. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.154-160, 1 jan. 1980.

HAHN, L.W.; RITCHIE, M.D.; MOORE, J.H. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. **Bioinformatics**, v. 19(3):376-82, 2003.

HEIDARI, Mohammad Mehdi; KHATAMI, Mehri; TAHAMTAN, Yaser. Molecular Analysis of rs2070744 and rs1799983 Polymorphisms of NOS3 Gene in Iranian Patients With Multiple Sclerosis. **Basic And Clinical Neuroscience Journal**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.279-284, 1 jul. 2017. CASRP: Center of Advanced Scientific Research and Publications. <http://dx.doi.org/10.18869/nirp.bcn.8.4.279>.

HENDRIX, Philipp et al. The role of endothelial nitric oxide synthase –786 T/C polymorphism in cardiac instability following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 71, p.52-56, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2017.10.008>.

HILL, A.V. WAINSCOAT, J.S. The evolution of the alpha and beta globin gene clusters in human populations. **Hum Genet**. 74 (1): 16-23, PMID: 3530978, 1986.

HILLERY, C.A., et al. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. **Br J Haematol**. 2000. PMID 10848818

HUSAIN, Mariam; HARTMAN, Amber; DESAI, Payal. Pharmacogenomics of sickle cell disease: steps toward personalized medicine. **Pharmacogenomics And Personalized Medicine**, [s.l.], v. 10, p.261-265, out. 2017. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/pgpm.s123427>.

JANUÁRIO, J. Incidência da doença falciforme em um milhão de nascidos vivos em Minas Gerais (1998 – 2001). **[Dissertação/mestrado]** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; UFMG, 2002.

JEOUNG, Jin Wook et al. The Relation Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Normal Tension Glaucoma. **Journal Of Glaucoma**, [s.l.], v. 26, n. 11, p.1030-1035, nov. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ijg.0000000000000751>.

JIANG, Zhihua et al. The genetic basis of asymptomatic codon 8 frame-shift (HBB: c25_26delAA) β 0-thalassaemia homozygotes. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 172, n. 6, p.958-965, 13 jan. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.13909>.

JOSHI, M.S et al. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. **The FASEB Journal Research Communication** 0892-6638/07/0021-2655

KASSIM, Adetola A.; SHARMA, Deva. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: The changing landscape. **Hematology/oncology And Stem Cell Therapy**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.259-266, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hemonc.2017.05.008>.

KATO, Gregory J. et al. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **American Journal Of Hematology**, [s.l.], v. 84, n. 9, p.618-625, set. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21475>.

KATO, Gregory J. Defective nitric oxide metabolism in sickle cell disease. **Pediatric Blood & Cancer**, [s.l.], v. 62, n. 3, p.373-374, 12 nov. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.25297>.

KAUFMAN, Amy L. et al. Evidence for Clinical Implementation of Pharmacogenomics in Cardiac Drugs. **Mayo Clinic Proceedings**, [s.l.], v. 90, n. 6, p.716-729, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.03.016>.

KAUL, D.K., FABRY M.E. In vivo studies of sickle red blood cells. **Microcirculation**. 2004 Mar;11(2):153-65 PMID: 15280089.

KHATAMI, Mehri et al. Relationship of the MTHFD1 (rs2236225), eNOS (rs1799983), CBS (rs2850144) and ACE (rs4343) gene polymorphisms in a population of Iranian pediatric patients with congenital heart defects. **The Kaohsiung Journal Of Medical Sciences**, [s.l.], v. 33, n. 9, p.442-448, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.kjms.2017.05.016>.

KIEFER, Christine M. et al. Epigenetics of β -globin gene regulation. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [s.l.], v. 647, n. 1-2, p.68-76, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.07.014>

KING, S.B. Serial Review: Mechanisms and Novel Directions in the Biological Applications of Nitric Oxide Donors. Nitric Oxide Production from Hydroxyurea. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 37, No. 6, pp. 737 – 744, 2004 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.073

KOURY, M.J. RHODES, M. How to approach chronic anemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2012;2012:183-90. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.183

LACCHINI, R et al. Influence of arginase polymorphisms and arginase levels/activity on the response to erectile dysfunction therapy with sildenafil. **The Pharmacogenomics Journal**, [s.l.], p.1-2, 4 abr. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/tpj.2017.2>.

LACCHINI, Riccardo et al. Relationship between Arginase 1 and Arginase 2 levels and genetic polymorphisms with erectile dysfunction. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 51, p.36-42, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2015.10.003>.

LARRUSKAIN, J et al. Genetic Variants and Hamstring Injury in Soccer: An Association and Validation Study. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Publish Ahead of Print doi: 10.1249/MSS.0000000000001434

LAURENTINO, M.R. Relação entre polimorfismos do gene BCL11A e biomarcadores de hemólise em pacientes com anemia falciforme. [**Dissertação de Mestrado**]. Universidade Federal do Ceará. 2016.

LAUSCHKE, V.M.; INGELMAN-SUNDBERG, M. How to Consider Rare Genetic Variants in Personalized Drug Therapy. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** doi:10.1002/cpt.976

LEAL, Alexandra S. et al. Haplotypes β s-globin and its clinical-haematological correlation in patients with sickle-cell anemia in Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil. **Jornal Brasileiro**

de Patologia e Medicina Laboratorial, [s.l.], p.1-2, 2016. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1676-2444.20160001>.

LERVOLINO, Luciana Garcia et al. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.49-54, 2011. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (RBHH). <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20110015>.

LETTRE, Guillaume; BAUER, Daniel e. Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies. **The Lancet**, [s.l.], v. 387, n. 10037, p.2554-2564, jun. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)01341-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(15)01341-0).

LI, J.Y et al. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genes contribute to the development of type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population. **Genetics and Molecular Research** 14 (4): 12993-13002 (2015) doi <http://dx.doi.org/10.4238/2015>.

LIMA, P. D. L. et al. Evaluation of the mutagenic activity of hidroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: na in vitro study. **Genetics and Molecular Research**. 2003 Sep 30;2(3):328-33. PMID: 14966681

LITONJUA, A. A. et al. ARG1 Is a Novel Bronchodilator Response Gene: Screening and Replication in Four Asthma Cohorts. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 178, n. 7, p.688-694, 19 jun. 2008. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200709-1363oc>.

LOBO, C.L.C et al. The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease **British Journal of Haematology**, 2013, 161, 852–860 doi: 10.1111/bjh.12323

LOBO, Clarisse Lopes de Castro et al. Mortality in children, adolescents and adults with sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], p.1-7, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2017.09.006>.

LOGGETTO, S.R. et al. **Hematologia e Hemoterapia Pediátrica**. 1ª Edição. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 2013.

LOGGETTO, S.R. Sickle cell anemia: clinical diversity and beta S-globin haplotypes. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2013;35(3):153-62 doi: 10.5581/1516-8484.20130048

LOUREIRO, M.M; ROZENFELD, S. Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil. **Rev Saude Publica**. 2005 Dec;39(6):943-9. Epub 2005 Dec 7. doi: /S0034-89102005000600012

LUBERT, S et al. **Bioquímica**. 7ª edição. Editora Guanabara Koogan LTDA. Capítulos 2 e 3. Rio de Janeiro. 2014.

LUCHTMAN-JONES, L et al. Effects of hydroxyurea treatment for patients with hemoglobin SC disease. **American Journal of Hematology**, Vol. 91, No. 2, February 2016 doi:10.1002/ajh.24255

MA, Q et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea. **The Pharmacogenomics Journal**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.386-394, 13 fev. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.tpj.6500433>.

MACEDO, C.G. Estudo das paraoxonases 1, 2 e 3 em pacientes portadores de anemia falciforme. **[Dissertação/Mestrado]**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. USP, 2013.

MAGALHÃES, I.Q. Alterações renais nas doenças falciformes. **Rev. bras. hematol. hemoter.** 2007;29(3):279-284

MATTHES-MARTIN, Susanne et al. Stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning for sickle cell disease. **European Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 90, n. 4, p.308-312, 26 fev. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/ejh.12082>.

MEIER, E.R et al. Expression Patterns of Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Erythrocytes Are Both Patient- and Treatment-Specific During Childhood. **Pediatr Blood Cancer**. 2011 January;56(1): 103–109. doi:10.1002/pbc.22643.

MENZEL, Stephan et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 39, n. 10, p.1197-1199, 2 set. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng2108>.

METZGER, Ingrid F.; SOUZA-COSTA, Débora C.; TANUS-SANTOS, José Eduardo. Farmacogenética: Princípios, Aplicações e Perspectivas. **Medicina (ribeirao Preto. Online)**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.515-516, 30 dez. 2006. Universidade de Sao Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v39i4p515-521>.

MIKOBİ, Tite Minga et al. Protective BCL11A and HBS1L-MYB polymorphisms in a cohort of 102 Congolese patients suffering from sickle cell anemia. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.22207-1, 23 mar. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.22207>.

MILLER, Scott T. et al. Prediction of Adverse Outcomes in Children with Sickle Cell Disease. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 342, n. 2, p.83-89, 13 jan. 2000. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejm200001133420203>.

MIRANDA, J.A. Fatores genéticos associados ao óxido nítrico e alterações bioquímicas na obesidade de crianças e adolescentes **[Dissertação/mestrado]**. Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP, São Paulo, 2015.

- MIYAMOTO Y, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. **Hum Mol Genet**, 2000. 9(18): p. 2629-37.
- MOORE, J.H.; ASSELBERGS, F.W.; WILLIAMS, S.M. Bioinformatics challenges for genome-wide association studies. **Bioinformatics**, V. 15;26(4):445-55, 2010.
- MOREIRA, J. A. et al. Influence of β S-Globin Haplotypes and Hydroxyurea on Arginase I Levels in Sickle Cell Disease. **Disease Markers**, [s.l.], v. 2016, p.1-5, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9172726>.
- MOUSINHO, RIBEIRO R.C et al., Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** [online]. 2008, vol.30, n.2, pp.136-141. ISSN 1516-8484. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842008000200012>.
- NAGASSAKI S, et al. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. **Free Radic Biol Med**, 2006. 41(7): p. 1044-9.
- NAGEL, R. L et al. The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Rev**, New York, v. 17, n. 3, p. 167-178, Sep. 2003 PMID: 12818227.
- NAKAYAMA, M. et al. T-786 >C Mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. **Circulation**. 1999 Jun 8;99(22):2864-70 PMID: 10359729
- NAOUM, P.C. NAOUM, F.A. Doenças das Células Falciformes. **Editora: Sarvier**, São Paulo. 1ª Edição. 224p. 2004.
- NASR, Hela Ben et al. The -786 T/C polymorphism of NOS3 gene is a susceptibility marker of COPD among Tunisians that correlates with nitric oxide levels and airflow obstruction. **Cytokine**, [s.l.], v. 93, p.66-73, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.010>.
- NELSON, D.L., COX, M.M. Princípios de Bioquímica Lehninger. 6ª edição. **Editora Artmed**. Capítulos 1, 2 e 3. São Paulo, 2014.
- NEVITT, Sarah J; JONES, Ashley P; HOWARD, Jo. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [s.l.], p.227-345, 20 abr. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd002202.pub2>.
- NISHANK, Sudhansu Sekhar et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with sickle cell disease patients in India. **Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 58, n. 12, p.775-779, 3 out. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/jhg.2013.99>.
- PALADINO, S.F. Úlcera de membros inferiores na anemia falciforme. **Rev. bras. hematol. hemoter.** 2007;29(3):288-290

PARISE, L.V., TELEN, M.J. Erythrocyte adhesion in sickle cell disease. **Curr Hematol Rep.** 2003 Mar;2(2):102-8. PMID: 12901140

PASSOS, C.P. Análise da prevalência de alterações bucais em pacientes com doença falciforme. [**Dissertação de Mestrado**]. Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, 2010.

PATRINOS, G.P; GROSVELD, F.G. Pharmacogenomics and therapeutics of hemoglobinopathies. **Hemoglobin**, 32 (1–2):229–236, (2008) Copyright © Informa Healthcare USA, Inc. ISSN: 0363-0269 print/1532-432X online doi: 10.1080/03630260701680367

PATRINOS, George P.; GROSVELD, Frank G.. Pharmacogenomics and Therapeutics of Hemoglobinopathies. **Hemoglobin**, [s.l.], v. 32, n. 1-2, p.229-236, jan. 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03630260701680367>.

PENKERT, Rhiannon R. et al. Inflammatory molecule reduction with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia. **Haematologica**, [s.l.], v. 103, n. 2, p.50-54, 16 nov. 2017. Ferrata Storti Foundation (Haematologica). <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2017.177360>.

PEREIRA, Clara et al. Polymorphic variations influencing fetal hemoglobin levels: Association study in beta-thalassemia carriers and in normal individuals of Portuguese origin. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, [s.l.], v. 54, n. 4, p.315-320, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.02.001>.

PEREIRA, C.I.A. Estudo de polimorfismo associados ao aumento da expressão da hemoglobina fetal (HbF). [**Dissertação/ mestrado**]. Universidade de Coimbra, 2013.

PERNOW, John; JUNG, Christian. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? **Cardiovascular Research**, [s.l.], v. 98, n. 3, p.334-343, 14 fev. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvt036>.

PERUTZ, M.F et al. Structure of haemoglobin: a three dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution obtained by X ray analysis. **Nature**. 185(4711):416-22. PMID: 18990801. 1960.

PLATT, O.S et al. Hydroxyurea Enhances Fetal Hemoglobin Production in Sickle Cell Anemia. **J. Clin. Invest.** The American Society for Clinical Investigation, Inc. 0021-9738/84/08/0652/05 Volume 74, August 1984, 652-656

PULE, Gift Dineo et al. Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce γ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease. **Clinical And Translational Medicine**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-2, 7 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s40169-016-0092-7>.

QUINN, C. T. et al. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. **Blood**, [s.l.], v. 115, n. 17, p.3447-3452, 1 mar. 2010. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-07-233700>.

RAHIM, F et al. Evaluation of signaling pathways involved in γ – globin gene induction using fetal hemoglobin inducer drugs. **Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.** 2013;7(3):41-6

RANG, H.P, et al. **Farmacologia.** 8ª edição. Elsevier, Cap 42, São Paulo, 2016.

RATHTHAGALA, Madushi et al. Hydroxyurea stimulates the release of ATP from rabbit erythrocytes through an increase in calcium and nitric oxide production. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 645, n. 1-3, p.32-38, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.07.012>.

REES, David C; WILLIAMS, Thomas N; GLADWIN, Mark T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 376, n. 9757, p.2018-2031, dez. 2010. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61029-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61029-x).

REZENDE, Paulo V. et al. Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 85, n. 2, p.163-169, 21 mar. 2009. Jornal de Pediatria. <http://dx.doi.org/10.2223/jped.1885>.

RIGANO, Paolo et al. Real-life experience with hydroxyurea in sickle cell disease: A multicenter study in a cohort of patients with heterogeneous descent. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, [s.l.], v. 69, p.82-89, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.08.017>.

RODRIGUES, D.O.W et al. Diagnóstico histórico da triagem neonatal para doença falciforme. **Rev. APS**, Juiz de Fora, v. 13, n. 1, p. 34-45, jan./mar. 2010

SABARENSE, A.P. Análise comparativa da ocorrência de óbitos em crianças com doença falciforme triadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais nos períodos de 1998-2004 e 2006-2012. **[Dissertação de Mestrado]**. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, 2014.

SABARENSE, Alessandra P. et al. Characterization of mortality in children with sickle cell disease diagnosed through the Newborn Screening Program. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 91, n. 3, p.242-247, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.08.006>.

STEINBERG, Martin H. et al. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. **American Journal Of Hematology**, [s.l.], p.325-347, 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.21699>.

SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H.. The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.011643-011643, 3 dez. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a011643>.

SANKARAN, Vijay G.; XU, Jian; ORKIN, Stuart H.. Advances in the understanding of haemoglobin switching. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 149, n. 2, p.181-194, abr. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08105.x>.

SANT'ANA, Phelipe Gabriel dos Santos et al. Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.40-45, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.09.007>.

SANTOS, M.N.N. Genótipos da haptoglobina e aspectos inflamatórios na anemia falciforme. [Tese de Doutorado]. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 2013.

SANTOS, N.J.G. Avaliação de marcadores associados à síntese de hemoglobina fetal em indivíduos com anemia falciforme e persistência hereditária da hemoglobina fetal. [Dissertação/mestrado]. Universidade Federal da Bahia. UFBA, 2011.

SARAF, Santosh L. et al. Associations of α -thalassemia and BCL11A with stroke in Nigerian, United States, and United Kingdom sickle cell anemia cohorts. **Blood Advances**, [s.l.], v. 1, n. 11, p.693-698, 25 abr. 2017. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/bloodadvances.2017005231>.

SCHECHTER, A. N.. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, [s.l.], v. 112, n. 10, p.3927-3938, 15 nov. 2008. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-04-078188>.

SHARAN, K 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 Jan;124(2):240-3

SHEEHAN, V.A et al. Whole Exome Sequencing Identifies Novel Genes for Fetal Hemoglobin Response to hydroxyurea in Children with Sickle Cell Anemia. **PLoS ONE** 9(10): e110740. doi:10.1371/journal.pone.0110740

SILVA, M. A. L. da et al. β -Globin Gene Cluster Haplotypes and Clinical Severity in Sickle Cell Anemia Patients in Southern Brazil. **Open Journal Of Blood Diseases**, [s.l.], v. 04, n. 02, p.16-23, 2014. Scientific Research Publishing.

SILVA, M.R. Estudo de hemoglobinas variantes com mobilidade eletroforética semelhante à da hemoglobina S em crianças do programa de triagem neonatal de Minas Gerais (PTN-MG). [Tese de Doutorado]. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2012.

SILVA-PINTO, Ana Cristina et al. Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a single-center experience in Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, [s.l.], v. 131, n. 4, p.238-243, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1516-3180.2013.1314467>.

SILVA, P.S, LACCHINI, R., GOMES, V.D.E. A, TANUS-SANTOS, J.E. Pharmacogenetic implications of the eNOS polymorphisms for cardiovascular action drugs. **Arq Bras Cardiol**. 2011;96(2):e27–e34.

SIMÕES, B.P, et al. Consenso brasileiro em transplantes de células-tronco hematopoiéticas: Comitê de hemoglobinopatias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** vol.32 supl.1 São Paulo May 2010 Epub Apr 02, 2010 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842010005000020>

SOLOVIEFF, N. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. **Blood**, [s.l.], v. 115, n. 9, p.1815-1822, 16 dez. 2009. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-08-239517>.

SONATI, Maria de Fátima; COSTA, Fernando Ferreira. The genetics of blood disorders: the hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], p.1-2, 12 set. 2008. Jornal de Pediatria. <http://dx.doi.org/10.2223/jped.1802>.

STEINBERG, M.H et al. The Risks and Benefits of Long-term Use of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia: A 17.5 Year Follow-Up. **Am J Hematol.** 2010 June; 85(6): 403–408. doi:10.1002/ajh.21699.

STEINBERG, Martin H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology pathophysiology and therapeutic approach. **Scientific World Journal.** 2008; 8, 1295 – 324.

STEINBERG, Martin H.. Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 9, p.46-67, 2009. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1100/tsw.2009.10>.

STEPHENS, Matthew; DONNELLY, Peter. A Comparison of Bayesian Methods for Haplotype Reconstruction from Population Genotype Data. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 73, n. 5, p.1162-1169, nov. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1086/379378>.

STEWART, G. Review The emerging physiological roles of the SLC14A family of urea transporters. **British Journal of Pharmacology** (2011) 164 1780–1792 <http://dx.doi.org/10.1111/bph.2011.164.issue-7>

STUART, Marie J; NAGEL, Ronald L. Sickle-cell disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 364, n. 9442, p.1343-1360, out. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)17192-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(04)17192-4).

STYPULKOWSKI, Jaíne B.; MANFREDINI, Vanusa. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.56-62, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842010005000001>.

TANUS-SANTOS, J.E, et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. **Pharmacogenetics**, 2002. 12(5): p. 407-13.

TEINBERG, M.H et al., Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. JAMA: **The journal of the American Medical Association**, 2003.

TERZI, S et al. The Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS3-786T>C) Genetic Polymorphism in Chronic Heart Failure: Effects of Mutant-786 Calleleon Long-term Mortality. **Acta Cardiol Sin** 2017; 33:420428 doi: 10.6515/ACS20161215B

THAKUR, Tanya J. et al. Endothelin-1 but not Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism is Associated with Sickle Cell Disease in Africa. **Gene Regulation And Systems Biology**, [s.l.], v. 8, p.5-10, jan. 2014. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.4137/grsb.s14836>.

THEIN, S. L. et al. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.216-223, 6 out. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddp401>.

TORRES, Lidiane de Souza et al. The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 34, n. 6, p.421-425, 2012. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (RBHH). <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20120106>.

TURNER, S.T., et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase, alpha-adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide. **Am J Hypertens**, 2003. 16(10): p. 834-9.

VAN BEYNUM, Ingrid M. et al. Common 894G>T single nucleotide polymorphism in the gene coding for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of congenital heart defects. **Clinical Chemistry And Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 46, n. 10, p.1-2, 1 jan. 2008. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/cclm.2008.271>.

VARGAS, A. E. et al. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. **Tissue Antigens**, [s.l.], v. 66, n. 6, p.683-690, dez. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0039.2005.00506.x>.

VIEIRA, A.P.Z. Determinação das regiões de recombinação em haplótipos atípicos de pacientes com anemia falciforme [**Dissertação/mestrado**]. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo, 2000.

VILAS-BOAS, Wendell et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase (-786T>C) and Endothelin-1 (5665G>T) Gene Polymorphisms as Vascular Dysfunction Risk Factors in Sickle Cell Anemia. **Gene Regulation And Systems Biology**, [s.l.], v. 10, p.5-10, jan. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.4137/grsb.s38276>.

VILELA, R.Q.B et al. Alterações oculares nas doenças falciformes. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007;29(3):285-287

VONK, Judith M. et al. Arginase 1 and arginase 2 variations associate with asthma, asthma severity and β 2 agonist and steroid response. **Pharmacogenetics And Genomics**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.179-186, mar. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/fpc.0b013e328336c7fd>.

VOSKARIDOU, E. et al. The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). **Blood**, [s.l.], v. 115, n. 12, p.2354-2363, 10 nov. 2009. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-05-221333>.

WALKER, Aisha L. et al. Transcellular movement of hydroxyurea is mediated by specific solute carrier transporters. **Experimental Hematology**, [s.l.], p.1-8, 21 jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2011.01.004>.

WANG, Winfred C et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (**BABY HUG**). **The Lancet**, [s.l.], v. 377, n. 9778, p.1663-1672, maio 2011. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60355-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60355-3)

WARE, R. E. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. **Blood**, [s.l.], v. 118, n. 18, p.4985-4991, 29 ago. 2011. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-07-364190>.

WARE, R. E.. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. **Blood**, [s.l.], v. 115, n. 26, p.5300-5311, 11 mar. 2010. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-04-146852>.

WARE, R.E et al. TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWiTCH): a multicentre, randomised controlled trial. **Lancet**. 2016 February 13; 387(10019): 661–670. doi:10.1016/S0140-6736(15)01041-7.

WARE, R.E et al. Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia—TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWiTCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. www.thelancet.com Published online December 6, 2015 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01041-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01041-7)

WEATHERALL, D.J. CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**. P. 704-7012, 2001. PMID: PMC2566499

WEYERSTRAß, Jan et al. Nine genetic polymorphisms associated with power athlete status – A Meta-Analysis. **Journal Of Science And Medicine In Sport**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.213-220, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsams.2017.06.012>.

XU, Xiaoxin S; HONG, Xin; WANG, Gan. Induction of endogenous γ -globin gene expression with decoy oligonucleotide targeting Oct-1 transcription factor consensus sequence. **Journal Of Hematology & Oncology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.15-17, 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-8722-2-15>.

YOUSRY, Sherif M.; ELLITHY, Hend N.; SHAHIN, Gehan H. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of vasculopathy in sickle cell disease. **Hematology**,

[s.l.], v. 21, n. 6, p.359-367, 4 mar. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10245332.2016.1142710>.

YOUSSRY, Ilham et al. Enhancing Effect of Hydroxyurea on Hb F in Sickle Cell Disease: Ten-Year Egyptian Experience. **Hemoglobin**, [s.l.], v. 41, n. 4-6, p.267-273, 2 nov. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03630269.2017.1408646>.

ZAGO, M.A.; PINTO, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. bras. hematol. hemoter.** 2007;29(3):207-214

ZAMARO, P.J.A et al. Hemoglobinas Similares a S no Brasil: um guia prático de identificação. 1ª Edição. **Editora HN**, 2006.

ZDANOWICZ, M.M. Concepts in Pharmacogenomics. American Society of Health-System Pharmacists. **Can J Hosp Pharm.** 2010 Sep-Oct; 63(5): 395 PMID: PMC2999374.

ZHU, Boqian et al. An association between the endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and premature coronary artery disease: a meta-analysis. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 44, p.1-2, 23 ago. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.20400>.

ZHU, Xingguo et al. Hydroxyurea differentially modulates activator and repressors of γ -globin gene in erythroblasts of responsive and non-responsive patients with sickle cell disease in correlation with Index of Hydroxyurea Responsiveness. **Haematologica**, [s.l.], v. 102, n. 12, p.1995-2004, 29 set. 2017. Ferrata Storti Foundation (Haematologica). <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2017.175646>.

ZIMMERMAN, S. A. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. **Blood**, [s.l.], v. 103, n. 6, p.2039-2045, 15 mar. 2004. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-07-2475>.

APÊNDICE

Tabela A: Associação dos biomarcadores bioquímicos em 83 pacientes com anemia falciforme tratados com HU com genótipos para o rs2070744 no gene da sintase endotelial do óxido nítrico (*eNOS*)

	TT (n=32)	TC (n=44)	CC (n=7)	<i>p</i>
Hb, g/dL (pré-tratamento)	7,56 ± 1,10	7,84 ± 1,15	7,53 ± 0,51	0,280 ¹
Hb, g/dL (pós-tratamento)	8,72 ± 1,18	8,82 ± 1,11	8,31 ± 1,34	0,565 ²
ΔHb	1,17 ± 1,06	0,98 ± 0,68	0,79 ± 1,53	0,525 ²
Hct, % (pré-tratamento)	22,73 ± 3,84	23,50 ± 3,81	21,69 ± 2,94	0,271 ¹
Hct, % (pós-tratamento)	25,75 ± 3,64	26,59 ± 3,73	24,94 ± 4,07	0,427 ²
ΔHct	3,02 ± 3,33	3,09 ± 2,64	3,25 ± 2,25	0,981 ²
LG, x10³/L (pré-tratamento)²	13,09 ± 3,17	14,42 ± 4,19	15,49 ± 5,00	0,203 ²
LG, x10³/L (pós-tratamento)²	9,27 ± 3,11	9,42 ± 2,42	10,16 ± 2,27	0,802 ¹
ΔLG²	3,83 ± 3,15	5,00 ± 3,88	5,33 ± 3,59	0,484 ¹
Rtc, % (pré-tratamento)	5,03 ± 2,00	4,60 ± 2,13	4,08 ± 1,95	0,305 ¹
Rtc, % (pós-tratamento)	2,85 ± 0,98	2,61 ± 1,19	2,54 ± 0,55	0,612 ²
ΔRtc	2,03 ± 1,99	1,85 ± 2,57	1,90 ± 1,60	0,949 ²
HbF, % (pré-tratamento)	7,06 ± 4,98	6,65 ± 5,03	4,03 ± 2,43	0,321 ¹
HbF, % (pós-tratamento)	14,98 ± 7,03	16,49 ± 8,13	13,71 ± 4,52	0,535 ²
ΔHbF	7,97 ± 6,51	9,89 ± 7,71	9,86 ± 5,87	0,496 ²

Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; LG: leucometria global; Rtc: reticulócitos. ¹ As análises foram desenvolvidas usando o Kruskal-Wallis test; ² As análises foram desenvolvidas usando ANOVA. Valores são expressos como média ± desvio padrão. Os valores de delta (Δ) representam a diferença de cada um dos parâmetros hematológicos antes e após o tratamento com a hidroxiureia.

Tabela B: Associação dos biomarcadores bioquímicos em 83 pacientes com anemia falciforme tratados com HU com genótipos para o rs17599586 no gene da Arginase tipo 1 (*ARG1*)

	CC (n=61)	CT (n=20)	TT (n=2)	p
Hb, g/dL (pré-tratamento)	7,78 ± 1,10	7,52 ± 1,15	7,15 ± 0,07	0,655 ¹
Hb, g/dL (pós-tratamento)	8,78 ± 1,22	8,63 ± 0,98	8,45 ± 0,64	0,816 ²
ΔHb	1,00 ± 1,00	1,11 ± 0,70	1,30 ± 0,57	0,842 ²
Hct, % (pré-tratamento)	23,08 ± 3,67	22,95 ± 4,28	23,30 ± 0,99	0,854 ¹
Hct, % (pós-tratamento)	26,43 ± 3,67	25,40 ± 3,86	24,30 ± 4,10	0,440 ²
ΔHct	3,35 ± 3,08	2,45 ± 1,76	1,00 ± 5,09	0,278 ²
LG, x10³/L (pré-tratamento)²	14,39 ± 4,02	12,88 ± 3,71	13,43 ± 0,32	0,326 ²
LG, x10³/L (pós-tratamento)²	9,58 ± 2,76	8,96 ± 2,54	9,35 ± 1,63	0,676 ²
ΔLG²	4,81 ± 3,83	3,92 ± 2,98	4,08 ± 1,95	0,623 ²
Rtc, % (pré-tratamento)	4,93 ± 2,17	3,88 ± 1,40	6,95 ± 0,78	0,060 ¹
Rtc, % (pós-tratamento)	2,75 ± 1,10	2,59 ± 1,04	2,80 ± 0,00	0,861 ²
ΔRtc	2,14 ± 2,38	1,16 ± 1,73	3,60 ± 0,00	0,244 ¹
HbF, % (pré-tratamento)	5,93 ± 3,77	8,72 ± 7,15	5,15 ± 0,21	0,599 ¹
HbF, % (pós-tratamento)	16,30 ± 6,62	15,68 ± 7,78	9,30 ± 3,25	0,455 ²
ΔHbF	9,84 ± 7,15	7,55 ± 7,05	4,00 ± 2,83	0,272 ²

Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; LG: leucometria global; Rtc: reticulócitos. ¹ As análises foram desenvolvidas usando o Kruskal-Wallis test; ² As análises foram desenvolvidas usando ANOVA. Valores são expressos como média ± desvio padrão. Os valores de delta (Δ) representam a diferença de cada um dos parâmetros hematológicos antes e após o tratamento com a hidroxiureia.

Tabela C: Associação dos biomarcadores bioquímicos em 83 pacientes com anemia falciforme tratados com HU com genótipos para o rs4671393 no gene do *BCL11A*

	GG (n=52)	GA (n=27)	AA (n=4)	p
Hb, g/dL (pré-tratamento)	7,69 ± 1,00	7,68 ± 1,31	8,03 ± 0,68	0,472 ¹
Hb, g/dL (pós-tratamento)	8,68 ± 1,04	8,82 ± 1,38	8,98 ± 1,01	0,802 ²
ΔHb	0,99 ± 0,89	1,14 ± 1,01	0,95 ± 0,93	0,640 ¹
Hct, % (pré-tratamento)	22,90 ± 3,44	23,47 ± 4,47	22,23 ± 2,91	0,687 ¹
Hct, % (pós-tratamento)	25,83 ± 3,39	26,80 ± 4,16	25,50 ± 5,13	0,516 ²
ΔHct	2,93 ± 2,57	3,33 ± 3,24	3,28 ± 4,61	0,835 ²
LG, x10³/L (pré-tratamento)²	14,26 ± 4,07	13,27 ± 3,73	15,60 ± 3,09	0,407 ²
LG, x10³/L (pós-tratamento)²	9,51 ± 2,61	9,03 ± 2,77	10,99 ± 2,87	0,373 ²
ΔLG²	4,75 ± 3,83	4,24 ± 3,43	4,62 ± 1,51	0,956 ¹
Rtc, % (pré-tratamento)	4,82 ± 1,94	4,64 ± 2,40	4,33 ± 1,24	0,621 ¹
Rtc, % (pós-tratamento)	2,74 ± 1,02	2,63 ± 1,17	2,83 ± 1,34	0,899 ²
ΔRtc	1,83 ± 2,16	2,21 ± 2,66	1,50 ± 0,38	0,993 ¹
HbF, % (pré-tratamento)	6,16 ± 4,00	6,73 ± 5,00	11,10 ± 11,34	0,936 ¹
HbF, % (pós-tratamento)	14,60 ± 6,69	17,54 ± 7,87	16,93 ± 13,08	0,239 ²
ΔHbF	8,50 ± 6,66	10,89 ± 7,17	5,75 ± 11,59	0,230 ²

Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; LG: leucometria global; Rtc: reticulócitos. ¹ As análises foram desenvolvidas usando o Kruskal-Wallis test; ² As análises foram desenvolvidas usando ANOVA. Valores são expressos como média ± desvio padrão. Os valores de delta (Δ) representam a diferença de cada um dos parâmetros hematológicos antes e após o tratamento com a hidroxiureia.

Tabela D: Associação dos biomarcadores bioquímicos em 83 pacientes com anemia falciforme tratados com HU com genótipos para o rs766432 no gene do *BCL11A*

	AA (n=53)	AC (n=26)	CC (n=4)	<i>p</i>
Hb, g/dL (pré-tratamento)	7,68 ± 1,00	7,70 ± 1,33	8,03 ± 0,68	0,487 ¹
Hb, g/dL (pós-tratamento)	8,68 ± 1,03	8,81 ± 1,41	8,98 ± 1,01	0,823 ²
ΔHb	1,01 ± 0,89	1,11 ± 1,01	0,95 ± 0,93	0,788 ¹
Hct, % (pré-tratamento)	22,86 ± 3,42	23,57 ± 4,53	22,23 ± 2,91	0,620 ¹
Hct, % (pós-tratamento)	25,85 ± 3,36	26,80 ± 4,24	25,50 ± 5,13	0,534 ²
ΔHct	2,99 ± 2,57	3,24 ± 3,27	3,28 ± 4,61	0,927 ²
LG, x10³/L (pré-tratamento)²	14,22 ± 4,04	13,30 ± 3,80	15,60 ± 3,09	0,440 ²
LG, x10³/L (pós-tratamento)²	9,53 ± 2,60	8,96 ± 2,80	10,99 ± 2,87	0,330 ²
ΔLG²	4,69 ± 3,81	4,34 ± 3,46	4,62 ± 1,51	0,994 ¹
Rtc, % (pré-tratamento)	4,84 ± 1,92	4,60 ± 2,45	4,33 ± 1,24	0,507 ¹
Rtc, % (pós-tratamento)	2,72 ± 1,02	2,65 ± 1,19	2,83 ± 1,34	0,914 ²
ΔRtc	1,86 ± 2,15	2,16 ± 2,71	1,50 ± 0,38	0,945 ¹
HbF, % (pré-tratamento)	6,26 ± 4,02	6,56 ± 5,03	11,10 ± 11,34	0,942 ¹
HbF, % (pós-tratamento)	14,55 ± 6,63	17,76 ± 7,95	16,93 ± 13,08	0,190 ²
ΔHbF	8,36 ± 6,67	11,27 ± 7,03	5,75 ± 11,59	0,144 ²

Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; LG: leucometria global; Rtc: reticulócitos. ¹ As análises foram desenvolvidas usando o Kruskal-Wallis test; ² As análises foram desenvolvidas usando ANOVA. Valores são expressos como média ± desvio padrão. Os valores de delta (Δ) representam a diferença de cada um dos parâmetros hematológicos antes e após o tratamento com a hidroxiureia.

Tabela E: Associação dos biomarcadores bioquímicos em 83 pacientes com anemia falciforme tratados com HU com genótipos para o rs9960464 no gene do Transportador de Ureia (*UTA*)

	GG (n=31)	GA (n=44)	AA (n=8)	p
Hb, g/dL (pré-tratamento)	7,85 ± 1,42	7,66 ± 0,85	7,39 ± 0,76	0,625 ¹
Hb, g/dL (pós-tratamento)	8,87 ± 1,44	8,72 ± 0,98	8,33 ± 0,69	0,492 ²
ΔHb	1,02 ± 0,86	1,06 ± 1,04	0,94 ± 0,47	0,883 ¹
Hct, % (pré-tratamento)	23,07 ± 4,61	22,70 ± 3,18	24,89 ± 2,71	0,170 ¹
Hct, % (pós-tratamento)	26,45 ± 4,56	25,73 ± 3,22	27,10 ± 2,51	0,532 ²
ΔHct	3,38 ± 2,79	3,03 ± 3,06	2,21 ± 2,09	0,588 ²
LG, x10³/L (pré-tratamento)²	14,17 ± 3,92	13,51 ± 3,97	16,02 ± 3,47	0,242 ²
LG, x10³/L (pós-tratamento)²	9,73 ± 2,52	9,15 ± 2,82	9,76 ± 2,61	0,611 ²
ΔLG²	4,45 ± 3,88	4,36 ± 3,52	6,26 ± 2,77	0,144 ¹
Rtc, % (pré-tratamento)	4,87 ± 2,37	4,50 ± 1,83	5,80 ± 1,99	0,319 ¹
Rtc, % (pós-tratamento)	2,39 ± 1,12	2,87 ± 1,03	3,07 ± 0,87	0,132 ²
ΔRtc	2,04 ± 2,98	1,73 ± 1,73	2,73 ± 1,64	0,576 ²
HbF, % (pré-tratamento)	5,90 ± 3,12	7,43 ± 5,97	4,61 ± 2,35	0,527 ¹
HbF, % (pós-tratamento)	13,61 ± 7,04	17,10 ± 7,78	15,76 ± 6,04	0,136 ²
ΔHbF	7,81 ± 7,85	9,71 ± 6,65	11,25 ± 6,48	0,359 ²

Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; LG: leucometria global; Rtc: reticulócitos. ¹ As análises foram desenvolvidas usando o Kruskal-Wallis test; ² As análises foram desenvolvidas usando ANOVA. Valores são expressos como média ± desvio padrão. Os valores de delta (Δ) representam a diferença de cada um dos parâmetros hematológicos antes e após o tratamento com a hidroxiureia.

Tabela F: Associação dos biomarcadores bioquímicos em 51 pacientes com hemoglobinopatia SC (HbSC) não tratados com Hidroxiureia com genótipos para os SNPs nos genes da *eNOS*, *ARG1*, *BCL11A* e *UTA*

Parâmetro	Genótipos			Valor p
<i>eNOS</i> (rs1799983)	GG (n=30)	GT (n=18)	TT (n=3)	
Hb, g/dL	10,78 ± 1,34	11,33 ± 1,01	10,60 ± 1,48	0,300 ¹
Hct, %	33,17 ± 4,75	34,51 ± 2,95	32,90 ± 4,37	0,386 ¹
LG, x10 ³ /L	8,93 ± 4,21	6,84 ± 2,80	8,93 ± 0,75	0,164 ²
Rtc, %	1,43 ± 0,79	1,57 ± 0,76	1,30 ± 0,70	0,772 ¹
<i>eNOS</i> (rs2070744)	TT (n=23)	TC (n=22)	CC (n=6)	
Hb, g/dL	11,18 ± 1,10	10,80 ± 1,43	10,72 ± 1,14	0,420 ¹
Hct, %	34,37 ± 3,55	33,10 ± 4,96	32,73 ± 2,99	0,570 ¹
LG, x10 ³ /L	8,48 ± 3,22	7,60 ± 4,41	9,23 ± 3,11	0,394 ¹
Rtc, %	1,54 ± 0,92	1,41 ± 0,61	1,42 ± 0,67	0,997 ¹
<i>ARG1</i> (rs17599586)	CC (n=38)	CT (n=13)	TT (n=0)	
Hb, g/dL	10,86 ± 1,29	11,27 ± 1,12	-	0,354 ³
Hct, %	33,46 ± 4,42	34,13 ± 3,37	-	0,681 ³
LG, x10 ³ /L	8,62 ± 4,02	6,94 ± 2,52	-	0,114 ³
Rtc, %	1,55 ± 0,84	1,27 ± 0,49	-	0,268 ⁴
<i>BCL11A</i> (rs4671393)	GG (n=29)	GA (n=16)	AA (n=3)	
Hb, g/dL	10,81 ± 1,36	11,08 ± 1,25	11,60 ± 0,61	0,475 ¹
Hct, %	33,20 ± 4,45	33,89 ± 3,76	36,87 ± 5,31	0,462 ¹
LG, x10 ³ /L	9,11 ± 3,97	7,44 ± 3,16	5,77 ± 3,90	0,355 ¹
Rtc, %	1,49 ± 0,63	1,55 ± 1,04	1,20 ± 0,76	0,798 ¹
<i>BCL11A</i> (rs766432)	AA (n=30)	AC (n=16)	CC (n=5)	
Hb, g/dL	10,81 ± 1,33	11,01 ± 1,20	11,70 ± 0,64	0,222 ¹
Hct, %	33,17 ± 4,38	33,73 ± 3,74	36,04 ± 3,96	0,257 ¹
LG, x10 ³ /L	8,93 ± 4,02	7,93 ± 2,59	4,62 ± 3,57	0,123 ¹
Rtc, %	1,446 ± 0,63	1,52 ± 1,06	1,38 ± 0,74	0,937 ²
<i>UTA</i> (rs996046)	GG (n=22)	GA (n=22)	AA (n=7)	
Hb, g/dL	11,15 ± 0,91	10,91 ± 1,55	10,51 ± 1,16	0,376 ¹
Hct, %	34,05 ± 3,07	33,51 ± 5,47	32,69 ± 2,24	0,729 ¹
LG, x10 ³ /L	7,89 ± 2,97	8,67 ± 4,27	7,63 ± 4,57	0,907 ¹
Rtc, %	1,49 ± 0,84	1,45 ± 0,66	1,47 ± 0,90	0,990 ¹

Hb: hemoglobina; Hct: hematócrito; LG: leucometria global; Rtc: reticulócitos. Valores são expressos como média ± desvio padrão. 1 As análises foram desenvolvidas usando o Kruskal-Wallis test; 2 As análises foram desenvolvidas usando ANOVA. 3 As análises foram desenvolvidas usando Mann-Whitney; 4As análises foram desenvolvidas usando teste t não pareado.

Tabela G: Modelo multivariado associando aos valores do hematócrito em pacientes com doença falciforme tratados com Hidroxiureia

Variável	Média dos quadrados	Estatística F	Valor p	Valor R
Diagnóstico	114,7	30,1	<0,001	0,291
Tempo de tratamento	1089,2	71,4	<0,001	

Tabela H: Modelo multivariado associando aos valores de leucometria global em pacientes com doença falciforme tratados com Hidroxiureia

Variável	Média dos quadrados	Estatística F	Valor <i>p</i>	Valor R
Diagnóstico	0,2	7,1	0,009	0,268
Tempo de tratamento	4,1	117,5	<0,001	

Tabela I: Modelo multivariado associando a porcentagem de reticulócitos em pacientes com doença falciforme tratados com Hidroxiureia

Variável	Média dos quadrados	Estatística F	Valor <i>p</i>	Valor R
Diagnóstico	17,7	10,4	0,002	0,298
Tempo de tratamento	20,6	12,1	<0,001	
ARG1 (rs17599586)	5,8	3,4	0,036	
ARG1 (rs17599586) e tempo de tratamento	4,1	2,4	0,022	

Tabela J: Principais índices de qualidade da estatística realizada por análise da *deviance* calculados a partir do modelo proposto pela regressão logística

Índice de Qualidade	Valor
Acurácia	0,7742
Sensibilidade	0,1739
Especificidade	0,9714
Valor Preditivo Positivo	0,6667
Valor Preditivo Negativo	0,7816

ANEXOS

ANEXO A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (ADULTO/HU)



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF
 36036-900 JUIZ DE FORA - MG – BRASIL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Grupo Hidroxiureia)

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Avaliação farmacogenética e hematológica de pacientes com doença falciforme SS e SC em tratamento com hidroxiureia atendidos no Hemocentro de Governador Valadares**”. Nesta pesquisa pretendemos estudar os fatores genéticos e no sangue que podem interferir na resposta ao tratamento com o hidroxiureia, um medicamento usado no tratamento da doença falciforme. O motivo que nos leva a estudar esse assunto é o fato de existir grande variação individual na resposta ao medicamento hidroxiureia, sendo que 25% das pessoas que usam esse medicamento não respondem bem ao tratamento.

Para esta pesquisa faremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): (1) coleta de 10mL de sangue da veia do braço, no período da manhã, após você ter ficado 8 horas sem comer (em jejum), sendo essa uma quantidade parecida com aquela retirada para exames de sangue de rotina, para obtenção do DNA a ser usado na análise genética; quantificação do remédio no seu sangue e avaliação de possíveis efeitos tóxicos da hidroxiureia (2) Avaliação do seu prontuário médico para obtenção dos dados somente relacionados à esse projeto de pesquisa, com o objetivo de comparar os seus dados clínicos e sanguíneos antes e após o início do seu tratamento com hidroxiureia.

Sua participação na pesquisa permitirá melhor acompanhamento do seu tratamento com o medicamento hidroxiureia. Além disso, poderá contribuir para dizer com antecedência se o tratamento com hidroxiureia é ou não indicado para uma determinada pessoa, através da elaboração de um perfil genético de boa resposta ao medicamento. Esta pesquisa apresenta riscos mínimos, estando relacionados ao desconforto físico decorrente do procedimento invasivo para retirada de sangue. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Para participar deste estudo o (a) Sr (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar.

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

Rubrica do (a) voluntário (a):

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.

CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG

Fone: (33) 8859-3028/E-mail:

pamela.souza@ufjf.edu.br

Rubrica do (a) pesquisador (a):

Os resultados das análises genéticas e sanguíneas serão acrescentados no prontuário médico no final das análises da pesquisa. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Ao final do período de realização da pesquisa, seu sangue será armazenado no Biorrepositório, onde:

- a) poderá ficar armazenado por até 10 anos, após autorizado do CEP e se em conformidade com as normas pertinentes do Conselho Nacional de Saúde, sob a responsabilidade da Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares;
- b) poderá ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, respeitando-se o Item 7 da Resolução do Conselho Nacional de Saúde 441/11, o qual determina que tal transferência deve ser comunicada a você, sempre que possível ou, na impossibilidade, deve ser apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP;
- c) poderá ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa. O DNA, sem contaminantes químicos, mas com possibilidade de contaminantes biológicos infecciosos como vírus, será descartado após os microtubos serem preenchidos com hipoclorito de sódio 3% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, o líquido descartado na pia do laboratório. Os microtubos serão destinados ao descarte de plásticos contaminados e enviados ao descarte com material hospitalar da respectiva Universidade.

O (a) Sr. (a) será informado (a) sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório, quando for o caso. A retirada do seu consentimento de guarda da sua amostra biológica no biorrepositório, dar-se-á a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo para você, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, por você, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes. Tal devolução será feita imediatamente após a entrega do documento assinado ao pesquisador responsável, sendo entregue, *em mãos* do participante da pesquisa, os microtubos contendo todas as suas amostras biológicas (sangue e DNA). Não será solicitado o patenteamento ou permitida a utilização comercial do seu material biológico armazenado no Biorrepositório. Em caso de dissolução futura da parceria firmada entre a UFJF e a Fundação Hemominas no que se refere a essa pesquisa, os materiais biológicos e dados coletados serão destinados à instituição de origem do pesquisador responsável.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias: uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, na **Universidade Federal de Juiz de Fora – campus avançado de Governador Valadares** 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.

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

Rubrica do (a) voluntário (a): _____

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.

CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG

Fone: (33) 8859-3028/E-mail:

pamela.souza@ufjf.edu.br

Rubrica do (a) pesquisador (a): _____

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de

maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poder solicitar novas informações e modificar a decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, ____ de _____ de 20__

Nome	Assinatura participante	Data
------	-------------------------	------

Nome	Assinatura pesquisador	Data
------	------------------------	------

Nome	Assinatura testemunha	Data
------	-----------------------	------

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

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza
Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.

CEP: 35020-220 – Governador Valadares –

MG Fone: (33) 8859-3028/E-mail:

pamela.souza@ufjf.edu.br

ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (ADULTO/ CONTROLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF
 36036-900 JUIZ DE FORA - MG – BRASIL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Grupo Controle)

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Avaliação farmacogenética e hematológica de pacientes com doença falciforme SS e SC em tratamento com hidroxureia atendidos no Hemocentro de Governador Valadares**”. Nesta pesquisa pretendemos estudar os fatores genéticos e no sangue que podem interferir na resposta ao tratamento com o hidroxureia, um medicamento usado no tratamento da doença falciforme. Como você não usa a hidroxureia, seus dados serão comparados aos dos pacientes que estão em uso do medicamento. O motivo que nos leva a estudar esse assunto é o fato de existir grande variação individual na resposta ao medicamento hidroxureia, sendo que 25% das pessoas que usam esse medicamento não respondem bem ao tratamento.

Para esta pesquisa faremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): (1) coleta de 10mL de sangue da veia do braço, no período da manhã, após você ter ficado 8 horas sem comer (em jejum), sendo essa uma quantidade parecida com aquela retirada para exames de sangue de rotina, para obtenção do DNA a ser usado na análise genética; (2) Avaliação do seu prontuário médico para obtenção dos dados somente relacionados à esse projeto de pesquisa, com o objetivo de comparar os seus dados clínicos e sanguíneos com aqueles dos pacientes em tratamento com hidroxureia.

Sua participação na pesquisa poderá contribuir para dizer com antecedência se o tratamento com hidroxureia é ou não indicado para uma determinada pessoa, através da elaboração de um perfil genético de boa resposta ao medicamento. Esta pesquisa apresenta riscos mínimos, estando relacionados ao desconforto físico decorrente do procedimento invasivo para retirada de sangue. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Para participar deste estudo o (a) Sr (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar.

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

Rubrica do (a) voluntário (a) :

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.

CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG

Fone: (33) 8859-3028/E-mail:

pamela.souza@ufjf.edu.br

Rubrica do (a) pesquisador (a):

Os resultados das análises genéticas e sanguíneas serão acrescentados no prontuário médico no final das análises da pesquisa. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão

liberados sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Ao final do período de realização da pesquisa, seu sangue será armazenado no Biorrepositório, onde:

- a) poderá ficar armazenado por até 10 anos, após autorizado do CEP e se em conformidade com as normas pertinentes do Conselho Nacional de Saúde, sob a responsabilidade da Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares;
- b) poderá ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, respeitando-se o Item 7 da Resolução do Conselho Nacional de Saúde 441/11, o qual determina que tal transferência deve ser comunicada a você, sempre que possível ou, na impossibilidade, deve ser apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP;
- c) poderá ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa. O DNA, sem contaminantes químicos, mas com possibilidade de contaminantes biológicos infecciosos como vírus, será descartado após os microtubos serem preenchidos com hipoclorito de sódio 3% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, o líquido descartado na pia do laboratório. Os microtubos serão destinados ao descarte de plásticos contaminados e enviados ao descarte com material hospitalar da respectiva Universidade.

O (a) Sr. (a) será informado (a) sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório, quando for o caso. A retirada do seu consentimento de guarda da sua amostra biológica no biorrepositório, dar-se-á a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo para você, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, por você, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes. Tal devolução será feita imediatamente após a entrega do documento assinado ao pesquisador responsável, sendo entregue, *em mãos* do participante da pesquisa, os microtubos contendo todas as suas amostras biológicas (sangue e DNA). Não será solicitado o patenteamento ou permitida a utilização comercial do seu material biológico armazenado no Biorrepositório. Em caso de dissolução futura da parceria firmada entre a UFJF e a Fundação Hemominas no que se refere a essa pesquisa, os materiais biológicos e dados coletados serão destinados à instituição de origem do pesquisador responsável.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias: uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, na **Universidade Federal de Juiz de Fora – campus avançado de Governador Valadares** 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.

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
Rubrica do (a) voluntário (a): _____

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva
Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.
CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG
Fone: (33) 8859-3028/E-mail:
pamela.souza@ufjf.edu.br
Rubrica do (a) pesquisador (a): _____

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, 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 modificar a decisão de participar se assim o desejar. Declaro que

concordo em participar dessa pesquisa. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, ____ de _____ de 20__.

Nome	Assinatura participante	Data
Nome	Assinatura pesquisador	Data
Nome	Assinatura testemunha	Data

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

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza
Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.
CEP: 35020-220 – Governador Valadares –
MG Fone: (33) 8859-3028/E-mail:
pamela.souza@ufjf.edu.br

ANEXO C: TERMO DE ASSENTIMENTO (ENTRE 12 E 18 ANOS) GRUPO HU



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF
 36036-900 JUIZ DE FORA - MG – BRASIL
TERMO DE ASSENTIMENTO
 (No caso do menor entre 12 a 18 anos)
 (Grupo Hidroxiureia)

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Avaliação farmacogenética e hematológica de pacientes com doença falciforme SS e SC em tratamento com hidroxiureia atendidos no Hemocentro de Governador Valadares**”. Nesta pesquisa, nós iremos estudar os fatores genéticos (ou seja, que estão dentro da célula e vieram dos seus pais para você) e no sangue que podem modificar o resultado do tratamento com a hidroxiureia, um remédio usado no tratamento da doença falciforme. Nós estamos estudando esse assunto porque para 1 pessoa, em cada 4 pessoas que usam a hidroxiureia, o remédio não funciona muito bem. Desta forma, sua participação na pesquisa lhe dará a oportunidade de um melhor acompanhamento do tratamento com o remédio hidroxiureia. Além disso, sua participação poderá ajudar no futuro a descobrir se o remédio irá funcionar bem para a pessoa antes de ela usar.

Para esta pesquisa faremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): (1) coleta de 10mL de sangue da veia do braço, no período da manhã, após você ter ficado 8 horas sem comer (em jejum), sendo essa uma quantidade parecida com aquela retirada para exames de sangue de rotina, para obtenção do DNA a ser usado na análise genética; quantificação do remédio no seu sangue e avaliação de possíveis efeitos tóxicos da hidroxiureia; (2) Avaliação do seu prontuário médico para obtenção dos dados somente relacionados à esse projeto de pesquisa, com o objetivo de comparar os seus dados clínicos e sanguíneos antes e após o início do seu tratamento com hidroxiureia.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não pagará nada para participar da pesquisa, nem receberá qualquer vantagem financeira. Será falado para você tudo o que desejar saber sobre a pesquisa e você também estará livre para querer ou não participar da pesquisa. Você ou o seu responsável poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem que isso prejudique seu tratamento.

A sua participação é voluntária e você não será punido se não quiser participar da pesquisa, sendo que isso não mudará a forma em que é atendido (a) pelo pesquisador que irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação. Esta pesquisa apresenta riscos bem pequenos, estando relacionados ao desconforto físico decorrente do procedimento invasivo para retirada de sangue. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização.

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
 Rubrica do (a) menor:

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva
 Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.
 CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG
 Fone: (33) 8859-3028/E-mail:
 pamela.souza@ufjf.edu.br
 Rubrica do (a) pesquisador (a):

Os resultados das análises genéticas e sanguíneas serão acrescentados no prontuário médico no final das análises da pesquisa. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados sem a sua permissão ou do seu responsável. Os dados e instrumentos utilizados na

pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos.

Ao final do período de realização da pesquisa, seu sangue será armazenado no Biorrepositório, onde:

- a) poderá ficar armazenado por até 10 anos, após autorizado do CEP e se em conformidade com as normas pertinentes do Conselho Nacional de Saúde, sob a responsabilidade da Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares;
- b) poderá ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, respeitando-se o Item 7 da Resolução do Conselho Nacional de Saúde 441/11, o qual determina que tal transferência deve ser comunicada a você e/ou seu representante legal, sempre que possível ou, na impossibilidade, deve ser apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP;
- c) poderá ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa. O DNA, sem contaminantes químicos, mas com possibilidade de contaminantes biológicos infecciosos como vírus, será descartado após os microtubos serem preenchidos com hipoclorito de sódio 3% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, o líquido descartado na pia do laboratório. Os microtubos serão destinados ao descarte de plásticos contaminados e enviados ao descarte com material hospitalar da respectiva Universidade.

Você e seu representante legal serão informados sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório, quando for o caso. A retirada do seu consentimento e de seu representante legal de guarda da sua amostra biológica no biorrepositório, dar-se-á a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo para você, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, por você e seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes. Tal devolução será feita imediatamente após a entrega do documento assinado ao pesquisador responsável, sendo entregue, *em mãos* do participante da pesquisa e de seu representante legal, os microtubos contendo todas as suas amostras biológicas (sangue e DNA). Não será solicitado o patenteamento ou permitida a utilização comercial do seu material biológico armazenado no Biorrepositório. Em caso de dissolução futura da parceria firmada entre a UFJF e a Fundação Hemominas no que se refere a essa pesquisa, os materiais biológicos e dados coletados serão destinados à instituição de origem do pesquisador responsável.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias: uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, na **Universidade Federal de Juiz de Fora – campus avançado de Governador Valadares** e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução N° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

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

Rubrica do (a) menor: _____

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro n° 2000.

CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG

Fone: (33) 8859-3028/E-mail:

pamela.souza@ufjf.edu.br

Rubrica do (a) pesquisador (a): _____

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), 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*.

Governador Valadares, ____ 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

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza
Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.

CEP: 35020-220 – Governador Valadares –

MG Fone: (33) 8859-3028/E-mail:

pamela.souza@ufjf.edu.br

ANEXO D: TERMO DE ASSENTIMENTO (ENTRE 12 E 18 ANOS) GRUPO CONTROLE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF
 36036-900 JUIZ DE FORA - MG – BRASIL
TERMO DE ASSENTIMENTO
 (No caso do menor entre 12 a 18 anos)
 (Grupo Controle)

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Avaliação farmacogenética e hematológica de pacientes com doença falciforme SS e SC em tratamento com hidroxiureia atendidos no Hemocentro de Governador Valadares**”. Nesta pesquisa, nós iremos estudar os fatores genéticos (ou seja, que estão dentro da célula e vieram dos seus pais para você) e no sangue que podem modificar o resultado do tratamento com a hidroxiureia, um remédio usado no tratamento da doença falciforme. Como você não usa esse remédio, o seus resultados serão importantes para compararmos aos dos outros voluntários que estão usando esse remédio. Nós estamos estudando esse assunto porque para 1 pessoa, em cada 4 pessoas que usam a hidroxiureia, o remédio não funciona muito bem. Desta forma, a sua participação na pesquisa lhe dará a oportunidade de conhecer melhor os fatores genéticos e do sangue que podem mudar o resultado do tratamento com esse remédio, podendo ajudar no futuro a descobrir se o remédio irá funcionar bem para a pessoa antes de ela usar.

Para esta pesquisa faremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): (1) coleta de 10mL de sangue da veia do braço, no período da manhã, após você ter ficado 8 horas sem comer (em jejum), sendo essa uma quantidade parecida com aquela retirada para exames de sangue de rotina, para obtenção do DNA a ser usado na análise genética; (2) Avaliação do seu prontuário médico para obtenção dos dados somente relacionados à esse projeto de pesquisa, com o objetivo de comparar os seus dados clínicos e sanguíneos com aqueles dos pacientes usando a hidroxiureia.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não pagará nada para participar da pesquisa, nem receberá qualquer vantagem financeira. Será falado para você tudo o que desejar saber sobre a pesquisa e você também estará livre para querer ou não participar da pesquisa. Você ou o seu responsável poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem que isso prejudique seu tratamento.

A sua participação é voluntária e você não será punido se não quiser participar da pesquisa, sendo que isso não mudará a forma em que é atendido (a) pelo pesquisador que irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação. Esta pesquisa apresenta riscos bem pequenos, estando relacionados ao desconforto físico decorrente do procedimento invasivo para retirada de sangue. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização.

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

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva
 Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.
 CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG
 Fone: (33) 8859-3028/E-mail:
 pamela.souza@ufjf.edu.br

Rubrica do (a) menor:

Rubrica do (a) pesquisador (a):

Os resultados das análises genéticas e sanguíneas serão acrescentados no prontuário médico no final das análises da pesquisa. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados sem a sua permissão ou do seu responsável. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos.

Ao final do período de realização da pesquisa, seu sangue será armazenado no Biorrepositório, onde:

a) poderá ficar armazenado por até 10 anos, após autorizado do CEP e se em conformidade com as normas pertinentes do Conselho Nacional de Saúde, sob a responsabilidade da Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares;

b) poderá ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, respeitando-se o Item 7 da Resolução do Conselho Nacional de Saúde 441/11, o qual determina que tal transferência deve ser comunicada a você e/ou seu representante legal, sempre que possível ou, na impossibilidade, deve ser apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP;

c) poderá ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa. O DNA, sem contaminantes químicos, mas com possibilidade de contaminantes biológicos infecciosos como vírus, será descartado após os microtubos serem preenchidos com hipoclorito de sódio 3% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, o líquido descartado na pia do laboratório. Os microtubos serão destinados ao descarte de plásticos contaminados e enviados ao descarte com material hospitalar da respectiva Universidade.

Você e seu representante legal serão informados sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório, quando for o caso. A retirada do seu consentimento e de seu representante legal de guarda da sua amostra biológica no biorrepositório, dar-se-á a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo para você, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, por você e seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes. Tal devolução será feita imediatamente após a entrega do documento assinado ao pesquisador responsável, sendo entregue, *em mãos* do participante da pesquisa e de seu representante legal, os microtubos contendo todas as suas amostras biológicas (sangue e DNA). Não será solicitado o patenteamento ou permitida a utilização comercial do seu material biológico armazenado no Biorrepositório. Em caso de dissolução futura da parceria firmada entre a UFJF e a Fundação Hemominas no que se refere a essa pesquisa, os materiais biológicos e dados coletados serão destinados à instituição de origem do pesquisador responsável.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias: uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, na **Universidade Federal de Juiz de Fora – campus avançado de Governador Valadares** 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.

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

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.

CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG

Fone: (33) 8859-3028/E-mail:

pamela.souza@ufjf.edu.br

Rubrica do (a) menor: _____ Rubrica do (a) pesquisador (a): _____

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ **(se já tiver documento)**, 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.

Governador Valadares, ____ 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

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza
Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.

CEP: 35020-220 – Governador Valadares –

MG Fone: (33) 8859-3028/E-mail:

pamela.souza@ufjf.edu.br

ANEXO E: TERMO DE CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PELO MENOR/ GRUPO HU



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF
 36036-900 JUIZ DE FORA - MG – BRASIL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
 (No caso do responsável pelo menor)

(Grupo Hidroxiureia)

O menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Avaliação farmacogenética e hematológica de pacientes com doença falciforme SS e SC em tratamento com hidroxiureia atendidos no Hemocentro de Governador Valadares”**. Nesta pesquisa pretendemos estudar os fatores genéticos e no sangue que podem interferir na resposta ao tratamento com o hidroxiureia, um medicamento usado no tratamento da doença falciforme. O motivo que nos leva a estudar esse assunto é o fato de existir grande variação individual na resposta ao medicamento hidroxiureia, sendo que 25% das pessoas que usam esse medicamento não respondem bem ao tratamento. Desta forma, a participação de seu(sua) filho(a) na pesquisa lhe dará a oportunidade de um melhor acompanhamento do tratamento com o medicamento hidroxiureia. Além disso, poderá auxiliar futuramente para dizer com antecedência se o tratamento com hidroxiureia é ou não indicado para uma determinada pessoa, através da elaboração de um perfil genético de boa resposta ao medicamento.

Para esta pesquisa faremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): (1) coleta de 5mL de sangue da veia do braço, no período da manhã, após você ter ficado 8 horas sem comer (em jejum), sendo essa uma quantidade parecida com aquela retirada para exames de sangue de rotina, para obtenção do DNA a ser usado na análise genética, quantificação do medicamento no sangue e avaliação de possíveis efeitos tóxicos da hidroxiureia (2) Avaliação do seu prontuário médico do (a) seu (sua) filho (a) para obtenção dos dados somente relacionados à esse projeto de pesquisa, com o objetivo de comparar os seus dados clínicos e sanguíneos antes e após o início do seu tratamento com hidroxiureia.

Para participar desta pesquisa, o menor sob sua responsabilidade não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Ele (a) será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Você ou o menor sob sua responsabilidade poderá retirar o consentimento ou interromper a participação nessa pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo ao tratamento. A participação dele (a) 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. O menor não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar. Esta pesquisa apresenta riscos mínimos, estando relacionados ao desconforto físico decorrente do procedimento invasivo para retirada de sangue. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização.

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
 Rubrica do (a) responsável:

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva
 Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.
 CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG
 Fone: (33) 8859-3028/E-mail: pâmela.souza@ufjf.edu.br
 Rubrica do (a) pesquisador (a):

Os resultados das análises genéticas e sanguíneas serão acrescentados no prontuário médico no final das análises da pesquisa. O nome ou o material que indique a participação do menor não serão liberados sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos.

Ao final do período de realização da pesquisa, o sangue do menor será armazenado no Biorrepositório, onde:

a) poderá ficar armazenado por até 10 anos, após autorizado do CEP e se em conformidade com as normas pertinentes do Conselho Nacional de Saúde, sob a responsabilidade da Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares;

b) poderá ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, respeitando-se o Item 7 da Resolução do Conselho Nacional de Saúde 441/11, o qual determina que tal transferência deve ser comunicada a você, sempre que possível ou, na impossibilidade, deve ser apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP;

c) poderá ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa. O DNA, sem contaminantes químicos, mas com possibilidade de contaminantes biológicos infecciosos como vírus, será descartado após os microtubos serem preenchidos com hipoclorito de sódio 3% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, o líquido descartado na pia do laboratório. Os microtubos serão destinados ao descarte de plásticos contaminados e enviados ao descarte com material hospitalar da respectiva Universidade.

Você será informado (a) sobre a perda ou destruição das amostras biológicas do menor, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório, quando for o caso. A retirada do consentimento de guarda da amostra biológica do menor no biorrepositório, dar-se-á a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo para o menor, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, por você ou pelo menor, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes. Tal devolução será feita imediatamente após a entrega do documento assinado ao pesquisador responsável, sendo entregue, *em mãos* do representante legal do participante da pesquisa, os microtubos contendo todas as amostras biológicas (sangue e DNA). Não será solicitado o patenteamento ou permitida a utilização comercial do material biológico armazenado no Biorrepositório. Em caso de dissolução futura da parceria firmada entre a UFJF e a Fundação Hemominas no que se refere a essa pesquisa, os materiais biológicos e dados coletados serão destinados à instituição de origem do pesquisador responsável.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias: uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, na **Universidade Federal de Juiz de Fora – campus avançado de Governador Valadares** e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução N° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

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

Rubrica do (a) responsável:

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro n° 2000.

CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG

Fone: (33) 8859-3028/E-mail: pamela.souza@ufjf.edu.br

Rubrica do (a) pesquisador (a):

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, responsável pelo menor _____, 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 modificar a decisão do menor sob minha responsabilidade de participar, se assim o desejar. Declaro que concordo que o menor sob minha responsabilidade participe dessa pesquisa. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do (a) Responsável

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

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza
Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.

CEP: 35020-220 – Governador Valadares –

MG Fone: (33) 8859-3028/E-mail:

pamela.souza@ufjf.edu.br

ANEXO F: TERMO DE CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PELO MENOR/ GRUPO
CONTROLE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF
36036-900 JUIZ DE FORA - MG – BRASIL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(No caso do responsável pelo menor)

(Grupo Controle)

O menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Avaliação farmacogenética e hematológica de pacientes com doença falciforme SS e SC em tratamento com hidroxiureia atendidos no Hemocentro de Governador Valadares**”. Nesta pesquisa pretendemos estudar os fatores genéticos e no sangue que podem interferir na resposta ao tratamento com o hidroxiureia, um medicamento usado no tratamento da doença falciforme. Como o voluntário não usa a hidroxiureia, seus dados serão comparados aos dos outros voluntários que estão em uso do medicamento. O motivo que nos leva a estudar esse assunto é o fato de existir grande variação individual na resposta ao medicamento hidroxiureia, sendo que 25% das pessoas que usam esse medicamento não respondem bem ao tratamento. Desta forma, a participação de seu(sua) filho(a) na pesquisa lhe dará a oportunidade de conhecer melhor os fatores genéticos e sanguíneos que podem interferir na resposta ao medicamento, bem como poderá auxiliar futuramente para dizer com antecedência se o tratamento com hidroxiureia é ou não indicado para uma determinada pessoa, através da elaboração de um perfil genético de boa resposta ao medicamento.

Para esta pesquisa faremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): (1) coleta de 5mL de sangue da veia do braço, no período da manhã, após você ter ficado 8 horas sem comer (em jejum), sendo essa uma quantidade parecida com aquela retirada para exames de sangue de rotina, para obtenção do DNA a ser usado na análise genética; (2) Avaliação do seu prontuário médico do (a) seu (sua) filho (a) para obtenção dos dados somente relacionados à esse projeto de pesquisa, com o objetivo de comparar os seus dados clínicos e sanguíneos com aqueles dos pacientes em tratamento com hidroxiureia.

Para participar desta pesquisa, o menor sob sua responsabilidade não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Ele (a) será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Você ou o menor sob sua responsabilidade poderá retirar o consentimento ou interromper a participação nessa pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo ao tratamento. A participação dele (a) 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. O menor não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar. Esta pesquisa apresenta riscos mínimos, estando relacionados ao desconforto físico decorrente do procedimento invasivo para retirada de sangue. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização.

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
Rubrica do (a) responsável:

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva
Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.
CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG
Fone: (33) 8859-3028/E-mail: pâmela.souza@ufjf.edu.br
Rubrica do (a) pesquisador (a):

Os resultados das análises genéticas e sanguíneas serão acrescentados no prontuário médico no final das análises da pesquisa. O nome ou o material que indique a participação do menor não serão liberados sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos.

Ao final do período de realização da pesquisa, o sangue do menor será armazenado no Biorrepositório, onde:

- a) poderá ficar armazenado por até 10 anos, após autorizado do CEP e se em conformidade com as normas pertinentes do Conselho Nacional de Saúde, sob a responsabilidade da Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares;
- b) poderá ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, respeitando-se o Item 7 da Resolução do Conselho Nacional de Saúde 441/11, o qual determina que tal transferência deve ser comunicada a você, sempre que possível ou, na impossibilidade, deve ser apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP;
- c) poderá ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa. O DNA, sem contaminantes químicos, mas com possibilidade de contaminantes biológicos infecciosos como vírus, será descartado após os microtubos serem preenchidos com hipoclorito de sódio 3% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, o líquido descartado na pia do laboratório. Os microtubos serão destinados ao descarte de plásticos contaminados e enviados ao descarte com material hospitalar da respectiva Universidade.

Você será informado (a) sobre a perda ou destruição das amostras biológicas do menor, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório, quando for o caso. A retirada do consentimento de guarda da amostra biológica do menor no biorrepositório, dar-se-á a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo para o menor, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, por você ou pelo menor, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes. Tal devolução será feita imediatamente após a entrega do documento assinado ao pesquisador responsável, sendo entregue, *em mãos* do representante legal do participante da pesquisa, os microtubos contendo todas as amostras biológicas (sangue e DNA). Não será solicitado o patenteamento ou permitida a utilização comercial do material biológico armazenado no Biorrepositório. Em caso de dissolução futura da parceria firmada entre a UFJF e a Fundação Hemominas no que se refere a essa pesquisa, os materiais biológicos e dados coletados serão destinados à instituição de origem do pesquisador responsável.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias: uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, na **Universidade Federal de Juiz de Fora – campus avançado de Governador Valadares** 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.

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
 Rubrica do (a) responsável:

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza Silva
 Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.
 CEP: 35020-220 – Governador Valadares – MG
 Fone: (33) 8859-3028/E-mail: pamela.souza@ufjf.edu.br
 Rubrica do (a) pesquisador (a):

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, responsável pelo menor _____, 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 modificar a decisão do menor sob minha responsabilidade de participar, se assim o desejar. Declaro que concordo que o menor sob minha responsabilidade participe dessa pesquisa. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do (a) Responsável

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

Pesquisador Responsável: Pâmela Souza
Silva

Endereço: Rua Israel Pinheiro nº 2000.
CEP: 35020-220 – Governador Valadares –
MG Fone: (33) 8859-3028/E-mail:
pamela.souza@ufjf.edu.br

ANEXO G: INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS



UNIVERSIDADE
FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Formulário para coleta de dados - Prontuário

Prontuário n°: _____ Data da análise: ___/___/___ Realizada por: _____

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Sexo: () M () F Raça: _____

Cidade onde reside: _____ Telefone (s): () _____ / () _____

<p>1. Diagnóstico: Doença Falciforme: () SS () SC () Outro: qual _____ Data da última consulta: ___/___/___</p>	<p>2. Análise dos critérios de exclusão: 2.1. Em gestação: () Sim () Não 2.2. Resultado HIV: () Negativo () Positivo () Não avaliado 2.3. Resultado Hepatite B ou C: () Negativo () Positivo () Não avaliado 2.4. Comprometimento renal ou hepático severos: () Sim () Não () Não diagnosticado 2.5. Transfusão sanguínea: () Não () Sim, há quanto tempo? () há mais de 100 dias () há menos de 100 dias Data (aproximada) da última transfusão: ___/___/___</p>
--	---

3. Uso de Hidroxiureia (HU)*:	
() Não	() Sim Desde: _____
Há indicação médica?	Posologia inicial: _____ Peso na ocasião: _____ Kg
() Sim	Posologia atual: _____ Peso atual: _____ Kg
() Não	Dose atual: _____ mg/Kg/dia
Em caso de uso, relate as reações adversas apresentadas:	

Obs.: * relatar o paciente que usa HU atualmente ou que já tenha usado em algum momento, mas que possa ter interrompido o tratamento por alguma razão. Anotar a razão da interrupção do tratamento, se houver.

4. Eventos relatados durante as consultas:				
Data	Crise álgica/localização	Sequestro esplênico	Esplenectomia	Infecções/Qual



UNIVERSIDADE
FEDERAL DE JUIZ DE FORA

5. Medidas: (dados mais recentes)

Peso: _____ Kg	Altura: _____ cm	PA: _____ mmHG
Data: ____/____/____	Data: ____/____/____	Data: ____/____/____

6 . Utilização de medicamentos cronicamente:

Medicamento	Posologia	Doença	Desde

7. Exames hematológicos*

Data	Hb Fetal	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM	HCM	LG	Bt	S	M	L	Plaquetas mil/ mm ³	Retic

Obs.: * anotar o exame mais recente, 2 exames imediatamente anteriores ao início do tratamento com HU e 2 após o início do tratamento.

Outros dados laboratoriais ou considerações importantes: _____

ANEXO H: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFJF



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação farmacogenética e hematológica de pacientes com doença falciforme SS e SC em tratamento com hidroxíureia atendidos no Hemocentro de Governador Valadares

Pesquisador: Pâmela Souza Silva

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

Versão: 7

CAAE: 29058814.4.0000.5147

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.085.038

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto em sua 7a. versão, anteriormente aprovado e que retorna ao CEP com novo pedido de aprovação em virtude de emenda para prorrogar o prazo de realização por motivo justificado. Apresentação do projeto esta clara, detalhada de forma objetiva, descreve as bases científicas que justificam o estudo, de acordo com o previsto na Resolução CNS 466/12 de 2012, item III.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos bem descritos e em consonância com a hipótese da pesquisa.

O Objetivo da pesquisa está bem delineado, apresenta clareza e compatibilidade com a proposta, tendo adequação da metodologia aos objetivos pretendidos, de acordo com as disposições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013, item 3.4.1 - 4.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco que o projeto apresenta é caracterizado como risco mínimo e está adequadamente descrito, considerando que os indivíduos não sofrerão qualquer dano ou sofrerão prejuízo pela participação ou pela negação de participação na pesquisa e benefícios esperados adequadamente

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



Continuação do Parecer: 2.085.038

descritos. A avaliação dos Riscos e Benefícios está de acordo com as disposições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, itens III; III.2 e V.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários a acrescentar aos do parecer anterior.

O projeto está bem estruturado, apresenta o tipo de estudo, número de participantes, critério de inclusão e exclusão, forma de recrutamento. As referências bibliográficas são atuais, sustentam os objetivos do estudo e seguem uma normatização. O cronograma mostra as diversas etapas da pesquisa, além de mostra que a coleta de dados ocorrerá após aprovação do projeto pelo CEP. O orçamento lista a relação detalhada dos custos da pesquisa que serão financiados com recursos próprios conforme consta no campo apoio financeiro. A pesquisa proposta está de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466 de 2012, itens IV.6, II.11 e XI.2; com a Norma Operacional CNS 001 de 2013. Itens: 3.4.1-6, 8, 9, 10 e 11; 3.3 - f; com o Manual Operacional para CEPS Item: VI - c; e com o Manual para submissão de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Mantidas sem alteração as considerações expostas no parecer anterior.

O protocolo de pesquisa está em configuração adequada, apresenta FOLHA DE ROSTO devidamente preenchida, com o título em português, identifica o patrocinador pela pesquisa, estando de acordo com as disposições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra a; e 3.4.1 item 16. Apresenta o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO em linguagem clara para compreensão dos participantes, apresenta justificativa e objetivo, campo para identificação do participante, descreve de forma suficiente os procedimentos, informa que uma das vias do TCLE será entregue aos participantes, assegura a liberdade do participante recusar ou retirar o consentimento sem penalidades, garante sigilo e anonimato, explicita riscos e desconfortos esperados, ressarcimento com as despesas, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, contato do pesquisador e do CEP e informa que os dados da pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador pelo período de cinco anos, de acordo com o previsto na Resolução CNS 466 de 2012, itens: IV letra b; IV.3 letras a, b, d, e, f, g e h; IV. 5 letra d e XI.2 letra f. Apresenta o INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS de forma pertinente aos objetivos delineados e preserva os participantes da pesquisa. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas no Manual Operacional para CPEs. Apresenta DECLARAÇÃO de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra h.

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@uffj.edu.br



Continuação do Parecer: 2.085.038

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto em condições de ser aprovado sem ressalvas quanto aos princípios éticos norteadores da pesquisa. Diante do exposto, a emenda ao projeto está aprovada, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional N° 001/2013 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: maio de 2018.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional N°001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO a emenda ao protocolo de pesquisa proposto, a qual solicita extensão no cronograma de execução. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_912895 E4.pdf	02/05/2017 19:43:51		Aceito
Outros	Termo_sigilo_Kenia.pdf	24/10/2016 14:08:44	Pâmela Souza Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Colaborador_ext_kenia.pdf	24/10/2016 14:07:52	Pâmela Souza Silva	Aceito
Outros	Lattes_Ana Paula Pinho Santos.pdf	03/11/2014 22:59:21		Aceito
Outros	carta resposta_parecer 28 maio 2014 Pamela.pdf	27/06/2014 13:22:11		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_27_06_CEP.pdf	27/06/2014 13:07:19		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Hemominas.pdf	27/06/2014 12:45:48		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_infra-estrutura.pdf	28/03/2014 17:40:48		Aceito
Outros	TA_HU.doc	19/03/2014 13:30:07		Aceito
Outros	TA_controle.doc	19/03/2014 13:29:48		Aceito

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@uffj.edu.br



Continuação do Parecer: 2.085.038

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_para-os-responsáveis-de-menor_HU.doc	19/03/2014 13:29:11		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_para-os-responsáveis-de-menor_controle.doc	19/03/2014 13:29:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_aduto_HU.doc	19/03/2014 13:28:50		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_aduto_controle.doc	19/03/2014 13:28:30		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto_assinada.pdf	19/03/2014 13:27:37		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

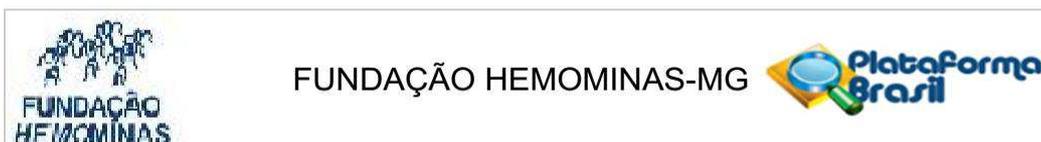
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JUIZ DE FORA, 26 de Maio de 2017

Assinado por:
Patrícia Aparecida Fontes Vieira
(Coordenador)

ANEXO I: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HEMOMINAS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação farmacogenética e hematológica de pacientes com doença falciforme SS e SC em tratamento com hidroxiureia atendidos no Hemocentro de Governador Valadares

Pesquisador: Pâmela Souza Silva

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 3

CAAE: 29058814.4.3001.5118

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.087.995

Apresentação do Projeto:

A doença falciforme (DF) é um grave problema de saúde pública mundial, com grande impacto na morbimortalidade da população acometida. O Brasil apresenta alta prevalência dessa doença, sendo padronizado pelo Ministério da Saúde o tratamento farmacológico com hidroxiureia (HU). Apesar de a maioria dos pacientes apresentar uma resposta terapêutica efetiva à HU, existe grande variabilidade de resposta farmacológica, sendo que aproximadamente de 25% das pessoas não apresentam resposta satisfatória ao fármaco. Sendo assim, o objetivo do presente projeto é avaliar a variabilidade individual de resposta farmacológica ao tratamento com HU, analisando marcadores farmacogenéticos e parâmetros hematológicos de pacientes com DF não tratados e após tratamento com esse fármaco. Para tal, serão selecionados 100 voluntários com doença falciforme SS ou SC não tratados com HU e 100 voluntários tratados com esse fármaco acompanhados no Hemocentro de Governador Valadares. Amostras de sangue venoso serão coletadas dos voluntários para 1) análises hematológicas (para avaliação da concentração de hemoglobina fetal, hemograma, dosagem sérica de transaminases, creatinina e ácido úrico) e quantificação da HU plasmática; 2) extração do DNA para avaliação dos polimorfismos genéticos

Endereço: Alameda Ezequiel Dias. 321

Bairro: Santa Efigênia

CEP: 30.130-110

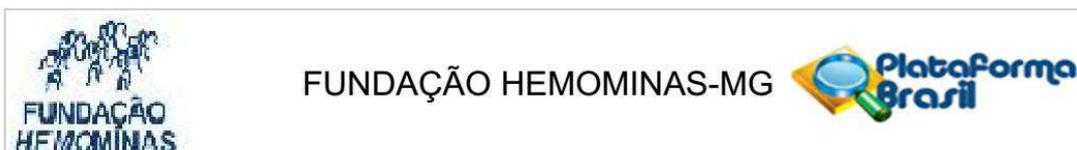
UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3768-4587

Fax: (31)3768-4600

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



Continuação do Parecer: 2.087.995

em cinco genes candidatos relacionados aos alvos farmacocinéticos e farmacodinâmicos da HU (genes BCL11A, NOS 3, ARG 1, FLT1 e UTA) e 3) isolamento de células mononucleares para análise da genotoxicidade in vitro e in vivo da HU, relacionando tal perfil de resposta com os marcadores genéticos. Tal projeto possibilitará melhor acompanhamento farmacoterapêutico dos pacientes portadores de DF, além de permitir a avaliação ampla e inédita do perfil genético de resposta de voluntários brasileiros ao tratamento com a HU. Além disso, tais achados poderão contribuir para prever o perfil de resposta à HU pelo paciente com DF, definindo-se padrões de respondedores e não respondedores ao fármaco.

Objetivo da Pesquisa:

A presente proposta tem por objetivo a avaliação de marcadores genéticos e de parâmetros hematológicos de pacientes com doença falciforme (SS e SC) relacionando-os tanto à resposta terapêutica com hidroxiureia, quanto às reações adversas a esse tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Esta pesquisa apresenta riscos mínimos relacionados ao desconforto físico decorrente do procedimento invasivo para retirada de sangue.

Benefícios: Mais intenso acompanhamento farmacoterapêutico dos pacientes portadores de doença falciforme SS ou SC atendidos no Hemocentro de Governador Valadares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verificar campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

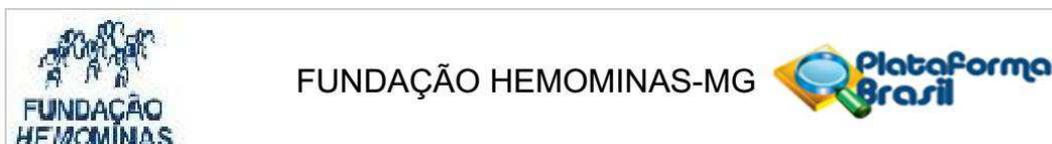
Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Este parecer consubstanciado trata do pedido de emenda feito pela pesquisadora, que trata sobre: "A emenda aqui apresentada trata exclusivamente da solicitação de prorrogação do prazo de execução para maio de 2018. Portanto, houve alteração exclusivamente no item "cronograma". Houve atraso no cronograma da pesquisa anteriormente proposto em função do desabastecimento nacional do medicamento Hidroxiureia pelo SUS, o que levou à interrupção do tratamento por muitos pacientes. Sendo assim, houve comprometimento do acompanhamento dos efeitos do fármaco em função dessa descontinuação, fazendo-se necessário o acompanhamento por um

Endereço: Alameda Ezequiel Dias. 321
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.130-110
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3768-4587 **Fax:** (31)3768-4600 **E-mail:** cep@hemominas.mg.gov.br



Continuação do Parecer: 2.087.995

período adicional de tempo. Faz-se importante destacar que os resultados preliminares obtidos com tal projeto de pesquisa já foram apresentados como 4 resumos em eventos científicos, tendo sido premiado em um deles. Além disso, outro resumo já foi aceito para apresentação em evento científico que ocorrerá em julho de 2017.". Não foram evidenciados óbices éticos na emenda. Considera-se a emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_912895 E4.pdf	02/05/2017 19:43:51		Aceito
Outros	Termo_sigilo_Kenia.pdf	24/10/2016 14:08:44	Pâmela Souza Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Colaborador_ext_kenia.pdf	24/10/2016 14:07:52	Pâmela Souza Silva	Aceito
Outros	Lattes_Ana Paula Pinho Santos.pdf	03/11/2014 22:59:21		Aceito
Outros	carta resposta_parecer 28 maio 2014 Pamela.pdf	27/06/2014 13:22:11		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_27_06_CEP.pdf	27/06/2014 13:07:19		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Hemominas.pdf	27/06/2014 12:45:48		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_infra-estrutura.pdf	28/03/2014 17:40:48		Aceito
Outros	TA_HU.doc	19/03/2014 13:30:07		Aceito
Outros	TA_controle.doc	19/03/2014 13:29:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_para-os-responsáveis-de-menor_HU.doc	19/03/2014 13:29:11		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_para-os-responsáveis-de-menor_controle.doc	19/03/2014 13:29:03		Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_aduto_HU.doc	19/03/2014		Aceito

Endereço: Alameda Ezequiel Dias. 321

Bairro: Santa Efigênia

CEP: 30.130-110

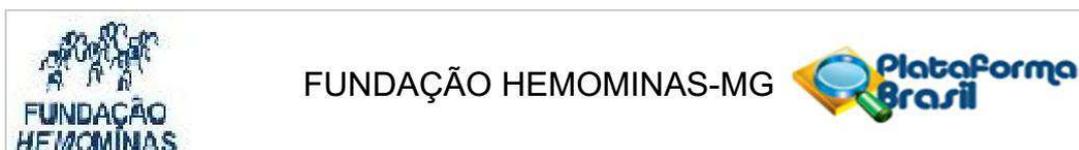
UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3768-4587

Fax: (31)3768-4600

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



Continuação do Parecer: 2.087.995

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_aduto_HU.doc	13:28:50		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_aduto_controle.doc	19/03/2014 13:28:30		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto_assinada.pdf	19/03/2014 13:27:37		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 29 de Maio de 2017

Assinado por:
Daniel Gonçalves Chaves
(Coordenador)