



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas

LILIAN CARLA PEREIRA BARBOSA

Frequências dos polimorfismos nos genes da haptoglobina e mieloperoxidase (-G463A) em pacientes com doença falciforme (SS) e correlação com a gravidade clínica da sobrecarga de ferro

Brasília-DF

2013

LILIAN CARLA PEREIRA BARBOSA

Frequências dos polimorfismos nos genes da haptoglobina e mieloperoxidase (-G463A) em pacientes com doença falciforme (SS) e correlação com a gravidade clínica da sobrecarga de ferro

Dissertação apresentada para obtenção de título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª. Ana Luisa Miranda-Vilela


Brasília-DF

2013


LILIAN CARLA PEREIRA BARBOSA

Frequências dos polimorfismos nos genes da haptoglobina e mieloperoxidase (-G463A) em com doença falciforme (SS) e correlação com a gravidade clínica da sobrecarga de ferro

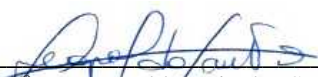
BANCA EXAMINADORA:



Dr. José Carlos Martins Córdoba
Hospital de Apoio SES-DF



Prof^a Dr^a. Zulmira Lacava
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília



Prof^o Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto
Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Orientador

Brasília

2013

*Aos meus pais por todo o amor e dedicação,
à minha irmã pelo companheirismo e incentivo e
à minha sobrinha pelo carinho.*

Dedico

“Chuva e sol. Poeira e carvão. Longe de casa, sigo o roteiro. Mais uma estação.

E a saudade no coração...”

Luiz Gonzaga

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por guiar meus passos e possibilitar a realização deste trabalho providenciando solução para todas as incertezas ao longo do caminho.

Aos meus pais, Alcides e Lúcia, à minha irmã Taciana e a minha sobrinha Bruna que compreenderam a minha ausência e me mantiveram sempre motivada a concluir este trabalho.

À minha tia Margarete e toda sua família, Daldegan, Mariana, Vivian e Giovanni, por me acolherem em sua casa e providenciar para que me adaptasse à mudança fazendo com que me sentisse em casa. Obrigada por me adotar e incentivar sempre.

Ao professor Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto, pela confiança em mim depositada, pela orientação, amizade, apoio e atenção em todos os momentos.

À professora Dra. Ana Luisa Miranda-Vilela, minha co-orientadora, que desde a troca do primeiro e-mail sempre se mostrou disponível e solícita. Obrigada pela amizade, paciência e participação ativa em de todas as etapas deste trabalho. Obrigada por tudo, nunca vou esquecer!

Ao prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia por disponibilizar o Laboratório de Genética Toxicológica para a realização dos procedimentos de bancada e, além disso, agradeço pela companhia nas brincadeiras, noites em que estive no laboratório, seu carinho, amizade, confiança e preocupação.

À prof^a Dra. Maria de Nazaré Klautau por disponibilizar o laboratório de Genética Humana.

À Universidade de Brasília e a Faculdade de Medicina pela oportunidade de ingressar no Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.

À coordenação e ao secretário Alessandro, obrigada pela atenção e esclarecimentos prestados.

À CAPES pela bolsa de estudos durante o meu primeiro ano do mestrado.

Ao Decanato de Pesquisa e Pós-graduação (DPP) da Universidade de Brasília, pelo financiamento deste trabalho (Edital 09/2011).

À Novartis pela compra dos kits de extração de DNA realizada no início do trabalho.

Aos profissionais do Núcleo de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base pelo auxílio na coleta de dados e recrutamento dos pacientes, particularmente: Luzia, Cleide,

Cleuza, Graciana, João Rogério, Alessandra, Oziel, Rozilda, Dra. Cláudia, Dr. Humberto, Dra. Franciele e Dra. Margarete.

À Dra. Margarete pelo auxílio no recrutamento dos pacientes, interpretação dos resultados e discussão.

Às farmacêuticas do setor de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Base, Cecília e Fátima, pela atenção e disponibilidade em receber as amostras e realizar os exames.

À minha querida amiga Ieler, pela ajuda nas disciplinas, extrações de DNA, padronização dos marcadores e nos resultados.

À Cassinha, pela ajuda na padronização e genotipagem da haptoglobina, além da companhia fins de semana e feriado no laboratório, muito obrigada.

Às minhas amigas e companheiras de todas as horas Ieler, Graciana e Ingrid, agradeço pelos conhecimentos divididos, experiências vividas juntas, risadas e momentos de desespero. Sem o companheirismo de vocês seria mais difícil chegar ao final.

A todos aqueles do Departamento de Genética e Morfologia - UnB que de alguma forma estiveram presentes, seja ajudando ou dando apoio moral. São eles: Ana Luisa, Ieler, Ingrid, Graciana, Johnny, Wânia, Maria Luiza, Bélin, Flávia Portilho, Franciele, Mariana, Paolin, Igor e Thais.

Aos colegas de trabalho do Hospital SARAH e do IPDNA/PCDF que apoiaram e incentivaram na fase final do trabalho.

A todos da minha família, distantes, mas tão amados. Graças ao seu incentivo e carinho com quem sempre renovei as energias consegui chegar até aqui.

Aos meus grandes amigos que, mesmo tão longe, se fazem sempre presentes. O meu agradecimento por compreender a ausência nos casamentos, aniversários e momentos especiais. Esta conquista também é de vocês. Obrigada pelo incentivo e apoio sempre.

Aos meus amigos sempre presentes Swamy, Otávio, Adriana, Magno, André, Danny, e Luciana, obrigada pelos momentos de descanso, descontração e incentivo.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatogenia da doença falciforme.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 2: O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro.....	6
Figura 3: Captação de ferro celular através da transferrina.....	9
Figura 4: Regulação da homeostase do ferro mediada pela hepcidina.....	12
Figura 5: Espécies reativas de oxigênio e o ciclo redox do ferro.....	13
Figura 6: Demonstração das 4 classes para a avaliação visual do teste do cometa.....	21
Figura 7: Frequência (em porcentagem) dos pacientes com anemia falciforme amostrados neste estudo, por naturalidade (regiões do Brasil).	36
Figura 8: Distribuição da amostra de acordo com a faixa etária e o gênero dos pacientes.	37
Figura 9: Distribuição da amostra de acordo com o gênero e a idade dos pacientes na época do diagnóstico.	38
Figura 10: Distribuição da amostra de acordo com os tipos de tratamento adotados e o gênero dos pacientes.	39
Figura 11: Distribuição da amostra de acordo com o número de transfusões ao longo da vida e gênero dos pacientes.....	40
Figura 12: Distribuição da amostra de acordo com o número de crises de dor severas ao longo da vida e gênero dos pacientes.....	40
Figura 13: Distribuição da amostra de acordo com o número de crises de dor severas nos últimos 12 meses e o gênero dos pacientes.....	41
Figura 14: Distribuição da amostra de acordo com o número de internações ao longo da vida e gênero dos pacientes.....	42

Figura 15: Distribuição da amostra de acordo com o número de internações nos últimos 12 meses e gênero dos pacientes.....	42
Figura 16: Distribuição da amostra de acordo com o motivo de internações ao longo da vida e gênero dos pacientes.....	43
Figura 17: Distribuição da amostra de acordo com presença de outras comorbidades ao longo da vida e gênero dos pacientes.	44
Figura 18: Número de indivíduos observado e esperado por gênero e genótipos de Hp.	67
Figura 19: Número de indivíduos observado e esperado por genótipos de Hp e tratamento com hidroxiureia.	70
Figura 20: Número de indivíduos observado e esperado por genótipos de Hp e internações por AVC.....	71
Figura 21: Número de indivíduos observado e esperado por genótipos de Hp e sequelas por AVC.....	71
Figura 22: Número de indivíduos observado e esperado por genótipos de MPO e número de internações no último ano.	72
Figura 23: Número de indivíduos observado e esperado por genótipos de MPO e esplenectomia.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Testes diagnósticos para sobrecarga de ferro.	15
Tabela 2: Sequência de iniciadores (primers) e enzimas de restrição utilizados nas análises dos polimorfismos dos genes da Haptoglobina (Hp) e da Mieloperoxidase (MPO, dbSNP rs2333227).	27
Tabela 3: Condições do mix para reação de PCR da Haptoglobina.....	28
Tabela 4: Condições do mix para a reação de PCR da Mieloperoxidase.....	29
Tabela 5: Reagentes empregados na digestão do produto da PCR da Mieloperoxidase.....	29
Tabela 6: Valores de referência para os exames avaliados.....	31
Tabela 7: Diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga no grupo total de pacientes em relação aos exames realizados e número de transfusões recebidas.	45
Tabela 8: Diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga no gênero feminino em relação aos exames realizados e número de transfusões recebidas.	45
Tabela 9: Diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga no sexo masculino em relação aos exames realizados e número de transfusões recebidas.	46
Tabela 10: Diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga na faixa etária de 21-39 anos em relação aos exames realizados e número de transfusões recebidas.	47
Tabela 11: Diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga na faixa etária de 40-59 anos em relação aos exames realizados e número de transfusões recebidas.	48
Tabela 12: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da Hp dos pacientes com Anemia Falciforme sem sobrecarga.	49
Tabela 13: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da Hp dos pacientes com Anemia Falciforme com sobrecarga.	50
Tabela 14: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da MPO no grupo de pacientes com Anemia Falciforme e sem sobrecarga.....	52

Tabela 15: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da MPO no grupo de pacientes com Anemia Falciforme e com sobrecarga.	53
Tabela 16: Frequência da distribuição dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária.....	54
Tabela 17: Frequência da distribuição por gênero dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária.....	55
Tabela 18: Frequência da distribuição por faixa etária dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária.....	56
Tabela 19: Distribuição das frequências alélicas de Hp e MPO (dbSNP rs2333227) e dados para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária.	57
Tabela 20: Dados de diversidade genética, estatísticas F e teste de diferenciação genética para os marcadores Hp e MPO (dbSNP rs2333227) em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária.....	58
Tabela 21: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões pelo gênero dos pacientes com Anemia Falciforme.	60
Tabela 22: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por faixa etária dos pacientes com Anemia Falciforme.	60
Tabela 23: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da Hp nos pacientes do grupo total com Anemia Falciforme.	61
Tabela 24: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da MPO no grupo total de pacientes com Anemia Falciforme.	62
Tabela 25: Frequência da distribuição dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) do grupo total de pacientes com anemia falciforme.....	63
Tabela 26: Frequência da distribuição por gênero dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) no grupo total de pacientes com anemia falciforme.	64
Tabela 27: Frequência da distribuição por faixa etária dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) do grupo total de pacientes com anemia falciforme.	65

Tabela 28: Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos de Hp e MPO -G463A (dbSNP rs2333227) no grupo total de pacientes com anemia falciforme, dados de diversidade genética e para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).	66
Tabela 29: Correlação dos valores de ferritina com PCR, hemácias, hematócrito, número de transfusões, número de exsanguíneo e o uso de quelante.....	68
Tabela 30: Correlação do número de transfusões com número de exsanguíneo, o uso de quelante, internação por priapismo, internação por AVC, sequelas por AVC e número de internações ao longo da vida.	69
Tabela 31: Odds Ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC) para exames laboratoriais e comorbidades.	74
Tabela 32: Odds Ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC) para os genótipos de Hp e MPO, exames laboratoriais e comorbidades.	75

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AVC	acidente vascular cerebral
AF	anemia falciforme
ANOVA	análise de variância
CHCM	concentração hemoglobínica corpuscular média
Dcytb	citocromo b redutase duodenal
DMT1	transportadora de metal divalente 1
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido (do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i>)
ERO	espécies reativas de oxigênio
EPM	erro padrão da média
EHW	equilíbrio de Hardy-Weinberg
EDTA	ácido etilenodiamino tetra- acético (do inglês <i>ethylenediaminetetraaceticacid</i>)
Fe ²⁺	ferro ferroso
Fe ³⁺	ferro férrico
FIS	coeficiente de endogamia intrapopulacional
FST	índice de fixação
FIT	de endogamia total
HBDF	Hospital de Base do Distrito Federal
HPN	hepcidina
HFE	proteína da hemocromatose
HbF	hemoglobina fetal
HbS	hemoglobina S

IREG1	<i>iron-regulated transporter 1</i>
LDH	desidrogenase láctica
Hp	haptoglobina
Hb	hemoglobina
HU	hidroxiureia
HOCl	ácido hipocloroso
HCM	hemoglobina corpuscular média
HCT	hematócrito
HGB	hemoglobina
Ho	heterozigosidade observada
He	heterozigosidade esperada
IRPs	proteínas reguladoras ao ferro (do inglês <i>iron response proteins</i>)
IREs	elementos responsivos ao ferro (do inglês <i>iron response element</i>)
LDL	lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>low density lipoprotein</i>)
MANOVA	análise de variância multivariada
MPO	mieloperoxidase
N	tamanho amostral
NRAMP2	<i>natural resistance associated macrophage protein</i>
OR	odds ratio
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
•OH	radical hidroxila
O ₂ ^{•-}	ânion superóxido
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PCR-us	proteína-C reativa-ultra sensível
pb	pares de base
PDW	amplitude da distribuição do tamanho das plaquetas (do inglês <i>Platelet Distribution Width</i>)
PLT	plaquetas
RBC	número total de hemácias (do inglês <i>red blood cell</i>)
SNP	polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>)
STEAP 3	<i>six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TBE	solução base de Trisborato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TfR	receptor da transferrina
Tf	transferrina
U	unidade
VCM	volume corpuscular médio
VPM	volume plaquetário médio
WBC	número total de leucócitos (do inglês <i>white blood cell</i>)
σ	desvio padrão
%DD	percentagem de danos ao DNA
%HbF	percentagem de hemoglobina
χ^2	qui-quadrado

RESUMO

O íon ferro é fundamental para a homeostase celular; porém, pode ser altamente danoso ao organismo quando se encontra livre, pois sua capacidade de aceitar ou doar elétrons permite catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Em circunstâncias normais, essa reação é minimizada pelo sequestro de ferro dentro de complexos com proteínas; na sobrecarga de ferro, os depósitos de ferro estão livres para promover a produção de ERO, sendo esta inevitável em pacientes que recebem transfusões frequentes, como na doença falciforme. A haptoglobina (Hp) é uma glicoproteína que se liga à hemoglobina (Hb) livre formando o complexo Hp-Hb que é essencial para a remoção de Hb do plasma, tendo um papel crucial contra o estresse oxidativo induzido por Hb. Outra proteína relacionada ao estresse oxidativo é a mieloperoxidase (MPO), uma enzima lisossômica com atividade microbicida oxigênio-dependente presente em monócitos e neutrófilos. Visto que ambas as proteínas apresentam polimorfismo genético que pode influenciar na proteção contra o estresse oxidativo, o objetivo do presente trabalho foi investigar a frequência dos polimorfismos nos genes da Hp e da MPO (-G463A) em pacientes com doença falciforme (SS) e sua correlação com a gravidade clínica da sobrecarga de ferro, visando avaliar uma possível associação entre esses polimorfismos com a variabilidade clínica, a resposta aos tratamentos e o prognóstico, especialmente aqueles relacionados ao estresse oxidativo. Para tal, foi realizado um estudo transversal com amostra de conveniência composta por 78 pacientes com diagnóstico de doença falciforme atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal (HDBF), sem e com sobrecarga de ferro. Os dados foram obtidos através de exames laboratoriais, questionário, pesquisa em prontuários e análises dos polimorfismos por métodos baseados na reação em cadeia da polimerase. Correlação positiva foi encontrada entre os genótipos de Hp e valores de ferritina ($p=0,035$; coeficiente de correlação de Spearman= 0,239), tratamento com hidroxíureia ($p=0,031$; coeficiente de contingência= 0,369), internação por acidente vascular-cerebral (AVC) ($p=0,023$; coeficiente de contingência= 0,379) e sequelas por AVC ($p=0,031$; coeficiente de contingência= 0,368), e entre os genótipos de MPO e número de internações no último ano ($p=0,049$; coeficiente de contingência= 0,332) e esplenectomia ($p=0,024$; coeficiente de contingência= 0,297). Associação significativa entre genótipos específicos da Hp e comorbidades também foram encontradas, enquanto para MPO os resultados sugeriram que a homozigose AA poderia potencializar os efeitos da asplenia. Desvio significativo no equilíbrio de Hardy-Weinberg foi observado apenas para o polimorfismo da Hp, sendo este compatível com deficiência de heterozigotos, sugerindo uma possível existência de seleção natural desfavorecendo o genótipo 1S-2 entre os pacientes com doença falciforme. Os resultados do Odds Ratio sugeriram a possibilidade de que principalmente o aumento de chances de hospitalização por AVC (OR= 6,346; IC 95%= 1,56–25,79; $p=0,005$) e de sequelas por AVC (OR= 6,556; IC 95%= 1,578–27,237; $p=0,005$) poderiam estar associados à menor frequência observada de 1S-2 em relação ao esperado. Apesar de não haver diferenças nas frequências genotípicas

entre os grupos sem e com sobrecarga de ferro para nenhum dos polimorfismos analisados, quando analisadas as interações entre os polimorfismos, efeitos significativos foram mostrados apenas no grupo sem sobrecarga para o polimorfismo de Hp nos valores de proteína C-reativa ultra-sensível (PCR-us) ($p=0,000$) e número de transfusões ($p=0,018$), o mesmo ocorrendo em relação ao polimorfismo de MPO nos valores de PCR-us ($p=0,000$), e para a interação entre Hp/MPO também nos valores de PCR-us ($p=0,000$). Diferenças significativas nas comparações 2-a-2 foram observadas para MPO entre os genótipos GG e AA e entre GA e AA ($p=0,000$ para ambos). Apesar da associação reportada entre o fenótipo Hp1-1 e doença falciforme, nossos resultados corroboram outros indicando que existem diferenças entre os subtipos do alelo Hp^{*1}. Esses resultados ressaltam a importância do presente estudo para um melhor entendimento do significado biológico do polimorfismo de Hp na variabilidade clínica e resposta aos tratamentos de indivíduos falcêmicos na nossa população, e também sugerem que a homozigose AA da MPO pode potencializar os efeitos da asplenia nesses indivíduos.

Palavras-chave: anemia falciforme, sobrecarga de ferro; estresse oxidativo; polimorfismos genéticos; haptoglobina; mieloperoxidase

ABSTRACT

The iron ion is essential for cellular homeostasis; however, it can be highly damaging to the body when it is free, because its ability to accept or donate electrons allows the formation of reactive oxygen species (ROS) to be catalyzed. Under normal circumstances, this reaction is minimized by sequestering iron in complexes with proteins. However, in iron overload, iron deposits are free to promote the production of ROS, which is inevitable in patients who receive frequent transfusions, as occurs in sickle cell anemia. Haptoglobin (Hp) is a glycoprotein which binds free hemoglobin (Hb), forming the Hp-Hb complex that is essential for removal of plasma Hb, having a crucial role against oxidative stress induced by Hb. Another protein related to oxidative stress is myeloperoxidase (MPO), a lysosomal enzyme with oxygen-dependent microbicidal activity present in monocytes and neutrophils. Since both proteins show genetic polymorphisms that may influence the protection against oxidative stress, the objective of this study was to investigate the frequency of polymorphisms in the Hp and MPO (-G463A) genes of patients with sickle cell disease (SS) and its correlation with the clinical severity of iron overload, aiming to evaluate a possible association between these polymorphisms and clinical variability, response to treatment and prognosis, especially those related to oxidative stress. To this end, we conducted a cross-sectional study with a convenience sample comprising 78 patients with sickle cell disease treated at Hospital de Base do Distrito Federal (HDBDF), with and without iron overload. Data were obtained from laboratory tests, questionnaires, the medical records and analysis of the polymorphisms by methods based on polymerase chain reaction. Positive correlations were found between Hp genotypes and values of ferritin levels ($p=0.035$, Spearman's correlation coefficient= 0.239), treatment with hydroxyurea ($p=0.031$, contingency coefficient= 0.369), hospitalization for stroke ($p=0.023$, contingency coefficient= 0.379) and sequelae of stroke ($p=0.031$, contingency coefficient= 0.368); and between MPO genotypes and number of hospitalizations in the past 12 months ($p=0.049$; contingency coefficient= 0.332) and splenectomy ($p=0.024$, contingency coefficient= 0.297). Significant associations between specific Hp genotypes and comorbidities were also found, while for MPO, results suggested that AA homozygosity could increase the effects of asplenia. Significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium was observed only for the Hp polymorphism, which was compatible with heterozygous deficit, suggesting a possible existence of natural selection disfavoring the 1S-2 genotype

XIII

among patients with sickle cell anemia. Results of the Odds Ratio suggested the possibility that mainly increased chances of hospitalization for stroke (OR= 6.346; IC 95%= 1.56–25.79; p=0.005) and of sequelae from stroke (OR= 6.556; IC 95%= 1.578–27.237; p=0.005) could be associated with less frequently observed 1S-2 than was expected. Although no differences were observed in genotype frequencies between the groups with and without iron overload for any of the polymorphisms analyzed, when the interactions between the polymorphisms were analyzed, significant effects between subjects were shown only in the group without overload for Hp polymorphism in the values of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP; p=0.000) and number of transfusions (p=0.018), with the same occurring for MPO polymorphism (p=0.000) and the interaction between Hp/MPO (p=0.000) with hs-CRP values. Significant differences in 2-to-2 comparisons were observed for MPO between the genotypes GG and AA (p=0.000), and GA and AA (p=0.000) in the hs-CRP levels. Despite the reported association between Hp1-1 phenotype and sickle cell disease, our results corroborate others indicating that there are biological differences between the Hp^{*1} allele subtypes. These results highlight the importance of this study to better understand the biological significance of Hp polymorphism in the clinical variability and response to treatment of individuals with sickle cell disease in our population, and also suggest that MPO AA homozygosis may increase the effects of asplenia in these individuals.

Keywords: sickle cell anemia, iron overload, oxidative stress, genetic polymorphisms, haptoglobin; myeloperoxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença falciforme	1
1.2. Metabolismo do Ferro	5
1.2.1. Absorção de ferro	5
1.2.2. Transporte, captação e estoque de ferro	8
1.2.3. Regulação de ferro	10
1.2.4. Sobrecarga de ferro	12
1.3. Estresse oxidativo.....	16
1.4. Haptoglobina e Mieloperoxidase contra o estresse oxidativo e infecções	16
1.5. Polimorfismos da Haptoglobina, estresse oxidativo e infecções	17
1.6. Polimorfismos da Mieloperoxidase, estresse oxidativo e predisposição à infecção em doenças de sobrecarga de ferro secundária	18
1.1. Teste do cometa e estresse oxidativo	20
2. OBJETIVO	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Casuística	23
3.2. Tipo de estudo	23
3.3. Seleção dos pacientes	24
3.3.1. Critérios de inclusão	24
3.3.2. Critérios de exclusão	24

3.4.	Coleta de amostra de sangue periférico.....	24
3.5.	Teste do Cometa.....	25
3.6.	Extração de DNA.....	26
3.7.	Estudo molecular (genotipagem) dos polimorfismos nos genes da haptoglobina e da Mieloperoxidase (–G463A, dbSNP rs2333227)	26
3.7.1.	Genotipagem da Haptoglobina	27
3.7.2.	Genotipagem do polimorfismo –G463A da Mieloperoxidase (dbSNP rs2333227)	28
3.8.	Análises Estatísticas	30
3.8.1.	Cálculo do Tamanho Amostral	30
3.8.2.	Diferenças entre sexo, faixa etária e genótipos da Haptoglobina e da Mieloperoxidase (dbSNP rs2333227) nos valores dos exames laboratoriais e do teste do cometa 31	
3.8.3.	Testes de correlação	32
3.8.4.	Odds Ratio	33
3.8.5.	Interações entre os polimorfismos	34
3.8.6.	Estatística de populações	35
4.	RESULTADOS.....	35
4.1.	Cálculo do Tamanho Amostral (N).....	35
4.2.	Perfil da amostra de pacientes.....	36
4.3.	Comparações entre os grupos sem e com sobrecarga de ferro secundária.....	44
4.4.	Frequência de distribuição dos polimorfismos da Haptoglobina (Hp) e Mieloperoxidase (MPO) –G463A (dbSNP rs2333227) em pacientes com anemia falciforme sem e com sobrecarga de ferro secundária.....	54
4.5.	Estatística de populações dos grupos com e sem sobrecarga de ferro secundária.....	56
4.6.	Comparações entre os gêneros, faixas etárias e genótipos da Haptoglobina (Hp) e da Mieloperoxidase (MPO) –G463A (dbSNP rs2333227) no grupo total de pacientes	59

4.7. Frequência de distribuição dos polimorfismos da Haptoglobina e Mieloperoxidase (MPO) –G463A (dbSNP rs2333227) no grupo total de pacientes.....	63
4.8. Estatística de populações do grupo total.....	65
4.9. Testes de correlações.....	67
4.10. Odds Ratio (Razão de Chances).....	73
4.11. Análises da interação entre os polimorfismos de Hp e MPO (–G463A, dbSNP rs2333227) nos valores dos exames realizados.	76
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
8. ANEXOS	98
8.1. Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Secretaria de Estado da Saúde (SES-DF).....	98
8.2. Questionário respondido pelos pacientes	99
8.3. Aceite do artigo para publicação na revista Blood Cells, Molecules and Diseases	101
9. APÊNDICE.....	102
9.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	102

1. INTRODUÇÃO

O íon ferro é um elemento fundamental para a homeostase celular, sendo essencial no transporte de oxigênio, na síntese de DNA e no metabolismo energético. É um componente de todos os organismos vivos e neles participa primordialmente de reações de transferência de elétrons, pois tem a capacidade de facilmente recebê-los e doá-los, pela interconversão entre ferro ferroso (Fe^{2+}) e ferro férrico (Fe^{3+}) (ZAGO *et al.*, 2004; CANÇADO, 2007; GROTTTO, 2008).

É um cofator importante para proteínas e enzimas essenciais no transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), na síntese de DNA (ribonucleotídeo redutase), na produção de energia oxidativa (citocromo, citocromo oxidase, succinato desidrogenase e xantina desidrogenase/oxidase) e na inativação de radicais livres (catalase e peroxidase). Nos mamíferos é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado (GROTTTO, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

1.1. Doença falciforme

O termo doença falciforme engloba um grupo de anemias hemolíticas hereditárias que têm em comum a presença intraeritrocitária da hemoglobina S (Hb S). Representa a enfermidade hereditária mais prevalente no mundo (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

A doença falciforme está dentre as doenças genéticas de maior importância epidemiológica no Brasil e no mundo. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, o gene pode ser encontrado em frequências de 2% a 6% nas regiões do país, aumentando para 6% a 10% na população afrodescendente brasileira. Neste grupo, destaca-se a anemia falciforme (AF), que apresenta importância clínica, hematológica, bioquímica, genética, antropológica e epidemiológica, entre outras, devido à sua morbidade e alto índice de mortalidade; por isso tem sido apontada como uma questão de saúde pública (DINIZ *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Descrita pela primeira vez em 1910 por Herrick, a doença caracteriza-se por mutação pontual (GAG → GTG) no cromossomo 11, com a substituição de uma adenina por timina no códon do gene da β-globina, conduzindo à permuta do ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica. A doença falciforme (DF) é caracterizada pela homozigose da hemoglobina S (SS). Com características físico-químicas modificadas, as moléculas da hemoglobina S podem polimerizar, ocasionando deformação dos glóbulos vermelhos ou falcização, denominação conseqüente à produção de células em forma de foice, clássicas da anemia falciforme (REES *et al.*, 2010). Desta forma, o diagnóstico da doença é baseado na análise da hemoglobina. Tipicamente, esta análise envolve cromatografia ou eletroforese de proteínas, que são técnicas baratas e amplamente disponíveis em todo o mundo. O rastreio pré-natal está disponível para mulheres em alguns países para ajudar a identificar os casais que estão em risco de ter um bebê com doença falciforme, oferecendo um diagnóstico pré-natal (REES *et al.*, 2010).

Os pacientes com doença falciforme possuem um quadro clínico heterogêneo (Nuzzo *et al.*, 2004; DINIZ *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2009). Entre as manifestações clínicas mais típicas podem ser mencionadas a anemia hemolítica crônica e, decorrentes da oclusão da microvasculatura com isquemia tissular, as crises dolorosas osteoarticulares ou abdominais agudas, assim como lesões crônicas com asplenia funcional, vasculopatia cerebral, insuficiência renal, pulmonar e cardíaca (Figura 5) (DINIZ *et al.*, 2009).

A heterogeneidade clínica da doença está relacionada a fatores genéticos e adquiridos. Entre os fatores adquiridos destaca-se o nível socioeconômico, com as conseqüentes variações na qualidade de alimentação, prevenção de infecções e assistência médica. Em relação às características geneticamente determinadas, têm importância na gravidade clínica: as variações nos níveis de hemoglobina fetal (Hb F), a coexistência de alfa-talassemia e o tipo de haplótipo associado do gene da Hb S (SILVA *et al.*, 2009; MOURA NETO *et al.*, 2010). Entre os indicadores da gravidade clínica, a percentagem de hemoglobina fetal (%Hb F) é o parâmetro laboratorial mais crítico. Hb F é um protetor contra gravidade clínica; baixa percentagem de Hb F está associada a um maior risco de desenvolver complicações vaso-oclusivas, lesões de órgãos e morte precoce. Assim, a indução farmacológica de aumento nos níveis de Hb F é um dos objetivos principais no tratamento. A leucocitose também tem sido

associada com desfechos clínicos. Mais recentemente, a elevação da desidrogenase láctica (LDH), refletindo hemólise intravascular, tem sido associada com morbidade e mortalidade em AF (REES *et al.*, 2010).

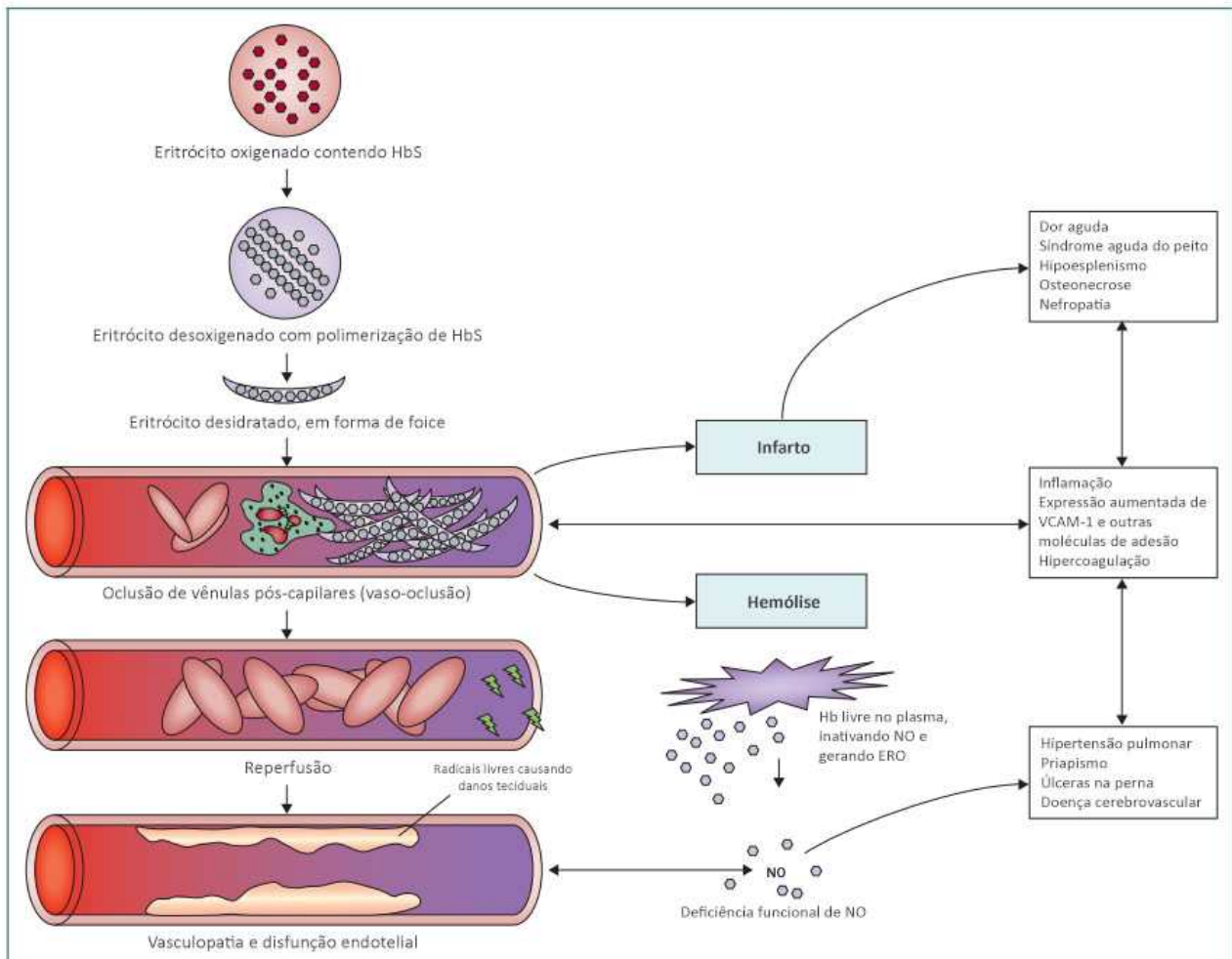


Figura 1: Fisiopatogenia da doença falciforme.

Os papéis da polimerização da hemoglobina S, hiperviscosidade, vaso-oclusão, hemólise, e disfunção do endotélio vascular são mostrados. A desoxigenação causa polimerização da hemoglobina S, levando à formação de hemácias falciformes. A vaso-oclusão resulta da interação entre as hemácias falciformes e leucócitos com o endotélio vascular. A vaso-oclusão pode levar a infarto, hemólise e inflamação. A inflamação aumenta a expressão das moléculas de adesão aumentando a tendência das hemácias falciformes aderirem ao endotélio vascular e provocar a vaso-oclusão. A reperfusão dos tecidos

isquêmicos gera radicais livres e danos oxidativos. A hemácia lesada libera hemoglobina livre no plasma, que se liga ao óxido nítrico, causando deficiência funcional do óxido nítrico e contribui para o desenvolvimento de vasculopatia (adaptado de REES *et al.*, 2010).

Os tratamentos mais comuns são a suplementação com o ácido fólico, a utilização da hidroxiuréia (HU) e transfusões de sangue. HU é frequentemente administrada para promover o aumento da síntese de Hb F (BELINI JUNIOR *et al.*, 2012).

A transfusão tem um papel estabelecido na gestão de complicações agudas e crônicas da AF. Corrige-se a anemia, mantendo a concentração de Hb S abaixo de 30%, aumentando a oxigenação e diminuindo complicações vasculares e reduzindo a hemólise. Além disso, as transfusões previnem acidentes vasculares cerebrais primários e secundários e diminuem a frequência de internações, eventos vaso-oclusivos, síndrome torácica aguda e retardo de crescimento. Os eritrócitos podem ser fornecidos como uma transfusão simples ou por troca, onde o sangue é também removido (exsanguíneo-transfusão). O tratamento com exsanguíneo-transfusão é necessário quando há uma necessidade de rápida diminuição da percentagem de Hb S, sem aumentar o hematócrito e a viscosidade do sangue. Este tipo de procedimento é mais rápido e eficiente quando realizado através de máquinas de aférese automatizadas, embora o uso seja limitado por dificuldades de acesso venoso, especialmente em crianças (REES *et al.*, 2010; BELINI JUNIOR *et al.*, 2012).

Pacientes com sobrecarga de ferro necessitam dos agentes quelantes para a sua sobrevivência (BELINI JUNIOR *et al.*, 2012). Entre os quelantes de ferro disponíveis, dois agentes são aprovados para uso na América: o mesilato de deferoxamina (Desferal), administrado por via parenteral, e o deferasirox (Exjade), administrado por via oral (BRITTENHAM, 2011). A deferoxamina é fracamente absorvida após administração oral e é rapidamente eliminada; por conseguinte, a administração subcutânea ou intravenosa é necessária (BRITTENHAM, 2011). O deferasirox é um quelante de ferro via oral administrado uma vez ao dia, que foi avaliado extensivamente em pacientes com anemia dependente de transfusão, incluindo doença falciforme, tanto em pacientes adultos quanto em pacientes pediátricos (BELINI JUNIOR *et al.*, 2012).

O transplante de células hematopoiéticas foi usado pela primeira vez na doença falciforme há 25 anos e é o único tratamento curativo. No entanto, apenas algumas centenas de pacientes receberam transplantes em todo o mundo, e este procedimento é exclusivo para

HLA-compatíveis, nos quais o procedimento é mais seguro. A maioria das crianças com doença falciforme tem poucas complicações evidentes, e o transplante de células hematopoiéticas para estas é considerado apenas quando as complicações graves ocorreram, na maioria das vezes em crianças com doença cerebrovascular, que são efetivamente dependentes de transfusões (REES *et al.*, 2010).

1.2. Metabolismo do Ferro

1.2.1. Absorção de ferro

A dieta ocidental normal tem de 15 a 20 mg de ferro nas formas heme (10%) e não-heme (iônico, 90%). Contudo, o conteúdo de ferro absorvido a partir de uma dieta alimentar padrão é de aproximadamente 1 a 3 mg por dia, o suficiente para compensar perdas habituais por descamação celular e pequenas perdas sanguíneas. A quantidade absoluta de ferro no organismo é mantida praticamente em níveis constantes, ao redor de 3 a 4 g (KLEBER, 2011; MUÑOZ *et al.*, 2011; FLEMING *et al.*, 2012).

O ferro utilizado pelo organismo é obtido de duas fontes principais: da dieta e da reciclagem de hemácias senescentes. Por não existir fisiologicamente um mecanismo de excreção do ferro, a absorção diária é altamente regulada para fornecer apenas o necessário e para evitar a toxicidade, uma vez que o excesso de ferro livre pode levar à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), enquanto a diminuição dos níveis de ferro pode levar à anemia. O ferro proveniente da dieta é absorvido primeiramente pelo epitélio duodenal, que apresenta estruturas vilosas para ampliar a superfície de absorção. Alguns fatores favorecem a absorção intestinal, como a acidez e a presença de agentes solubilizantes (GROTTO, 2008; LEMOS *et al.*, 2011; FLEMING *et al.*, 2012).

O ferro não-heme proveniente da dieta existe primeiramente na forma oxidada (Fe^{3+}), forma que não é biodisponível e precisa ser reduzida a Fe^{2+} pela enzima citocromo b redutase duodenal (Dcytb), que usa a vitamina C como coenzima, antes de ser transportado através do epitélio intestinal. Após essa modificação, o ferro é transportado para dentro da célula através

da proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT1) (Figura 1) (CRICHTON *et al.*, 2002; GROTTTO, 2008; MUÑHOZ *et al.*, 2011; FLEMING *et al.*, 2012).

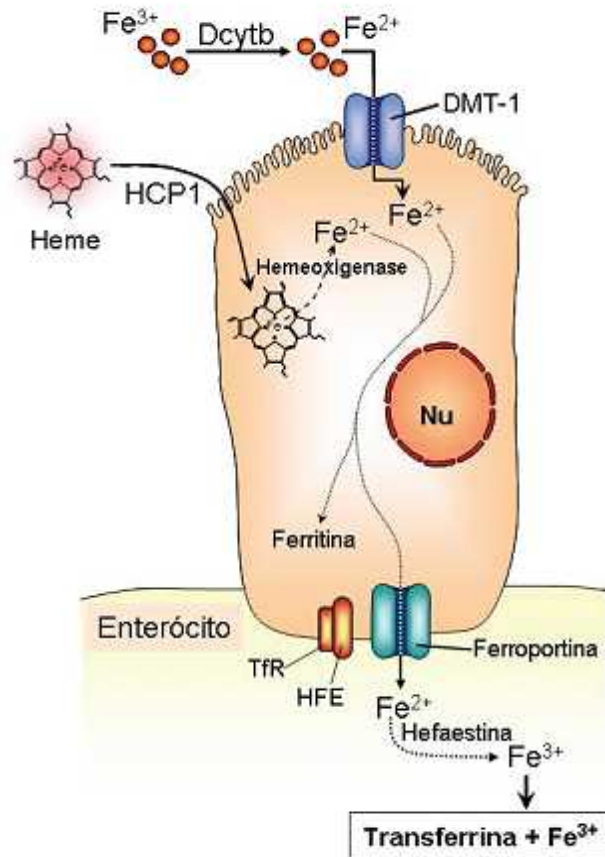


Figura 2: O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro.

Dcytb: ferredoxina; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor de transferrina (Grotto 2008).

A DMT-1, também conhecida como proteína 2 de macrófago associada à resistência natural (NRAMP2, do inglês *natural resistance associated macrophage protein*), é composta por 12 segmentos transmembrana e, além do ferro, transporta outros metais como o zinco, cobre e cobalto. A absorção do ferro não-heme (Figura 1) pode ser reduzida pela administração de tetraciclina, inibidores da bomba de prótons e medicações anti-ácidas, dietas ricas em fibras, cálcio e compostos fenólicos (café, chá). (GROTTO, 2008; MUÑHOZ *et al.*, 2011).

O ferro heme é absorvido nos enterócitos por uma proteína carreadora de heme 1 (HCP1), ainda não completamente identificada. Uma vez interiorizado no enterócito (Figura 1), a maior parte heme dietética é metabolizada pela heme-oxigenase para liberar Fe^{2+} , que entra numa via comum com ferro não-heme alimentar antes de sair do enterócito (MUÑOZ *et al.*, 2011; FLEMING *et al.*, 2012).

Uma vez dentro da célula, a maior parte do Fe^{2+} é exportada por uma ferroportina, também conhecida como IREG1 (do inglês, *iron-regulated transporter 1*), através da membrana basolateral do enterócito e oxidado a Fe^{3+} pela hefaestina, oxidase semelhante à ceruloplasmina sérica, antes de ser ligado à transferrina no plasma. A ferroportina também é expressa em hepatócitos, macrófagos do sistema reticuloendotelial e sinciciotrofoblastos placentários (onde regula a entrada de ferro em circulação fetal) e, além de exportadora do ferro celular, é também o receptor da hepcidina (HPN), importante regulador da aquisição do ferro (GROTTO, 2008/2010; MUÑOZ *et al.*, 2011; FLEMING *et al.*, 2012).

Como a maior parte do ferro no organismo está associada à molécula de hemoglobina (Hb), a fagocitose e a degradação de hemácias senescentes representam uma fonte importante de ferro (de 25 a 30 mg/dia). Essa quantidade de ferro reciclado é suficiente para manter a necessidade diária de ferro para a eritropoiese. Macrófagos do baço e da medula óssea e, em menor extensão, células de Kupffer no fígado, reconhecem modificações bioquímicas na membrana da hemácia senescente. Essas alterações sinalizam para que o macrófago elimine essas células. Após a interação de receptores específicos nos macrófagos com as hemácias, inicia-se o processo de fagocitose, seguido da degradação dos componentes da hemácia. A parte proteica da molécula de Hb, a cadeia globínica, terá seus aminoácidos também reciclados e aproveitados na síntese de novas proteínas. Na célula, o ferro pode ser armazenado em duas formas: no citosol, como ferritina, e após desagregação da ferritina, nos lisossomos, como hemossiderina. A hemossiderina representa uma fração muito pequena dos estoques de ferro normais do corpo, principalmente nos macrófagos, mas aumenta drasticamente durante a sobrecarga de ferro. O armazenamento de ferro nos macrófagos é seguro, uma vez que não conduz a danos oxidativos (GROTTO, 2008, MUÑOZ *et al.*, 2011).

A proteína da hemocromatose (HFE) está relacionada com a regulação da absorção intestinal do ferro. Interage com o receptor da transferrina (TfR) e detecta o seu grau de

saturação, sinalizando para o enterócito se há maior ou menor necessidade de absorção do ferro na luz intestinal. Indivíduos com mutação no gene da HFE apresentam hemocromatose, caracterizada pelo acúmulo de ferro no organismo decorrente da sua contínua absorção pelo intestino (GROTTO, 2008).

A regulação de cada etapa (redução, absorção, transporte e estoque) é mediada por sinais que refletem a tensão de oxigênio nos enterócitos, os níveis de ferro intracelulares, e as necessidades de ferro sistêmicas (FLEMING *et al.*, 2012).

1.2.2. Transporte, captação e estoque de ferro

O ferro é transportado no plasma pela transferrina (Tf), uma glicoproteína de 80 KDa sintetizada e secretada pelo fígado, além da retina, testículos e cérebro. Possui dois sítios homólogos que se ligam fortemente, mas de forma reversível, que em pH neutro podem transportar dois átomos de Fe^{3+} . Além de solubilizar o ferro, a transferrina atenua sua reatividade e facilita a sua liberação para as células. Em condições normais, a transferrina plasmática tem a capacidade de transportar até 12 mg de ferro, mas essa capacidade raramente é utilizada e, em geral, 3 mg de ferro circulam ligados a ela, ou seja, 30% da transferrina está saturada com o ferro. Quando a capacidade de ligação da transferrina está totalmente saturada, o ferro pode circular livremente pelo soro, na forma não ligada à transferrina (NTBI), que acumula nos tecidos parenquimais, contribuindo para o dano celular nos casos de sobrecarga de ferro (CRICHTON *et al.*, 2002, GROTTO, 2010).

Quando ligado à transferrina, a interiorização do ferro é iniciada pela ligação desse complexo a um receptor específico (TfR) presente na superfície da maioria das células. A interação transferrina-receptor é facilitada pelo pH extra-celular de 7,4 e, a partir dessa ligação, inicia-se o mecanismo de captação de ferro pela célula (Figura 2). O complexo Tf-TfR-HFE é internalizado por endocitose. Dentro do endossoma, a bomba de prótons dependente de ATP encarrega-se de reduzir o pH, facilitando a liberação do ferro da transferrina, que permanece ligado ao seu receptor, e o complexo apoTf-TfR-HFE é reciclado de volta à superfície celular, quando então a apo-transferrina é liberada do TfR. O ferro do

endossoma atravessa a membrana da vesícula e alcança o citoplasma. A proteína DMT-1 é essencial para o efluxo do ferro do endossoma para o citoplasma. O ferro liberado pela transferrina no endossoma está na forma férrica (Fe^{3+}) e a DMT-1 tem grande afinidade pelo Fe^{2+} . Uma metalo-redutase recentemente identificada e denominada STEAP 3 (do inglês, *six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3*) é responsável pela redução do ferro liberado pela Tf, que será então transferido para o citossol pela DMT-1 (GROTTO, 2010).

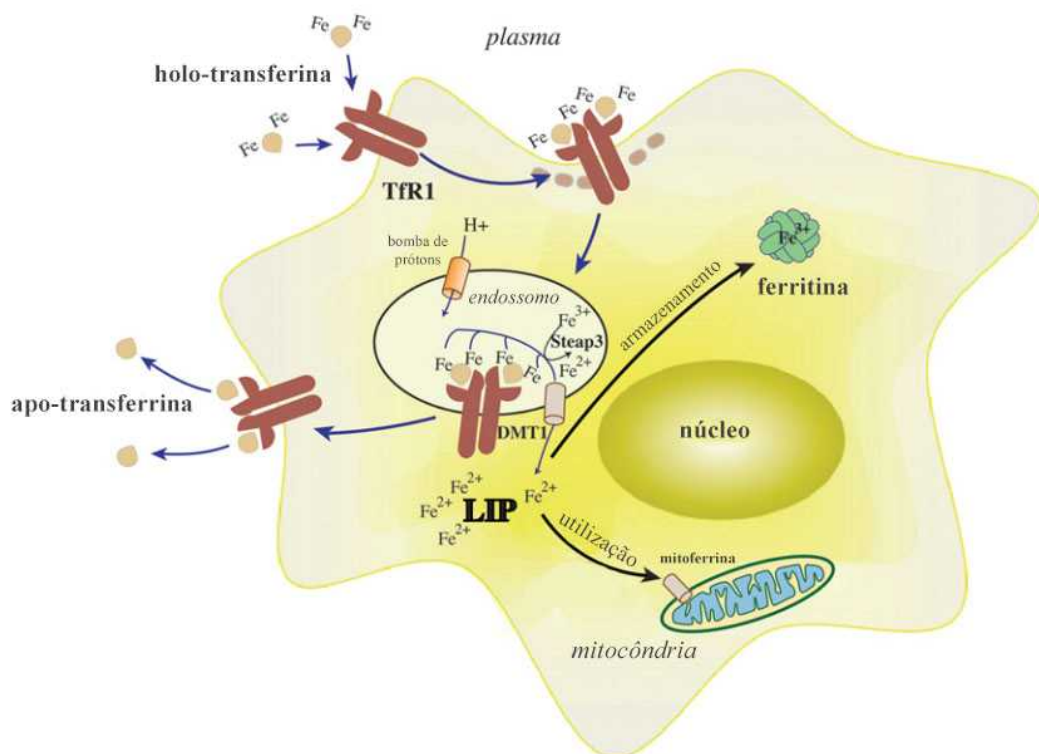


Figura 3: Captação de ferro celular através da transferrina.

O ferro ligado a transferrina se liga ao receptor de transferrina 1 na superfície celular e o complexo sofre endocitose através de poços revestidos com clatrina. Uma bomba de prótons acidifica o endossoma, resultando na liberação de Fe^{3+} , que é reduzido a Fe^{2+} pela Steap 3 e transportado através da membrana endossomal para o citoplasma pela DMT1. O ferro internalizado é direcionado para as mitocôndrias para utilização metabólica e o excesso de ferro é armazenado na ferritina. A fração citosólica de ferro intracelular redox-ativa constitui o LIP. O complexo Tf-apo-TfR1 é reciclado para a superfície da célula, onde a apo-Tf é liberada para capturar Fe^{3+} no plasma (Adaptado de Wang and Pantopoulos 2011).

O ferro fica estocado nas células reticulo-endoteliais do fígado, baço e medula óssea, nas formas de ferritina e hemossiderina. A apoferritina, tem uma quantidade de ferro necessária para a produção diária de 300 mil milhões de células vermelhas do sangue (20 a 30 mg) que é proporcionada principalmente pela reciclagem de ferro feita pelos macrófagos. O fígado é um dos principais órgãos para armazenamento de ferro. A absorção de ferro ligado à transferrina pelo fígado a partir do plasma é mediada por TfR1 e TfR2, embora também possa adquirir ferro de ferro não ligado à transferrina (processo mediado pela DMT1), ferritina, complexos hemoglobina-haptoglobina e complexos heme-hemopexina. Em contraste, a ferroportina é a única proteína envolvida na mediação da exportação de ferro a partir dos hepatócitos, o qual é então oxidado pela ceruloplasmina e ligado à transferrina. O armazenamento de ferro em cardiomiócitos também é de grande interesse, por ser a insuficiência cardíaca a principal causa de morte entre os pacientes que tratam hemocromatose hereditária ou sobrecarga de ferro associada a transfusão em falcêmicos (GROTTO, 2008; MUÑHOZ *et al.*, 2011).

1.2.3. Regulação de ferro

A absorção de ferro pelos enterócitos do duodeno é dependente das reservas de ferro do corpo, hipóxia, inflamação e taxa de eritropoiese. Dois modelos de regulação têm sido propostos, os quais podem contribuir para a regulação da absorção de ferro: um mecanismo intracelular, dependendo da quantidade de ferro disponível para a célula, e um mecanismo sistêmico através da hepcidina (MUÑHOZ *et al.*, 2011; LEMOS *et al.*, 2011).

A regulação de ferro intracelular é conseguida predominantemente ao nível da síntese de proteína (tradução de RNAm em proteína), ao invés de ser a nível transcripcional (síntese de RNAm), como ocorre com seres procariontes (CRICHTON *et al.*, 2002; GARRICK 2011). A concentração de ferro intracelular controla a interação entre as proteínas reguladoras de ferro (IRPs) e os elementos responsivos ao ferro (IREs). O sistema IRE/IRP regula de forma eficaz a absorção de ferro, prevê o armazenamento do excesso de ferro na ferritina, e coordena a síntese do grupo heme, ferro-enxofre e ferroproteína com a disponibilidade de ferro. O sistema, com efeito, atua diminuindo gastos de energia desperdiçada na síntese de

substratos e para evitar a acumulação de formas tóxicas de ferro (MUÑHOZ *et al.*, 2011; GANZ *et al.*, 2012).

Os IREs estão localizados nas regiões não-codificantes ou regiões não traduzidas (UTRs) do RNAm nas extremidades 5' e 3' da parte que codifica a sequência do RNAm, sendo normalmente associados à iniciação da tradução, ou seja, ligação aos ribossomos. Duas proteínas citossólicas estão estreitamente vinculadas aos IREs, designadas IRP-1 e IRP-2. Essas IRPs agem como sensores de ferro. Quando o ferro é escasso, a apo-IRP se liga aos IREs com elevada afinidade. Isso impede a tradução da ferritina e promove a proteção do RNAm do receptor da transferrina, permitindo assim que a demanda de ferro seja maior para as células. Quando a oferta de ferro para as células é aumentada, a proteína IRP-1 é inativada enquanto a IRP-2 é rapidamente degradada. O resultado é que a ferritina e a aminolaevulinato sintetase eritróide são traduzidas, enquanto do RNAm do receptor de transferrina é degradado (CRICHTON *et al.*, 2002; GARRICK, 2011).

Já a regulação de ferro extracelular é realizada pela hepcidina (Figura 3), peptídeo rico em cisteína constituído por 25 aminoácidos com propriedades antimicrobianas, sintetizado no fígado e detectável no sangue e na urina. Como regulador mestre da homeostase do ferro sistêmico, coordena o uso e o armazenamento deste mineral no organismo. Ela atua sobre a inibição da absorção intestinal de ferro e liberação de ferro por macrófagos e enterócitos, e é um mediador do ciclo de absorção de ferro entre o fígado e intestino. A produção de hepcidina é regulada por anemia, hipoxia, inflamação e estresse oxidativo (GISBERT *et al.*, 2009; LEMOS *et al.*, 2011).

O modelo propõe que a hepcidina é secretada para o sangue e interage nas vilosidades dos enterócitos para regular a taxa de absorção de ferro, através do controle da expressão de ferroportina 1 nas suas membranas basolaterais. Quando há aumento de concentrações de hepcidina, ela se liga a moléculas de ferroportina induzindo sua internalização e degradação, e a liberação de ferro é diminuída progressivamente. Quando as concentrações de hepcidina são baixas, as moléculas de ferroportina são exibidas na membrana plasmática e o ferro é exportado. Consequentemente, mais ferro é disponibilizado a partir da dieta e do pool de armazenamento em macrófagos e hepatócitos (GISBERT *et al.*, 2009; LEMOS *et al.*, 2011).

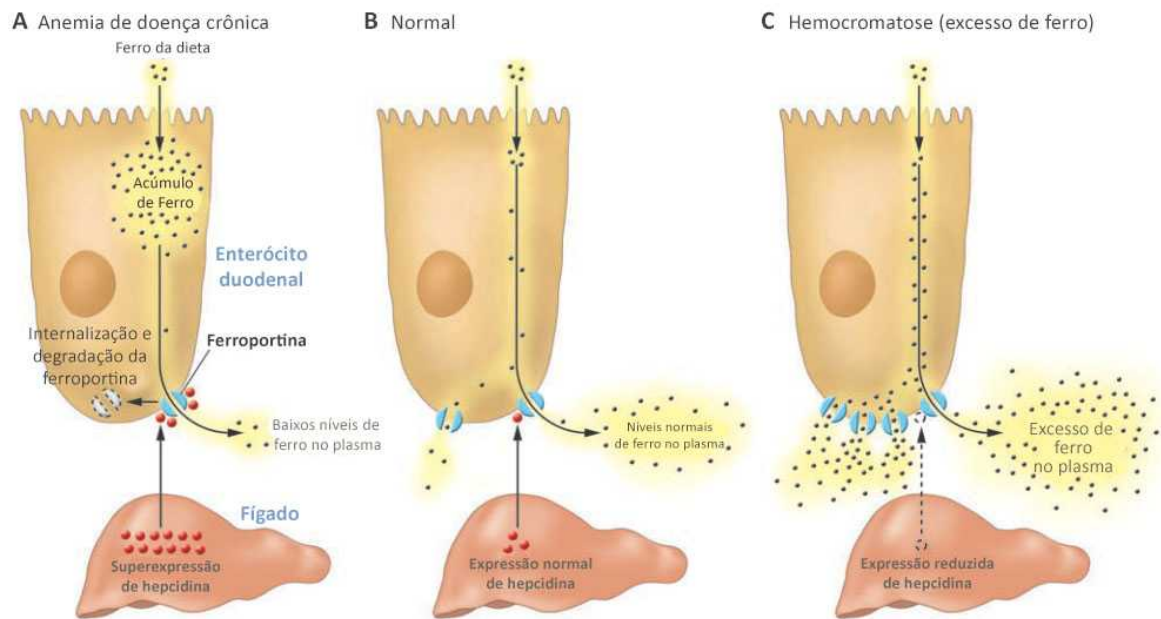


Figura 4: Regulação da homeostase do ferro mediada pela hepcidina.

(A) Aumento da expressão da hepcidina no fígado devido estímulos inflamatórios. Altos níveis de hepcidina na corrente sanguínea resultam na internalização e degradação da ferroportina. A perda da ferroportina na superfície da célula resulta em macrófagos carregados de ferro, baixos níveis de ferro no plasma e diminuição da eritropoiese, devido à diminuição de ferro ligado à transferrina. A diminuição da eritropoiese dá origem à anemia de doença crônica. (B) Níveis de hepcidina normais, em resposta à demanda de ferro, nível regular de importação de ferro no plasma, saturação de transferrina normal, e níveis normais de eritropoiese. (C) A hemocromatose, ou sobrecarga de ferro, níveis de hepcidina insuficientes causando um aumento da importação de ferro no plasma, alta saturação de transferrina, e o excesso de deposição de ferro no fígado (adaptado de Domenico *et al.*, 2007).

Assim, quando os níveis de hepcidina estão aumentados, a liberação de ferro a partir de células intestinais, fígado e macrófagos é reduzida. Em contraste, quando os níveis de hepcidina estão reduzidos, como na deficiência de ferro, anemia ou hipóxia, é provável que a expressão de ferroportina e liberação de ferro a partir de células do intestino, fígado e células do sistema retículo-endotelial esteja aumentada (GISBERT *et al.*, 2009).

1.2.4. Sobrecarga de ferro

Apesar de ser vital para a homeostase celular, o ferro pode ser altamente danoso ao organismo quando se encontra livre (CANÇADO, 2007). Sua capacidade de aceitar ou doar

elétrons (ciclo redox) permite catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) através das reações de Fenton e Haber-Weiss (HERMES-LIMA, 2004; KRUSZEWSKI, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006). A reação do Fe^{2+} com o H_2O_2 (Reação de Fenton) gera o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), espécie de ERO mais deletéria ao organismo (Figura 4). Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são Cu^{1+} e Fe^{2+} , mas nesse sistema, a importância do ferro é mais pronunciada devido à sua maior biodisponibilidade (HERMES-LIMA, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006).

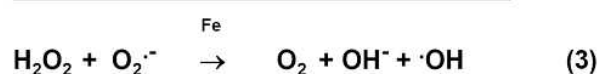
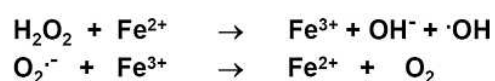
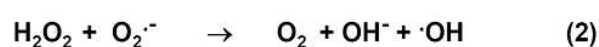
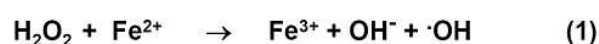


Figura 5: Espécies reativas de oxigênio e o ciclo redox do ferro.

A reação de Fenton é representada pela equação (1), a reação de Haber-Weiss pela equação (2) e o ferro catalisado na reação de Haber-Weiss pela equação (3). A reação de Fenton descreve a decomposição do peróxido de hidrogênio à espécie altamente reativa radical hidroxila, na presença de ferro ferroso (adaptado de Castiñeiras 2010).

Em circunstâncias normais, essa reação é minimizada pelo sequestro de ferro dentro de complexos com proteínas, como a haptoglobina, a transferrina e a ferritina, entre outras. Na sobrecarga de ferro, o ferro em excesso está livre para promover a produção de ERO (Breuer *et al.*, 2000). Nestas situações, a liberação do íon ferroso (Fe^{2+}) das moléculas de ferritina no citoplasma celular leva à conversão citosólica deste íon em íon férrico (Fe^{3+}). O ferro livre atua como catalisador de reações oxidativas e consequente síntese de radicais hidroxila, que destroem a membrana celular, proteínas e o DNA (ZAGO *et al.*, 2004; CANÇADO, 2007).

Em situações de exposição crônica, o acúmulo de ferro tem sido correlacionado ao aumento do risco de câncer, bem como problemas cardiovasculares, neurodegenerativos e outras doenças. Hemocromatose é um termo utilizado para se referir à sobrecarga de ferro que é associada à disfunção pancreática, hepática e cardiovascular. Artrites, hiperpigmentação cutânea, diabetes mellitus, fadiga e dores abdominais são sinais clínicos comumente encontrados na hemocromatose. A hemocromatose primária é um problema hereditário que resulta da mutação de um ou mais genes envolvidos na absorção e transporte de ferro. Como consequência, indivíduos com hemocromatose primária podem absorver 30% do ferro da dieta (em relação aos 10% absorvido por indivíduos normais) (PRÁ *et al.*, 2012).

A hemocromatose secundária é quase sempre causada por distúrbio hereditário ou adquirido da eritropoiese e/ou tratamentos de doenças com transfusão sanguínea, mas também pode surgir por ingestão excessiva de ferro ou alcoolismo. O excesso de absorção de ferro a partir da dieta em resposta a eritropoiese ineficaz ou por pacientes que se submetem a terapia de transfusão regular para tratar a anemia crônica causa acúmulo de ferro no fígado, órgãos endócrinos, coração e outros tecidos com consequências graves e aumento da morbimortalidade. A cardiomiopatia causada pela sobrecarga de ferro é particularmente preocupante e continua sendo a principal causa de morte em pacientes com talassemia maior (PRÁ *et al.*, 2012; TAHER *et al.*, 2009; WOOD 2007).

Em pacientes com talassemia intermédia e hemocromatose hereditária, a progressão da sobrecarga de ferro é modesta e facilmente administrada por flebotomia ou terapia de quelação de curto prazo. Em contraste, a terapia de transfusão regular proporciona entre 0,4 e 0,5 mg/kg/dia de ferro, já que cada unidade de sangue contém cerca de 200 mg de ferro. A terapia de transfusão regular é necessária em pacientes com síndromes de anemia grave, incluindo talassemia major e síndromes mielodisplásicas. Este procedimento também está sendo amplamente utilizado em pacientes com doença falciforme para evitar complicações neurológicas. Pacientes cronicamente transfundidos ficam sobrecarregados de ferro dentro de um ano de tratamento e necessitam de terapia quelante para evitar consequências deletérias da sobrecarga de ferro (TAHER *et al.*, 2009; WOOD 2007).

O diagnóstico costuma ser feito por exames de sangue rotineiros que medem os níveis de ferritina e a saturação de transferrina (**Tabela 1**). Testes genéticos podem confirmar mutações nos genes que tipicamente causam hemocromatose hereditária, como por exemplo a

homozigose para a mutação C282Y no gene da HFE, tipicamente associada à hemocromatose hereditária tipo 1, ou mutações no gene da ferroportina 1, associadas à síndrome clínica completa de hemocromatose (POWELL, 2004).

Tabela 1: Testes diagnósticos para sobrecarga de ferro.

Testes	Vantagens	Desvantagens
Ferritina sérica	Baixo custo; identificação clinicamente significativa da sobrecarga de ferro.	Baixa especificidade; aumenta com a inflamação ou doença hepática; subestima a quantidade de ferro na talassemia intermediária, não distingue a sobrecarga de ferro no sistema reticuloendotelial ou nos tecidos.
Saturação da transferrina	Baixo custo; teste de rastreamento mais sensível para a Hemocromatose hereditária que a ferritina; identifica a maioria das condições associada a toxicidade de ferro mediada pelo NTBI.	Baixa sensibilidade como teste de triagem de Hemocromatose hereditária em mulheres na pré-menopausa; ferro sérico mostra a variação diurna e os efeitos da recente ingestão de ferro dietético, aumentando a variabilidade.
Biópsia Hepática	A medição direta da concentração de ferro no fígado; padrão de referência validado; sensível e específica; fornece avaliação histopatológica do fígado; achados correlacionados com a gravidade da doença e o risco de morte.	Caro; invasivo; risco de erro de amostragem; padronização inadequada em laboratórios; impraticável para medições longitudinais.
Ressonância Magnética	O ferro do fígado e do coração pode ser medido em paralelo; mensuração do ferro hepático e dos tecidos; útil nas medições longitudinais.	Avaliação indireta do teor de ferro nos tecidos; requer técnica de imagem especializada.

Tabela adaptada de Fleming e Ponka 2012. NTBI (do inglês, *Non Transferrin Bound Iron*) = ferro não ligado à transferrina.

1.3. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando há uma falta de equilíbrio dinâmico (ou desequilíbrio) entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes, levando a danos celulares. Pode ocorrer pela elevada produção de radicais livres, pela diminuição das defesas antioxidantes ou por ambos os processos simultaneamente (HERMES-LIMA, 2004). O equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes encontra-se na fronteira entre a saúde e muitas doenças humanas e condições patológicas, incluindo doenças neuronais, inflamação, aterosclerose, lesões de reperfusão, a sobrecarga de ferro, carcinogênese e diabetes (HERMES-LIMA, 2004).

A dependência de transfusão na anemia crônica provoca acúmulo excessivo de ferro. Este está associado a diversas doenças e o aumento de ERO contribuindo assim para um estado hiperoxidativo de células. O ferro livre atua como um catalisador para a oxidação com a consequente produção de radicais superóxido e hidroxila através de reações de Fenton e Haber-Weiss (BARBOSA *et al.*, 2013; SAIGO *et al.*, 2013).

1.4. Haptoglobina e Mieloperoxidase contra o estresse oxidativo e infecções

A haptoglobina (Hp) é uma glicoproteína de fase aguda da fração α_2 -globulina do plasma de mamíferos, que pode capturar Hb por formar um complexo de alta afinidade Hp-Hb (TSENG *et al.*, 2004). Após ser liberada dos eritrócitos que se fragmentam no espaço intravascular, a Hb é capturada pela Hp. O complexo Hp-Hb formado é, então, fagocitado através de um processo mediado pelo receptor CD163 de macrófagos e monócitos e metabolizado quase imediatamente, liberando ferro na corrente sanguínea para ser conduzido pela transferrina tanto para a medula óssea (produção de novas células vermelhas) quanto para o fígado (metabolização e armazenamento na forma de ferritina) (SADRZADEH E BOZORGMEHR, 2004; TSENG *et al.*, 2004; GUYTON E HALL, 2006). Sendo assim, a ligação Hp-Hb é essencial para a rápida remoção da Hb livre do plasma, tendo um papel crucial contra o estresse oxidativo induzido por Hb, uma vez que a alta afinidade do complexo

Hp-Hb previne a liberação de ferro e a consequente geração de ERO. A Hp funciona, desta forma, como um antioxidante preventivo (MELAMED-FRANK *et al.*, 2001; LEVI, 2004; SADRZADEH E BOZORGMEHR, 2004; TSENG *et al.*, 2004). Além disto, tem sido sugerido que a Hp pode ter um potencial terapêutico contra infecções bacterianas favorecidas pela Hb, visto que nessas situações, o complexo Hp-Hb formado previne também a utilização do ferro como fonte nutricional por bactérias (EATON *et al.*, 1982).

Outra enzima relacionada ao estresse oxidativo e à proteção contra infecções microbianas é a Mieloperoxidase (MPO – EC 1.11.1.7), uma heme-proteína lisossômica presente nos grânulos primários (azurofílicos) citoplasmáticos e nucleares de monócitos e neutrófilos, que participa da atividade microbicida oxigênio-dependente (NAUSEEF *et al.*, 1983; MURAO *et al.*, 1988; REYNOLDS *et al.*, 2000, COSTA *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2006). Esta proteína, na presença de haletos tais como Cl^- , converte peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a ácido hipocloroso (HOCl), um oxidante poderoso que pode causar danos no DNA, oxidar lipoproteínas e também contribuir para a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (REYNOLDS *et al.*, 2000; KLEBANOFF, 2005; ZHU *et al.*, 2006). Neste sentido, tem sido proposto que a MPO intranuclear pode ajudar a proteger o DNA das células mielóides contra danos oxidativos resultantes de ERO produzidas durante sua maturação e função (MURAO *et al.*, 1988).

Apesar de diversos sistemas antimicrobianos já terem sido descritos para neutrófilos humanos normais, o sistema MPO é considerado o mais eficiente (PARRY *et al.*, 1981; KLEBANOFF, 2005). Leucócitos deficientes em MPO ainda têm capacidade bactericida, porém mais lentamente do que os leucócitos normais. Entretanto, a MPO parece ser essencial na resposta imunológica contra infecções causadas por fungos (LEHRER e CLINE, 1969; PARRY *et al.*, 1981; ARATANI *et al.*, 2006).

1.5. Polimorfismos da Haptoglobina, estresse oxidativo e infecções

A Hp humana, cujo gene está localizado no cromossomo 16q22.1, contém dois tipos de cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto: α (leve: α_1 de 8,9 kDa e α_2 de 16 kDa) e β (pesada, de 40 kDa). As cadeias β são idênticas, enquanto as cadeias α podem apresentar

diferentes variações e são responsáveis por seus três fenótipos principais, Hp1-1, Hp1-2 e Hp2-2. Esses fenótipos são controlados por dois alelos autossômicos co-dominantes, Hp^{*1} e Hp^{*2} , sendo que o alelo Hp^{*1} apresenta ainda dois subtipos, Hp^{*1S} e Hp^{*1F} , os quais diferem em suas cadeias α (SMITHIES e WALKER, 1956; SMITHIES *et al.*, 1962; LANGLOIS e DELANGHE, 1996; SADRZADEH e BOZORGMEHR, 2004; CARTER e WORWOOD, 2007).

Os fenótipos Hp diferem entre si no número de componentes proteicos, na mobilidade eletroforética, na concentração plasmática de Hp e nas atividades antioxidante e anti-inflamatória, apresentando consequências clínicas diferentes (LANGLOIS e DELANGHE, 1996; YANO *et al.*, 1998; WASSEL, 2000; KOCH *et al.*, 2003; SADRZADEH e BOZORGMEHR, 2004; TSENG *et al.*, 2004; CARTER e WORWOOD, 2007). Além disto, uma vez que a Hp pode ter um potencial terapêutico contra infecções bacterianas favorecidas pela Hb (EATON *et al.*, 1982), o polimorfismo deste gene também pode influenciar na proteção contra infecções bacterianas favorecidas pela Hb.

Muitos estudos clínicos têm demonstrado uma associação entre o polimorfismo de Hp com uma ampla variedade de condições patológicas, e tais associações provavelmente refletem as diferenças funcionais entre os fenótipos (LANGLOIS e DELANGHE, 1996; WASSEL, 2000; SADRZADEH e BOZORGMEHR, 2004; LEVY, 2006; ZVI e LEVY, 2006). Em contraste, outros estudos não relatam tais associações (CARTER e WORWOOD, 2007). Esses resultados aparentemente divergentes refletem, no entanto, apenas variações étnicas e geográficas deste polimorfismo, uma vez que tanto os fenótipos Hp quanto os subtipos alélicos Hp^{*1F} e Hp^{*1S} variam em suas frequências entre as diferentes populações do mundo inteiro, de acordo com a sua origem étnica (CARTER e WORWOOD, 2007).

1.6. Polimorfismos da Mieloperoxidase, estresse oxidativo e predisposição à infecção em doenças de sobrecarga de ferro secundária

O gene da MPO está localizado no cromossomo 17q23.1 e dez polimorfismos diferentes já foram identificados para esse loco (OMIM*606989). Dentre esses

polimorfismos, merece destaque o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, *do inglês Single-Nucleotide Polymorphism*) –G463A (dbSNP rs2333227) na região promotora do gene da MPO, localizado dentro de um elemento Alu responsivo a estímulo hormonal que precede o gene da mieloperoxidase. Tal região contém sítios de ligação para o fator de transcrição SP1 e para os receptores do ácido retinoico e do hormônio da tireoide (PIEDRAFITA *et al.*, 1996). O alelo normal (G) apresenta o sítio de ligação com SP1, enquanto o alelo variante (A) conduz à perda deste sítio e cria um sítio de ligação com o receptor alfa de estrógeno, o que provoca redução da expressão de MPO e pode contribuir com diferenças entre os sexos (REYNOLDS *et al.*, 2000; REYNOLDS *et al.*, 2002). Desta forma, o alelo G está associado com uma atividade e expressão mais fortes, enquanto o alelo A reduz significativamente sua transcrição, estando relacionado à deficiência de MPO (REYNOLDS *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2005).

O polimorfismo –G463A (dbSNP rs2333227) parece ter um papel importante na susceptibilidade de indivíduos falcêmicos a infecções (COSTA *et al.*, 2005). Tais indivíduos estão sujeitos ao aumento do estresse oxidativo, especialmente durante os episódios de hemólise e transfusões sanguíneas e durante as crises vaso-oclusivas e de síndrome torácica aguda (HEBBEL *et al.*, 1982; AMER *et al.*, 2006). Visto que o alelo A diminui a expressão da MPO, pode ser um possível marcador para eventos infecciosos em pacientes com sobrecarga de ferro e/ou com defesa imune já comprometida. Adicionalmente, o alelo A também pode fornecer menor proteção contra os danos oxidativos no DNA resultantes de ERO produzidas durante a maturação e função das células mielóides.

Por outro lado, a MPO é expressa diante da ativação leucocitária, com múltiplas ações aterogênicas, incluindo a oxidação do colesterol (LDL), e relacionada à instabilidade da placa aterosclerótica. É preditora de eventos adversos em indivíduos hígidos, coronariopatas ou em investigação de precordialgia (ESPORCATTE *et al.*, 2007). Sendo assim, o alelo G, por aumentar a expressão de MPO, poderia contribuir com o aumento dos episódios vaso-oclusivos e com a síndrome torácica aguda em pacientes falcêmicos portadores de tal alelo. Entretanto, de maneira semelhante à Hp, o polimorfismo –G463A da MPO tem mostrado variações étnicas (CHU *et al.*, 2010), o que pode explicar resultados de associação conflitantes com doenças tais como o câncer (Chu *et al.*, 2010) e a aterosclerose (MÄKELÄ *et al.*, 2003; KATAKAMI *et al.*, 2009).

1.1. Teste do cometa e estresse oxidativo

O genoma humano é regularmente exposto a agentes que danificam o DNA. Existem três mecanismos principais que induzem danos no DNA que são: (1) agentes ambientais, tais como, a luz ultravioleta (UV); (2) produtos celulares normais do metabolismo, que são uma fonte contínua de dano ao DNA, e (3) agentes químicos que se ligam ao DNA e tendem a provocar a sua desintegração espontânea (VANDGHANOONI e ESKANDANI, 2011).

O ensaio do cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única, foi introduzido há quase 30 anos como uma forma simples de detectar quebras de DNA. É um dos mais importantes e bem aplicados métodos *in vitro* em estudos de genotoxicologia e danos ao DNA. Ganhou generalizada popularidade como um método rápido e confiável, sensível, simples para medir diretamente os efeitos genotóxicos de agentes físicos e químicos, bem como cinética de reparo de DNA em células individuais (PARK e PARK 2010; VANDGHANOONI e ESKANDANI 2011; COLLINS, 2013).

É um método *in situ* de células que são incorporadas na base de agarose sendo lisadas e submetidas à eletroforese em condições alcalinas. A imagem visual (Figura X) obtida com essa técnica parece um “cometa” com uma cabeça distinta que consiste em DNA intacto (nucleoide), e uma cauda incluindo partes danificadas ou quebradas de DNA. Em comparação com outros testes de genotoxicidade, as vantagens mais importantes do ensaio cometa são: capacidade do ensaio para identificar danos no DNA ao nível de uma única célula; sensibilidade para a detecção de baixos níveis de danos no DNA; exigência de um pequeno número de células; facilidade de aplicação; baixo custo; flexibilidade, uma vez que pode ser usado para avaliar vários tipos de danos no DNA; adaptação a uma variedade de condições experimentais; e curto período de tempo para a realização do ensaio. Com as modificações, o ensaio tornou-se o método mais popular para medir danos no DNA de vários tipos, incluindo o dano oxidativo causado por ERO (VANDGHANOONI e ESKANDANI, 2011; COLLINS, 2013).






		% fragm. DIIA	
Classes dos cometas	0	(< 5 %)	
	1	(5 – 20 %)	
	2	(20 – 40 %)	
	3	(40 – 95 %)	
	4	(> 95 %)	

Figura 6: Demonstração das 4 classes para a avaliação visual do teste do cometa.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar a frequência dos polimorfismos nos genes da haptoglobina e da mieloperoxidase (-G463A; dbSNP rs2333227) em pacientes com doença falciforme (SS) e sua correlação com a gravidade clínica da sobrecarga de ferro, visando avaliar uma possível associação entre esses polimorfismos com a variabilidade clínica, a resposta aos tratamentos e o prognóstico, especialmente aqueles relacionados ao estresse oxidativo.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o estado clínico dos pacientes através dos exames de Hemograma, Proteína C Reativa ultra-sensível (PCR-us) e Ferritina.
- Verificar o grau de danos ao DNA através do Teste do Cometa.
- Verificar se existem diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga nos resultados dos exames laboratoriais e nas frequências genótípicas dos polimorfismos estudados.
- Avaliar a existência de correlação entre os grupos com e sem sobrecarga quanto aos exames laboratoriais, comorbidades e polimorfismos estudados.
- Verificar se os polimorfismos nos genes da haptoglobina e da mieloperoxidase encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- Estimar a razão de chances de risco ou proteção dos grupos com e sem sobrecarga de ferro, exames realizados e genótipos de Hp e MPO em relação às comorbidades.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

A análise molecular dos polimorfismos e a avaliação do dano oxidativo deste estudo foram realizados no Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. As dosagens de ferritina sérica e proteína C reativa foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Base do Distrito Federal, enquanto os resultados dos demais exames foram obtidos através de consulta ao prontuário médico.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal (**Anexo 1**). Para a realização desta pesquisa foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de acordo com as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (**Apêndice 1**). O TCLE foi lido e assinado pelos voluntários previamente à sua participação nesta pesquisa, na presença dos pesquisadores responsáveis. No momento do esclarecimento do TCLE, foi preenchido pelos pesquisadores um questionário sobre hábitos de vida, existência de infecção/inflamação e demais informações relevantes à investigação (**Apêndice 2**). Os voluntários foram devidamente informados sobre o direito de solicitar qualquer informação durante a realização do trabalho, bem como, de abandonar a pesquisa a qualquer momento, se assim desejar, bastando para isso comunicar a decisão aos pesquisadores responsáveis.

Os voluntários participantes foram provenientes da Rede Hospitalar Pública do Distrito Federal, atendidos no serviço ambulatorial do Núcleo de Hematologia e Hemoterapia (NHH) do Hospital de Base da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. Os participantes foram codificados e enumerados aleatoriamente, a fim de manter sua privacidade. O período de coleta compreendeu entre junho de 2011 e novembro de 2012.

3.2. Tipo de estudo

Estudo transversal com amostra de conveniência composta por pacientes atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF) com diagnóstico de anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária ao tratamento.

3.3. Seleção dos pacientes

Para a realização da pesquisa foram selecionados 78 pacientes com diagnóstico de doença falciforme (fenótipo SS). Destes, 59 (75,6%) estavam com sobrecarga de ferro secundária ao tratamento e 19 (24,4%) estavam sem sobrecarga. Os pacientes são regularmente acompanhados no Serviço de Hematologia do Hospital de Base da Secretaria de Estado do Distrito Federal.

3.3.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos na pesquisa pacientes entre 21 e 65 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de Anemia Falciforme. A existência da doença foi determinada pela presença de homozigose para o gene da hemoglobina S (fenótipo SS).

3.3.2. Critérios de exclusão

Pacientes com Anemia falciforme e com outra hemoglobinopatia associada (ex.: talassemia) síndrome mielodisplásica, pacientes heterozigotos para HbS, homozigotos para HbC (ou qualquer outro fenótipo diferente de HbSS) e aqueles incapazes de compreender os termos do TCLE. Para tal, foi realizada pesquisa em prontuário médico.

3.4. Coleta de amostra de sangue periférico

Após a aceitação dos voluntários em participar da pesquisa, seguindo os preceitos recomendados pela Comissão de Ética em Pesquisa, realizou-se a coleta de sangue periférico (~4ml/tubo), utilizando-se agulhas descartáveis estéreis e tubos Vacutainer devidamente identificados com o número da amostra. Foram coletados dois tubos, um contendo EDTA e o

outro sem anticoagulante. O tubo sem anticoagulante foi submetido à centrifugação a 1.500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. A seguir, este foi encaminhado ao laboratório de Patologia Clínica do HBDF para as dosagens de ferritina e proteína-C reativa-ultra sensível (PCR-us).

O tubo contendo EDTA foi levado para o laboratório de Genética da Universidade de Brasília (UnB) onde, após a retirada do volume necessário de sangue total para a realização do teste do cometa, foi submetido à centrifugação a 3.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. A fração leucocitária foi transferida para um microtubo de 2 mL previamente enumerado. A esta alíquota, cuidadosamente removida com a ajuda de uma pipeta Pasteur, foi acrescentado aproximadamente igual volume de solução tampão de estocagem de eritrócitos (0,0598 M citrato trisódico; 0,02 M NaH_2PO_4 , 0,0197 M Na_2PO_4 , 40% de glicerol, pH 7,1). Após homogeneização, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C .

3.5. Teste do Cometa

O teste do cometa foi feito segundo metodologia proposta por Singh *et al.* (1988), com modificações. Lâminas para microscopia de extremidade fosca foram mergulhadas em 1,5% de agarose ponto de fusão normal em solução salina PBS e colocadas para secar a temperatura ambiente. Subsequentemente, retirou-se 30 μL de sangue total periférico e transferiu-se para um eppendorf contendo 120 μL de 0,5% de agarose baixo ponto de fusão (Gibco BRL) em solução salina PBS a 37°C . O material foi então homogeneizado e distribuído nas lâminas (2 lâminas/paciente). Cada lâmina foi coberta por lamínula e colocada para secar a 4°C por 15 minutos. Após solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas mergulhadas em solução de lise fresca contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris (pH ajustado para 10,0 com NaOH), 1% de N-lauril sarcosina, 1 mL de Triton X-100 e 10 DMSO. A solução de lise fresca foi preparada a partir de uma solução-estoque contendo NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM e Tris 10 mM. Protegidas da luz, as lâminas permaneceram nessa solução, mantidas a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e submersas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, $\text{pH} > 13,0$)

recém preparado e mantido a 4 °C. Após 30 minutos de submersão neste tampão procedeu-se com a eletroforese a 250 V, 350 mA a 4 °C durante 30 minutos. A seguir, as lâminas foram transferidas para uma cuba contendo tampão de neutralização (0,4 M Tris-HCl; pH 7,5). A cada 5 minutos, as lâminas eram retiradas do tampão, permanecendo à temperatura ambiente durante 5 minutos e depois retornando por mais 5 minutos ao tampão, e assim sucessivamente, num total de 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas para secar a temperatura ambiente durante 1 hora e foram posteriormente fixadas em etanol 100% por 7 minutos. Após secagem, as lâminas foram guardadas a 4°C até o momento de uso. Todas as etapas foram realizadas em ausência de luz direta (penumbra) para evitar danos adicionais ao DNA.

Foram avaliadas 100 células por paciente, e o processo de coloração foi feito com brometo de etídio a 20 µg/mL. A avaliação visual foi feita através de um microscópio de fluorescência Axioskop-II da Carl Zeiss®, filtro de 510-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400x, utilizando-se as 5 classes de cometa propostas por Collins *et al.* (1995), e o índice de danos no DNA foi calculado de acordo com Jalszyński *et al.* (1997).

3.6. Extração de DNA

A partir da fração leucocitária previamente armazenada, a extração de DNA foi realizada por kit *Ilustra Blood genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram quantificadas pelo quantificador Nanovue, GE Healthcare®, e armazenadas em freezer a -20° C.

3.7. Estudo molecular (genotipagem) dos polimorfismos nos genes da haptoglobina e da Mieloperoxidase (-G463A, dbSNP rs2333227)

A genotipagem foi realizada através de amplificação dos fragmentos de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*),

seguida ou não de corte com enzimas de restrição, de acordo com a necessidade. Os iniciadores (*primers*) e as referências dos protocolos utilizados na amplificação do DNA/genotipagens estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Sequência de iniciadores (primers) e enzimas de restrição utilizados nas análises dos polimorfismos dos genes da Haptoglobina (Hp) e da Mieloperoxidase (MPO, dbSNP rs2333227).

Gene/Mutação	Localização cromossômica	Sequências dos <i>primers</i> (iniciadores)	Enzima de restrição	Referência
Haptoglobina				
Alelo Hp^{*IF}				
F3		5' CAGGAGTATACACCTTAAATG 3'		
C72		5' AATTTAAAATTGGCATTTCGCC 3'		
Alelo Hp^{*IS}				
C51	16q22.1	5' GCAATGATGTCACGGATATC 3'	–	Yano <i>et al.</i> , 1998
S2		5' TTATCCACTGCTTCTCATTG 3'		
Alelo Hp^{*2}				
F3		5' CAGGAGTATACACCTTAAATG 3'		
C42		5' TTACTGGTAGCGAACCGA 3'		
MPO –G463A				
Sense	17q23.1	5' CGGTATAGGCACACAATGGTGAG 3'	<i>AciI</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2006
Antisense		5' GCAATGGTTCAAGCGATTCTTC 3'		

Para ser amplificado, o DNA extraído foi quantificado e diluído para concentrações de 100 ng/μL (MPO) e 10 ng/μL (Hp). Os iniciadores foram diluídos com água Milli-Q esterilizada para uma concentração de uso de 50 μM utilizando-se para base de cálculo a quantidade de nanomoles obtidos na síntese destes (dados fornecidos pelo fabricante).

3.7.1. Genotipagem da Haptoglobina

Para a determinação dos genótipos da Hp foram necessárias três PCRs distintas, uma para cada alelo da cadeia α da haptoglobina (Hp^{*IF}, Hp^{*IS}, Hp^{*2}), seguindo o protocolo de Yano *et al.* (1998), com modificações (**Tabela 3**).

Tabela 3: Condições do mix para reação de PCR da Haptoglobina.

Reagente	Concentração final	Volume (μL)
Água Milli-Q	-	9,625
Tampão 10X	1X	1,25
dNTP 10mM	200 μM	0,25
MgCl ₂ 50mM	2,5 mM	0,625
Primer 1 50mM	200 nM	0,05
Primer 2 50mM	200 nM	0,05
Taq 5U/ μL	1,5 U	0,15
Total do Mix	-	12,0
DNA	10 ng	1,0

Os microtubos foram previamente identificados e o DNA, pipetado. O mix preparado foi então adicionado em cada tubo. A PCR foi executada no termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler.

As condições de PCR envolveram 34 ciclos de amplificação a 94°C por 40 segundos, 58°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 2 minutos (extensão).

Os produtos da PCR foi visualizado em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante após 2 horas de eletroforese a 150 mV (20-30 mA) e coloração com nitrato de prata. Três tipos de fragmentos foram observados: 1,4 Kb, se alelo Hp^{*1F}; 1,2 Kb, se alelo Hp^{*1S}; e 935 pb, se alelo Hp^{*2}. Os tamanhos dos fragmentos foram observados com auxílio do marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen®).

3.7.2. Genotipagem do polimorfismo –G463A da Mieloperoxidase (dbSNP rs2333227)

As condições da mistura que foi realizada para a reação de PCR da Mieloperoxidase encontram-se na **Tabela 4**.

Tabela 4: Condições do mix para a reação de PCR da Mieloperoxidase

Reagente	Concentração final	Volume (μL)
Água Milli-Q	-	15,7
Tampão 10X	1X	2,0
dNTP 10mM	200 μM	0,4
MgCl ₂ 50mM	1,0mM	0,4
Primer 1 50mM	0,375 μM	0,15
Primer 2 50mM	0,375 μM	0,15
Taq 5U/ μL	1U	0,2
Total do Mix	-	19,0
DNA	100ng	1,0

Os microtubos foram previamente identificados e o DNA, pipetado. O mix preparado foi então adicionado em cada tubo. A PCR foi executada no termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler.

As condições de PCR envolveram 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e extensão final de 72°C por 10 minutos.

O produto amplificado da MPO, de 350 pb, foi digerido com a endonuclease *AciI* nas condições apresentadas na **Tabela 5**. A reação foi encubada a 37°C por 24 horas.

Tabela 5: Reagentes empregados na digestão do produto da PCR da Mieloperoxidase

Reagente	Concentração	Volume (μL)
Água Milli-Q	-	7,5
Tampão 10X	1X	2
<i>AciI</i>	5U	0,3
Total do Mix	17,8	8,0
Produto da PCR	-	7,5

O produto de PCR e os fragmentos de restrição foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante a 150 mV (20-30 mA) durante 2 horas e coloração com nitrato de prata.

3.8. Análises Estatísticas

3.8.1. Cálculo do Tamanho Amostral

O planejamento amostral é fundamental na elaboração do projeto e determina o dimensionamento numérico e também a técnica de amostragem (coleta/seleção) dos elementos de um estudo (MIOT, 2011). Um planejamento amostral adequado depende do conhecimento básico do problema investigado, dos fatores que o influenciam, e da estatística que se pretenda realizar, a fim de que se possa unir a significância estatística dos testes ao significado clínico dos resultados (CALLEGARI-JACQUES, 2003; MIOT, 2011).

A escolha da fração populacional que compõe a amostra do estudo implica que o pesquisador assumira certo grau de erro relacionado à estimativa dos parâmetros populacionais de cada variável (MIOT, 2011). Assim, o tamanho mínimo amostral é obtido a partir da análise estatística que se pretenda realizar, onde está embutida uma medida de erro de amostragem, que é o erro padrão (CALLEGARI-JACQUES, 2003). No presente estudo, o tamanho mínimo amostral foi determinado a partir dos dados quantitativos, para o qual se deve dispor do desvio padrão populacional da variável, selecionar o nível de significância da estimativa e o erro amostral máximo tolerado (em unidades da média) (MIOT, 2011). Para tal, considerou-se a fórmula abaixo, com o erro máximo tolerável de amostragem (erro amostral) variando de 0,05 a 0,20, de acordo com uma menor ou maior variabilidade populacional nos valores de referência dos exames realizados.

$$(\sqrt{n})^2 = (1,96)^2 \times \frac{(\sigma)^2}{(E)^2} \rightarrow n = (1,96)^2 \times \frac{\sigma^2}{E^2}$$

Onde:

n = tamanho amostral

σ = desvio padrão

E = erro máximo tolerável = $1,96 \times \sigma_{\bar{x}}$, onde $\sigma_{\bar{x}}$ = erro padrão da média (EPM). Assim,

$E = 1,96 \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$, porque o intervalo de confiança de 95% = $\bar{x} \pm 1,96 \sigma_{\bar{x}}$, onde \bar{x} = média

Tendo em vista o cuidado adicional necessário com o superdimensionamento amostral, o qual pode reduzir os intervalos de confiança e permitir a detecção de diferenças entre subgrupos que, apesar de estatisticamente significativos, não possuem relevância clínica (MIOT, 2011), as variáveis quantitativas que apresentam naturalmente valores de referência com intervalos muito grandes não foram consideradas nos cálculos do tamanho amostral (vide **Tabela 6**).

Tabela 6: Valores de referência para os exames utilizados.

Exames	Valores de referência
Leucócitos totais (WBC)	4,0 - 11,0 x 10 ³ /μL
Hemácias (RBC)	4,50 - 6,10 x 10 ⁶ /μL
Hemoglobina (HGB)	14,0 - 16,0 g/dL
Hematócrito (HCT)	42,0 - 50,0 %
VCM	80 - 94 fL
HCM	27,0 - 32,0 pg
CHCM	32,0 - 36,0 g/dL
Plaquetas (PLT)	150 - 450 x 10 ³ /μL
Ferritina (Homens)	20,0 - 290,0 μL
Ferritina (Mulheres)	4,5 - 260,0 μL
PCR us	<0,3 mg/dL

3.8.2. Diferenças entre sexo, faixa etária e genótipos da Haptoglobina e da Mieloperoxidase (dbSNP rs2333227) nos valores dos exames laboratoriais e do teste do cometa

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS[®] (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0. Os dados foram expressos pela média ± erro padrão da média (EPM) e os valores p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos. As variáveis contínuas foram testadas para a distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Os indivíduos foram estratificados por idade, de acordo com a sua inclusão em

um dos seguintes grupos: adultos jovens (21-39 anos), meia idade (40-59 anos) e idosos (a partir de 60 anos) (LAZZAROTTO *et al.*, 2010). Para a estratificação por grupo etário na época do diagnóstico, considerou-se: primeira infância (zero a seis anos) (Secretaria-Executiva do Programa Comunidade Solidária/Comitê da Primeira Infância, 2002), segunda infância (7 a 11 anos) (GIMENEZ e UGRINOWITSCH, 2002), adolescência (12 a 18 anos) (LEI N° 8.069 de 13/07/90) e adulto jovem (de 19 a 28 anos), visto que a idade máxima de diagnóstico referida foi de 28 anos.

Para os parâmetros avaliados (exames laboratoriais, teste do cometa e genótipos), possíveis diferenças entre os gêneros e faixa etária foram avaliados pelos testes T para amostras independentes ou de Mann-Whitney (dados não-normalizados), enquanto diferenças entre os genótipos foram avaliadas por ANOVA ou pelo teste de Kruskal-Wallis (quando os dados não seguiram a distribuição normal), acompanhado, respectivamente, pelo teste de Bonferroni ou de Mann-Whitney.

Testes não-paramétricos têm sido amplamente utilizados em substituição aos testes paramétricos, em especial quando as pressuposições do modelo não se verificam, sendo mais apropriados quando (1) não se conhece a distribuição dos dados em uma população, (2) a distribuição é assimétrica e não se deseja realizar uma transformação dos dados, e (3) a distribuição é gaussiana em alguns grupos e assimétrica em outros. São, portanto, testes de aplicação mais ampla do que os paramétricos (PONTES e CORRENTE, 2001; CALLEGARI-JACQUES, 2003), sendo os mais comuns, (1) o teste de Kruskal-Wallis (KRUSKAL e WALLIS, 1952), usado quando existem mais de dois grupos a serem comparados, e (2) o teste de Mann-Whitney (MANN e WHITNEY, 1947), usado para comparar as funções de distribuição de uma variável em duas amostras independentes. Enquanto o teste de Kruskal-Wallis é a alternativa não-paramétrica para ANOVA *one way*, o teste de Mann-Whitney é a alternativa não-paramétrica para o teste T para amostras independentes.

3.8.3. Testes de correlação

Possíveis correlações entre os parâmetros sexo/grupos (com e sem sobrecarga de ferro), gênero/faixa etária, gênero/polimorfismos genéticos, faixa etária/grupos com e sem

sobrecarga de ferro, faixa etária/polimorfismos genéticos e polimorfismos genéticos/dados do perfil dos pacientes foram analisadas por meio do teste do qui-quadrado (χ^2), adequado para verificar se existe associação entre duas variáveis qualitativas, sendo então chamado de teste χ^2 de associação. Seu coeficiente de contingência indica se as variáveis são independentes ou associadas, ou seja, se uma influencia a outra ou não, e varia de 0 a 1, indicando a intensidade da associação (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Para testar as correlações entre estas variáveis qualitativas e os exames realizados (exames laboratoriais e teste do cometa), foi usado o teste de correlação de Spearman, enquanto possíveis correlações entre variáveis quantitativas foram testadas pelos testes de correlação de Pearson (dados normalizados) ou Spearman (dados não normalizados). Quando se pode demonstrar que existe associação entre duas variáveis quantitativas, isto é, quando se constata que elas variam juntas, diz-se que as variáveis estão correlacionadas (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Os testes foram realizados no programa SPSS versão 17.0 e valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

O coeficiente de correlação de Spearman exige que as variáveis tenham sido medidas pelo menos em escala ordinal, para que os valores possam ser ordenados e pode também ser empregado quando variáveis quantitativas não apresentam distribuição bivariada normal. Os coeficientes de Pearson e Spearman variam entre -1 (correlação perfeita negativa ou inversamente proporcional) e $+1$ (correlação perfeita positiva ou diretamente proporcional) (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

3.8.4. Odds Ratio

O teste de Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC) foi calculado para estimar a razão de chances (chance relativa) de risco ou proteção dos grupos com e sem sobrecarga de ferro, exames realizados e genótipos de Hp e MPO em relação às comorbidades. Para tal, o teste do χ^2 foi aplicado, usando-se o programa SPSS versão 17.0. Para calcular o OR dos exames laboratoriais, considerou-se os valores de referência previamente citados na **Tabela 6** ($>$ ou $<$ que o limite mínimo para o eritrograma e $>$ ou $<$ que o limite máximo para leucócitos totais e plaquetas); para o teste do cometa considerou-se

a mediana, uma vez que a média é influenciada por valores extremos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.8.5. Interações entre os polimorfismos

Possíveis interações entre os polimorfismos genéticos nos resultados dos exames realizados foram avaliadas através da análise de variância multivariada (MANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni (*post hoc*). Para controlar a taxa de erro do tipo I, foi utilizado o ajuste de Bonferroni. As análises foram feitas pelo programa SPSS versão 17.0., e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A principal preocupação da MANOVA é o exame das diferenças entre diversos grupos, quando se considera simultaneamente mais de uma variável dependente, ou seja, investigar a existência de ocorrência de um efeito no conjunto de dados analisados, quando todas as variáveis dependentes são conjuntamente analisadas (RIBAS & VIEIRA, 2011). Visto que MANOVA é robusta às violações da normalidade multivariada e às violações de homogeneidade das matrizes de variância-covariância se os grupos forem aproximadamente do mesmo tamanho (RIBAS e VIEIRA, 2011), esta foi aplicada aos dados paramétricos e não-paramétricos deste trabalho.

O ajuste (ou correção) de Bonferroni é uma correção aplicada ao nível alpha (α) para controlar a taxa de erro do tipo I (falso positivo), quando vários testes estatísticos dependentes ou independentes estão sendo executados simultaneamente (comparações múltiplas, como MANOVA e medidas repetidas). Como a realização de comparações múltiplas aumenta as chances de ocorrer erro tipo I dentro do intervalo de confiança previamente estipulado, a fim de evitar um grande número de falsos positivos, o valor de α deve ser reduzido para contabilizar o número de comparações. Cada teste conduzido utiliza um critério de significância de nível α (geralmente 0,05) dividido pelo número de testes realizados (α/n). Esta é uma correção simples, porém efetiva, mas tende a ser muito rígida quando muitos testes são executados, o que pode inflar o erro tipo II, isto é, deixarmos de identificar diferenças que podem existir (FIELD, 2009; LANA *et al.*, 2009; WEISSTEIN, 2013).

3.8.6. Estatística de populações

Os polimorfismos estudados foram também submetidos ao teste de probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) pelo método convencional do χ^2 , o qual serve para verificar se uma distribuição observada de dados ajusta-se a uma distribuição esperada (teórica) (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Os p-valores foram estimados pelo programa *Genepop on the web* versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>), sendo $p > 0,05$ considerado em EHW. O mesmo programa foi usado para calcular as frequências alélicas e genotípicas de cada loco e os parâmetros de diversidade genética tais como heterozigiosidade observada (H_o), heterozigiosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia intrapopulacional (FIS), índice de fixação (FST, que mede o grau de diferenciação entre as amostras), coeficiente de endogamia total (FIT, que mede a existência de endogamia total devido à subestruturação da amostra global) (NEI, 1997) e também testar a diferença genética entre as populações com e sem sobrecarga de ferro secundária.

4. RESULTADOS

4.1. Cálculo do Tamanho Amostral (N)

As variáveis ferritina e PCR, por apresentarem valores de referência com intervalos muito grandes, não foram consideradas nos cálculos.

Para a obtenção do tamanho amostral final (N=78) do grupo total de pacientes, o erro máximo tolerável variou de 0,05 a 0,010, sendo de 0,055 para hemácias (N=69,98); de 0,085 para leucócitos totais (N=71,05); de 0,10 para plaquetas; e 0,05 para as demais variáveis quantitativas.

Visto a inicial estratificação dos pacientes em “sem sobrecarga” e “com sobrecarga” de ferro secundária, novos cálculos do tamanho amostral mínimo foram realizados, sendo o erro máximo tolerável usado em cada estratificação relacionado a seguir. Para os pacientes sem sobrecarga de ferro (N=19), o erro máximo tolerável variou entre 0,05 e 0,18, sendo de 0,055 para VCM (N=18,91); de 0,05 para CHCM; de 0,18 para leucócitos totais (N=19,08) e plaquetas (N=19,09); e de 0,10 para as demais variáveis (hemácias= 14,84; hemoglobina=

35

9,20; hematócrito= 9,58; HCM= 10,43; %DD= 11,53). Para aqueles pacientes com sobrecarga de ferro (N=59), o erro máximo tolerável variou de 0,05 a 0,12, sendo de 0,065 para hemácias (N=52,55) e hematócrito (N=48,67); de 0,056 para hemoglobina (N=55,39); de 0,05 para VCM (N=27,14), HCM (N=34,92) e CHCM (N=8,77); de 0,10 para leucócitos totais (N=48,18); de 0,12 para plaquetas (N=51,30); e de 0,06 para o %DD (N=52,94).

4.2. Perfil da amostra de pacientes

Dado o fato de que o Distrito Federal foi formado por migrantes de todas as regiões brasileiras e sua população reflete a constituição geral da população brasileira melhor do que populações de outras regiões brasileiras (LORDELO *et al.*, 2012), a amostra de pacientes teve representação de local de nascimento de dez estados brasileiros, pertencentes a quatro de suas cinco regiões geográficas, como mostrado na **Figura 7**.

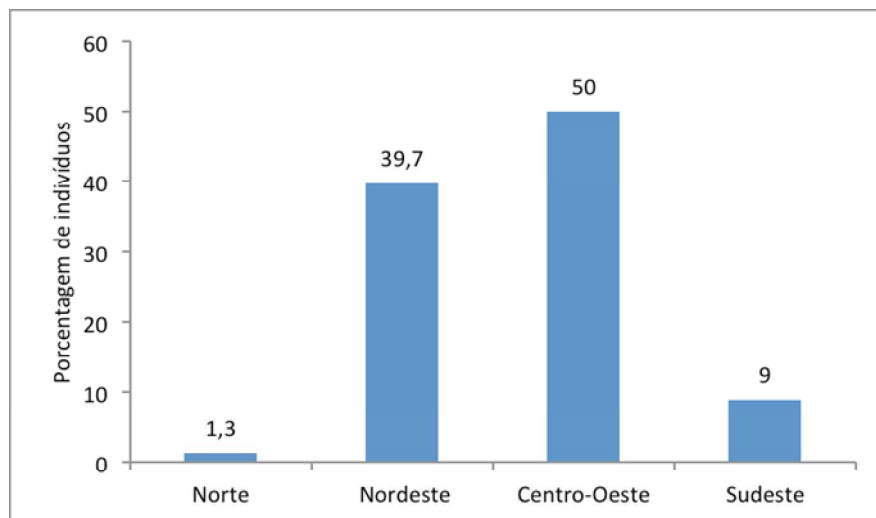


Figura 7: Frequência (em porcentagem) dos pacientes com anemia falciforme amostrados neste estudo, por naturalidade (regiões do Brasil).

Região Norte (PA: 1,3%); Região Nordeste (BA: 23,1%; CE: 1,3%; MA: 3,8%; PI: 11,5); Região Centro-Oeste (DF: 34,6%; GO: 12,8%; TO: 2,6%); Região Sudeste (MG: 7,7%; SP: 1,3%).

A amostra estudada foi composta por pacientes de ambos os gêneros, sendo 76,9% pertencentes à faixa etária de 21-39 anos (adultos jovens), 20,5% à faixa etária de 40-59 anos

(meia idade) e 2,56% à faixa etária ≥ 60 anos (idosos). A distribuição da amostra de acordo com a faixa etária e o gênero dos pacientes é mostrada na **Figura 8**.

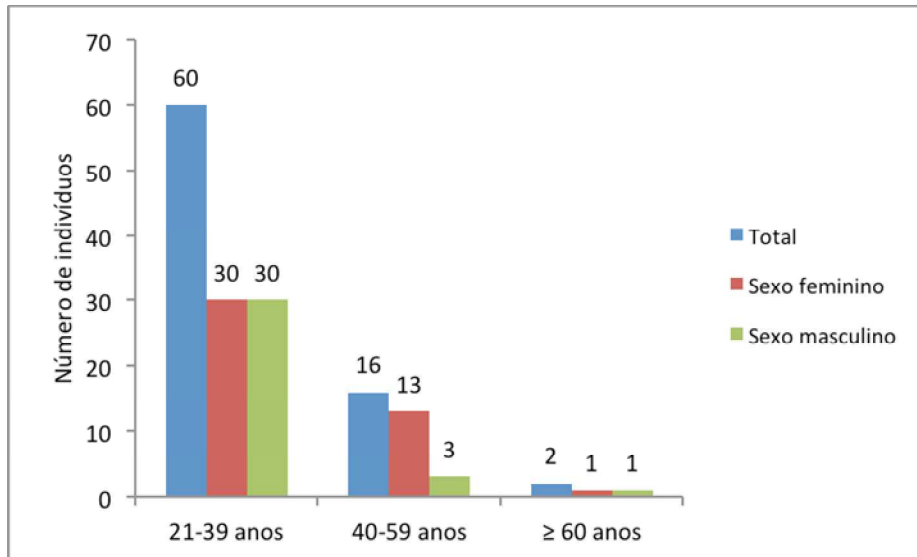


Figura 8: Distribuição da amostra de acordo com a faixa etária e o gênero dos pacientes.

Os números indicam o total de pacientes em cada estratificação.

Do total de pacientes, 65,4% foram diagnosticados na primeira infância, 7,7% na segunda infância, 14,1% na adolescência e 12,8% no início da fase adulta. A **Figura 9** mostra a distribuição da amostra de acordo com o gênero e a idade dos pacientes na época do diagnóstico.

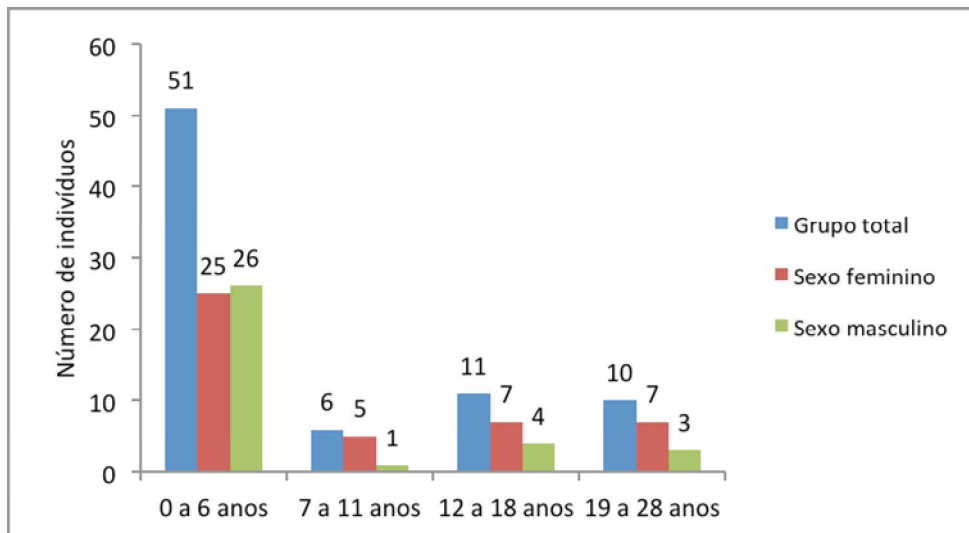


Figura 9: Distribuição da amostra de acordo com o gênero e a idade dos pacientes na época do diagnóstico.

Os números indicam o total de pacientes em cada estratificação.

Para cada paciente, foi adotado um tipo de tratamento para diminuição da sobrecarga de ferro secundária, onde cada escolha dependeu da reação destes pacientes aos medicamentos e procedimentos. Na **Figura 10**, é mostrada a distribuição dos tipos de tratamento adotados.

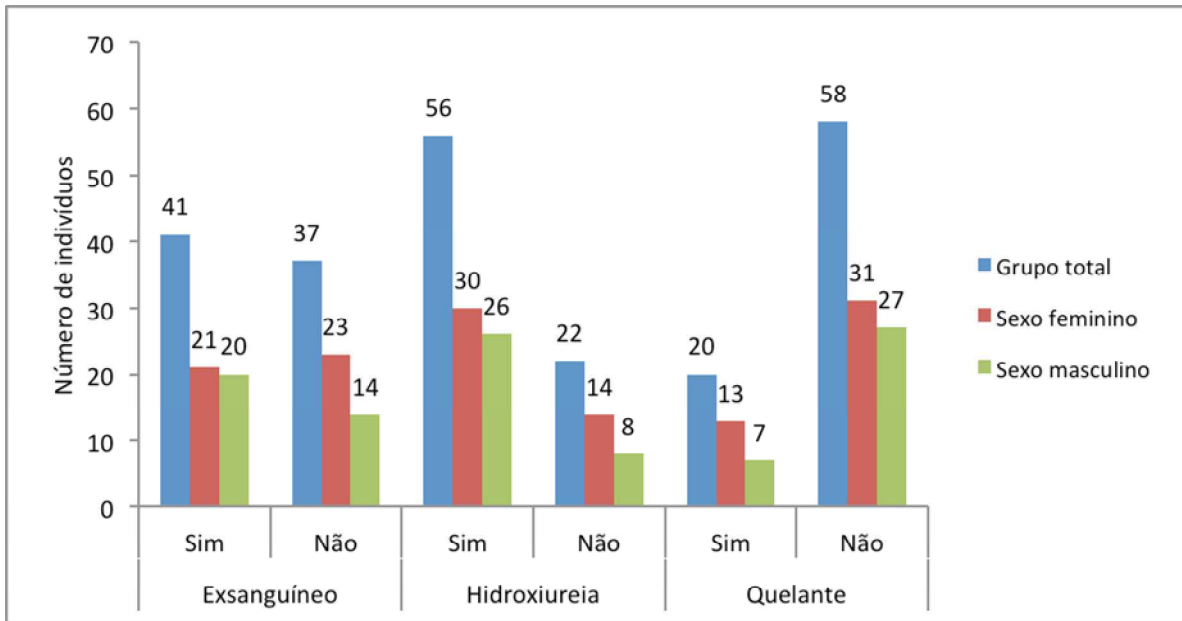


Figura 10: Distribuição da amostra de acordo com os tipos de tratamento adotados e o gênero dos pacientes.

Os números indicam o total de pacientes em cada estratificação.

Desses, 10 pacientes não faziam uso de nenhum dos tratamentos (6 sem sobrecarga e 4 com sobrecarga); 8 eram tratados apenas com exsanguíneo (1 sem sobrecarga e 7 com sobrecarga); 19 apenas com hidroxiureia (6 sem sobrecarga e 13 com sobrecarga); 2 somente com quelante (ambos com sobrecarga); 20 com exsanguíneo e hidroxiureia (5 sem sobrecarga e 15 com sobrecarga); 2 com exsanguíneo e quelante (ambos com sobrecarga); 6 com hidroxiureia e quelante (1 sem sobrecarga e 5 com sobrecarga); e 11 faziam uso dos três tipos de tratamentos (todos com sobrecarga).

Visto que a anemia hemolítica crônica está entre as manifestações clínicas mais típicas da doença falciforme e que a terapia de transfusão regular é necessária em pacientes com síndromes de anemia grave (TAHER *et al.*, 2009; WOOD, 2007), o perfil da amostra de pacientes em relação ao número de transfusões recebidas ao longo da vida é apresentado na **Figura 11**.

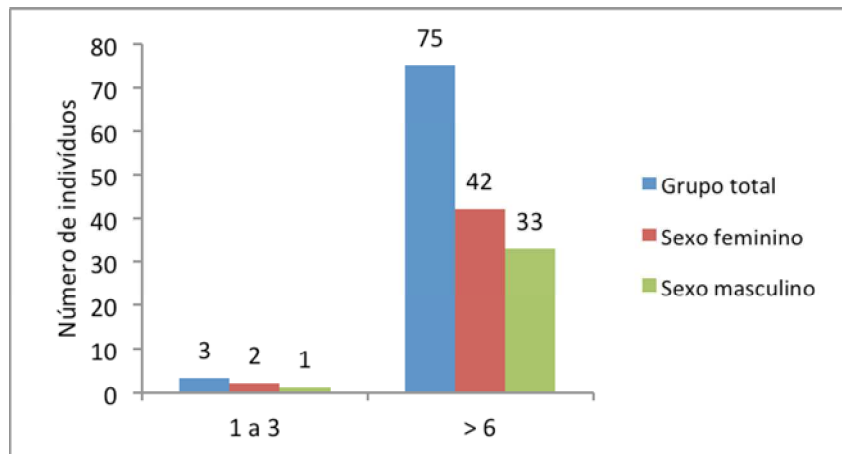


Figura 11: Distribuição da amostra de acordo com o número de transfusões ao longo da vida e gênero dos pacientes.

Os números indicam o total de pacientes em cada estratificação.

Além da anemia hemolítica crônica, estão também entre as manifestações clínicas mais comuns crises dolorosas, osteoarticulares ou abdominais agudas decorrentes da oclusão da microvasculatura com isquemia tissular, lesões crônicas com asplenia funcional, vasculopatia cerebral, insuficiência renal, pulmonar e cardíaca (DINIZ *et al.*, 2009). O número de crises de dor severas (que necessitam de internação) ao longo da vida é apresentado na **Figura 12**, enquanto o número de crises de dor severas nos últimos 12 meses, na **Figura 13**.

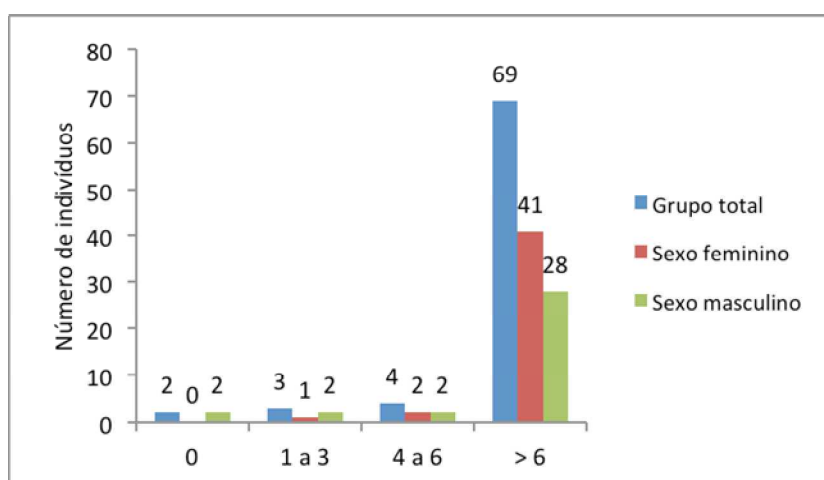


Figura 12: Distribuição da amostra de acordo com o número de crises de dor severas ao longo da vida e gênero dos pacientes.

Os números indicam o total de pacientes em cada estratificação.

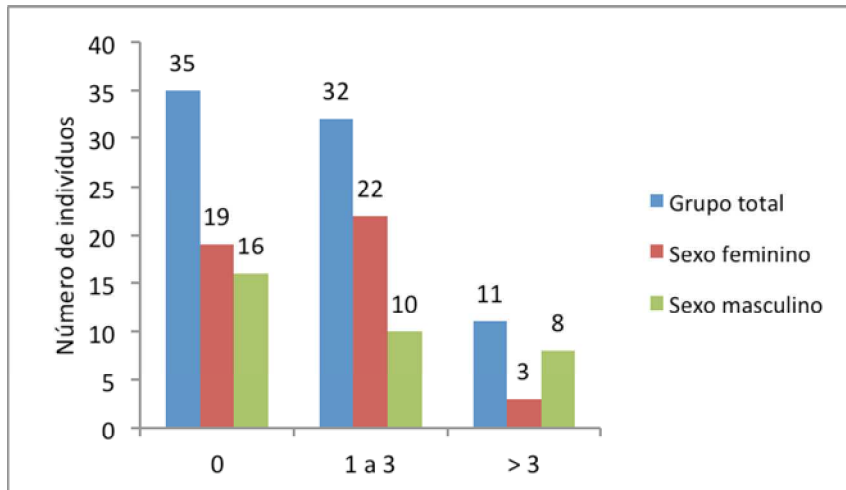


Figura 13: Distribuição da amostra de acordo com o número de crises de dor severas nos últimos 12 meses e o gênero dos pacientes.

Os números indicam o total de pacientes em cada estratificação.

A gravidade clínica é variável, mas um contingente significativo de pacientes tem as formas crônica e grave da doença, exacerbadas pelas crises agudas. A morbidade e a mortalidade são resultados de infecções, hemólise e microinfartos decorrentes de vaso-oclusão microvascular difusa e abrupta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Em decorrência do quadro clínico, o perfil das amostras de pacientes em relação ao número de internações ao longo da vida é mostrado na **Figura 14**; o número de internações nos últimos 12 meses na **Figura 15**; a causa das internações ao longo da vida na **Figura 16**. A **Figura 17** mostra outras comorbidades presentes nestes pacientes ao longo da vida.

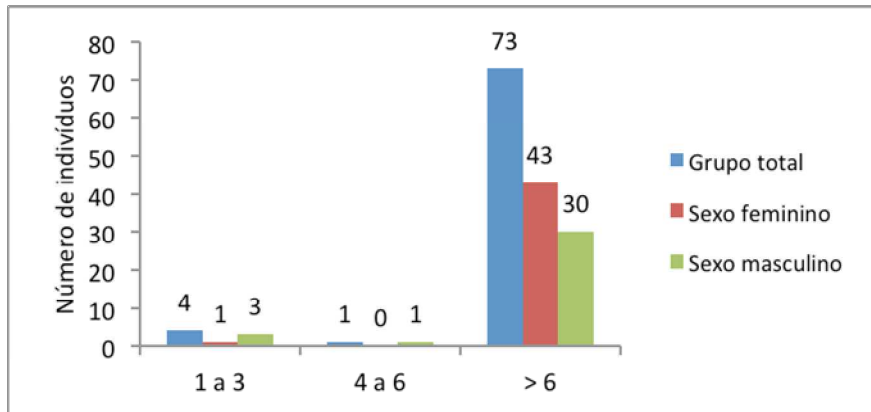


Figura 14: Distribuição da amostra de acordo com o número de internações ao longo da vida e gênero dos pacientes.

Os números indicam o total de pacientes em cada estratificação.

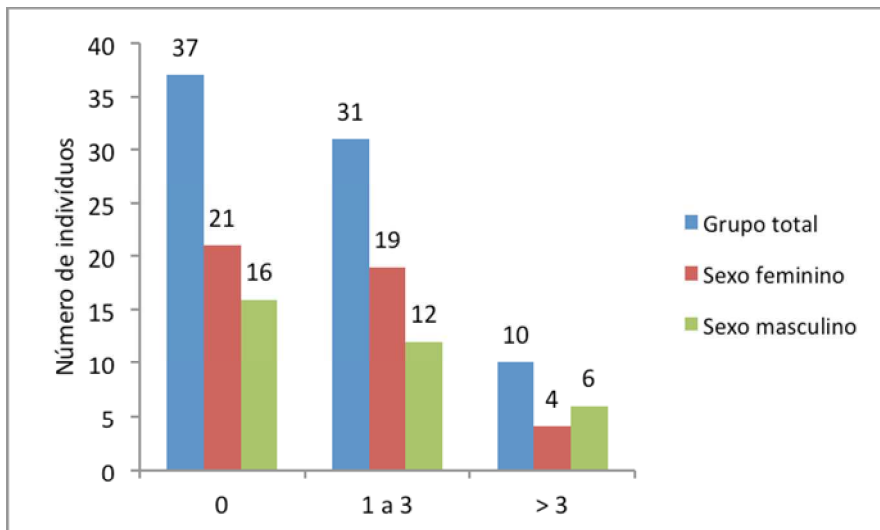


Figura 15: Distribuição da amostra de acordo com o número de internações nos últimos 12 meses e gênero dos pacientes.

Os números indicam o total de pacientes em cada estratificação.

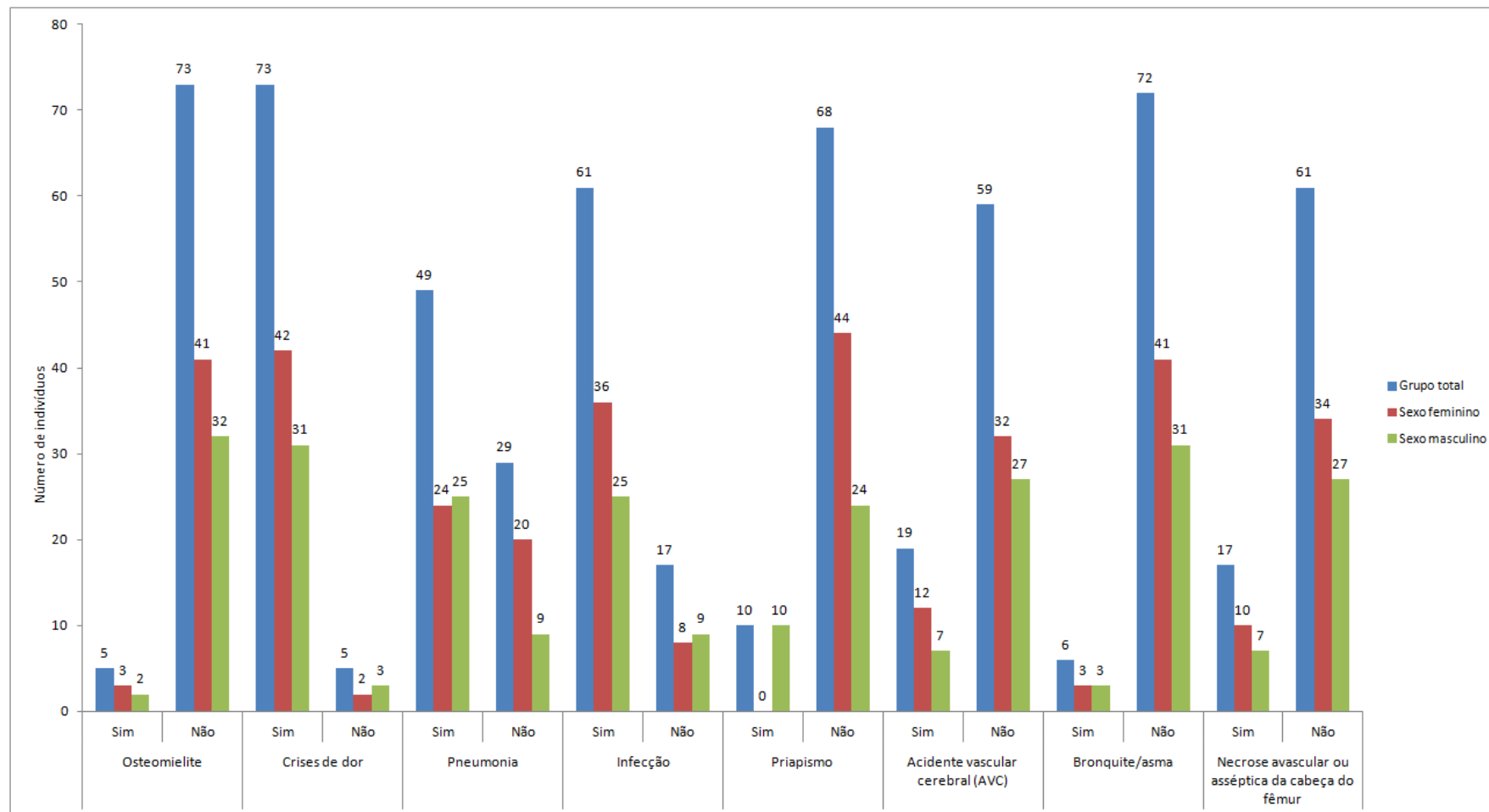


Figura 16: Distribuição da amostra de acordo com o motivo de internações ao longo da vida e gênero dos pacientes.

Os números indicam o total de pacientes em cada estratificação.

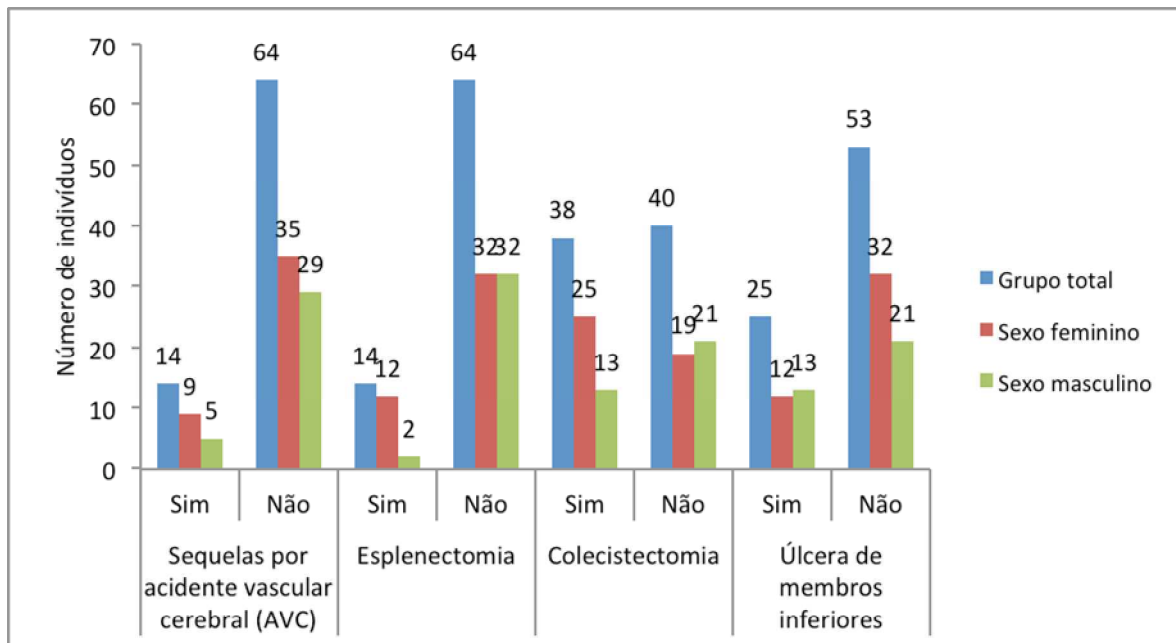


Figura 17: Distribuição da amostra de acordo com presença de outras comorbidades ao longo da vida e gênero dos pacientes.

Os números indicam o total de pacientes em cada estratificação.

4.3. Comparações entre os grupos sem e com sobrecarga de ferro secundária

Diferenças significativas entre os grupos com e sem sobrecarga foram observadas nos valores de ferritina, hemácias, HCM, e número total de transfusões para o grupo total e gênero feminino (**Tabelas 7 e 8**), e também nos valores de CHCM para o gênero feminino (**Tabela 8**). Para o sexo masculino, diferença significativa foi constatada no exame de ferritina (**Tabela 9**). Nenhuma diferença significativa foi observada para o teste do cometa.

Tabela 7: Diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga no grupo total de pacientes em relação aos exames realizados e número de transfusões recebidas.

Grupo	Ferritina (µg/L)	PCR (mg/dL)	Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/% ou g/dL)	Leucócitos totais (x10 ³ /mm ³)	Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	% DD	Transfusão
Sem sobrecarga (N=19)	127,43 ± 16,40	0,62 ± 0,17	2,96 ± 0,14	9,69 ± 0,33	27,05 ± 0,94	93,63 ± 2,37	33,42 ± 1,27	35,65 ± 0,66	9,94 ± 0,90	424,74 ± 42,38	55,18 ± 2,23	7,68 ± 3,21
Com sobrecarga (N=59)	2209,48 ± 297,19	1,00 ± 0,23	2,59 ± 0,08	9,25 ± 0,26	25,55 ± 0,77	100,65 ± 1,75	36,37 ± 0,70	36,47 ± 0,36	9,51 ± 0,44	366,36 ± 20,49	54,39 ± 1,56	26,58 ± 3,86
p-valores	0,000	0,124	0,026	0,380	0,310	0,055	0,043	0,261	0,650	0,247	0,793	0,003

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados teste T para amostras independentes (em azul) ou pelo teste de Mann-Whitney (em preto).

Tabela 8: Diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga no gênero feminino em relação aos exames realizados e número de transfusões recebidas.

Grupo	Ferritina (µg/L)	PCR (mg/dL)	Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/% ou g/dL)	Leucócitos totais (x10 ³ /mm ³)	Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	% DD	Transfusão
Sem sobrecarga (N=8)	145,48 ± 18,69	0,87 ± 0,35	2,97 ± 0,20	9,41 ± 0,32	27,10 ± 0,88	94,10 ± 3,91	32,40 ± 1,68	34,11 ± 0,83	8,58 ± 1,18	424,74 ± 42,38	56,78 ± 2,57	2,13 ± 0,88
Com sobrecarga (N=36)	2576,50 ± 443,52	0,77 ± 0,13	2,52 ± 0,08	9,01 ± 0,25	24,90 ± 0,76	100,32 ± 2,03	36,29 ± 0,69	36,36 ± 0,40	9,63 ± 0,56	366,36 ± 20,49	53,94 ± 2,10	22,00 ± 4,57
p-valores	0,000	0,819	0,034	0,471	0,193	0,191	0,024	0,030	0,426	0,941	0,427	0,007

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados pelo teste T para amostras independentes (em azul) ou pelo teste de Mann-Whitney (em preto).

Tabela 9: Diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga no sexo masculino em relação aos exames realizados e número de transfusões recebidas.

Grupo	Ferritina ($\mu\text{g/L}$)	PCR (mg/dL)	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM ($\text{g}/\%$ ou g/dL)	Leucócitos totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	% DD	Transfusão
Sem sobrecarga (N=11)	114,31 \pm 24,85	0,44 \pm 0,14	2,96 \pm 0,20	9,89 \pm 0,52	27,01 \pm 1,53	93,28 \pm 3,11	34,16 \pm 1,86	36,77 \pm 0,84	10,92 \pm 1,26	434,00 \pm 47,58	54,02 \pm 3,43	11,73 \pm 5,27
Com sobrecarga (N=23)	1635,00 \pm 287,94	1,37 \pm 0,56	2,70 \pm 0,16	9,63 \pm 0,54	26,57 \pm 1,59	101,16 \pm 3,22	36,50 \pm 1,48	36,63 \pm 0,67	9,33 \pm 0,74	339,87 \pm 26,5	55,08 \pm 2,35	33,74 \pm 6,71
p-valores	0,000	0,065	0,347	0,767	0,865	0,089	0,356	0,901	0,363	0,071	0,801	0,055

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média \pm EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL = gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; $\text{g}/\%$ =gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados pelo teste T para amostras independentes (em azul) ou pelo teste de Mann-Whitney (em preto).

Considerando as faixas etárias, diferenças significativas entre os grupos com e sem sobrecarga de ferro foram observadas na faixa etária de 21-39 anos para os valores de ferritina, hemácias, VCM, HCM e número de transfusões (**Tabela 10**); e na faixa etária de 40-59 anos apenas para os valores de ferritina (**Tabela 11**).

Tabela 10: Diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga na faixa etária de 21-39 anos em relação aos exames realizados e número de transfusões recebidas.

Grupo	Ferritina (µg/L)	PCR (mg/dL)	Hemácias (x10 ⁹ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/% ou g/dL)	Leucócitos totais (x10 ³ /mm ³)	Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	% DD	Transfusão
Sem sobrecarga (N=15)	127,87 ± 18,58	0,55 ± 0,19	3,03 ± 0,16	9,72 ± 0,38	27,44 ± 1,10	93,09 ± 2,95	32,71 ± 1,28	35,19 ± 0,73	10,70 ± 0,99	412,07 ± 47,87	55,70 ± 2,68	9,07 ± 3,98
Com sobrecarga (N=45)	1794,49 ± 253,12	0,88 ± 0,28	2,60 ± 0,09	9,34 ± 0,31	25,75 ± 0,93	101,70 ± 2,04	36,54 ± 0,75	36,53 ± 0,37	9,75 ± 0,52	375,83 ± 25,25	54,42 ± 1,84	24,96 ± 4,02
p-valores	0,000	0,124	0,025	0,510	0,335	0,032	0,013	0,087	0,379	0,539	0,447	0,020

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/%=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados pelo teste T para amostras independentes (em azul) ou pelo teste de Mann-Whitney (em preto).

Tabela 11: Diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga na faixa etária de 40-59 anos em relação aos exames realizados e número de transfusões recebidas.

Grupo	Ferritina (µg/L)	PCR (mg/dL)	Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/% ou g/dL)	Leucócitos totais (x10 ³ /mm ³)	Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	% DD	Transfusão
Sem sobrecarga (N=4)	125,80 ± 40,26	0,89 ± 0,44	2,71 ± 0,26	9,56 ± 0,73	25,58 ± 1,71	95,63 ± 2,47	36,10 ± 3,78	37,40 ± 1,36	7,07 ± 1,60	472,25 ± 100,68	53,25 ± 3,81	2,50 ± 2,18
Com sobrecarga (N=12)	3687,25 ± 1029,69	1,56 ± 0,41	2,70 ± 0,14	9,13 ± 0,52	25,73 ± 1,31	94,55 ± 3,15	33,95 ± 1,17	35,40 ± 0,58	9,24 ± 0,86	338,17 ± 30,65	53,77 ± 3,48	28,58 ± 9,70
p-valores	0,004	0,363	0,993	0,673	0,903	0,396	0,470	0,136	0,234	0,101	0,937	0,067

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g%=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados pelo teste T para amostras independentes (em azul) ou pelo teste de Mann-Whitney (em preto).

Como a faixa etária ≥ 60 anos possuía apenas 2 pacientes, tendo ambos sobrecarga de ferro, nenhuma comparação estatística pôde ser realizada.

Entre os genótipos de Hp, diferenças significativas foram observadas no grupo sem sobrecarga entre 1F-2 e 2-2 para os valores de plaquetas (p=0,014); e no grupo com sobrecarga entre 1F-1F e 1F-1S para os valores de ferritina (p=0,039), e entre 1S-1S e 2-2 para os valores de CHCM (p=0,034) (**Tabelas 12 e 13**).

Tabela 12: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da Hp dos pacientes com Anemia Falciforme sem sobrecarga.

Grupo	Ferritina ($\mu\text{g/L}$)	PCR (mg/dL)	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM ($\text{g}/\%$ ou g/dL)	Leucócitos totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	% DD	Transfusão
1F-1F (N=1)	28,10 \pm 0,00	1,60 \pm 0,00	3,04 \pm 0,00	10,60 \pm 0,00	30,80 \pm 0,00	101,00 \pm 0,00	34,80 \pm 0,00	34,40 \pm 0,00	9,61 \pm 0,00	511,00 \pm 0,00	33,25 \pm 0,00	52,00 \pm 0,00
1S-1S (N=5)	143,14 \pm 38,90	0,50 \pm 0,12	2,97 \pm 0,28	10,01 \pm 0,90	27,46 \pm 2,62	89,98 \pm 3,08	34,08 \pm 2,09	35,60 \pm 1,93	10,26 \pm 1,62	365,80 \pm 86,30	55,10 \pm 2,82	3,60 \pm 1,69
1F-1S (N=2)	101,00 \pm 17,00	1,17 \pm 1,01	2,98 \pm 0,26	9,18 \pm 0,13	27,20 \pm 0,60	95,65 \pm 1,95	31,05 \pm 3,15	33,70 \pm 0,30	10,02 \pm 0,09	548,00 \pm 194,00	64,13 \pm 0,63	3,50 \pm 2,50
1F-2 (N=6)	167,35 \pm 29,57	0,31 \pm 0,06	3,19 \pm 0,34	9,79 \pm 0,64	27,22 \pm 1,98	88,15 \pm 4,20	31,82 \pm 3,15	36,17 \pm 1,23	6,88 \pm 1,14	286,67 \pm 34,66	52,33 \pm 3,93	5,17 \pm 4,97
1S-2 (N=1)	71,50 \pm 0,00	0,19 \pm 0,00	3,04 \pm 0,00	8,75 \pm 0,00	24,40 \pm 0,00	89,70 \pm 0,00	28,80 \pm 0,00	35,90 \pm 0,00	8,74 \pm 0,00	542,00 \pm 0,00	48,00 \pm 0,00	29,00 \pm 0,00
2-2 (N=4)	99,95 \pm 23,59	0,83 \pm 0,64	2,56 \pm 0,21	9,39 \pm 0,62	25,93 \pm 1,20	104,53 \pm 5,72	37,00 \pm 1,88	36,18 \pm 1,22	14,46 \pm 1,99	593,00 \pm 69,14 ^{*d}	62,38 \pm 3,27	2,25 \pm 1,32
P- valores	0,302	0,718	0,805	0,932	0,708	0,171	0,702	0,778	0,074	0,113	0,150	0,245

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média \pm EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/%=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados por ANOVA (em azul) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (em preto). O asterisco indica diferença significativa detectada pelo teste de Mann-Whitney, sendo d= significativo comparado a 1F-2 (p=0,014).

Tabela 13: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da Hp dos pacientes com Anemia Falciforme com sobrecarga.

Grupo	Ferritina (µg/L)	PCR (mg/dL)	Hemácias (x10⁶/mm³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/% ou g/dL)	Leucócitos totais (x10³/mm³)	Plaquetas (x10³/mm³)	% DD	Transfusão
1F-1F (N=3)	729,67 ± 208,22	0,44 ± 0,34	2,79 ± 0,28	9,42 ± 0,69	26,03 ± 2,71	98,17 ± 6,56	33,97 ± 1,48	36,50 ± 1,88	11,06 ± 1,01	446,33 ± 68,39	54,08 ± 2,44	5,33 ± 3,18
1S-1S (N=8)	1211,00 ± 297,14	0,93 ± 0,48	2,77 ± 0,33	10,24 ± 0,94	27,24 ± 2,79	104,85 ± 4,87	38,49 ± 2,12	38,15 ± 0,94	7,82 ± 1,06	322,31 ± 45,42	57,47 ± 3,76	17,88 ± 9,07
1F-1S (N=6)	2544,33 ± 927,02 ^{*a}	0,87 ± 0,32	2,45 ± 0,27	8,52 ± 0,59	22,97 ± 2,23	95,32 ± 5,34	36,42 ± 3,82	37,80 ± 1,93	10,24 ± 1,47	390,50 ± 57,41	49,92 ± 5,15	24,50 ± 17,32
1F-2 (N=14)	1927,79 ± 390,09	0,60 ± 0,09	2,64 ± 0,17	9,53 ± 0,54	26,43 ± 1,80	104,34 ± 3,90	36,59 ± 1,36	36,50 ± 0,72	9,25 ± 1,11	384,44 ± 45,34	56,11 ± 4,05	33,07 ± 9,09
1S-2 (N=9)	2350,00 ± 1087,81	0,95 ± 0,41	2,44 ± 0,21	8,96 ± 0,58	24,84 ± 1,53	103,41 ± 4,40	37,50 ± 1,65	35,98 ± 0,56	8,24 ± 0,98	299,11 ± 29,59	55,78 ± 4,50	21,44 ± 5,15
2-2 (N=19)	2898,79 ± 623,22	1,48 ± 0,66	2,56 ± 0,11	8,97 ± 0,46	25,27 ± 1,29	96,92 ± 2,94	35,15 ± 1,04	35,54 ± 0,49 ^{*b}	10,55 ± 0,71	383,18 ± 44,21	52,62 ± 2,40	31,89 ± 7,06
P- valores	0,351	0,888	0,861	0,614	0,592	0,458	0,686	0,437	0,311	0,433	0,848	0,400

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g%=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados por ANOVA (em azul) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (em preto). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos, detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo a= significativo comparado a 1F-1F (p=0,039), e b= significativo comparado a 1S-1S (p=0,034).

Nas comparações entre os grupos com e sem sobrecarga, tais diferenças também foram observadas para Hp1S-1S nos valores de ferritina ($p=0,003$) e VCM ($p=0,048$); para Hp1F-1S nos valores de ferritina ($p=0,046$) e CHCM ($p=0,044$); para Hp1F-2 nos valores de ferritina ($p=0,001$), VCM ($p=0,025$), plaquetas ($p=0,048$) e transfusão ($p=0,010$); e para Hp2-2 nos valores de ferritina ($p=0,002$), leucócitos totais ($p=0,040$), plaquetas ($p=0,023$) e transfusão ($p=0,038$).

Para MPO, diferenças significativas foram verificadas apenas no grupo com sobrecarga: entre GG e GA para os valores de transfusão ($p=0,026$); entre GG e AA para os valores de PCR ($p=0,039$) e de plaquetas ($p=0,039$); e entre GA e AA para os valores de plaquetas ($p=0,027$), como apresentado nas **Tabelas 14 e 15**.

Tabela 14: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da MPO no grupo de pacientes com Anemia Falciforme e sem sobrecarga.

Grupo	Ferritina ($\mu\text{g/L}$)	PCR (mg/dL)	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM ($\text{g}/\%$ ou g/dL)	Leucócitos totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	% DD	Transfusão
GG (N=12)	147,28 \pm 21,44	0,48 \pm 0,16	3,04 \pm 0,18	9,99 \pm 0,45	27,43 \pm 1,28	92,45 \pm 2,84	33,58 \pm 1,76	36,09 \pm 0,98	10,23 \pm 1,29	415,17 \pm 54,60	57,31 \pm 2,38	3,75 \pm 2,45
GA (N=5)	99,52 \pm 25,87	0,52 \pm 0,28	3,12 \pm 0,15	9,59 \pm 0,42	27,92 \pm 1,20	91,70 \pm 3,35	30,92 \pm 1,48	34,36 \pm 0,51	8,27 \pm 0,78	373,40 \pm 70,75	49,40 \pm 5,11	17,40 \pm 10,17
AA (N=2)	78,10 \pm 46,90	1,74 \pm 1,01	2,10 \pm 0,04	8,12 \pm 0,34	22,55 \pm 2,05	105,50 \pm 12,50	38,70 \pm 2,30	36,25 \pm 1,75	12,35 \pm 3,16	610,50 \pm 136,50	56,88 \pm 10,13	7,00 \pm 2,00
P- valores	0,256	0,156	0,097	0,232	0,536	0,236	0,252	0,464	0,448	0,310	0,377	0,261

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média \pm EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/%=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados por ANOVA (em azul) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (em preto).

Tabela 15: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da MPO no grupo de pacientes com Anemia Falciforme e com sobrecarga.

Grupo	Ferritina (µg/L)	PCR (mg/dL)	Hemácias (x10⁶/mm³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/% ou g/dL)	Leucócitos totais (x10³/mm³)	Plaquetas (x10³/mm³)	% DD	Transfusão
GG (N=32)	2367,66 ± 354,00	0,76 ± 0,15	2,63 ± 0,11	9,17 ± 0,36	25,57 ± 1,12	98,83 ± 2,38	35,64 ± 0,92	36,20 ± 0,45	10,01 ± 0,67	379,57 ± 33,59	51,79 ± 2,34	33,09 ± 5,89
GA (N=23)	1676,83 ± 437,99	1,21 ± 0,54	2,61 ± 0,13	9,55 ± 0,42	25,91 ± 1,18	102,42 ± 2,82	37,34 ± 1,23	37,07 ± 0,64	9,15 ± 0,60	360,43 ± 20,60	56,38 ± 1,84	17,91 ± 4,96 ^{*a}
AA (N=3)	4855,67 ± 2943,14	2,05 ± 1,00 ^{*a}	2,05 ± 0,25	7,90 ± 1,02	22,53 ± 3,12	110,23 ± 5,64	38,43 ± 1,92	35,10 ± 0,40	6,89 ± 1,44	218,67 ± 32,83 ^{*a,b}	64,42 ± 9,60	19,00 ± 11,24
P- valores	0,172	0,121	0,307	0,389	0,645	0,291	0,428	0,392	0,263	0,090	0,128	0,080

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados por ANOVA (em azul) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (em preto). Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) detectadas entre os genótipos pelo teste de Mann Whitney, sendo a= significativo comparado a GG; b= significativo comparado a GA.

Diferenças significativas entre os genótipos de MPO no grupo com sobrecarga também foram mostradas para o gênero feminino, entre GG e AA para os valores de PCR ($p=0,045$) e de plaquetas ($p=0,022$); e entre GA e AA também para os valores de PCR e de plaquetas ($p=0,043$ para ambos); enquanto nenhuma diferença significativa nos valores dos exames realizados foi mostrada para o gênero masculino. Nas comparações entre os grupos com e sem sobrecarga, tais diferenças foram observadas para GG nos valores de ferritina ($p=0,000$) e transfusão ($p=0,000$); e para GA nos valores de ferritina ($p=0,001$), HCM ($p=0,028$) e CHCM ($p=0,024$).

4.4. Frequência de distribuição dos polimorfismos da Haptoglobina (Hp) e Mieloperoxidase (MPO) –G463A (dbSNP rs2333227) em pacientes com anemia falciforme sem e com sobrecarga de ferro secundária

Na estratificação do grupo total em grupos com e sem sobrecarga de ferro secundária, os genótipos 1F-2 da Hp e o GG da MPO foram os mais frequentes em ambos os grupos (Tabela 16) não havendo diferença significativa entre as frequências genotípicas.

Tabela 16: Frequência da distribuição dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária.

Marcador Genético	Sem sobrecarga N(%)	Com sobrecarga N(%)
Hp	19(100)	59(100)
1F-1F	1(5,3)	3(5,08)
1S-1S	5(26,3)	8(13,56)
1F-1S	2(10,5)	6(10,17)
1F-2	6(31,6)	14(23,73)
1S-2	1(5,3)	9(15,25)
2-2	4(21,1)	19(32,2)
P-valores	0,157	
MPO –G463A	19(100)	58(98,31)
GG	12(63,2)	32(54,24)
GA	5(26,3)	23(38,98)
AA	2(10,5)	3(5,08)
P-valores	0,700	

Os p-valores foram gerados pelo teste de Mann-Whitney, usando o programa SPSS versão 17.0.

Quando analisada a frequência dos genótipos da Hp entre os gêneros dos pacientes, observou-se que o genótipo 1F-2 foi o mais predominante entre pacientes do gênero feminino em ambos os grupos de falcêmicos; fato observado no gênero masculino apenas entre os que possuíam sobrecarga de ferro secundária, enquanto o genótipo 1F-1S foi o mais frequente entre os sem sobrecarga. Entretanto, também não houve diferença significativa nas frequências genotípicas dos grupos com e sem sobrecarga de cada gênero (**Tabela 17**).

Tabela 17: Frequência da distribuição por gênero dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária.

Marcador Genético	Feminino		Masculino	
	Sem sobrecarga N(%)	Com sobrecarga N(%)	Sem sobrecarga N(%)	Com sobrecarga N(%)
Hp	8(42,1)	36(61,02)	11(57,9)	23(38,98)
1F-1F	0(0)	3(5,08)	1(5,3)	0(0)
1F-1S	1(5,3)	2(3,39)	4(21,1)	6(10,17)
1S-1S	2(10,5)	5(8,47)	0(0)	1(1,69)
1F-2	3(15,8)	6(10,17)	3(15,8)	8(13,56)
1S-2	0(0)	6(10,17)	1(5,3)	3(5,08)
2-2	2(10,5)	14(23,73)	2(10,5)	5(8,47)
P-valores	0,379		0,360	
MPO –G463A	8(42,1)	35(59,32)	11(57,9)	23(38,98)
GG	4(21,1)	20(33,9)	8(42,1)	12(20,34)
GA	3(15,8)	12(20,34)	2(10,5)	11(18,64)
AA	1(5,3)	3(5,08)	1(5,3)	0(0)
P-valores	0,685		0,381	

Os p-valores foram gerados pelo teste de Mann-Whitney, usando o programa SPSS versão 17.0

Na análise da distribuição dos genótipos por faixa etária, observou-se, para a faixa etária de 21–39 anos, maior frequência dos genótipos 1F-1S, 1F-2 e 2-2 da Hp no grupo sem sobrecarga, enquanto os genótipos 1F-2 e 2-2 foram mais encontrados no grupo com sobrecarga; já o genótipo GG da MPO prevaleceu nos dois grupos (sem e com sobrecarga). Entretanto, também não foram observadas diferenças significativas nas frequências

genotípicas entre os grupos com e sem sobrecarga de cada faixa etária (**Tabela 18**). Igualmente, dentro de cada grupo (com e sem sobrecarga), não foram detectadas diferenças significativas entre as faixas etárias para nenhum dos marcadores genéticos.

Tabela 18: Frequência da distribuição por faixa etária dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária.

Marcador Genético	21-39 anos (N)		40-59 anos (N)		≥ 60 anos (N)	
	Sem sobrecarga	Com sobrecarga	Sem sobrecarga	Com sobrecarga	Sem sobrecarga	Com sobrecarga
Hp	15(78,9)	45(76,27)	4(21,1)	12(20,34)	0(0)	2(3,39)
1F-1F	1(5,3)	2(3,39)	0(0)	1(1,69)	0(0)	0(0)
1F-1S	4(21,1)	1(10,17)	1(5,3)	2(3,39)	0(0)	0(0)
1S-1S	1(5,3)	6(3,39)	1(5,3)	3(5,08)	0(0)	1(1,69)
1F-2	4(21,1)	14(23,73)	2(10,5)	0(0)	0(0)	0(0)
1S-2	1(5,3)	7(11,86)	0(0)	2(3,39)	0(0)	0(0)
2-2	4(21,1)	14(23,73)	0(0)	4(6,78)	0(0)	1(1,69)
P-valores	0,290		0,496		-	
MPO – G463A	15(78,9)	44(74,58)	4(21,1)	12(20,34)	0(0)	2(3,39)
GG	9(47,4)	26(44,07)	3(15,8)	5(8,47)	0(0)	1(1,69)
GA	5(26,3)	5(28,81)	1(5,3)	5(8,47)	0(0)	1(1,69)
AA	1(5,3)	17(1,69)	0(0)	2(3,39)	0(0)	0(0)
P-valores	0,952		0,467		-	

Os p-valores foram gerados pelo teste de Mann-Whitney, usando o programa SPSS versão 17.0. Na faixa etária ≥ 60 anos os p-valores não foram gerados em decorrência dos dados vazios.

4.5. Estatística de populações dos grupos com e sem sobrecarga de ferro secundária

Desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi observado em ambos os grupos (com e sem sobrecarga) apenas para o polimorfismo de Hp, sendo este significativo para deficiência de heterozigotos no grupo com sobrecarga ($p=0,0210$), onde houve maior frequência do genótipo 1S-1S e menor frequência do genótipo 1S-2 em relação ao esperado. Apesar de nos pacientes sem sobrecarga o p-valor gerado no teste de deficiência de heterozigotos ter sido de 0,0515, também houve maior frequência do genótipo 1S-1S e menor frequência do genótipo 1S-2 em relação ao esperado (**Tabela 19**).

Tabela 19: Distribuição das frequências alélicas de Hp e MPO (dbSNP rs2333227) e dados para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária.

Alelos	Frequências alélicas		Genótipos	Número de indivíduos observados		Número de indivíduos esperados		Coeficiente de Endogamia Intrapopulacional (F_{IS})		Teste do EHW (p-valores)	
	Sem sobrecarga	Com sobrecarga		Sem sobrecarga	Com sobrecarga	Sem sobrecarga	Com sobrecarga	Sem sobrecarga	Com sobrecarga	Sem sobrecarga	Com sobrecarga
Hp			Hp								
1F	0,263	0,220	1F-1F	1	3	1,2162	2,7778				
1S	0,342	0,263	1F-1S	2	6	3,5135	6,8889				
2	0,395	0,517	1S-1S	5	8	2,1081	3,9744	0,3047	0,2092	0,0210	0,0442
			1F-2	6	14	4,0541	13,5556				
			1S-2	1	9	5,2703	16,1624				
			2-2	4	19	2,8378	15,6410				
MPO – G463A			MPO								
G	0,763	0,750	GG	12	32	10,9730	32,5304	0,2969	-0,0488	0,2317	1,0000
A	0,237	0,250	GA	5	23	7,0541	21,9391				
			AA	2	3	0,9730	3,5304				

p<0,05 indica desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os dados foram gerados pelo programa estatístico Genepopweb versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>).

Os resultados das estatísticas F e do teste de diferenciação genética indicaram que as amostras dos grupos com e sem sobrecarga eram homogêneas, não havendo diferenciação genética dos grupos (**Tabela 20**).

Tabela 20: Dados de diversidade genética, estatísticas F e teste de diferenciação genética para os marcadores Hp e MPO (dbSNP rs2333227) em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro secundária.

Marcador Genético	Heterozigosidade observada (H _o)		Heterozigosidade Esperada (H _e)		Déficit de Heterozigotos (p-valor)		Excesso de Heterozigotos (p-valor)		F _{IS}	F _{ST}	F _{IT}	Diferenciação genética (p-valor)
	Sem sobrecarga	Com sobrecarga	Sem sobrecarga	Com sobrecarga	Sem sobrecarga	Com sobrecarga	Sem sobrecarga	Com sobrecarga				
Hp	0,4737	0,4915	0,6578	0,6334	0,0515	0,0210	0,9494	0,9793	0,2336	-0,0033	0,2310	0,4472
MPO	0,2632	0,3898	0,3602	0,3750	0,2317	0,7664	0,9746	0,4979	0,0348	-0,0179	0,0174	1,0000

Os dados das Estatísticas F e os p-valores dos testes para excesso e déficit de heterozigotos e diferenciação genética foram gerados pelo programa estatístico Genepopweb versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>).

Mediante a homogeneidade da amostra e ausência de diferenciação genética dos grupos sem e com sobrecarga, a amostra de pacientes passou a ser tratada estatisticamente como um só grupo para as demais análises.

4.6. Comparações entre os gêneros, faixas etárias e genótipos da Haptoglobina (Hp) e da Mieloperoxidase (MPO) –G463A (dbSNP rs2333227) no grupo total de pacientes

Nenhuma diferença significativa entre os gêneros foi observada para os valores dos exames realizados (**Tabela 21**).

No entanto, nas comparações entre as faixas etárias, o grupo de 40-59 anos apresentou valores significativamente maiores de PCR-us em relação ao grupo 21-39 anos (**Tabela 22**).

Tabela 21: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões pelo gênero dos pacientes com Anemia Falciforme.

Grupo	Ferritina (µg/L)	PCR (mg/dL)	Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/% ou g/dL)	Leucócitos totais (x10 ³ /mm ³)	Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	% DD	Transfusão
Total (N=78)	1702,31 ± 246,4	0,91 ± 0,18	2,68 ± 0,07	9,36 ± 0,21	25,92 ± 0,63	98,94 ± 1,47	35,65 ± 0,63	36,27 ± 0,31	9,61 ± 0,40	380,58 ± 18,70	54,58 ± 1,29	21,97 ± 3,15
Feminino (N=44)	2134,50 ± 389,18	0,78 ± 0,13	2,60 ± 0,08	9,08 ± 0,21	25,30 ± 0,65	99,19 ± 1,82	35,58 ± 0,67	35,96 ± 0,38	9,44 ± 0,50	388,50 ± 27,43	54,46 ± 1,78	18,39 ± 3,91
Masculino (N=34)	1143,01 ± 229,75	1,07 ± 0,38	2,78 ± 0,12	9,71 ± 0,40	26,72 ± 1,17	98,61 ± 2,46	35,74 ± 1,17	36,68 ± 0,52	9,85 ± 0,65	370,32 ± 24,44	54,74 ± 1,91	26,62 ± 5,13
p-valores	0,051	0,618	0,215	0,167	0,295	0,944	0,903	0,257	0,612	1,000	0,614	0,338

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados pelo teste T para amostras independentes (em azul) ou pelo teste de Mann-Whitney (em preto).

Tabela 22: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por faixa etária dos pacientes com Anemia Falciforme.

Grupo	Ferritina (µg/L)	PCR (mg/dL)	Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	HEMOGLOBINA (g/dL)	HEMATÓCRITO (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/% ou g/dL)	Leucócitos totais (x10 ³ /mm ³)	Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	% DD	Transfusão
21-39 anos (N=60)	1377,83 ± 211,38	0,80 ± 0,22	2,71 ± 0,08	9,43 ± 0,25	26,18 ± 0,75	99,55 ± 1,75	35,58 ± 0,68	36,19 ± 0,34	9,99 ± 0,46	384,89 ± 22,28	54,74 ± 1,53	20,98 ± 3,29
40-59 anos (N=16)	2796,89 ± 861,26	1,39 ± 0,33	2,70 ± 0,12	9,24 ± 0,42	25,69 ± 1,04	94,82 ± 2,40	34,49 ± 1,24	35,90 ± 0,57	8,69 ± 0,77	371,69 ± 35,33	53,64 ± 2,72	22,06 ± 7,78
≥ 60 anos (N=2)	2680,00 ± 720,00	0,29 ± 0,15	1,79 ± 0,46	8,07 ± 0,79	19,90 ± 4,20	113,50 ± 5,50	47,10 ± 7,50	41,55 ± 4,85	5,70 ± 1,29	322,50 ± 129,50	57,25 ± 3,00	51,00 ± 51,00
p-valores	0,175	0,012	0,983	0,710	0,758	0,196	0,455	0,687	0,189	0,716	0,738	0,868

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/=gramas por porcentagem. Devido ao pequeno tamanho amostral da faixa etária ≥ 60 anos (N=2), apenas as faixas de 21-39 e 40-59 anos foram estatisticamente comparadas, sendoos p-valores gerados pelo teste T para amostras independentes (em azul) ou pelo teste de Mann-Whitney (em preto).

Em relação aos genótipos de Hp, nenhuma diferença significativa foi encontrada, conforme demonstrado na **Tabela 23**.

Tabela 23: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da Hp nos pacientes do grupo total com Anemia Falciforme.

Grupo	Ferritina ($\mu\text{g/L}$)	PCR (mg/dL)	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM ($\text{g}/\%$ ou g/dL)	Leucócitos totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	% DD	Transfusão
1F-1F (N=4)	554,28 \pm 229,00	0,73 \pm 0,37	2,86 \pm 0,21	9,72 \pm 0,57	27,23 \pm 2,26	98,88 \pm 4,69	34,18 \pm 1,07	35,98 \pm 1,43	10,70 \pm 0,80	462,50 \pm 50,99	48,88 \pm 5,49	17,00 \pm 11,88
1S-1S (N=13)	800,29 \pm 233,20	0,76 \pm 0,30	2,85 \pm 0,22	10,15 \pm 0,65	27,32 \pm 1,92	99,13 \pm 3,75	36,79 \pm 1,6	37,17 \pm 0,96	8,75 \pm 0,93	339,04 \pm 41,63	56,56 \pm 2,49	12,38 \pm 5,82
1F-1S (N=8)	1933,50 \pm 787,58	0,94 \pm 0,31	2,59 \pm 0,22	8,69 \pm 0,44	24,03 \pm 1,78	95,40 \pm 3,93	35,08 \pm 2,99	36,78 \pm 1,57	10,19 \pm 1,08	429,88 \pm 61,43	53,47 \pm 4,43	19,25 \pm 13,14
1F-2 (N=20)	1399,66 \pm 327,42	0,51 \pm 0,07	2,81 \pm 0,16	9,61 \pm 0,42	26,67 \pm 1,37	99,49 \pm 3,40	35,16 \pm 1,39	36,40 \pm 0,61	8,54 \pm 0,87	355,11 \pm 34,43	54,98 \pm 3,04	24,70 \pm 7,08
1S-2 (N=10)	2122,15 \pm 999,29	0,87 \pm 0,37	2,50 \pm 0,20	8,94 \pm 0,52	24,80 \pm 1,37	102,04 \pm 4,17	36,63 \pm 1,72	35,97 \pm 0,50	8,29 \pm 0,88	323,40 \pm 35,92	55,00 \pm 4,10	22,20 \pm 4,66
2-2 (N=23)	2412,04 \pm 560,08	1,37 \pm 0,55	2,56 \pm 0,09	9,04 \pm 0,40	25,38 \pm 1,08	98,24 \pm 2,65	35,47 \pm 0,91	35,65 \pm 0,45	11,23 \pm 0,73	419,67 \pm 41,49	54,32 \pm 2,19	26,74 \pm 6,29
P- valores	0,341	0,982	0,124	0,577	0,289	0,120	0,763	0,639	0,118	0,849	0,884	0,607

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média \pm EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/%=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados por ANOVA (em azul) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (em preto).

Quanto aos genótipos da MPO, diferenças significativas foram encontradas entre GG e AA (p=0,005) e GA e AA (p=0,025) para os valores de PCR, como pode ser visto na **Tabela 24**.

Tabela 24: Valores de ferritina, PCR, eritrograma, leucócitos totais, plaquetas, danos ao DNA e número de transfusões por genótipos da MPO no grupo total de pacientes com Anemia Falciforme.

Grupo	Ferritina (µg/L)	PCR (mg/dL)	Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/% ou g/dL)	Leucócitos totais (x10 ³ /mm ³)	Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	% DD	Transfusão
GG (N=44)	1762,10 ± 297,45	0,68 ± 0,12	2,74 ± 0,10	9,39 ± 0,29	26,08 ± 0,89	97,09 ± 1,93	35,08 ± 0,82	36,17 ± 0,42	10,07 ± 0,59	389,28 ± 28,38	53,30 ± 1,85	25,09 ± 4,75
GA (N=28)	1395,16 ± 376,74	1,09 ± 0,45	2,70 ± 0,11	9,56 ± 0,35	26,27 ± 1,00	100,51 ± 2,50	36,19 ± 1,14	36,58 ± 0,57	8,99 ± 0,51	362,75 ± 20,43	55,13 ± 1,79	17,82 ± 4,38
AA (N=5)	2944,64 ± 1992,07	1,93 ± 0,64 ^{**a,*b}	2,07 ± 0,14	7,99 ± 0,57	22,54 ± 1,83	108,34 ± 5,15	38,54 ± 1,28	35,56 ± 0,66	9,07 ± 1,85	375,40 ± 106,76	61,40 ± 6,43	14,20 ± 6,85
P- valores	0,844	0,028	0,080	0,226	0,378	0,144	0,361	0,830	0,426	0,806	0,430	0,481

N= tamanho amostral. Os dados foram expressos como média ± EP (erro padrão da média). VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; %DD= % danos ao DNA; g/dL= gramas por decilitro; fl=fentolitros; pg=picogramas; g/=gramas por porcentagem. Os p-valores foram gerados por ANOVA (em azul) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (em preto). Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) e altamente significativas (**p<0,01) detectadas entre genótipos pelo teste de Mann-Whitney, sendo a=significativo comparado a GG; b= significativo comparado a GA.

4.7. Frequência de distribuição dos polimorfismos da Haptoglobina e Mieloperoxidase (MPO) –G463A (dbSNP rs2333227) no grupo total de pacientes

Apesar do genótipo 2-2 da Hp ter sido observado com maior frequência no grupo total e no gênero feminino, enquanto 1F-1S e 1F-2 foram mais predominantes nos indivíduos do sexo masculino, não houve diferença significativa na distribuição dos genótipos de Hp por gênero. Fato semelhante ocorreu para MPO, onde o genótipo GG teve frequência maior tanto no grupo total quanto em cada gênero (**Tabelas 25 e 26**).

Tabela 25: Frequência da distribuição dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) do grupo total de pacientes com anemia falciforme.

Marcador Genético	N(%)
Hp	78(100,0)
1F-1F	4(5,1)
1S-1S	13(16,7)
1F-1S	8(10,3)
1F-2	20(25,6)
1S-2	10(12,8)
2-2	23(29,5)
MPO –G463A	77(98,7)
GG	44(56,4)
GA	28(35,9)
AA	5(6,4)

Tabela 26: Frequência da distribuição por gênero dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) no grupo total de pacientes com anemia falciforme.

Marcador Genético	Feminino N(%)	Masculino N(%)
Hp	44(56,4)	34(43,6)
1F-1F	3(3,8)	1(1,3)
1F-1S	3(3,8)	10(12,8)
1S-1S	7(9)	1(1,3)
1F-2	9(11,5)	11(14,1)
1S-2	6(7,7)	4(5,1)
2-2	16(20,5)	7(9)
P-valores	0,127	
MPO –G463A	43(55,1)	34(43,6)
GG	24(30,8)	20(25,6)
GA	15(19,2)	13(16,7)
AA	4(5,1)	1(1,3)
P-valores	0,635	

Os p-valores foram gerados pelo teste de Mann-Whitney, usando o programa SPSS versão 17.0.

Semelhantemente, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na distribuição por faixa etária (**Tabela 27**).

Tabela 27: Frequência da distribuição por faixa etária dos genótipos Hp e MPO (dbSNP rs2333227) do grupo total de pacientes com anemia falciforme.

Marcador Genético	21-39 anos (N)	40-59 anos (N)	≥ 60 anos (N)
Hp	60(76,9)	16(20,5)	2(2,6)
1F-1F	3(3,8)	1(1,3)	0(0)
1F-1S	10(12,8)	3(3,8)	0(0)
1S-1S	3(3,8)	4(5,1)	1(1,3)
1F-2	18(23,1)	2(2,6)	0(0)
1S-2	8(10,3)	2(2,6)	0(0)
2-2	18(23,1)	4(5,1)	1(1,3)
P-valores	0,652		
MPO –G463A	59(75,6)	16(20,5)	2(2,6)
GG	35(44,9)	8(10,3)	1(1,3)
GA	22(28,2)	5(6,4)	1(1,3)
AA	2(2,6)	3(3,8)	0(0)
P-valores	0,562		

Os p-valores foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis, usando o programa SPSS versão 17.0.

4.8. Estatística de populações do grupo total

Desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) continuou a ser observado apenas para o loco de Hp (**Tabela 28**), sendo este compatível com deficiência de heterozigotos ($p=0,0044$), onde observou-se também maior frequência do genótipo 1S-1S e menor frequência do genótipo 1S-2 em relação ao esperado.

Tabela 28: Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos de Hp e MPO -G463A (dbSNP rs2333227) no grupo total de pacientes com anemia falciforme, dados de diversidade genética e para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Alelos	Frequências alélicas	Genótipos	Número de indivíduos observados	Número de indivíduos esperados	Heterozigosidade observada (H _o)	Heterozigosidade Esperada (H _e)	Déficit de Heterozigotos (p-valor)	Excesso de Heterozigotos (p-valor)	Coefficiente de Endogamia Intrapopulacional (F _{IS})	Teste do EHW (p-valores)
Hp										
1F	0,231	1F-1F	4	4,0645						
1S	0,282	1F-1S	8	10,2194						
2	0,487	1S-1S	13	6,1032	0,4872	0,6299	0,0044	0,9956	0,2326	0,0016
		1F-2	20	17,6516						
		1S-2	10	21,5742						
		2-2	23	18,3871						
MPO										
G	0,753	GG	44	43,5948						
A	0,247	GA	28	28,8105	0,3590	0,3720	0,5065	0,7218	0,0283	0,7672
		AA	5	4,5948						

p<0,05 indica desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os dados foram gerados pelo programa estatístico Genepopweb versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>).

4.9. Testes de correlações

Nenhuma correlação foi encontrada entre os parâmetros gênero/grupos com e sem sobrecarga de ferro, gênero/faixa etária, gênero/genótipos MPO, faixa etária/grupos com e sem sobrecarga de ferro ou faixa etária/polimorfismos genéticos. Entretanto, houve uma correlação positiva entre gênero/genótipos Hp ($p=0,031$; coeficiente de contingência = 0,369), onde houve uma menor frequência de mulheres e maior frequência de homens 1S-1S em relação ao esperado, o oposto ocorrendo com 1F-1S (**Figura 18**).

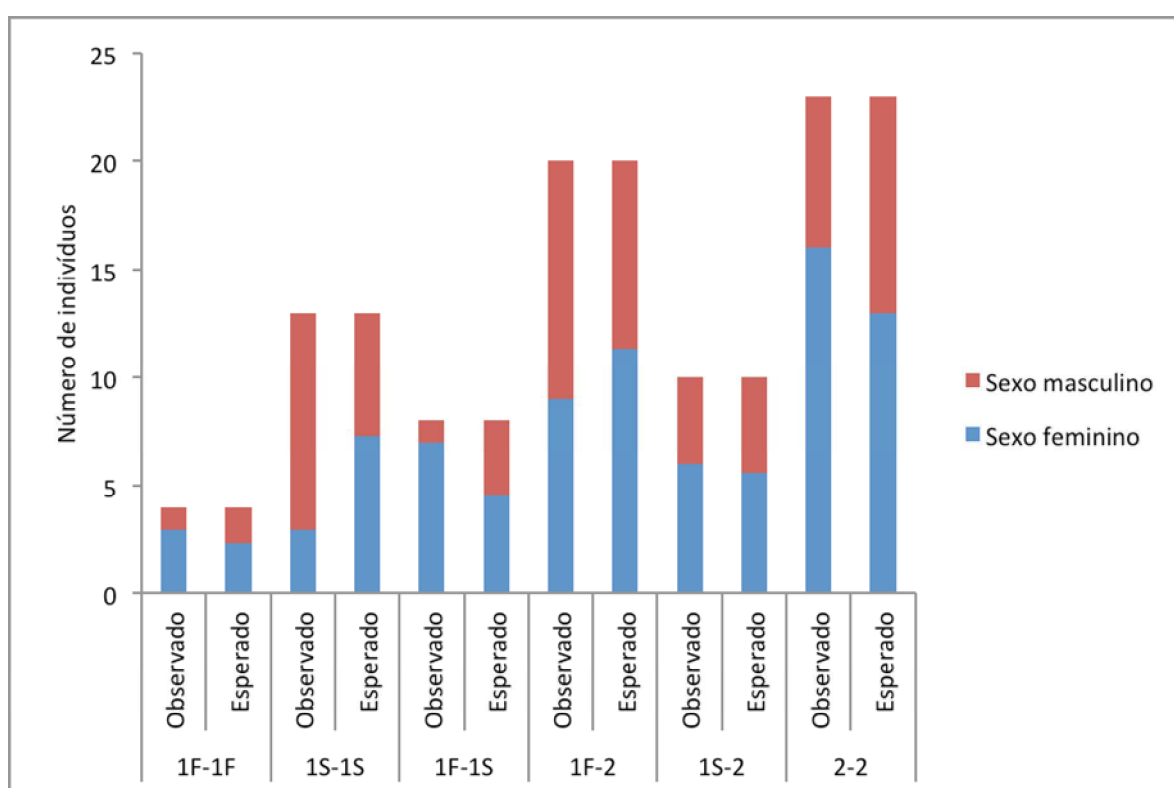


Figura 18: Número de indivíduos observado e esperado por gênero e genótipos de Hp.

Para os exames realizados, tratamentos adotados e comorbidades apresentadas, os resultados estatisticamente significativos pelo teste de correlação de Spearman são mostrados nas **Tabelas 29, 30 e 31**.

Para ferritina, houve correlação positiva com os valores de PCR, número de transfusões, número de exsanguíneo e uso de quelante, enquanto correlação negativa foi encontrada para o número de hemácias, hemoglobina e hematócrito. Esses resultados indicaram que quanto maior os valores de ferritina, maiores tendem a ser os valores de PCR, número de transfusões, número de exsanguíneo e uso de quelante, o inverso ocorrendo com os demais exames citados.

Tabela 29: Correlação dos valores de ferritina com PCR, hemácias, hematócrito, número de transfusões, número de exsanguíneo e o uso de quelante.

	Ferritina	
	Coefficiente de correlação de Spearman	p-valor
PCR	0,307	0,006
Hemácias	-0,354	0,001
Hemoglobina	-0,279	0,013
Hematócrito	-0,302	0,007
Número de transfusões	0,473	0,000
Número de exsanguíneo	0,259	0,022
Uso de quelante	0,262	0,020
Internações por AVC	0,252	0,026
Sequelas por AVC	0,332	0,003

Para PCR, a única correlação encontrada foi com o número de internações por crises de dor, a qual foi positivamente correlacionada ($p=0,031$; coeficiente de correlação de Spearman = 0,244).

Entre os parâmetros do eritrograma, o VCM foi negativamente correlacionado com leucócitos totais ($p=0,000$; coeficiente de correlação de Spearman= $-0,401$) e positivamente correlacionado com plaquetas ($p=0,000$; coeficiente de correlação de Spearman= $0,611$). Além disto, VCM ($p=0,004$; coeficiente de correlação de Spearman = $0,323$) e HCM ($p=0,000$; coeficiente de correlação de Spearman = $0,390$) foram positivamente

corelacionados ao tratamento com hidroxíureia, indicando que pacientes tratados com hidroxíureia tenderam a ter maiores valores de VCM e HCM.

Em relação aos valores dos exames laboratoriais e comorbidades, foi encontrada uma correlação negativa entre hemoglobina e sequelas por AVC ($p=0,040$; coeficiente de correlação de Spearman= $-0,233$), indicando que quanto maiores os valores de hemoglobina, menos sequelas por AVC.

Para o número de transfusões, houve correlação positiva com número de exsanguíneo, o uso de quelante, internação por priapismo, internação por AVC, sequelas por AVC e úlcera de membros inferiores, enquanto correlação negativa foi encontrada com o número de internações ao longo da vida (**Tabela 30**).

Tabela 30: Correlação do número de transfusões com número de exsanguíneo, o uso de quelante, internação por priapismo, internação por AVC, sequelas por AVC e número de internações ao longo da vida.

	Número de transfusões	
	Coeficiente de correlação de Spearman	p-valor
Número de exsanguíneo	0,733	0,000
Uso de quelante	0,345	0,002
Número de internações ao longo da vida	-0,240	0,034
Internação por priapismo	0,230	0,043
Internação por AVC	0,395	0,000
Sequelas por AVC	0,411	0,000
Úlcera de membros inferiores	0,268	0,018

Para os genótipos de Hp, correlação positiva foi encontrada com os valores de ferritina ($p=0,035$; coeficiente de correlação de Spearman= $0,239$), tratamento com hidroxíureia ($p=0,031$; coeficiente de contingência= $0,369$), internação por AVC ($p=0,023$; coeficiente de contingência = $0,379$) e sequelas por AVC ($p=0,031$; coeficiente de

contingência = 0,368). Para hidroxíureia, houve uma maior frequência de não uso em relação ao esperado para o genótipo 1F-1F, o contrário ocorrendo com o genótipo 2-2 (**Figura 19**).

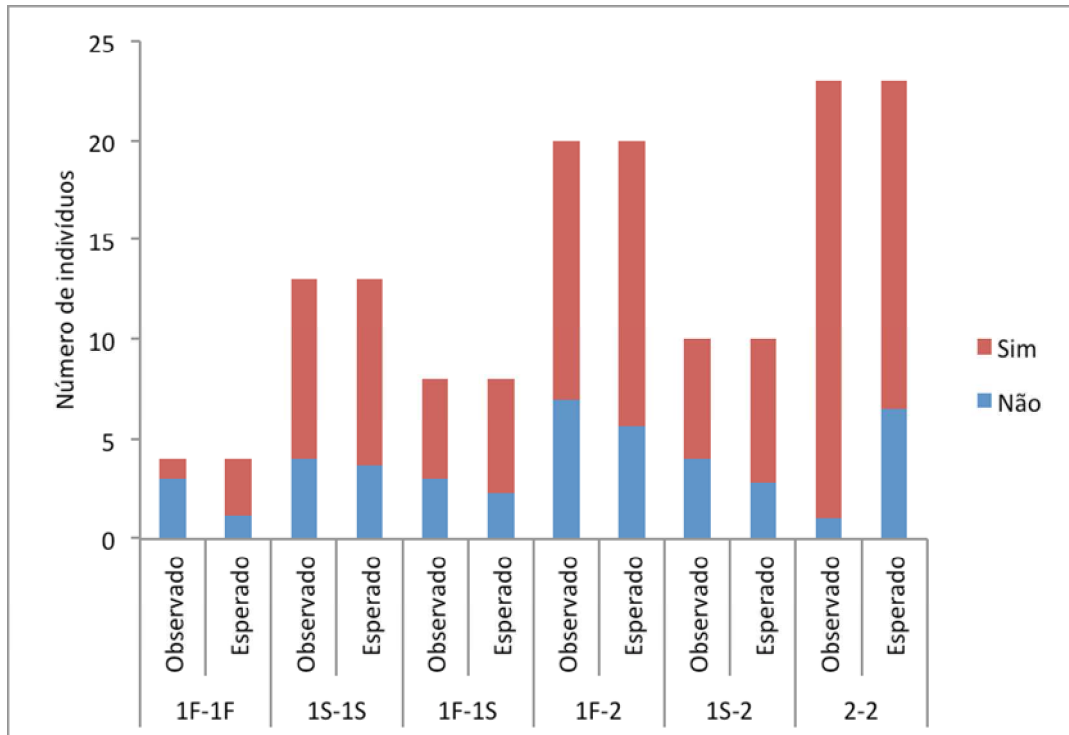


Figura 19: Número de indivíduos observado e esperado por genótipos de Hp e tratamento com hidroxíureia.

Para interação por AVC, apenas o genótipo 1S-2 apresentou uma maior frequência de interações em relação ao esperado (**Figura 20**).

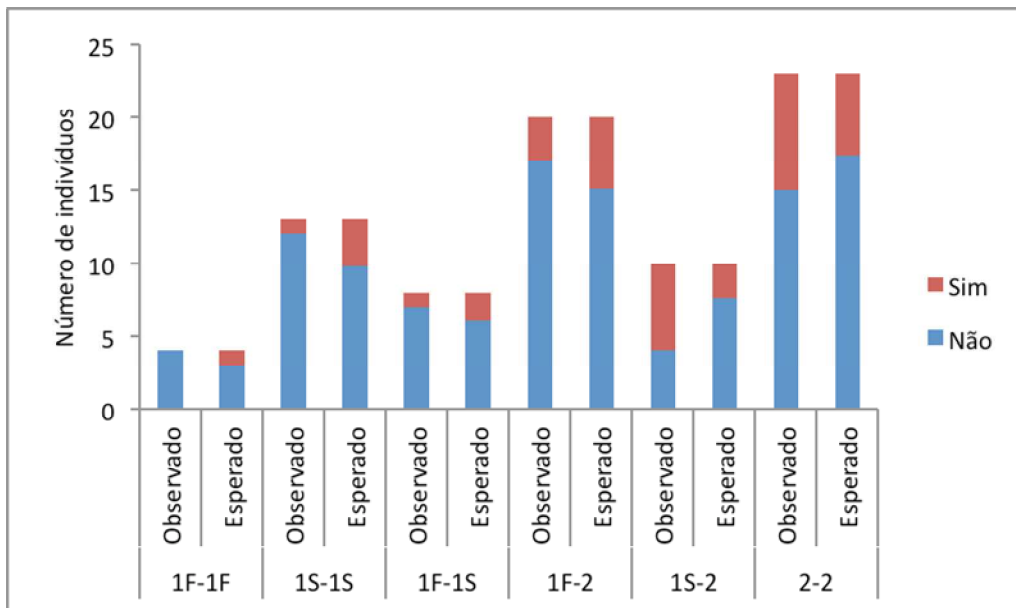


Figura 20: Número de indivíduos observado e esperado por genótipos de Hp e interações por AVC.

Para sequelas por AVC, apenas os genótipos 1F-1S e 2-2 tiveram frequências observadas e esperadas semelhantes (**Figura 21**).

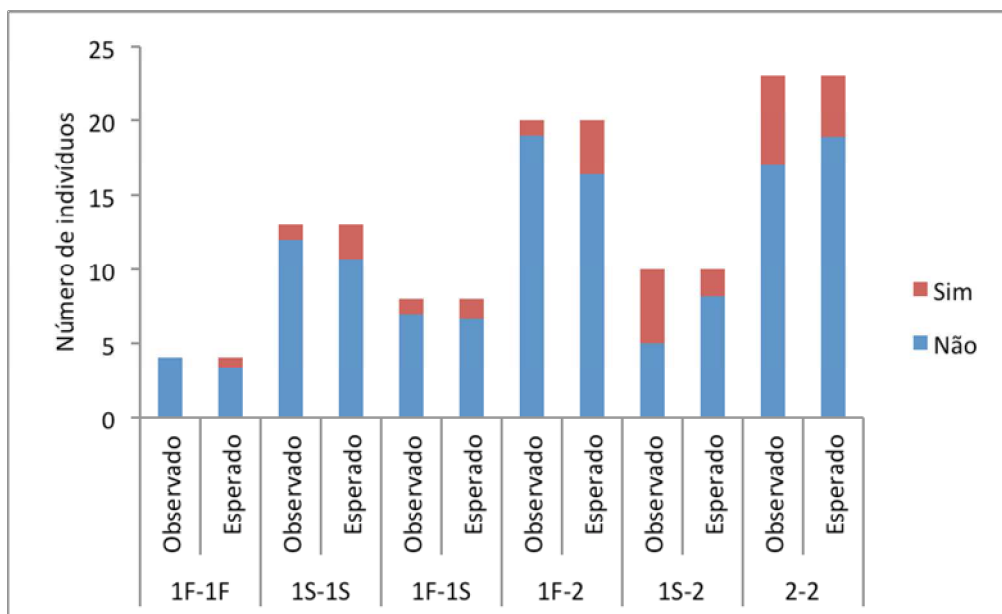


Figura 21: Número de indivíduos observado e esperado por genótipos de Hp e sequelas por AVC.

Para MPO, houve correlação positiva com o número de internações no último ano ($p=0,049$; coeficiente de contingência= $0,332$) e esplenectomia ($p=0,024$; coeficiente de contingência= $0,297$). Para o número de internações no último ano, o genótipo GG apresentou menor frequência para o intervalo >3 do que o esperado, o mesmo ocorrendo com GA em relação ao intervalo de 1–3, enquanto o genótipo AA apresentou maior frequência de 1–3 internações e ausência de zero internações em relação ao esperado (**Figura 22**).

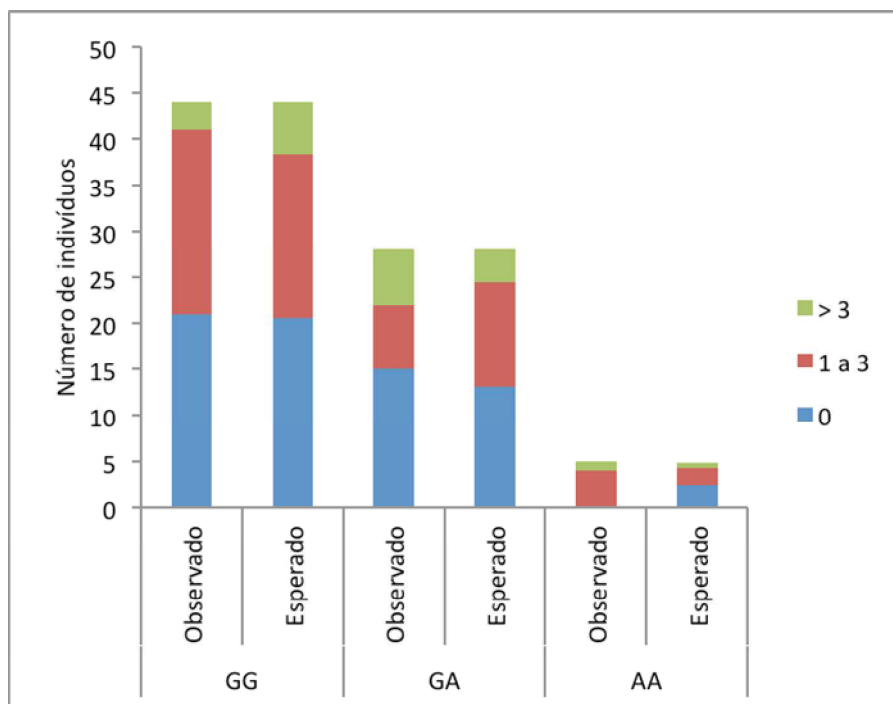


Figura 22: Número de indivíduos observado e esperado por genótipos de MPO e número de internações no último ano.

Em relação à esplenectomia, enquanto o genótipo GG apresentou menor frequência, o genótipo AA mostrou maior frequência do que o esperado (**Figura 23**).

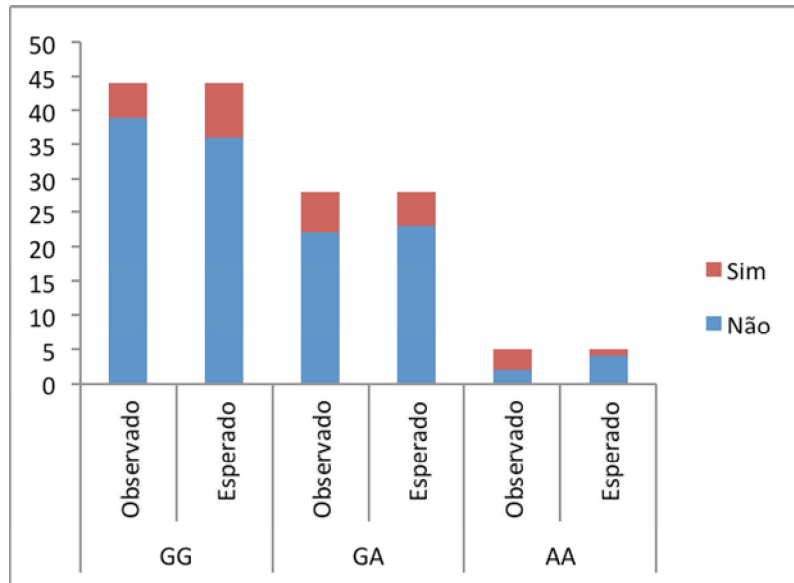


Figura 23: Número de indivíduos observado e esperado por genótipos de MPO e esplenectomia.

4.10. Odds Ratio (Razão de Chances)

Indivíduos com leucócitos totais acima de $11.000/\text{mm}^3$ apresentaram 3,5 vezes mais chance de apresentarem contagem de plaquetas acima de $480.000/\text{mm}^3$, já aqueles com plaquetas acima de $480.000/\text{mm}^3$ tiveram 10 vezes mais chance de terem de 1–3 internações nos últimos 12 meses. Considerando os gêneros, indivíduos do sexo masculino com valores elevados de ferritina ($>290,0 \mu\text{g/L}$) tiveram 8 vezes menos chance de apresentarem contagem de plaquetas acima de $480.000/\text{mm}^3$, enquanto mulheres com ferritina acima de $170 \mu\text{g/L}$ tiveram 22,2 vezes menos chance de terem internações por necrose asséptica da cabeça do fêmur (**Tabela 31**).

Quando analisados os genótipos da Hp, indivíduos 1F-1F apresentaram 8,25 vezes mais chance de terem mais de 3 internações nos últimos 12 meses do que aqueles que apresentaram outros genótipos; indivíduos 1F-1S apresentaram 4,38 vezes mais chances de serem internados por necrose asséptica da cabeça do fêmur que os demais; e aqueles com genótipo 1F-2, 3,95 vezes menos chances de serem submetidos à colecistectomia. Já os indivíduos 1S-2 apresentaram 6,34, 6,55 e 8,25 vezes mais chance de terem, respectivamente, internações por AVC, sequelas por AVC e de 4 a 6 crises álgicas (de dor) severas nos últimos

12 meses do que indivíduos que apresentaram outros genótipos. Por fim, indivíduos que apresentaram genótipo 2-2 tiveram 3,19 vezes mais chance de exibir um valor de leucócitos totais acima de 11.000/mm³ (**Tabela 32**).

Na análise dos genótipos da MPO, observou-se que indivíduos GA apresentaram 2,88 vezes menos chance de ter de 1–3 internações nos últimos 12 meses do que aqueles que portadores de outros genótipos. Já os indivíduos AA apresentaram 1,89 vezes menos chance de não sofrer crise álgica nos últimos 12 meses e 8,31 vezes mais chance de precisar ser submetido à esplenectomia (**Tabela 32**).

Contudo, para alguns parâmetros, observou-se que houve uma grande amplitude nos intervalos de confiança, o que provavelmente evidencia uma grande variabilidade entre os pacientes em relação às variáveis em análise.

Tabela 31: Odds Ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC) para exames laboratoriais e comorbidades.

Comparações entre exames e comorbidades	OR (IC de 95%)	p-valor
Leucócitos totais e Número de internações (1 a 3) nos últimos 12 meses	0,238 (0,078-0,727)	0,009
Ferritina homens e Plaquetas	0,125 (0,023–0,682)	0,010
Plaquetas e Número de internações (1 a 3) nos últimos 12 meses	10,059 (0,982-103,083)	0,020
Ferritina Mulheres e Internações por Necrose Asséptica de Cabeça de Fêmur	0,045 (0,004-0,480)	0,001

Os p-valores foram gerados pelo teste de correlação do qui-quadrado (χ^2) de Pearson, usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 17.0.

Tabela 32: Odds Ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC) para os genótipos de Hp e MPO, exames laboratoriais e comorbidades.

Marcador Genético	Comparações entre genótipo, exames e comorbidades	OR (IC de 95%)	p-valor
Haptoglobina	1F-1F e Número de internações (> que 3) nos últimos 12 meses	8,250 (1,018–66,888)	0,022
	1S-1S e Internação por priapismo	5 (0,970–25,771)	0,045
	1F-1S e Internação por necrose asséptica da cabeça do fêmur	4,385 (0,967–19,871)	0,041
	1F-2 e Colectomia	0,253 (0,081–0,788)	0,014
	1S-2 e Internação por AVC	6,346 (1,562–25,790)	0,005
	1S-2 e Sequelas por AVC	6,556 (1,578–27,237)	0,005
	1S-2 e Crises de dor severas (4 a 6) nos últimos 12 meses	8,250 (1,018–66,888)	0,022
	2-2 e Leucócitos totais	3,195 (1,154–8,847)	0,022
Mieloperoxidase	GA e Número de internações (1 a 3) nos últimos 12 meses	0,347 (0,125–0,965)	0,039
	AA e Sem crises de dor nos últimos 12 meses	0,528 (0,424–0,657)	0,040
	AA e Esplenectomia	8,318 (1,243–55,664)	0,012

Os p-valores foram gerados pelo teste de correlação do qui-quadrado (χ^2) de Pearson, usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 17.0.

4.11. Análises da interação entre os polimorfismos de Hp e MPO (-G463A, dbSNP rs2333227) nos valores dos exames realizados.

Considerando-se o grupo total de pacientes, os resultados de MANOVA indicaram que não houve interação entre os polimorfismos de Hp e MPO nos exames realizados. Porém, quando considerada a estratificação em grupos com e sem sobrecarga de ferro, efeitos significativos foram mostrados apenas no grupo sem sobrecarga para o polimorfismo de Hp nos valores de PCR-us ($p=0,000$) e transfusão ($p=0,018$), o mesmo ocorrendo em relação ao polimorfismo de MPO nos valores de PCR-us ($p=0,000$), e para a interação entre Hp/MPO também nos valores de PCR-us ($p=0,000$). Diferenças significativas nas comparações 2-a-2 do grupo sem sobrecarga foram particularmente observadas entre os genótipos de MPO (teste de Bonferroni) para os valores de PCR-us entre GG e AA e entre GA e AA ($p=0,000$ para ambos).

5. DISCUSSÃO

Para que os resultados obtidos em uma amostra possam ser generalizados para uma população, a amostra deve ser representativa desta população. Assim, a melhor maneira de se obter uma amostra representativa é empregar um procedimento aleatório para a seleção dos indivíduos (CALLEGARI-JACQUES, 2003), uma vez que algumas amostras coletadas por conveniência podem não representar adequadamente toda a população do estudo (MIOT, 2011). No entanto, apesar de este estudo ter sido conduzido com uma amostra de conveniência, esta foi composta por pacientes atendidos no HBDF, o qual faz parte da rede de assistência do Sistema Único de Saúde (SUS) e caracteriza-se como hospital terciário, ou seja, centro de referência para diagnósticos e tratamento das doenças hematológicas em pacientes adultos do Distrito Federal e entorno, atendendo a uma grande região geoeconômica. Sendo assim, nossa amostra pode ser considerada como representativa da população em estudo. Além disso, para pacientes nascidos fora do Distrito Federal e áreas do entorno, a maior frequência observada do nordeste, a menor frequência do sudeste e nenhuma representação do sul já eram esperadas. Isto porque, embora a anemia falciforme seja a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil, a distribuição do gene da HbS é bastante heterogênea, dependendo da composição negroide ou caucasóide da população (CANÇADO e JESUS, 2007). Visto que a anemia falciforme ocorre predominantemente entre afrodescendentes, a prevalência de heterozigotos para HbS no Brasil é maior no norte e nordeste (6% a 10%), do que no sul e sudeste a prevalência é menor (2% a 3%) (CANÇADO e JESUS, 2007).

Uma vez que a ferritina sérica é uma medida não invasiva utilizada para monitorar a carga de ferro (ADAMKIEWICZ *et al.*, 2009), os níveis maiores de ferritina observados para o grupo com sobrecarga em relação ao grupo sem sobrecarga já eram esperados. Sendo a anemia hemolítica crônica uma das manifestações clínicas mais típicas da anemia falciforme, cujo mecanismo patológico leva a manifestações cardiovasculares, pulmonares, gastrointestinais e renais (TAYLOR *et al.*, 2008), também já era esperado que o grupo com sobrecarga apresentasse uma tendência geral de queda na média (medida de tendência central) de hemácias e aumento do número de transfusões em relação ao grupo sem sobrecarga. Além disto, o HCM é calculado a

partir da quantidade média de Hb (em peso) dentro de uma hemácia, e células maiores (macrocíticas) tendem a geralmente apresentar mais Hb do que células menores (microcíticas) e valores mais elevados de HCM (ONOFREY *et al.*, 2005), corroborando os resultados de VCM e HCM do grupo total, gêneros e faixa etária de 21-39 anos nas comparações sem e com sobrecarga de ferro.

A hidroxiureia tem efeitos múltiplos sobre a linhagem eritrocitária, isto é, promove elevação no nível de HbF em cerca de 60% dos pacientes tratados, eleva a taxa de hemoglobina, do VCM e reduz o número de reticulócitos (SILVA e SHIMAUTI 2006), o que justifica os resultados de VCM e HCM correlacionando-se positivamente com o tratamento com hidroxiureia.

Estudos têm demonstrado que pacientes com anemia falciforme em transfusões de sangue regulares tiveram o curso clínico da doença melhorado, especialmente redução significativa no número de internações (CANÇADO, 2007), corroborando os resultados de correlação negativa entre o número de transfusões e número de internações até o momento. Assim, um número crescente de pacientes com anemia falciforme recebe transfusões crônicas de sangue para prevenção ou tratamento de complicações relacionadas à doença (ADAMKIEWICZ *et al.*, 2009). Com a transfusão crônica, os macrófagos e hepatócitos não conseguem reter todo o ferro em excesso, permitindo que o ferro permaneça no plasma em quantidades que excedem a capacidade de ligação com a transferrina, e atue como mediador de danos nos tecidos extra-hepáticos em sobrecarga de ferro transfusional (BRITTENHAM, 2011). Como resultado, esses pacientes necessitam de tratamento com exsanguíneo transfusão ou com agentes quelantes para evitar a lesão do tecido por sobrecarga de ferro (ADAMKIEWICZ *et al.*, 2009), corroborando os resultados de valores significativamente mais elevados de PCR-us para o grupo de faixa etária 40-59 anos em relação a 21-39 anos, dado que as sequelas decorrentes das manifestações clínicas são fatores de risco presumíveis para morbidade e mortalidade no envelhecimento da população com anemias hemolíticas (TAYLOR *et al.*, 2008).

A proteína C-reativa (PCR) é produzida no fígado em resposta ao estímulo das citocinas inflamatórias, e sua dosagem tem sido usada historicamente desde a década de 1970 no diagnóstico e monitoramento de infecção ou inflamação ativa (BAUMANN e GAULDIE, 1994; RIFAI *et al.*, 2003). Haja vista que a PCR-us foi desenvolvida para detectar níveis de PCR mais baixos, sendo muito mais sensível para o diagnóstico

(RIFAI *et al.*, 2003), isto também poderia explicar a correlação positiva encontrada neste estudo entre a PCR-us e o número de internações por crises de dor. A terapia com agentes quelantes, que formam um complexo com o ferro e promovem sua excreção, pode eliminar o ferro não ligado à transferrina, remover o excesso de ferro das células e manter ou voltar os níveis seguros de ferro no organismo (BRITTENHAM, 2011). Em alguns pacientes o tratamento com exsanguíneo transfusão pode reduzir ou eliminar a necessidade de quelante de ferro (BRITTENHAM, 2011). Isso justifica a correlação positiva encontrada neste estudo entre o número de transfusões e o tratamento com quelantes e exsanguíneo e também as correlações negativas entre o número de transfusões e o número de hospitalizações.

O programa de transfusão regular deve ser instituído tão logo seja confirmado o diagnóstico de infarto cerebral (ANGULO 2007). Vários métodos estão disponíveis, incluindo transfusão simples, exsanguíneo transfusão ou eritrocitaférese; o método utilizado depende de indicações específicas (VICHINSKY, 2001). Na fase aguda do AVC isquêmico, o tratamento com exsanguíneo transfusão é o procedimento ideal, preferencialmente dentro das primeiras seis horas do início dos sintomas (ANGULO 2007). Já para o tratamento de úlcera, alguns autores sugerem que a HbS deve ser reduzida a menos de 50% com transfusões periódicas por um período mínimo de seis meses (PALADINO 2007). O priapismo em pacientes com anemia falciforme foi classicamente atribuído a episódios de vaso-oclusão, secundários à deformação de hemácias contendo HbS (JESUS e DEKERMACHER 2009), estando também associado com marcadores de hemólise, juntamente com úlceras de membros inferiores (TAYLOR *et al.*, 2008). Tais fatos justificam a presença de correlação positiva entre o número de transfusões e hospitalização por priapismo e AVC, sequelas por AVC e úlcera de membros inferiores, uma vez que são necessárias maiores quantidades de transfusão para a diminuição da percentagem de HbS e estabilização do paciente.

As transfusões a longo prazo previnem a lesão endotelial causada pela anemia e hiperviscosidade em pacientes com AVC isquêmico. Sem transfusões crônicas, 2/3 dos casos sofrem recorrência. As transfusões devem ser mantidas até os 18 anos de idade, procurando respeitar os valores de hemoglobina de 12 g/dL (ANGULO 2007). O tratamento do AVC agudo exige oxigenioterapia, controles de pressão arterial, desidratação, hipotermia e hiperglicemia, além de suporte respiratório e transfusão que

reduz a anemia, viscosidade e concentração de HbS (ANGULO, 2007), o que explica a correlação negativa entre maiores níveis de hemoglobina e sequelas por AVC.

Fenômenos vaso-oclusivos e doença vascular subjacente são responsáveis por grande parte da morbidade em pacientes com anemia falciforme, e as plaquetas podem desempenhar um papel importante nesta doença vascular (WUN *et al.*, 1998). A este respeito, os resultados sugerem que no grupo sem sobrecarga os pacientes portadores do genótipo Hp2-2 poderiam ser mais propensos a apresentar eventos vaso-oclusivos que outros, principalmente do que aqueles com genótipo 1F-2, devido a sua contagem mais alta de plaquetas. Por outro lado, quando na presença de sobrecarga de ferro, o genótipo 2-2 apresentou valores menores de HCM e dentro dos limites de referência, mesmo com valores elevados de ferritina. Tendo em vista que hemácias falciformes perdem as suas propriedades elásticas, o que resulta num aumento da viscosidade do plasma (STOLTZ, 1985) e tendência das hemácias se agregarem (BECKER, 2008), e o CHCM desempenha um papel dominante no comportamento reológico das hemácias desoxigenadas (KAUL e LIU, 1999), os valores maiores de ferritina e menores de CHCM para Hp2-2 sugerem a possibilidade de este genótipo poder apresentar menor alteração da reologia do sangue em relação aos outros genótipos quando na presença de sobrecarga de ferro. Entretanto, o desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) sugeriu uma possível existência de seleção natural desfavorecendo o genótipo 1S-2 entre os pacientes com anemia falciforme. Como o desvio do EHW pode ser explicado por seleção natural ou pela mistura étnica recente (SERRE e HUDSON, 2006), e a última não é o caso da nossa população, e genes sob seleção positiva são pensados ter um importante papel na sobrevivência humana e afetar fenótipos complexos de relevância médica (BARREIRO *et al.*, 2008), os resultados do Odds Ratio sugeriram que o desfavorecimento do genótipo 1S-2 poderia estar relacionado principalmente ao aumento de chances de hospitalização e sequelas por AVC. Sendo assim, nossos resultados sugerem que a associação reportada entre o fenótipo Hp1-1 e anemia falciforme (SADRZADEH e BOZORGMEHR, 2004) precisa ser melhor investigada. Os resultados dos exames laboratoriais corroboram outros estudos que indicam que os alelos Hp*^l não podem ser tratados como um único bloco em estudos de associação, porque existem diferenças nas respostas biológicas entre eles, especialmente aquelas que envolvem o estresse oxidativo (MOREIRA *et al.*, 2009; AKIMOTO *et al.*, 2010; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2011).

A haptoglobina e os receptores CD163 de monócitos e macrófagos coordenam a remoção de Hb quando esta é liberada das hemácias senescentes ou durante a hemólise (ALAYASH, 2011), mas existem diferenças funcionais entre as proteínas Hp correspondentes aos diferentes fenótipos, incluindo velocidade de acesso aos espaços extravasculares (maior para Hp1-1 pelo menor tamanho), de remoção do complexo Hp-Hb pelo receptor do macrófago (a interiorização do Hp1-1-Hb é mais rápida) e nas atividades de imunomodulação (ASLEH *et al.*, 2003; CARTER e WORWOOD, 2007). Além disto, apesar de ter sido demonstrado que a estequiometria da reação de ligação Hp-Hb é igual para Hp1-1 e Hp2-2 (MELAMED-FRANK *et al.*, 2001), também tem sido relatado que alelos Hp^{*1} diferem nos seus efeitos protetores contra danos oxidativos, sugerindo que o produto do alelo Hp^{*1F} poderia se ligar mais eficientemente na Hb ou no receptor CD163 do que os produtos dos outros alelos (MOREIRA *et al.*, 2009), o que poderia explicar a frequência mais alta de não usuários de hidroxiureia com genótipo Hp1F-1F encontrada no presente estudo, mas não o aumento de chances de >3 internações no último ano. Como as frequências de Hp^{*1} e Hp^{*2} variam entre populações em todo o mundo dependendo da origem étnica, e também há uma diferença significativa na distribuição dos alelos e Hp^{*1F} e Hp^{*1S} (CARTER e WORWOOD, 2007), isto poderia justificar esses resultados aparentemente contraditórios, uma vez que a população brasileira é miscigenada e esta miscigenação pode influenciar a distribuição de certos polimorfismos (LORDELO *et al.*, 2012).

O pequeno tamanho da molécula de Hp1-1 permite que esta proteína se difunda no fluido intersticial cerebral mais prontamente do que nos outros subtipos Hp, protegendo assim os seus portadores contra consequentes convulsões (WOBETO *et al.*, 2008). Experimentos com Hp purificadas também demonstraram que o fenótipo Hp1-1 confere maior proteção contra o dano oxidativo *in vitro*, enquanto o fenótipo Hp2-2 remove ferro para o espaço extravascular mais lentamente, porque é uma molécula maior, ao passo que Hp2-1 tem tamanho e atividade antioxidante intermediários (ADEKILE e HAIDER, 2010). Além disto, as concentrações totais de Hp também variam de acordo com o fenótipo, sendo menor para indivíduos Hp2-2 do que para Hp1-1 e 2-1 (CARTER e WORWOOD, 2007). Por outro lado, a haptoglobina possui propriedades imunorregulatórias, com indivíduos Hp2-2 mostrando maior reatividade imunológica (incluindo maior produção de anticorpos após a vacinação) que indivíduos Hp1-1 e Hp2-1 (WOBETO *et al.*, 2008). Assim, podemos entender os resultados de

indivíduos 2-2 apresentarem 3,19 vezes mais chance ter valores de leucócitos totais aumentados e também uma maior frequência de uso de hidroxíureia. Também, considerando todas as informações acima e as possíveis diferenças previamente mencionadas entre os alelos Hp^{*1F} e Hp^{*1S}, é possível compreender os resultados de pacientes 1S-1S apresentarem 5 vezes maior chance de internações por priapismo e indivíduos 1F-1S apresentarem 4 vezes maior chance de necrose asséptica de cabeça de fêmur, enquanto indivíduos 1F-2 apresentam 3,9 menos chance de sofrerem colecistectomia.

Tem sido demonstrado em estudos animais que a infusão de Hb complexado com Hp previne a lesão tecidual induzida por Hb, sugerindo que este mecanismo de proteção pode ser explorado para amenizar a toxicidade associada com a Hb livre, quando utilizado como agente terapêutico nas anemias hemolíticas (ALAYASH, 2011). Embora esta sugestão nos faça pensar primeiramente neste tipo de terapia para pacientes que sofrem com sobrecarga de ferro, nossas análises de interação mostraram efeitos significativos entre os indivíduos para o polimorfismo de Hp nos valores de PCR-us e transfusão, e para a interação entre os polimorfismos Hp/MPO nos valores de PCR-us, porém apenas no grupo sem sobrecarga. Esses resultados aparentemente conflitantes ressaltam a importância do presente estudo para um melhor entendimento do significado biológico do polimorfismo de Hp na variabilidade clínica e resposta aos tratamentos de indivíduos falcêmicos na nossa população. Além disso, também sugerem a necessidade de estudos que avaliem uma possível associação entre os subtipos Hp1-1 com anemia falciforme em várias etnias, particularmente na América do Sul e África, onde a frequência do alelo Hp^{*1F} é maior (MIRANDA-VILELA e LORDELO, 2013).

Em relação à MPO, como previamente mencionado na introdução, o alelo selvagem (G) contém sítio de ligação para o fator de transcrição SP1, enquanto o alelo variante (A) conduz à perda deste sítio e cria um sítio de ligação com o receptor alfa de estrógeno, o que provoca redução da expressão de MPO e pode contribuir com diferenças entre os sexos (REYNOLDS *et al.*, 2000; REYNOLDS *et al.*, 2002). Nossos resultados corroboram estas informações, mas apenas para o grupo com sobrecarga, haja vista que as diferenças entre os genótipos foram encontradas para PCR e plaquetas apenas no sexo feminino deste grupo, apesar de não haver diferenças nas frequências genotípicas entre os grupos sem e com sobrecarga para ambos os polimorfismos analisados.

As principais causas da vulnerabilidade a infecções no paciente falcêmico são a asplenia e a hipóxia tecidual facilitando locais de foco de infecção (BRAGA, 2007). Isto é devido ao fato de que as crises vaso-oclusivas recorrentes resultam em atrofia do baço, com conseqüente redução na sua função, especialmente na opsonização de organismos encapsulados; falha na função de leucócitos é outro dos defeitos imunológicos observados em pacientes com doença falciforme. A adesão anormal das hemácias falciformes ao endotélio vascular mantém baixos níveis de inflamação, mas constante, evoluindo a baixos níveis de isquemia do tecido (LOGGETTO *et al.*, 1999). Deste modo, e considerando que o polimorfismo MPO –G463A parece ter um papel importante na susceptibilidade de indivíduos falcêmicos à infecção (Costa *et al.*, 2005), onde o alelo variante A foi ligado a uma deficiência da MPO (REYNOLDS *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2005), os resultados do Odds Ratio e teste de correlação sugerem que a homozigose AA poderia potencializar os efeitos da asplenia. Isto porque, apesar do pequeno tamanho amostral de indivíduos AA, esses apresentaram 8,31 vezes mais chance de precisarem ser submetidos à esplenectomia, menor chance de não apresentar crises de dor, maior frequência de 1–3 internações e ausência de zero internações em relação ao esperado. Tal tamanho amostral reduzido também justificaria o grande intervalo de confiança e a falta de correlação e de chance relativa de risco aumentado para infecções. Apesar do fato de que para os pacientes sem hemoglobinopatias foi relatado que as deficiências na atividade bactericida de células deficientes em MPO são suaves, e não parecem aumentar a susceptibilidade à infecção bacteriana (PARRY *et al.*, 1981), tendo em vista as alterações imunológicas ocorridas em pacientes com anemia falciforme, a deficiência de MPO para esses pacientes provavelmente poderia ter efeitos mais graves, principalmente para aqueles com sobrecarga de ferro, devido a rápida multiplicação de bactérias no sangue ocasionada pelos altos níveis de ferro circulante (BRAGA *et al.*, 2007). Isso poderia explicar os resultados do grupo total com níveis de PCR-us significativamente mais elevados para os indivíduos AA do que GG ou GA, e também aqueles resultados encontrados para o grupo sem sobrecarga de ferro nas análises de interação, onde foram observadas diferenças significativas entre AA e GG e entre AA e GA para PCR-us.

6. CONCLUSÕES

Nas comparações entre os grupos com e sem sobrecarga, e nas condições em que o trabalho foi realizado, foi possível concluir que:

- Tanto para Hp quanto para MPO nenhuma diferença significativa foi observada nas frequências genóticas dos grupos com e sem sobrecarga.
- Apesar da grande exposição ao ferro, os resultados do teste do cometa não apresentaram diferenças significativas. Porém as células analisadas no teste (leucócitos do sangue periférico) não são células-alvo que sofrem danos diretos do excesso de ferro. Assim não foi possível concluir que essa condição não mostra fragilidade no genomas.
- Desvio significativo no equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi observado em ambos os grupos (com e sem sobrecarga) apenas para o polimorfismo de Hp, sendo este significativo para deficiência de heterozigotos, onde houve maior frequência do genótipo 1S-1S e menor frequência do genótipo 1S-2 em relação ao esperado.
- Efeitos significativos da interação entre Hp/MPO foram observados apenas nos valores de PCR-us do grupo sem sobrecarga.
- Os resultados das estatísticas F e do teste de diferenciação genética indicaram que as amostras dos grupos com e sem sobrecarga eram homogêneas, não havendo diferenciação genética dos grupos. Assim, a amostra de pacientes pôde ser tratada estatisticamente como uma única amostra (sem estratificação em grupos com e sem sobrecarga).

Considerando o grupo de pacientes como um todo, sem estratificação em com e sem sobrecarga, podemos concluir que:

- Nenhuma diferença foi encontrada na distribuição das frequências genóticas de ambos os marcadores para o grupo total, gêneros ou faixas etárias.
- Para os valores dos exames realizados, nenhuma diferença significativa foi observada entre os gêneros ou genótipos de Hp; enquanto os valores de PCR

mostraram diferenças entre as faixas etárias do grupo de 21-39 e 40-59 anos e entre os genótipos MPO AA e GG e AA e GA.

- Não houve diferença significativa nas frequências da distribuição dos genótipos de ambos os polimorfismos por gêneros ou faixas etárias, porém desvio significativo no EHW continuou a ser observado para Hp, sugerindo uma possível existência de seleção natural desfavorecendo 1S-2 do gene da Hp. O resultado do Odds Ratio sugeriu a possibilidade de que o aumento de chance de hospitalização e sequelas por AVC poderiam estar associados com a menor frequência observada no genótipo 1S-2 em relação ao esperado.
- Associações de genótipos específicos de Hp com outras comorbidades também foram encontrados, corroborando outros relatos de que os subtipos Hp1-1 não podem ser tratados como um único bloco, devido às diferenças biológicas entre eles.
- As correlações positivas encontradas entre o genótipo AA da MPO e internações nos últimos 12 meses e esplenectomia e os resultados do Odds Ratio sugeriram que a presença deste genótipo poderia potencializar os efeitos da asplenia em indivíduos falcêmicos.

Em síntese, nossos resultados ressaltam a importância do presente estudo para um melhor entendimento do significado biológico dos polimorfismos de Hp e MPO na variabilidade clínica e resposta aos tratamentos de indivíduos falcêmicos na nossa população.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMKIEWICZ, T. V.; ABOUD M. R.; PALEY C.; OLIVIERI N.; KIRBY-ALLEN M.; VICHINSKY E. Serum ferritin level changes in children with sickle cell disease on chronic blood transfusion are nonlinear and are associated with iron load and liver injury. **Blood**, v. 114, n. 21, p. 4632-4638, 2009.

ADEKILE, A. D.; HAIDER, M. Z. Haptoglobin gene polymorphisms in sickle cell disease patients with different β S-globin gene haplotypes. **Medical Principles and Practice**, v. 19, n. 6, p. 447-450, 2010.

AKIMOTO, A. K.; MIRANDA-VILELA A.; ALVES P.; PEREIRA L.; LORDELO G.; HIRAGI C. Evaluation of gene polymorphisms in exercise-induced oxidative stress and damage. **Free Radical Research**, v. 44, n. 3, p. 322-331, 2010.

ALAYASH, A. I. Haptoglobin: Old protein with new functions. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 7, p. 493-498, 2011.

AMER, J.; GHOTI H.; RACHMILEWITZ E.; KOREN A.; LEVIN C.; FIBACH E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **British journal of haematology**, v. 132, n. 1, p. 108-113, 2006.

ANGULO, I. L. Acidente vascular cerebral e outras complicações do sistema nervoso central nas doenças falciformes; Stroke and other vascular complications of the central nervous system in sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 262-267, 2007.

ARATANI, Y.; KURA, F.; WATANABE, H.; AKAGAWA, H.; TAKANO, Y.; ISHIDA-OKAWARA, A.; SUZUK, K.; MAEDA, N.; KOYAMA, H. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defence against *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 1291-1299, 2006.

ASLEH R.; MARSH S.; SHILKRUT M.; BINAH O.; GUETTA J.; LEJBKOWICZ F. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to

diabetic cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 92, n. 11, p. 1193-1200, 2003.

BARBOSA M. C.; SANTOS T. E. J.; SOUZA G. F.; ASSIS L. C.; FREITAS M. V. C.; GONÇALVES R. P. Impact of iron overload on interleukin-10 levels, biochemical parameters and oxidative stress in patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. 1, p. 29-34, 2013.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BARREIRO L. B.; LAVAL G.; QUACH H.; PATIN E.; QUINTANA-MURCI L. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. **Nature Genetics**, v. 40, n. 3, p. 340-345, 2008.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, n. 2, p. 74-80, 1994.

BECKER P. S. The hemolytic anemias. **Intensive Care Medicine**, p. 1385-91, 2008.

BELINI JUNIOR E.; SILVA D. G. H.; SOUZA L. T.; ALMEIDA E. A.; CANCADO R.D.; CHIATTONE C. Oxidative stress and antioxidant capacity in sickle cell anaemia patients receiving different treatments and medications for different periods of time. **Annals of Hematology**, v. 91, n. 4, p. 479-489, 2012.

BRAGA, J. A. P. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes; General measures in the treatment of sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n.3, p. 233-238, 2007.

BREUER, W.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z. I. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. **Transfusion Science**, v. 23, n. 3, p. 185-192, 2000.

BRITTENHAM, G. M. Iron-chelating therapy for transfusional iron overload. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 2, p. 146-156, 2011.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística** – Princípios e Aplicações. Porto Alegre/RS: Artmed Editora S.A., 2003. 255 p.

CANÇADO, R. D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 316-326, 2007.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 204-206, 2007.

CARTER, K.; WORWOOD, M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 29, n. 2, p. 92-110, 2007.

CHU H.; WANG M.; WANG M. GU D.; WU D.; ZHANG Z. The MPO- 463G> A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 43 case-control studies. **Mutagenesis**, v. 25, n. 4, p. 389-395, 2010.

COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 336, n. 1, p. 69-77, 1995.

COSTA R. N.; CONRAN N.; ALBUQUERQUE D. M.; SOARES P. H.; SAAD S. T.; COSTA F. F. Association of the G-463A myeloperoxidase polymorphism with infection in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 90, n. 7, p. 977-979, 2005.

CRICHTON, R. R.; Wilmet, S.; Legssyer, R.; Ward, R. J. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 91, n. 1, p. 9-18, 2002.

DINIZ D.; GUEDES C.; BARBOSA L. B.; TAUIL P.L.; MAGALHÃES Í. Prevalência do traço e da anemia falciforme em recém-nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 188-194, 2009.

DOMENICO D.; Ward D. M.; Kaplan, J. Hcpidin regulation: ironing out the details. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 7, p. 1755-1758, 2007.

EATON J.; BRANDT P.; MAHONEY, L. J. Haptoglobin: a natural bacteriostat. **Science**, v. 215, n. 4533, p. 691-693, 1982.

ESPORCATTE R, REY H. C.; RANGEL F. O.; ROCHA R. M.; MENDONÇA FILHO H. T.; DOHMANN H. F.; ALBANESI FILHO F. M. Predictive value of myeloperoxidase to identify high risk patients admitted to the hospital with acute chest pain. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, n. 6, p. 377-384, 2007.

FIELD, A. **Descobrimdo a estatística usando o SPSS**. 2ª Ed, Porto Alegre/RS, Artmed Editora S.A., 2009.

FLEMING, R. E.; PONKA, P. Iron overload in human disease. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 4, p. 348-359, 2012.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. supl. 2, p. 8-17, 2010.

CASTIÑEIRAS, S. G. Iron, the retina and the lens: A focused review. **Experimental Eye Research**, v. 90, n. 6, p. 664-678, 2010.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 5, 2012.

GISBERT J. P. Second-line rescue therapy of helicobacter pylori infection. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**. n. 2, n.6, p. 331-56, 2009.

GIMENEZ, R.; UGRINOWITSCH, H. Iniciação esportiva para crianças de segunda infância. **ConScientiae Saúde** 1 : 53-60, 2002.

GUIMARÃES, T. M. R.; MIRANDA, W. L.; TAVARES, M. M. F. O cotidiano das famílias de crianças e adolescentes portadores de anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 9-14, 2009.

HEBBEL, R. P.; Eaton, J.W.; Balasingam, M.; Steinberg, M.H. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 70, n. 6, p. 1253, 1982.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry**: Role of free radicals. In: Storey KB (ed) **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Hoboken, New Jersey, p. 319-368, 2004

JESUS, L. E.; DEKERMACHER, S. Priapismo em crianças: revisão de fisiopatologia e tratamento. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 3, p. 194-200, 2009.

KATAKAMI N.; MATSUHISA, M.; KANETO, H.; MATSUOKA, T.; SAKAMOTO, K.; YASUDA, T.; UYAHARA, Y. KOSUGI, K.; YAMASAKI, Y. Serum endogenous secretory RAGE level is an independent risk factor for the progression of carotid atherosclerosis in type 1 diabetes. **Atherosclerosis** v. 204, n. 1, p. 288-292, 2009.

KAUL, D. K.; LIU, X-d. Rate of deoxygenation modulates rheologic behavior of sickle red blood cells at a given mean corpuscular hemoglobin concentration. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 21, n. 2, p. 125-135, 1999.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KRUSKAL, W.H.; WALLIS, W.A. Use of ranks in one criterion variance analysis. **Journal of the American statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583-621, 1952.

KRUSZEWSKI, M. The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. **Acta Biochimica Polonica-English Edition**, v. 51, p. 471-480, 2004.

LANA, F.C.F.; DAVI, R.F.L.; LANZA, F.M.; AMARAL, E.P. Detecção da hanseníase e Índice de Desenvolvimento Humano dos municípios de Minas Gerais, Brasil. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 11, n. 3, p. 539-44, 2009.

LAZZAROTTO, A.; REICHERT, M.T.; VENKER, C.; KRAMER, A.S.; SPRINZ, E. HIV/aids e meia idade: avaliação do conhecimento de indivíduos da região do Vale do Sinos (RS), Brasil. **Ciência e Saude Coletiva**, v. 15, p. 1185-1190, 2010.

LEHRER, R. I.; CLINE, M. J. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to Candida infection. **Journal of clinical investigation**, v. 48, n. 8, p. 1478, 1969.

LEI Nº 8.069, DE 13 DE JULHO DE 1990. Estatuto da Criança e do Adolescente. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/18069.htm> Acesso em 05/05/2013.

LE MOS, A. R.; ISMAEL, L. A. S.; BOATO, C. C. M.; BORGES, M. T. F.; RONDÓ, P. H. C. Hcpidin as a biochemical parameter for the assessment of iron deficiency anemia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 5, p. 596-599, 2010.

LEVY, A. P. Haptoglobin: A Major Susceptibility Gene for Diabetic Cardiovascular Disease. **Israel Medical Association. Journal**.v. 6, p. 308-310, 2004.

LOGGETTO SR, PELLEGRINI-BRAGA JA, COSTA-CARVALHO BT, SOLÉ D. Alterações imunológicas em pacientes com anemia falciforme. **Revista Brasileira Alergia e Imunopatologia**, v. 22, p. 77-82, 1999.

LORDELO G. S.; MIRANDA-VILELA A. L.; AKIMOTO A. K.; ALVES P. C.; HIRAGI C. O.; DALDEGAN, M. B.; KLAUTAU-GUIMARAES, M. N.; GRISOLIA, C. K.; NONINO A. Association between methylene tetrahydrofolate reductase and glutathione S-transferase M1 gene polymorphisms and chronic myeloid leukemia in a Brazilian population. **Genetics and molecular research : GMR.**, v. 11, p. 1013-26, 2012.

LWANGA S.K.; LEMESHOW, S. Sample size determination in health studies: a practical manual. Geneva: World Health Organization, 1991. 80 p. Disponível em <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/40062>> Acesso em 22/04/2013.

MÄKELÄ R.; DASTIDAR P.; JOKELA H.; SAARELA M.; PUNNONEN R.; LEHTIMÄKI T. Effect of long-term hormone replacement therapy on atherosclerosis progression in postmenopausal women relates to myeloperoxidase

promoter polymorphism. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 8, p. 3823-3828, 2003.

MANN, H.B.; WHITNEY, D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **Ann. Math. Statist.**, 18: 50-60, 1947.

MELAMED-FRANK M.; LACHE O.; ENAV B. I.; SZAFRANEK T.; LEVY N. S.; RICKLIS R. M.; Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3693-3698, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de educação em saúde. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 2 v. : il.

MIRANDA-VILELA A. L.; ALVES P. C. Z.; AKIMOTO A. K.; LORDELO G. S.; KLAUTAU-GUIMARÃES M. N., GRISOLIA C. K. Under Increased Hydrogen Peroxide conditions, the Antioxidant Effects of Pequi Oil (*Caryocar brasiliense Camb.*) to Decrease DNA Damage in Runners are Influenced by Sex, Age and oxidative Stress-related Genetic Polymorphisms. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 3, p. 27-39, 2011.

MIRANDA-VILELA, A. L.; LORDELO, G. S. Role of Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr), Glutathione S-transferases (Gsts M1 and T1) and Haptoglobin (Hp) Gene Polymorphisms in Susceptibility to Chronic Myeloid Leukemia (Cml). **Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases**, v. 1, n. 103, p. 2, 2013.

MIOT, H.A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 4, p. 275-8, 2011.

MOREIRA, L. R. S.; MIRANDA-VILELA, A. L.; SILVA, I.; AKIMOTO A. K.; KLAUTAU-GUIMARÃES MN, GRISOLIA CK. Antioxidant effect of haptoglobin phenotypes against DNA damage induced by hydrogen peroxide in human leukocytes. **Genetics and Molecular Research : GMR**, v. 8, p. 284-290, 2009.

MUÑOZ, M.; GARCÍA-ERCE, J. A.; REMACHA, Á. F. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 4, p. 281-286, 2011.

MURAO, S.-I.; STEVENS, F. J.; ITO, A.; HUBERMAN, E. Myeloperoxidase: A myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 4, p. 1232-1236, 1988.

NAUSEEF, W. M.; METCALF, J. A.; ROOT, R. K. Role of Myeloperoxidase in the Respiratory Burst of Human Neutrophils. **Blood**, v. 61, n. 3, p. 483-492, 1983.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, v. 41, n. 2, p. 225-233, 1977.

ONOFREY, B. E.; SKORIN Jr L.; HOLDEMAN, M. R. **Ocular therapeutics handbook: A clinical manual**. Wolters Kluwer Health, 2005.

OMIM: 606989. Myeloperoxidase; MPO.

PALADINO, S. F. Úlceras de membros inferiores na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 288-290, 2007.

PARK, JH.; PARK, E. Influence of iron-overload on DNA damage and its repair in human leukocytes *in vitro*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 718, n. 1, p. 56-61, 2011.

PARRY, M. F.; ROOT, R. K.; METCALF, J. A.; DELANEY, K. K.; KAPLOW, L. S.; RICHAR, W. J. Myeloperoxidase Deficiency Prevalence and Clinical Significance. **Annals of Internal Medicine**, v. 95, n. 3, p. 293-301, 1981.

PIEDRAFITA, F. J.; MOLANDER, R. B.; VANSANT, G.; ORLOVA, E. A.; PFAHL, M.; REYNOLDS, W. F. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 24, p. 14412-14420, 1996.

PRÁ, D.; FRANKE, S. I. R.; HENRIQUES, J. A. P.; FENECH, M. Iron and genome stability: An update. **Mutation Research**, v. 733, n. 1, p. 92-99, 2012.

PONTES, A.C.F.; CORRENTE, J.E. Comparações múltiplas não-paramétricas para o delineamento com um fator de classificação simples. **Rev. Mat. Estat., São Paulo**, v. 19, p. 179-197, 2001.

QUEIROZ, E.P. A migração intrametropolitana no Distrito Federal e Entorno: o consequente fluxo pendular e o uso dos equipamentos urbanos de saúde e educação, 2006. Disponível em <http://www.abep.nepo.unicamp.br/encontro2006/docspdf/ABEP2006_724.pdf>. Acesso em: 06/03/2013.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.

REYNOLDS, W. F.; HILTUNEN, M.; PIRSKANEN, M.; MANNERMAA, A.; HELISALMI, S.; LEHTOVIRTA, M., SOININEN, H., et al. MPO and APOE ϵ 4 polymorphisms interact to increase risk for AD in Finnish males. **Neurology**, v. 55, n. 9, p. 1284-1290, 2000.

REYNOLDS, W. F.; STEGEMAN, C. A.; COHEN TERVAERT, J. W. – 463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. **Clinical Immunology**, v. 103, n. 2, p. 154-160, 2002.

RIBAS, J.R.; VIEIRA, P.R.C. **Análise Multivariada com o uso do SPSS**. Rio de Janeiro, Ed. Ciência Moderna Ltda, 2011. 272 p.

RIFAI, N.; RIDKER, P. M. Population distributions of C-reactive protein in apparently healthy men and women in the United States: implication for clinical interpretation. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 666-669, 2003.

SADRZADEH, S. M. H.; BOZORGMEHR, J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. **American Journal of Clinical Pathology. Pathology Patterns Reviews**, v. 121, n. Suppl 1, p. S97-S104, 2004.

SAIGO K.; KONO M.; TAKAGI Y.; TAKENOKUCHI M.; HIRAMATSU Y.; TADA H.; et al. Deferasirox Reduces Oxidative Stress in Patients With Transfusion Dependency. **Journal of clinical medicine research**, v. 5, n. 1, p. 57, 2013.

SANTOS, P. C. J. L.; CANÇADO, R. D.; TERADA, C. T.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Alterações moleculares associadas à hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 3, p. 192-202, 2009.

Secretaria-Executiva do Programa Comunidade Solidária/Comitê da Primeira Infância. Comitê da Primeira Infância: uma estratégia de coordenação de políticas em favor da criança pequena. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.*, 2 (3): 319-322, 2002.

SECRETARIA-EXECUTIVA DO PROGRAMA COMUNIDADE SOLIDÁRIA/COMITÊ DA PRIMEIRA INFÂNCIA. Comitê da Primeira Infância: uma estratégia de coordenação de políticas em favor da criança pequena. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.*, 2 (3): 319-322, 2002.

SERRE, D.; HUDSON, T. J. Resources for genetic variation studies. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 7, p. 443-457, 2006.

SILVA, L. B.; GONCALVES, R. P.; MARTINS, Michele F. Estudo da correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e o prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 6, 2009 .

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 144-8, 2006.

SMITHIES, O.; WALKER, N. F.. Notation for serum-protein groups and the genes controlling their inheritance. 1956.

SMITHIES, O.; CONNELL, G. E.; DIXON, G. H. Chromosomal rearrangements and the evolution of haptoglobin genes. **Nature**, v. 196, p. 232, 1962.

STOLTZ, J. F. Hemorheology: pathophysiological significance. **Acta Médica Portuguesa**, v. 6, n. 7-8, p. S4-13, 1985.

TAHER, A.; CAPPELLINI, M. D. Update on the use of deferasirox in the management of iron overload. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 5, p. 857, 2009.

TAYLOR J. G. V.I.; NOLAN V.G.; MENDELSON L.; KATO G. J.; GLADWIN M. T.; STEINBERG M. H. Chronic Hyper-Hemolysis in Sickle Cell Anemia: Association of Vascular Complications and Mortality with Less Frequent Vasoocclusive Pain. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. e2095, 2008.

TSENG C. F.; LIN C. C.; HUANG H. Y.; LIU H. C.; MAO S. J. T. Antioxidant role of human haptoglobina. **Proteomics**, v. 4, n. 8, p. 2221-2228, 2004.

VANDGHANOONI, S.; ESKANDANI, M. Comet assay: a method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system. **BioImpacts: BI**, v. 1, n. 2, p. 87, 2011.

VICHINSKY, Elliott P. Current issues with blood transfusions in sickle cell disease. In: **Seminars in Hematology**. WB Saunders, 2001. p. 14-22.

WOOD, J. C. Diagnosis and management of transfusion iron overload: the role of imaging. **American Journal of Hematology**, v. 82, n. S12, p. 1132-1135, 2007.

WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemical Journal**, v. 434, p. 365-381, 2011.

WEISSTEIN, E.W. Bonferroni Correction. MathWorld – A Wolfram Web Resource. Disponível em <<http://mathworld.wolfram.com/BonferroniCorrection.html>> Acesso em 09/06/2013.

WOBETO, V.P. A.; ZACCARIOTTO, T. R.; SONATI, M. F. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 602-620, 2008.

WUN, T.; PAGLIERONI, T.; RANGASWAMI, A.; HILL FRANKLIN, P.; WELBORN, J.; CHEUNG, A.; TABLIN, F. Platelet activation in patients with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 100, n. 4, p. 741-749, 1998.

YANO, A.; YAMAMOTO, Y.; MIYAISHI, S.; ISHIZU, H. Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. **Acta medica Okayama**, v. 52, n. 4, p. 173, 1998.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia - Fundamentos e Prática**. São Paulo, Atheneu, 2004.

ZHU H.; YANG L.; YU R.; TANG N.; WANG B. Myeloperoxidase G463A polymorphism and the risk of gastric cancer: a case control study. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 12, p. 2491-6, 2006.

ZVI, B.; LEVY, A. P. Haptoglobin phenotypes, which one is better and when?. **Clinical laboratory**, v. 52, n. 1-2, p. 29, 2006.

8. ANEXOS

8.1. Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Secretaria de Estado da Saúde (SES-DF)



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER Nº 295/2010

PROCOLO Nº DO PROJETO: 273/10 – **Freqüência dos polimorfismos nos genes da haptoglobina e da mieloperoxidase (-G436A) em pacientes do HBDF – Brasil com sobrecarga de ferro secundária.**

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

Validade do Parecer: 08/09/2012

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 13 de setembro de 2010.


Atenciosamente,

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES
Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP: 70.710-904
BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE

8.2. Questionário respondido pelos pacientes

	GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE SUBSECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE DIRETORIA DE PROMOÇÃO E ASSISTÊNCIA À SAÚDE	Registro Clínico nº: _____ Unidade de Saúde: _____ Data: _____
PROGRAMA DE ATENÇÃO ESPECIAL À DOENÇA FALCIFORME CADASTRO DE DOENÇA FALCIFORME DO DISTRITO FEDERAL		
Identificação do Paciente		
1 - Nome: _____ 2 - Sexo: Masc. () Fem. ()		
3 - Data de Nascimento: ____/____/____ 4 - Idade Atual: ____ Anos ____ meses		
5 - Município de Nascimento: _____ UF: _____		
6 - Município de Residência: _____ UF: _____		
7 - Endereço Atual: _____ Fone: _____		
8 - Nome da mãe: _____		
9 - Ano de abertura do registro clínico: _____		
Identificação do Genótipo		
1 - Idade em que foi feito o diagnóstico: _____		
2 - Eletroforese de hemoglobina SS () SC () S/Beta ^o () S/Beta ⁺ ()		
3 - Percentual de hemoglobina A2 _____ % Fetal _____ %		
Programa Vacinal		
1 - Anti-haemophilus não realizado () incompleto () completo ()		
2 - Anti-pneumocócica não realizado () incompleto () completo ()		
3 - Anti-hepatite não realizado () incompleto () completo ()		
Profilaxia Antibiótica		
não realizada () em vigência () já realizada ()		
Escolaridade do Paciente		Escolaridade da mãe
() nunca estudou		() nunca estudou
() não está em idade escolar		1º grau () completo () incompleto
() em idade pré escolar		2º grau () completo () incompleto
1º grau () completo () incompleto		Superior () completo () incompleto
2º grau () completo () incompleto		
Superior () completo () incompleto		
Renda familiar		
() sem renda () < 1 SM () 1 a 2 SM () 3 a 4 SM () 5 a 6 SM		
() 7 a 10 SM () 11 a 15 SM () > 15 SM		
Benefícios		
() Prestação continuada INSS () Passe livre () Cesta básica () Outros		
Grupo informativo do HAB		
Nº de participações nos últimos 12 meses: 0 () 1 () 2 () 3 () mais de 3 ()		

Internações				
Nº de internações até hoje:	0 ()	1 a 3 ()	4 a 6 ()	> 6 ()
Nº de internações nos últimos 12 a 24 meses:	0 ()	1 a 3 ()	> 3 ()	
Causas:				
Anemia/palidez ()	Pneumonia ()	Bronquite/Asma ()		
Osteomielite ()	Infeção ()	Edema Mão/pé ()		
Diarréia ()	Priapismo ()	Necrose Asséptica ()		
Crises de Dor ()	AVC ()			
Outras _____				
Transfusões de Sangue				
Nº de transfusões de sangue até hoje:	0 ()	1 a 3 ()	4 a 6 ()	> 6 ()
Terapia quelante:	Não ()	Sim ()		
No protocolo de Hidroxiuréia	Não ()	Sim ()		
Controle Sorológico				
1. Hepatite B () não realizado	() positivo	() negativo		
2. Hepatite () não realizado	() positivo	() negativo		
3. Chagas () não realizado	() positivo	() negativo		
4. Sífilis () não realizado	() positivo	() negativo		
5. HIV () não realizado	() positivo	() negativo		
6. HTLVI-II () não realizado	() positivo	() negativo		
Alo-imunização				
Anticorpos irregulares () não realizado	() negativo			
	() positivo _____			
COMPLICAÇÕES E CIRURGIAS				
Crise de Dor				
Nº de crises severas até hoje:	0 ()	1 a 3 ()	4 a 6 ()	>6 ()
Nº de crises severas nos últimos 12 meses / 24 meses:	0 ()	1 ()	2 ()	3 () >3 ()
Nº de crises moderadas nos últimos 12 meses / 24 meses:	0 ()	1 ()	2 ()	3 () >3 ()
Esplenectomia não () sim ()	Ligadura de artéria esplênica não () sim ()			
AVC: Clínico não () sim ()	Laboratorial não () sim ()	Sequelas não () sim ()		
Patologia Pulmonar				
Nº de complicações pulmonares até hoje:	0 ()	1 a 3 ()	4 a 6 ()	>6 ()
Causas:	Pneumonia ()	Bronquite/asma ()	IVAS ()	
	Sind. Torácica Aguda ()	Cor pulmonale ()	Outros ()	
Colelitíase não () sim ()	Colecistectomia não () sim ()			
Enurese Noturna não () sim ()	Priapismo não () sim ()			
Osteomielite não () sim ()	Necrose Asséptica não () sim ()			
Úlcera de MMII não () sim ()				
Óbito: não () sim ()	Recebeu RESUMO DO CADASTRO não () sim ()			

8.3. Aceite do artigo para publicação na revista Blood Cells, Molecules and Diseases

Título do artigo: Haptoglobin and Myeloperoxidase (–G463A) gene polymorphisms in Brazilian sickle cell patients with and without secondary iron overload

Autores: Lilian Carla Pereira Barbosa, Ana Luisa Miranda-Vilela*, Cássia de Oliveira Hiragi, Ieler Ferreira Ribeiro, Margarete Barbosa Daldegan, Cesar Koppe Grisolia, Leopoldo Luiz dos Santos-Neto

**corresponding author*

Ana Luisa Miranda Vilela

Assunto: Blood Cells, Molecules and Diseases Enquiry: Re-submission of reviewed manuscript

De: Daley, Susan [mailto:Susan_Daley@URMC.Rochester.edu]

Enviada em: quarta-feira, 25 de setembro de 2013 16:39

Para: 'Ana Luisa Miranda Vilela,0626864,99657535,32011685'

Assunto: Blood Cells, Molecules and Diseases Enquiry: Re-submission of reviewed manuscript

Dear Dr. Miranda-Vilela,

Thank you for sending the revision of your paper. Dr. Horwitz and Dr. Lichtman asked me to let you know that the revision has been accepted. I will be forwarding the manuscript to our publisher tomorrow. You can expect to receive page proofs from the publisher in a few weeks.

Thank you and please let me know if you have any questions.

Sincerely,
Susan

Susan M. Daley
Administrative Assistant to
Marshall A. Lichtman, M.D.
University of Rochester Medical Center
601 Elmwood Avenue, Box MED
Rochester, NY 14642
USA
Telephone: 585-275-2205
Fax: 585-271-1876
email: Susan_Daley@urmc.rochester.edu

9. APÊNDICE

9.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



N° _____

Secretaria de Estado de Saúde-SES
Hospital de Base do Distrito Federal-HBDF
Projeto de parceria Núcleo de Hematologia e Hemoterapia-NHH/Universidade de Brasília-
UnB

Você está sendo convidado a participar do projeto: **Frequência dos polimorfismos nos genes da haptoglobina e da mieloperoxidase (G436A) em pacientes do Hospital de Base do Distrito Federal/Brasil com sobrecarga de ferro secundária.**

O nosso objetivo é verificar a presença de algumas variações genéticas possivelmente relacionadas a diferenças nas manifestações clínicas, tolerância aos medicamentos e predisposição a infecções. A pesquisa ocorrerá no Hospital de Base do Distrito Federal e no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília (UnB) e terá duração de 2 anos.

Você receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que todos os dados pessoais e coletados durante pesquisa serão mantidos no mais rigoroso sigilo, através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo. Os participantes serão identificados no estudo através de um número gerado por computador, para proteger qualquer informação pessoal. Apenas você terá acesso aos resultados de seus exames.

Todos os resultados deste estudo serão publicados apenas de forma generalizada em relatórios, congressos e revistas científicas, sejam eles favoráveis ou não, e não incluirão qualquer informação que identificará você como sujeito do estudo.

Não haverá nenhuma forma de pagamento pela participação no estudo e caso você se recuse a participar, sua vontade será respeitada. Você não terá nenhum ganho financeiro, e também nenhum gasto por participar deste estudo. Você continuará sendo responsável por seu tratamento médico habitual e também não precisará retornar mais vezes ao hospital em decorrência de sua participação no estudo. A participação é totalmente voluntária e você

poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo, bastando informar a decisão a um dos pesquisadores responsáveis. Em outras palavras, sua desistência não afetará o atendimento nem o tratamento médico atual ou futuro que você recebe no Hospital de Base do Distrito Federal.

A participação envolverá coleta de sangue para a realização dos exames necessários. Durante o estudo, será também necessário coletar informações no prontuário dos pacientes participantes para verificar a terapia escolhida pelo médico como procedimento padrão de tratamento. Isto significa que você não terá que passar por consultas extras ou receber qualquer medicação ou tratamento que normalmente não receberia.

As amostras de sangue coletadas serão devidamente armazenadas no Laboratório de Genética da UnB e serão usadas apenas para os exames previstos nesta pesquisa. Se qualquer alteração importante na forma de realização deste estudo for necessária, você será informado(a) para decidir sob sua permanência na pesquisa.

Possíveis benefícios e riscos

A pesquisa para a qual você está sendo convidado a participar, pode não trazer benefícios diretos a você, mas vai gerar informações muito valiosas para um tratamento mais eficaz dos pacientes com sobrecarga de ferro secundária. Durante a coleta de sangue, pode ser que você sinta uma pequena dor e desconforto por causa da agulha; o local de entrada da agulha pode ficar roxo.

Outras informações:

Caso tenha qualquer dúvida sobre seus direitos como paciente de pesquisa, você poderá entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa**, que avaliou e aprovou a realização deste estudo neste Hospital, pelos telefones **(61) 3326-0119 e (61) 3325-4964**.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável. Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte aos pesquisadores antes de assiná-lo.

Maiores esclarecimentos:

Se, a qualquer momento você tiver alguma pergunta referente ao estudo, procure uma das responsáveis, através dos contatos abaixo:

- 1- Dr^a Margarete Barbosa Daldegan
Núcleo de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base do Distrito Federal
Fone: (61) 3315-1790
E-mail: margaretedaldegan@gmail.com

- 2- Prof^a Dr^a Ana Luisa Miranda-Vilela
Dept^o de Genética e Morfologia – Laboratório de Genética – Universidade de Brasília
Fones: (61) 3307-2161 e 9965-7535
E-mail: mirandavilela@unb.com.br

Concordo em participar como voluntário da pesquisa **“Frequência dos polimorfismos nos genes da haptoglobina e da mieloperoxidase (G436A) em pacientes do Hospital de Base do Distrito Federal/Brasil com sobrecarga de ferro secundária”**, uma vez que compreendi o que está explicado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que acabei de ler e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas pela equipe responsável pelo estudo.

Brasília, ____ de _____ de 20____

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome (pesquisador): _____

Assinatura (pesquisador): _____