

Thaisa Netto Souza Valente Frossard

**ESTUDOS DIAGNÓSTICO E AVALIATIVO DE BIOMARCADORES DE
DISLIPIDEMIAS EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME
ACOMPANHADOS NOS HEMOCENTROS DE GOVERNADOR VALADARES
E UBERABA DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

Governador Valadares

2018

Thaisa Netto Souza Valente Frossard

**ESTUDOS DIAGNÓSTICO E AVALIATIVO DE BIOMARCADORES DE
DISLIPIDEMIAS EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME
ACOMPANHADOS NOS HEMOCENTROS DE GOVERNADOR VALADARES E
UBERABA DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares. Linha de pesquisa: Bioquímica patológica

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cibele Velloso Rodrigues
UFJF - Departamento de Ciências Básicas da Vida
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jacqueline Isaura Alvarez Leite
UFMG- Departamento de Bioquímica e Imunologia

Governador Valadares

2018

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

Netto Souza Valente Frossard, Thaisa.

Estudos diagnóstico e avaliativo de biomarcadores de dislipidemias em indivíduos com doença falciforme acompanhados nos Hemocentros de Governador Valadares e Uberaba da Fundação Hemominas / Thaisa Netto Souza Valente Frossard. -- 2018.

224 p.

Orientador: Cibele Velloso Rodrigues

Coorientadora: Jacqueline Isaura Alvarez Leite

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2018.

1. Doença falciforme. 2. Dislipidemia. 3. Polimorfismos. 4. Alfa talassemia. I. Velloso Rodrigues, Cibele, orient. II. Alvarez Leite, Jacqueline Isaura, coorient. III. Título.

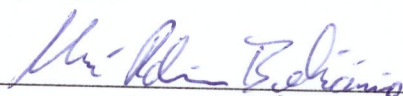
Thaís Netto Souza Valente Frossard

**ESTUDOS DIAGNÓSTICO E AVALIATIVO DE BIOMARCADORES DE
DISLIPIDEMIAS EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME
ACOMPANHADOS NOS HEMOCENTROS DE GOVERNADOR VALADARES E
UBERABA DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS**

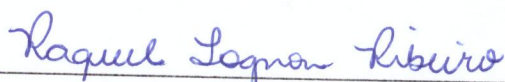
Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares. Linha de pesquisa: Bioquímica patológica.

Aprovada em: 09, 04, 2018

BANCA EXAMINADORA



Dr. ANDRÉ ROLIM BELISÁRIO
Fundação Hemominas



Prof^a. Dr^a. RAQUEL TOGNON RIBEIRO
Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares



Prof^a. Dr^a. CIBELE VELLOSO RODRIGUES – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares

Dedico aos meus pais Maria da Graça e Reinaldo, à Isabel, ao Ilson, às Tias Célia e Rita e a todos aqueles que me deram forças para a realização do presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me permitiu ir mais longe do que eu imaginava. A Nossa Senhora das Graças que sempre passou à minha frente iluminando meus caminhos.

À minha mãe, Maria da Graça Neto, exemplo de amor, retidão, persistência e competência. Ao meu pai, Reinaldo, pelo incentivo e carinho incondicional. À minha irmã, Isabel Neto Hastenreiter, que sempre foi minha inspiração e, por muitas vezes, minha orientadora. Às tias Célia da Silva Neto e Rita Maria Neto, por me incentivarem e vibrarem comigo em cada vitória. Ao meu marido, Ilson Gomes de Freitas Frossard Filho, por todo o amor, companheirismo e entendimento nas horas difíceis, realmente, você me ama!

Agradeço imensamente a toda a minha família, particularmente ao Padrinho Érico Ribeiro Netto e toda sua família que foram meu porto seguro em Governador Valadares. Aos amigos, colegas de trabalho (Graziela Regis Pereira, Duílio Geber de Melo e Joicy Guimarães Fonseca) e amigos adquiridos na Pós-graduação (Jenifer Carvalho Grossi, Mariany Lopes da Costa Folly, Kátia Maria de Oliveira Almeida, Kênia de Assis Boy, Elaine Carlos Scherrer Ramos, Thiago Brandão, Nilcemar Rodrigues Carvalho Cruz e Lorena Bruna Pereira de Oliveira), que caminharam junto comigo, me dando forças para alcançar meus objetivos.

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), por ser minha escola de vida, por me proporcionar a melhor formação na graduação, especialização e agora no mestrado. Além disso, agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares (UFJF-GV) por me acolher como membro, me possibilitar a experiência de ser uma profissional realizada no trabalho e por incentivar seus funcionários à qualificação. Sou muito grata também ao Departamento de Ciências Básicas da Vida, que me possibilitou a flexibilização de horários para a realização do mestrado.

Aos colegas do Grupo de pesquisa NAORIGEN da UFJF-GV, Antônio Frederico de Freitas Gomides, Maria Anete Santana Valente, Nilcemar Rodrigues Carvalho Cruz, Domicio Antônio da Costa Júnior, Fernanda de Oliveira Ferreira e Cibele Velloso Rodrigues, vocês me ensinaram muito mais do que pesquisa, me ensinaram ética e trabalho em equipe.

A equipe de funcionários do Hemocentro Regional de Governador Valadares: Maysa Maria Dias de Vasconcellos Cunha, Ana Paula Pinho Santos, Myriene Brasileiro Vilar, Juliano Cruz Gusmão, Denisson Brasileiro Bastos, entre outros funcionários que colaboraram e em especial à Maria do Perpétuo Socorro Spínola, sem você tudo teria sido muito mais difícil. Ao André Rolim Belisário, a Célia Maria da Silva e a Maristela Braga de Souza da HEMOMINAS de Belo Horizonte, pela parceria. Aos parceiros da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFMT), Hélio Moraes de Souza, Gláucia Aparecida Resende e Sheila Soares Silva.

Ao Sr. Wismar Fernandes Mourão do Laboratório Laborval.

Aos portadores da doença falciforme dos Hemocentros Regionais de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas, que confiaram, apoiaram e participaram da pesquisa.

Às bolsistas Patrícia Menezes, Bianca Bastos Lima, Laís Sousa Costa, Cleonice Aparecida de Souza, Andreza da Silva Brito, Natalia Smider de Oliveira, Áquila Rodrigues Costa Santos e especialmente à Brisa Machado Pereira, por toda a ajuda, dedicação e carinho com as atividades do estudo. À amiga Nilcemar Rodrigues Carvalho Cruz, que tornou a caminhada menos exaustiva, mais divertida e que com sua serenidade me ajudou a alcançar o propósito final.

À minha orientadora Cibele Velloso Rodrigues por todo o apoio, ensinamento, empenho e dedicação. A co-orientadora Jacqueline Isaura Alvarez Leite pelo amparo na reta final.

À UFJF, FINEP, FAPEMIGe CNPq que forneceram financiamento para aquisição dos insumos e/ou equipamentos utilizados neste projeto e bolsas de estudo.

“Todos ficaram fora de si, glorificavam a Deus e cheios de temor diziam: “Hoje vimos coisas maravilhosas!””

(Lucas 5, 26)

RESUMO

Hipocolesterolemia e hipertrigliceridemia são documentadas na Doença Falciforme (DF) há muitos anos, mas as causas e os efeitos na fisiopatologia ainda precisam ser esclarecidos. Além disto, relatos sobre marcadores genéticos relacionados ao metabolismo lipídico que explicam a variação dos níveis de lipídios e suas associações com os subfenótipos de hemólise e vaso-oclusão e com a variabilidade clínica da DF não foram publicados até o momento. O objetivo geral do estudo foi investigar se havia dislipidemia e se polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em genes ligados às variações lipídicas e inflamatórias estariam associados a alterações nas variáveis hematológicas, bioquímicas e clínicas, em crianças e adolescentes com as duas formas mais frequentes da DF, anemia falciforme (HbSS) e hemoglobinopatia SC (HbSC). A população consistiu de 155 indivíduos nascidos entre 2001 e 2010, com média de idade de 12,54 anos, sendo 55,5% do sexo masculino, acompanhados nos Hemocentros Regionais de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas. Um grupo controle constituído de 40 crianças sem DF com média de idade de 12,98 anos também foi incluído para comparações com dados lipídicos. Foram realizadas coletas de dados em registros médicos, exames bioquímicos, genotipagens dos SNPs de *ANGPTL4*, *APOA5*, *ZNF259* e *TNFA*, pesquisa de alfa-talassemia e avaliação do uso de hidroxiuréia (HU). Verificaram-se associações entre as variáveis investigadas e, destas, com a ocorrência de eventos clínicos da DF. Para estes fins foram aplicados testes qui-quadrado, Mann-Whitney, Teste T de Students, ANOVA, Kruskal-Wallis e realizadas correlações com o teste de Spearman. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$. Dentre os achados, foram encontrados piores índices de marcadores de hemólise e inflamação nos indivíduos HbSS em relação aos HbSC. A hipocolesterolemia (HDL < 40 mg/dL) foi encontrada em 64,52% da população com DF, havendo diferença significativa entre os indivíduos e os controles, sem diferença entre HbSS e HbSC. Indivíduos com DF que possuíam a HDL superior a 40 mg/dL apresentaram maiores níveis de APOA1 e menores de colesterol total e triglicerídios. A hipertrigliceridemia (TG > 100 mg/dL até os 10 anos e > 130 mg/dL acima de 10 anos) presente em apenas 8,51% dos pacientes DF não mostrou diferença significativa entre os grupos HbSS e HbSC e foi associada com níveis elevados da enzima LDH. Nos indivíduos HbSS os baixos níveis de HDL estavam em maior proporção se comparados ao grupo HbSC. O uso de HU no grupo HbSS não interferiu nos níveis de lipídios. A variante rara do gene *ANGPTL4* rs116843064 (G>A), no modelo de dominância, foi associada com redução de leucócitos globais e monócitos e aumento de apolipoproteína A1 e colesterol total nos indivíduos com DF. O polimorfismo de *ZNF259* rs964184 (c.724C>G) foi associado ao aumento dos marcadores de hemólise/inflamação (leucócitos globais, reticulócitos e bilirrubinas total e direta) e apresentou efeito dose dependente nos níveis de bilirrubina direta. A variante de menor frequência (-308A) de *TNFA* rs1800629 foi associada com aumento de 73% dos níveis de bilirrubina direta. A co-herança de alfa-talassemia presente nos dois grupos HbSS e HbSC, reduziu VCM e HCM, mas não influenciou os níveis de HbF, reticulócitos, bilirrubina ou o perfil lipídico. Em conclusão, a hipocolesterolemia foi caracterizada por baixos níveis de HDL em ambos os grupos de indivíduos HbSS e HbSC e o uso terapêutico da hidroxiuréia ou a co-existência de alelos de deleção dos genes *HBA* parecem não influenciar este quadro dislipidêmico. Entre os polimorfismos estudados o de *ZNF259* rs964184 foi o único associado a níveis de lipídios nos indivíduos com DF. Nosso estudo é o primeiro a mostrar que as variantes de menor frequência de *ZNF259* rs964184 e *TNFA* rs1800629 estão associadas a hiperbilirrubinemia em pacientes com DF.

Palavras chaves: doença falciforme; polimorfismos; dislipidemia; alfa-talassemia.

ABSTRACT

Hypocholesterolemia and hypertriglyceridemia have been documented in sickle cell disease (SCD) for many years, but the causes and effects on pathophysiology still need to be clarified. In addition, reports on genetic markers related to lipid metabolism that explain the variation of lipid levels and their associations with subtypes of hemolysis and vaso-occlusion and clinical variability of SCD have not been published to date. The overall objective of the study was to investigate whether dyslipidemia and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes linked to lipid and inflammatory changes would be associated with changes in hematological, biochemical and clinical variables in children and adolescents with the two most frequent forms of SCD, sickle cell anemia (HbSS) and hemoglobinopathy SC (HbSC). The population consisted of 155 individuals born between 2001 and 2010, with a mean age of 12.54 years, being 55.5% male, followed in the Regional Hemocenters of Governador Valadares and Uberaba of the Hemominas Foundation. A control group consisting of 40 children without SCD with a mean age of 12.98 years was also included for comparison with lipid data. Data collection on medical records, biochemical tests, genotyping of *ANGPTL4*, *APOA5*, *ZNF259* and *TNFA* SNPs, alpha-thalassemia screening and assessment of hydroxyurea (HU) use were performed. There were associations between the variables investigated and, of these, with the occurrence of clinical events of the SCD. For these purposes chi-square, Mann-Whitney, Student's T-Test, ANOVA, Kruskal-Wallis and correlations with the Spearman test were applied. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Among the findings, we found worse markers of hemolysis and inflammation in HbSS individuals in relation to HbSC. Hypocholesterolemia (HDL < 40 mg / dL) was found in 64.52% of the SCD population, with a significant difference between individuals and controls, with no difference between HbSS and HbSC. Individuals with SCD that had HDL greater than 40 mg / dL had higher levels of APOA1 and lower total cholesterol and triglycerides. Hypertriglyceridemia (TG > 100 mg / dL up to 10 years and > 130 mg / dL over 10 years) present in only 8.51% of SCD patients showed no significant difference between the HbSS and HbSC groups and was associated with high levels of the LDH enzyme. In the HbSS subjects the low HDL levels were in a higher proportion when compared to the HbSC group. The use of HU in the HbSS group did not interfere with lipid levels. The rare variant of the *ANGPTL4* gene rs116843064 (G $>$ A) in the dominance model was associated with reduction of global leukocytes and monocytes and increase of apolipoprotein A1 and total cholesterol in subjects with DF. The polymorphism of *ZNF259* rs964184 (c.724C $>$ G) was associated with increased markers of hemolysis/inflammation (total leukocytes, reticulocytes and total and direct bilirubin) and had a dose-dependent effect on direct bilirubin levels. The lower frequency variant (-308A) of *TNFA* rs1800629 was associated with a 73% increase in direct bilirubin levels. Alpha-thalassemia co-inheritance in both HbSS and HbSC groups reduced MCV and MCH, but did not influence HbF, reticulocyte, bilirubin or lipid profile levels. In conclusion, hypocholesterolemia was characterized by low levels of HDL in both groups of HbSS and HbSC and the therapeutic use of hydroxyurea or the coexistence of deletion alleles of *HBA* genes does not appear to influence this dyslipidemic condition. Among the polymorphisms studied, that of *ZNF259* rs964184 was the only one associated with lipid levels in SCD. Our study is the first to show that the lower frequency variants of *ZNF259* rs964184 and *TNFA* rs1800629 are associated with hyperbilirubinemia in SCD.

Keywords: sickle cell disease; polymorphisms; dyslipidemia; alpha-thalassemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1: Desenho da estrutura de uma molécula de Hemoglobina normal, indicando as quatro cadeias globínicas e os anéis tetrapirrólicos com os átomos de ferro.....	22
Figure 2: Esquema do agrupamento dos genes da alfa-globina, localizados no cromossomo 16 e do agrupamento dos genes da beta-globina, localizado no cromossomo 11	23
Figure 3: Representação gráfica da expressão temporal e local de produção das cadeias globinas nas fases embrionária, fetal e adulta.....	24
Figure 4: Mapa de presença ou ausência da mutação da célula falciforme (hemoglobina S) pelo mundo e a temperatura média anual (em °C)	27
Figure 5: Ilustração da hemácia falciforme	31
Figure 6: Esquema dos principais mecanismos fisiopatológicos da doença falciforme	31
Figure 7: Esquema das consequências da hemólise e da depleção do óxido nítrico na doença falciforme ..	33
Figure 8: Mecanismo de vaso-oclusão falciforme	35
Figure 9: Genes identificados por estudo amplo do genoma (GWAS) com significativa associação aos níveis de Lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicerídeos ($p < 5 \times 10^{-8}$)	54
Figure 10: Esquema do cromossomo 19 e a localização do gene ANGPTL4	57
Figure 11: Esquema do cromossomo 11 mostrando no traço vermelho a localização cromossômica do gene APOA5.....	60
Figure 12: Esquema do cromossomo 11 mostrando no traço vermelho a localização cromossômica do gene ZPR1 ou ZNF259.....	62
Figure 13: Esquema do cromossomo seis indicando no traço vermelho a localização do gene TNFA	65
Figure 14: Desenho experimental	70
Figure 15: Fluxograma do número de indivíduos que participaram da pesquisa cadastrados e acompanhados no Hemocentro Regional de Governador Valadares	86
Figure 16: Fluxograma do número de indivíduos que participaram da pesquisa, advindos do Hemocentro Regional de Uberaba e o número de indivíduos analisados	87
Figure 17: Proporção de Lipoproteína de alta densidade entre os grupos de pacientes com doença falciforme estudados	111
Figure 18: Resultado gráfico ilustrativo de uma das análises de genotipagem por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	120
Figure 19: Distribuição dos genótipos de rs964184 do gene ZNF259 e níveis de Bilirrubina direta	134
Figure 20: Fotografia do gel de agarose da genotipagem de alfa-tal em indivíduos com doença falciforme	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem e distribuição mundial das hemoglobinopatias nos continentes.....	21
Tabela 2: Percentual da doença falciforme (HbSS e HbSC) e heterozigotos para hemoglobinas S e C nos municípios de Governador Valadares e de Uberaba, por crianças triadas	28
Tabela 3: Mediadores inflamatórios e reagentes de fase aguda elevados na doença falciforme	36
Tabela 4: Marcadores de hemólise e de vaso-oclusão na Doença Falciforme	38
Tabela 5: Valores de alguns marcadores laboratoriais observados em indivíduos com Anemia Falciforme e hemoglobinopatia SC	38
Tabela 6: Principais manifestações clínicas de acordo com o subfenótipo da Doença Falciforme	40
Tabela 7: Subfenótipos da Doença Falciforme e principais características laboratoriais, com relação a hemoglobina fetal e alfa-talassemia.....	41
Tabela 8: Conteúdo de proteínas e fosfolípidos das partículas carreadoras de lípidios	47
Tabela 9: Níveis de lípidios em crianças e adolescentes	51
Tabela 10: Informações dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes selecionados para estudo de associação com níveis de lípidios	56
Tabela 11: Informações do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene selecionado para estudo de inflamação	64
Tabela 12: Informações sobre exames hematológicos e bioquímicos utilizados na pesquisa	73
Tabela 13: Dados dos genes e SNPs selecionados para genótipagens	77
Tabela 14: Dados dos oligonucleotídeos utilizados na reação de genótipagens da alfa-talassemia	78
Tabela 15: Dados demográficos dos participantes da pesquisa.....	87
Tabela 16: Descrição quantitativa dos dados laboratoriais dos indivíduos estudados	88
Tabela 17: Dados dos exames hematológicos e bioquímicos na população de estudo.....	91
Tabela 18: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos de todos os indivíduos com doença falciforme participantes do estudo	96
Tabela 19: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos de todos os indivíduos com anemia falciforme participantes do estudo	100
Tabela 20: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos dos indivíduos com hemoglobinopatia SC participantes do estudo	104
Tabela 21: Dados das concentrações de lipoproteínas e triglicérides dos indivíduos com doença falciforme comparados aos indivíduos controle	109
Tabela 22: Número e porcentagem de indivíduos que apresentaram níveis de Triglicéridos normais e alterados	110
Tabela 23: Análise dos níveis plasmáticos de triglicéridos em relação os parâmetros hematológicos e bioquímicos	110
Tabela 24: Distribuição dos níveis de concentração de Lipoproteína de alta densidade na população estudada	111
Tabela 25: Análise dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade em relação os parâmetros hematológicos e bioquímicos	113
Tabela 26: Razões aterogênicas em indivíduos com Doença falciforme, comparados ao grupo controle ..	116
Tabela 27: Resultado da razão aterogênica Apolipoproteína B/Apolipoproteína A1 nos indivíduos estudados.....	117
Tabela 28: Resultado da razão Triglicérides/Lipoproteína de alta densidade nos indivíduos estudados	117
Tabela 29: Número de indivíduos do estudo em terapia com Hidroxiuréia	118
Tabela 30: Análise dos resultados de exames bioquímicos e hematológicos em relação à terapêutica de Hidroxiuréia no grupo de indivíduos com anemia falciforme (HbSS)	119
Tabela 31: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs116843064, do gene ANGPTL4 na população de estudo.....	122
Tabela 32: Avaliação do Efeito de Dominância do alelo de menor frequência da variante rs116843064 do gene ANGPTL4 dos participantes com doença falciforme	123

Tabela 33: Efeito de dominância e recessividade do alelo A do polimorfismo rs116843064 do gene <i>ANGPTL4</i> sobre a concentração de lipoproteína de alta densidade em indivíduos com doença falciforme	124
Tabela 34: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs662799, do gene <i>APOA5</i> na população de estudo	125
Tabela 35: Avaliação do Efeito de Dominância do alelo de menor frequência do polimorfismo rs662799 do gene <i>APOA5</i> nos indivíduos com doença falciforme	126
Tabela 36: Efeito de dominância do alelo G do polimorfismo rs662799 do gene <i>APOA5</i> sobre a concentração de lipoproteína de alta densidade em indivíduos com doença falciforme	127
Tabela 37: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs964184, do gene <i>ZNF259</i> na população de estudo	129
Tabela 38: Avaliação do Efeito de Dominância e Recessividade do alelo de menor frequência do polimorfismo rs964184 do gene <i>ZNF259</i>	130
Tabela 39: Efeito de dominância e recessividade do alelo de menor frequência do polimorfismo rs964184 do gene <i>ZNF259</i> sobre a concentração de lipoproteína de alta densidade em indivíduos com doença falciforme	132
Tabela 40: Avaliação da presença de doença hepato-biliar entre os indivíduos com DF que apresentaram o alelo G do polimorfismo do gene <i>ZNF259</i>	133
Tabela 41: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1800629, do gene <i>TNFA</i> na população de estudo	136
Tabela 42: Avaliação do Efeito de Dominância e Recessividade do alelo de menor frequência do polimorfismo rs1800629 do gene <i>TNFA</i>	137
Tabela 43: Efeito de dominância e da recessividade do alelo de menor frequência do polimorfismo rs1800629 do gene <i>TNFA</i> sobre a concentração de lipoproteína de alta densidade em indivíduos com doença falciforme	139
Tabela 44: Avaliação da distribuição dos genótipos do gene <i>TNFA</i> rs1800629 no modelo de dominância em relação ao uso da terapia com hidroxiuréia entre os indivíduos com doença falciforme	139
Tabela 45: Avaliação da distribuição dos genótipos do gene <i>TNFA</i> rs1800629 no modelo de dominância em relação ao acometimento de doença hepatobiliar entre os indivíduos com DF	140
Tabela 46: Distribuição de Alfa-talassemia (alelo $\alpha^{-3.7}$ Kb) na população estudada.....	141
Tabela 47: Comparação dos perfis bioquímico e hematológico de pacientes com DF e co-existência de alfa-talassemia.....	142
Tabela 48: Efeito da co-herança da deleção do gene <i>HBA</i> sobre a concentração de lipoproteína de alta densidade em indivíduos com doença falciforme	142
Tabela 49: Comparação entre as frequências da população de estudo e frequências mundiais dos alelos menores dos genes analisados	159

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS E SIGNIFICADOS

SIGLA/ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AF	Anemia Falciforme
AFR	África
AIT	Ataque isquêmico transitório
Alfa-tal	Alfa talassemia
AMR	Américas
ANGPTL 4	Angiopoetina 4
APO A5	Apolipoproteína A5
APO B	Apolipoproteína B
APOA1	Apolipoproteína A1
APOB-100	Apolipoproteína B-100
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVE	Acidente vascular encefálico
BD	Bilirrubina direta
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
Ca ²⁺	Cátion Cálcio
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAPES	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cl	Ânion cloreto
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Colesterol Total
DAP	Doença arterial periférica
DCA	Doença cardiovascular aterosclerótica
DCC	Doenças coronarianas cardíacas
DCV	Doença cerebrovascular
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido desoxirribo nucleico
Dp	Desvio padrão
DTC	Doppler transcraniano
E40K	Ácido glutâmico substituído pela lisina na posição 40
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EMR	Mediterrâneo Oriental
EUR	Europa
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
fl	Fentolítro
g/dL	Grama por decilitro
gDNA	Ácido desoxirribo nucleico genômico

Glu	Aminoácido Ácido Glutâmico
Glu6Lys	Aminoácido Ácido Glutâmico substituído por um aminoácido Lisina na posição 6
Glu6Val	Aminoácido Ácido Glutâmico substituído por um aminoácido Valina na posição 6
GWAS	Do inglês <i>Genome wide association study</i>
Hb	Hemoglobina
HbC	Hemoglobina C
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HbSC	Heterozigose composta por hemoglobinas S e C – Hemoglobinopatia SC
HbSS	Homozigose para hemoglobina S – Anemia Falciforme
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HDL	Do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>
HIV	Do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HP	Hipertensão pulmonar
Ht	Hematócrito
HU	Hidroxiuréia
IL	Interleucina
IM	Infarto do miocárdio
K ⁺	Cátion potássio
KCC	Cotransportadores de cloreto de potássio
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Do inglês <i>Low density lipoprotein</i>
LDL-ox	LDL oxidada
LG	Leucometria global
Lis	Aminoácido Lisina
LPL	Lipoproteína Lipase
MG	Minas Gerais
mg/dL	Miligrama por decilitro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
n	Número de participantes
NADH ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
Não-HDL	Não <i>High Density Lipoprotein</i>
NAORIGEN	Núcleo de Atenção e Orientação em Genética e Nutrição
ng/mL	Nanograma por mililitro
NO	Óxido nítrico
NOS 3	Óxido nítrico sintase 3
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Proteína C Reativa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PETN-MG	Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais
pg	Picograma
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
Ret	Reticulócitos
RLDL	Receptor de LDL
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RP	Retinopatia
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto
SEAR	Sudeste Asiático
SPSS	Do inglês <i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SR	Do inglês <i>scavenger receptors</i>
STA	Síndrome Torácica Aguda
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Solução de Tris, Ácido acético e EDTA
TAG	Triacilglicerol
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Solução de Tris, EDTA
TG	Triglicerídios
TNFA	Fator de necrose tumoral A
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFJF-GV	Universidade Federal de Juiz de Fora <i>campus</i> Governador Valadares
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Val	Aminoácido Valina
VCM	Volume Corpuscular Médio
VLDL	Do inglês <i>Very low-density lipoprotein</i>
VR	Valor de Referência
WPR	Pacífico Ocidental
α-tal	Alfa talassemia
μg/dL	Micrograma por decilitro
μL	Microlitros
μm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGNIFICADOS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mi
δ	Delta
ζ	Zeta
ε	Epsilon
*	Asterisco (diferença significativa)
%	Porcento

Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 HEMOGLOBINOPATIAS.....	21
2.2 DOENÇA FALCIFORME.....	25
2.2.1 Doença Falciforme no Brasil	27
2.3 FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS FALCIFORMES	29
2.3.1 Polimerização.....	29
2.3.2 Hemólise crônica	32
2.3.3 Vaso-oclusão.....	34
2.3.4 Marcadores hematológicos e bioquímicos da Doença Falciforme	36
2.3.5 Diferenças entre Hemoglobinopatia SC e Anemia Falciforme	38
2.4 EVENTOS CLÍNICOS NA DOENÇA FALCIFORME.....	39
2.5 MODULADORES OU MODIFICADORES DA DOENÇA FALCIFORME.....	41
2.6 DISLIPIDEMIAS	45
2.6.1 Lipoproteínas e dislipidemias	45
2.6.2 Dislipidemias e Doença Falciforme.....	51
2.7 VARIANTES GENÉTICAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DE LIPÍDIOS E DOENÇA FALCIFORME.....	55
2.7.1 Gene <i>ANGPTL 4</i>	56
2.7.2 Gene <i>APOA5</i>	59
2.7.3 Gene <i>ZNF259 (ZPR1)</i>	62
2.8 POLIMORFISMO RELACIONADO À INFLAMAÇÃO E AO METABOLISMO DE LIPÍDIOS	64
2.8.1 Gene <i>TNFA</i>	64
3. OBJETIVOS.....	67
3.1 OBJETIVO GERAL	67
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	67
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4.1 DESENHO E LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	69
4.2 POPULAÇÃO ESTUDADA E ASPECTOS ÉTICOS	70
4.3 EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS.....	72
4.3.1 Exames coletados de prontuário	72
4.3.2 Exames realizados em laboratório contratado.....	72
4.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS	75
4.5 ANÁLISES MOLECULARES	75

4.5.1 Coleta do material biológico, extração e quantificação do DNA genômico.....	75
4.5.2 Genotipagens dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) de genes selecionados	76
4.6 GENOTIPAGEM DE ALFA-TALASSEMIA.....	77
4.7 GRUPO CONTROLE.....	79
4.7.1 Cálculo amostral do grupo controle	79
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	80
4.8.1 Análise univariada	80
4.9 FINANCIAMENTO.....	85
5. RESULTADOS.....	86
5.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	86
5.2 PERFIS HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DOS INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME	90
5.2.1 Correlação dos parâmetros Hematológicos e Bioquímicos dos indivíduos com doença falciforme.....	93
5.2.2 Perfil lipídico dos indivíduos com doença falciforme comparado ao grupo controle	108
5.2.3 Análise dos perfis hematológicos e bioquímicos em relação aos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade	112
5.2.4 Perfil aterogênico dos indivíduos estudados	116
5.3 INFLUÊNCIA DA TERAPÊUTICA DA HIDROXIURÉIA NOS PERFIS HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DOS INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME.....	118
5.4 BIOMARCADORES GENÉTICOS.....	120
5.4.1 Gene <i>ANGPTL4</i> rs116843064.....	120
5.4.2 Gene <i>APOA5</i> rs662799	124
5.4.3 Gene <i>ZNF259</i> rs964184	127
5.4.4 Gene <i>TNFA</i> rs1800629	134
5.5 CO-HERANÇA DE ALFA TALASSEMIA.....	140
6. DISCUSSÃO	143
6.1 PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DOS INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME	143
6.2 CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	145
6.3 ANÁLISES DO PERFIL LIPÍDICO	149
6.4 RAZÕES ATEROGÊNICAS.....	155
6.5 INFLUÊNCIA DA TERAPIA COM HIDROXIURÉIA.....	157
6.6 GENOTIPAGENS	158
6.6.1 <i>ANGPTL4</i> rs116843064c.118G>A	160
6.6.2 <i>APOA5</i> rs662799g.116792991 G>A.....	161
6.6.3 <i>ZNF259</i> rs964184c.724C>G,UTR 3'	161

6.6.4 <i>TNFA</i> rs1800629c.724C>G UTR 3' (-308G>A).....	163
6.7 ALFA TALASSEMIA	165
7.0 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	167
8. CONCLUSÕES.....	168
REFERÊNCIAS.....	170
APÊNDICES.....	206

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O termo “Doença Falciforme” (DF) não se refere a uma única doença, mas sim a uma coleção de anemias hemolíticas hereditárias, ou hemoglobinopatias, com padrão autossômico recessivo para a herança do alelo S, que apresentam propensão para que os eritrócitos se transformem em formas crescentes ou chamadas de foice (WARE et al., 2017). O alelo S leva à formação de uma Hemoglobina (Hb) defeituosa, conhecida como HbS. Tal Hb ocorre devido a uma mutação no códon seis no gene *HBB* (loco 11p15.4; MIM 141900; mutação HbS GAG>GTG; p.Glu6Val). Esta mutação promove uma modificação físico-química na molécula da Hb (AMARAL et al., 2015; CARVALHO et al., 2014; FELIX et al., 2010; SABARENSE et al., 2015). Quando o alelo HbS está em homozigose constitui-se a Anemia Falciforme (AF) (MIM # 603903), a qual apresenta manifestações clínicas e fisiopatológicas mais graves entre todos os tipos de DF (HABARA; STEINBERG, 2016; SERJEANT, 1997).

Podem ocorrer heterozigoses compostas do alelo S com outras variantes que codificam outros tipos de Hb tais como C, D, J, E, de maneira que a HbS esteja em concentração superior a 50% (SCHECHTER, 2008). A hemoglobina C (HbC) é formada em decorrência da mutação de transição também no códon seis do gene *HBB* que gera a troca do aminoácido ácido glutâmico pela lisina (p.Glu6Lis) (GARNIER et al., 2017). A combinação hereditária das variantes patogênicas HbS e HbC levam à Hemoglobinopatia SC. Além dessas combinações, pode ocorrer ainda, a co-herança do alelo HbS com outras variantes mutantes do gene *HBB* como a beta-talassemia e mutações no gene *HBA* que levam a alfa-talassemia (WARE et al., 2017).

Acredita-se que a mutação que leva a formação de HbS tenha surgido na África, e se perpetuou devido a vantagem conferida aos indivíduos que possuíam apenas o traço falcêmico em relação à resistência à malária (MCGANN, 2014; TEWARI et al., 2015). A doença se espalhou no Brasil em decorrência da imigração de negros africanos advindos do período colonial de escravidão no país (SILVA et al., 2013), o que poderia justificar a alta prevalência no Estado da Bahia, onde um em cada 650 nascidos vivos possui algum tipo de DF (CARVALHO et al., 2014; FERNANDES et al., 2010; RAMOS et al., 2015; RODRIGUES, et al., 2012; SANKARAN, et al., 2010). No Estado de Minas Gerais o Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN-MG) detectou a proporção de uma criança com DF a cada 1313

nascidos vivos (FERNANDES et al., 2010). Considerando os municípios de Governador Valadares e de Uberaba, a incidência observada é, respectivamente, de 0,030 e 0,019 para anemia falciforme e 0,021 e 0,016 para hemoglobinopatia SC (HbSC), segundo Diretorias Regionais de Saúde – DRS Programa Estadual de Triagem Neonatal - MG - 1998/2001 (JANUÁRIO, 2002).

As manifestações clínicas da DF variam consideravelmente entre os indivíduos, sendo os fenômenos vaso-oclusivos e a hemólise crônica os principais determinantes, acompanhado do estado inflamatório crônico (REED; VICHINSKY, 1998). Estes eventos levam a complicações vaso-oclusivas, dano de múltiplos órgãos e redução da sobrevivência do paciente (QUINN, 2016). As manifestações clínicas da AF podem ser moduladas pela presença da alfa-talassemia (alfa-tal), a qual interfere nos subfenótipos vaso-oclusivo e hemolítico de forma diferenciada (KATO et al., 2007). Embora haja muitos estudos dedicados a AF, informações comparativas da AF com a hemoglobinopatia SC são menos exploradas.

Outro interferente na gravidade na DF é a dislipidemia, sendo observados níveis aumentados de triglicerídios (TG) e reduzidos de colesterol total (CT), Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) (AKINLADE et al., 2014; ALELUIA et al., 2017b; EMOKPAE et al., 2014). A hipocolesterolemia, em especial os baixos níveis de HDL, tem sido identificada como biomarcador potencial da gravidade clínica da DF (EPHRAIM et al., 2016; SEIXAS et al., 2010; ZORCA et al., 2010). No entanto, o mecanismo de influência da dislipidemia na DF ainda permanece pouco esclarecido, sendo provável uma ação multifatorial, incluindo a variação genética, que responde em mais de 43% da variabilidade nos níveis de lipídios no plasma (CHANG et al., 2010).

Entre as variantes genéticas que podem influenciar o metabolismo lipídico, encontram-se os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) dos genes relacionados ao metabolismo de lipídios. Tais SNPs poderiam explicar parte da variação dos níveis de lipídios e modificar a gravidade das manifestações clínicas. No entanto, estudos que confirmam a influência desses SNPs na DF são escassos. A investigação do perfil lipídico, assim como o estudo de polimorfismos genéticos e suas associações com dados laboratoriais dos subfenótipos da DF e dos agravos clínicos poderiam elucidar parte da fisiopatologia e moduladores genéticos da DF, e, dessa forma, gerar ferramentas prognósticas ou diferentes alvos terapêuticos no tratamento dos agravos da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HEMOGLOBINOPATIAS

As principais doenças monogênicas hereditárias no mundo são as ligadas aos distúrbios hereditários da hemoglobina (Hb). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 7% da população mundial é portadora de alguma hemoglobinopatia e que 300.000 - 500.000 bebês nasçam a cada ano com alguma forma grave da doença (WEATHERALL, 2008).

As hemoglobinopatias foram originalmente predominantes nas regiões dos trópicos e subtropicais, onde a malária possuía alta incidência (MODELL; DARLISON, 2008). Fora do cinturão tropical, há uma distribuição desigual, refletindo diferentes padrões de migração dessas populações em países tropicais (WEATHERALL, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem e distribuição mundial das hemoglobinopatias nos continentes

Região do Mundo	HbS	HbC	HbE	β Tal	α^0 Tal	α^+ Tal
AFR	1-38	0-21	0	0-12	0	10-50
AMR	1-20	0-10	0-20	0-3	0-5	0-40
EMR	0-60	0-3	0-2	2-18	0-2	1-60
EUR	0-30	0-5	0-20	0-19	1-2	0-12
SEAR	0-40	0	0-70	0-11	1-30	3-40
WPR	0	0	0	0-13	0	2-60

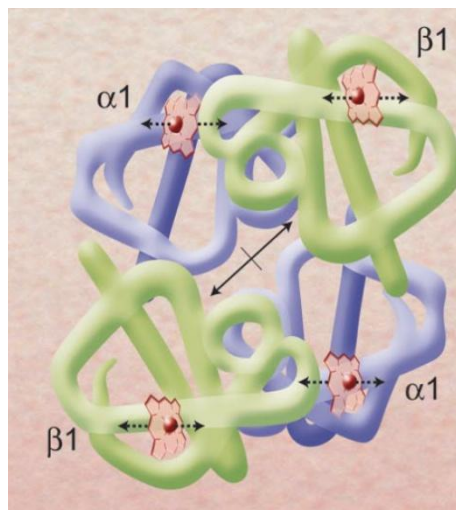
Sub-regiões do mundo: AFR = África; AMR = Américas; EMR = Mediterrâneo Oriental; EUR = Europa; SEAR = Sudeste Asiático; WPR = Pacífico Ocidental.
Weatherall, 2008

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias relacionadas com a síntese das cadeias globínicas da Hb. Englobam as doenças que apresentam ou uma alteração quantitativa da síntese de alguma cadeia de globina (alfa ou beta-talassemias) ou as doenças em que a síntese de uma globina estruturalmente diferente leva à formação de uma Hb anormal – uma variante

hemoglobínica com alterações qualitativas (BAIN, 2011; MODELL; DARLISON, 2008). Já foram descritas mais de 700 variantes de Hb (MAKANI, 2013), embora nem todas tenham efeito clínico (BAIN, 2011).

A Hb é o principal componente da hemácia e é a unidade responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos e órgãos e por fazer o transporte reverso do dióxido de carbono (CO_2) para os pulmões, bem como realizar o transporte de outros gases como o monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (NO) (SCHECHTER, 2008). É formada pela combinação de quatro cadeias polipeptídicas, chamadas globinas, associadas as unidades denominadas agrupamento heme (Figura 1) (SANKARAN; ORKIN, 2013).

Figure 1: Desenho da estrutura de uma molécula de Hemoglobina normal, indicando as quatro cadeias globínicas e os anéis tetrapirrólicos com os átomos de ferro

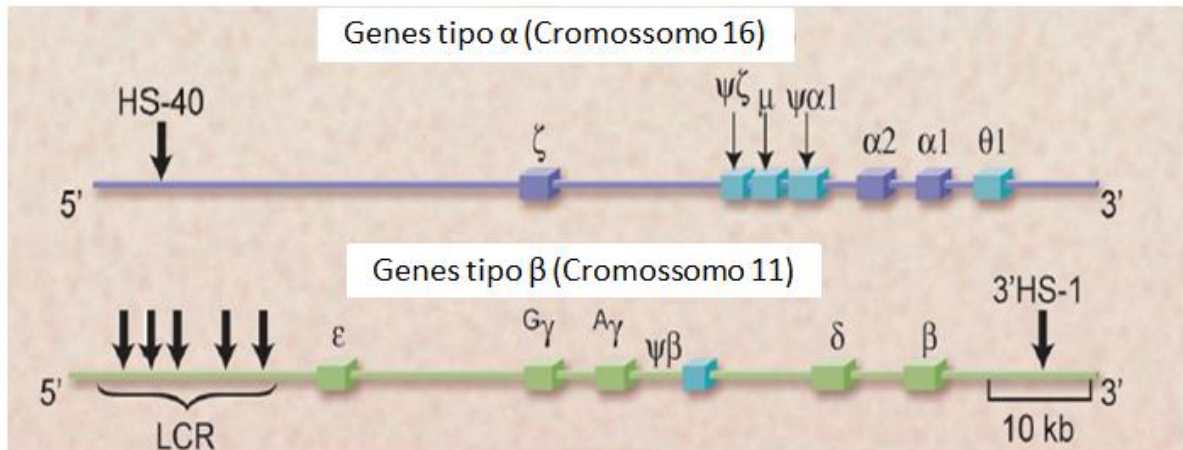


Adaptado de Schechter, 2008.

Os diferentes tipos de Hb humana são formados por combinações de cadeias globínicas que são sintetizadas de acordo com o período de desenvolvimento do indivíduo. Os genes das globinas estão organizados em agrupamentos alfa-globina e beta-globina em dois cromossomos autossômicos. Esses agrupamentos são compostos pelos genes *HBD* (11p15.4 142000), *HBB* (11p15.4 141900), *HBG1* (11p15.4 142200), *HBG2* (11p15.4 142250), *HBE1* (11p15.4 142100) e pelos genes *HBA1* (16p13.3 141800), *HBA2* (16p13.3), *HBZ* (16p13.3 142310), *HBM* (16p13.3 609639), *HBQ1* (16p13.3 142240) localizados nos cromossomos 11

e 16 respectivamente (Figura 2) (OMIM, 2017; SCHECHTER, 2008; SANKARAN; ORKIN, 2013).

Figure 2: Esquema do agrupamento dos genes da alfa-globina, localizados no cromossomo 16 e do agrupamento dos genes da beta-globina, localizado no cromossomo 11



Genes do agrupamento da alfa (α)-globina, localizado no cromossomo 16 (fita do DNA em azul no sentido 5'-3'), composto pelos genes ζ (*HBZ*) e μ (*HBM*) além dos pseudogenes $\psi\zeta$ e $\psi\mu$, gene $\alpha 1$ (*HBA1*), $\alpha 2$ (*HBA2*), $\theta 1$ (*HBQ1*). Genes do agrupamento da beta (β)-globina, localizado no cromossomo 11 (fita de DNA em verde no sentido 5'-3'), composto pelos genes ϵ (*HBE*), γG (*HBG¹*) e γA (*HBG²*), pseudogene beta ($\psi\beta$), gene δ (*HBD*) e β (*HBB*).

Adaptado de SCHECHTER, 2008.

O gene *HBB* é expresso em pouca quantidade no início da vida fetal. A troca para a Hb do adulto ocorre de três a seis meses após o nascimento, quando a expressão dos genes *HBG1* e *HBG2* é diminuída e aumenta a expressão do gene *HBB* e, em menor quantidade, é expresso o gene *HBD* (MAKANI et al., 2013; SCHECHTER, 2008) (Figura 3).

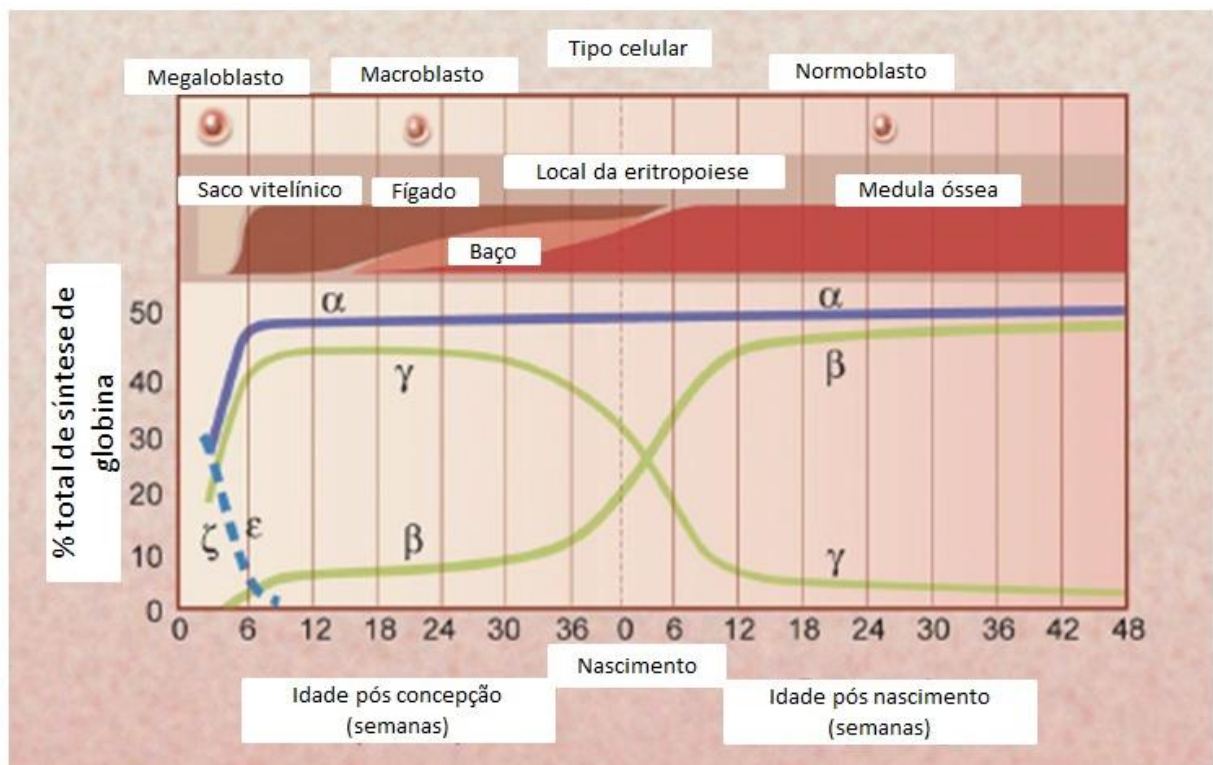
Duas cadeias alfa-globina mais duas cadeias beta-globinas constituem a Hb A1 (HbA1), que é a Hb mais comum no indivíduo adulto, compondo 97% do total das Hb. As cadeias alfa-globinas combinadas com cadeias delta-globinas constituem a Hb HbA2, que juntamente com a Hb fetal (HbF) completam os 3% remanescentes de Hb do adulto (SANKARAN; ORKIN, 2013).

Os defeitos moleculares nas regiões reguladoras ou codificantes dos genes humanos *HBA2*, *HBA1*, *HBB* ou *HBD* podem minimizar ou reduzir drasticamente a expressão dos

mesmos, levando a alfa (α), beta (β) ou delta (δ)-talassemia (α -tal, β -tal, δ -tal), respectivamente (GIARDINE et al., 2014).

A alfa-tal (MIM: 604131) é causada comumente por ao menos sete tipos de deleções mais conhecidas e denominadas: $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$, que atingem apenas um gene da alfa-globina e as deleções, que atingem ambos os genes da alfa-globina em cis, como os alelos $--^{SEA}$, $--^{FIL}$ e $--^{THAI}$, comuns no sudeste da Ásia, e os alelos $--^{MED}$ e $-\alpha^{20.5}$, que ocorrem com mais frequência no Mediterrâneo (TAN et al., 2001).

Figure 3: Representação gráfica da expressão temporal e local de produção das cadeias globinas nas fases embrionária, fetal e adulta.



Expressão temporal e da localização de Hemoglobinas nas diferentes fases da vida em seres humanos. Até o primeiro trimestre de gravidez são produzidas as cadeias épsilon globina (ϵ) e zeta globina (ζ), que se associam formando a Hemoglobina Gower 1 ($\epsilon\zeta\zeta$). Também no início do primeiro trimestre inicia-se a produção da globina alfa (α), que se associa à globina épsilon (ϵ) formando a hemoglobina Gower 2 ($\epsilon\alpha\alpha$). E ainda no período embrionário há a produção de Hemoglobina Portland, que é uma associação das cadeias zeta (ζ) e gama (γ) ($\zeta\gamma\gamma$). A hemoglobina fetal começa a ser produzida já no final do primeiro trimestre e permanece em pequena quantidade ao longo da vida do indivíduo, é formada pela combinação das cadeias globínicas gama A ou G (γ^A ou γ^G) e alfa (α) ($\gamma^A\alpha\alpha$ e $\gamma^G\alpha\alpha$). Já no final do terceiro trimestre começa a produção da β globina, que substitui a gama (γ) globina após o nascimento, se associando a alfa globina formando a hemoglobina principal do adulto, a hemoglobina A1. Inicia-se a partir do sexto mês de gestação a produção de delta (δ) globina, que associada à globina alfa (α) forma a hemoglobina A2, que tem baixa produção ao longo da vida do indivíduo.

Adaptado de SCHECHTER, 2008.

Estima-se, no Brasil, a prevalência de 10 a 20% do portador silencioso, no qual há a presença de um único cromossomo com a deleção do gene *HBA*, e de 1 a 3% de traço alfa-talassêmico em que o indivíduo herda a deleção em ambos os cromossomos de *HBA* ou apresenta deleção nos genes *HBA1* e *HBA2*. Se forem considerados apenas os indivíduos afrodescendentes, essa frequência pode alcançar de 20 a 25%. Este alto índice reflete a forte contribuição genética da população africana no Brasil e, em razão do elevado grau de miscigenação racial, há alta probabilidade de associação entre alfa-talassemia e outras variantes de Hb, sobretudo com a HbS, que é bastante frequente no Brasil (CANÇADO, 2006).

Levando em consideração a variação e especificidade clínica da Doença Falciforme e que, o presente estudo envolveu dois tipos de doença determinados pelos genótipos HbSS e HbSC, serão revisadas nas próximas seções, os aspectos específicos e associados a cada uma das formas.

2.2 DOENÇA FALCIFORME

A doença falciforme (DF) constitui um conjunto de hemoglobinopatias hereditárias monogênicas de padrão autossômico recessivo em que há duas hemoglobinas anormais e pelo menos uma é a hemoglobina denominada falciforme (HbS). A HbS ocorre devido a uma mutação de transversão, não sinônima no exon 1 no gene *HBB* (loco 11p15.4; OMIM 141900), que codifica a beta-globina (REN et al., 2017). A HbS é constituída de duas cadeias alfa-globinas normais e duas cadeias beta-globinas que apresentam uma alteração estrutural na qual o resíduo de aminoácido polar ácido glutâmico (Glu) foi substituído por um resíduo hidrofóbico de valina (Val) na posição 6 da cadeia polipeptídica (c.20A>T; SNP rs334; p.Glu6Val) (OMIM, 2017; ROBERTS-HAREWOOD, 2009; WEATHERALL, 2011). A anemia falciforme (AF) ocorre quando há homozigose do alelo S (HbSS) e constitui a forma mais comum (ROBERTS-HAREWOOD, 2009) e, geralmente, mais grave da DF (QUINN, 2016).

Alternativamente, a DF pode ocorrer quando há uma combinação da HbS com outras variantes que levam a alterações estruturais ou na síntese da beta-globina. O alelo HbC resulta

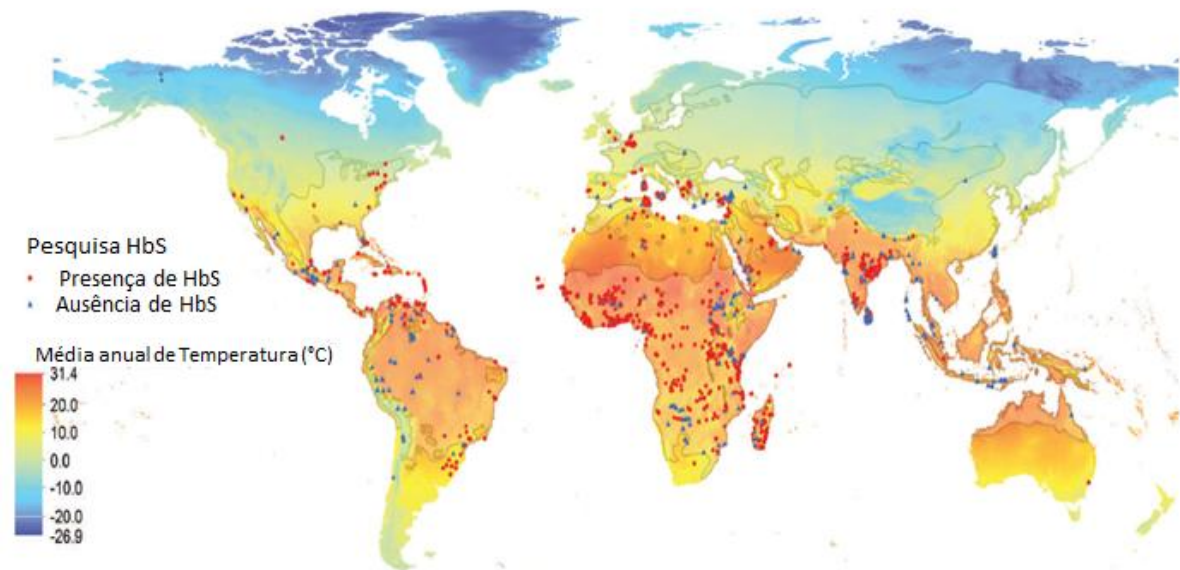
de uma mutação de transição também no códon 6 do gene *HBB* que gera a troca do aminoácido ácido glutâmico pela lisina (rs33930165; c.19G>A; p.Glu6Lis) (GARNIER et al., 2017). Um indivíduo heterozigoto composto, portando, a HbS e outra mutação da hemoglobina, como HbC apresentará a hemoglobinopatia HbSC, ou em combinação com a β -talassemia, os genótipos HbS β^0 ou HbS β^+ , além de outras combinações, como SD-Punjab, SO-árabe, S-Lepore e outras variantes raras (BAIN, 2011). Nestas categorias, não está incluído o estado heterozigótico HbAS, chamado traço falciforme que geralmente é assintomático (REN et al., 2017). As formas HbSC e HbS β^+ são as formas menos graves da DF quando comparadas às outras formas da doença, embora ocorra uma ampla variação clínica entre todas as formas (QUINN, 2016; SANKARAN, et al., 2010).

Quanto à epidemiologia, a DF é a doença monogênica mais comum e amplamente distribuída no mundo (WEATHERALL, 2011). O alelo HbS pode ser encontrado em grande parte do mundo, entretanto é mais frequente em regiões de clima mais quente (Figura 4) (TEWARI et al., 2015). Estima-se que nasçam por ano na África subsaariana 240.932 e em outros lugares 92.997 crianças com AF e 54.736 crianças com a doença HbSC em todo o mundo (WEATHERALL, 2011). Cerca de 8% dos afro-americanos carregam o traço da célula falciforme (STEINBERG, 2008). Alguns portadores de DF sofrem crises graves desde os primeiros meses de vida, levando a óbitos precoces no início da infância ou quando adultos jovens, enquanto outros pacientes têm vida quase normal (NNODIM et al., 2012). Em países em desenvolvimento estes índices se tornam ainda mais acentuados, sendo a incidência de óbitos maior e a sobrevida reduzida em pacientes com AF (SABARENSE et al., 2015).

Nos Estados Unidos da América, a mediana da idade dos óbitos de indivíduos com AF é de 42 anos para homens e 48 anos para mulheres. Já para as pessoas com hemoglobinopatia SC, a expectativa de vida é de 60 e 68 anos, para homens e mulheres, respectivamente (PLATT et al., 1994).

A elevada taxa de intercorrências clínicas de pacientes com DF altera a qualidade de vida do portador, desencadeando aspectos psicossociais alterados, levando a dificuldades de interação social no trabalho, estudos, lazer, além de baixa autoestima, depressão e medo, que se intensificam frente às repetidas crises de dor e internações (FELIX et al., 2010; MARTINS et al., 2010; SILVA et al., 2013).

Figure 4: Mapa de presença ou ausência da mutação da célula falciforme (hemoglobina S) pelo mundo e a temperatura média anual (em °C)



Adaptado de TEWARI et al., 2015.

2.2.1 Doença Falciforme no Brasil

Devido, principalmente, à imigração de negros africanos no período colonial, a DF se disseminou pelo Brasil, visto que a hemoglobina S é mais frequente na população africana. Dessa forma, a imigração favoreceu a miscigenação dos povos, o que levou à dispersão dos alelos causadores da DF, tornando-a a doença hereditária monogênica mais comum do país (CARVALHO et al., 2014; FERNANDES et al., 2010; RAMOS et al., 2015; RODRIGUES, et al., 2012; SANKARAN, et al., 2010).

Este grupo de doenças crônicas apresenta desafios significativos para a saúde pública em algumas partes do mundo, especialmente no Brasil (SILVA et al., 2013). O Ministério da Saúde estima a prevalência de 25.000 a 30.000 indivíduos com AF no país e a incidência de 3.500 novos casos a cada ano (o nascimento de uma criança com AF para cada 1.000 recém-nascidos vivos) (CANÇADO; JESUS, 2007).

Os maiores índices concentram-se na Bahia, onde em cada 650 nascidos vivos, um possui algum tipo de DF (SILVA et al., 2013). Minas Gerais é o terceiro estado em incidência

da DF (AMARAL et al., 2015), sendo 72 casos em cada 100 mil nascidos vivos (1:1.400), com incidência de 3,3% e um portador do traço falciforme para cada trinta nascimentos (SILVA et al., 2015). De acordo com o Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN-MG), entre 1998 e 2005, a cada 1400 nascidos vivos uma criança nascia com DF (FERNANDES et al., 2010).

Nos municípios de Governador Valadares e de Uberaba, Minas Gerais, observa-se uma importante incidência de DF e de traço falciforme. A Tabela 2 indica a prevalência da DF (genótipos HbSS e HbSC) e de heterozigotos para hemoglobinas S e C para os municípios citados (JANUÁRIO, 2002).

Tabela 2: Percentual da doença falciforme (HbSS e HbSC) e heterozigotos para hemoglobinas S e C nos municípios de Governador Valadares e de Uberaba, por crianças triadas

Município	Formas da Doença Falciforme			
	HbSS	HbSC	HbAS	HbAC
Governador Valadares	0,030	0,021	3,136	1,451
Uberaba	0,019	0,016	2,926	0,68

HbSS: anemia falciforme; HbSC: hemoglobinopatia SC; HbAS: traço falciforme; HbAC: traço hemoglobinopatia C.

Diretorias Regionais de Saúde - DRS Programa Estadual de Triagem Neonatal - MG - 1998/2000

Diante da grande incidência no país, foram necessários mecanismos de triagem precoce de diagnóstico para que o tratamento antecipado reduza a ocorrência agravos em estágios posteriores da vida do indivíduo (SILVA et al., 2015). No ano de 2001, o governo Brasileiro incluiu a pesquisa de hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), por meio da portaria número 822/01 (MARTINS et al., 2010; RODRIGUES, et al., 2012). O PNTN lançou fundamentos para uma abordagem ampla da questão, que envolveu detecção precoce, ampliação da cobertura populacional, busca ativa de pacientes, confirmação diagnóstica, acompanhamento e tratamento adequados, além da criação de um sistema de informações para cadastrar os doentes (SILVA et al., 2015).

Em Minas Gerais, o Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) iniciou a triagem para detecção de hemoglobinopatias em 1998 (FELIX et al., 2010). Em 2005 foi instituída a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com DF e outras

hemoglobinopatias, visando à organização da rede de assistência aos portadores. Todas essas medidas têm como objetivo contribuir para redução da morbimortalidade da DF (MARTINS et al., 2010).

Após a inserção dessas políticas, os índices de mortalidade por AF têm decaído ao longo das últimas décadas, o que reflete o empenho do Estado pelo diagnóstico precoce e pela adoção de medidas preventivas já a partir do período neonatal em crianças com AF (RAMOS et al., 2015). A precocidade no diagnóstico permite o acompanhamento médico proporcionando mais chance de diminuição da morbidade, mortalidade e transmissão hereditária (CARVALHO et al., 2014).

2.3 FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS FALCIFORMES

A DF é uma anemia hemolítica multisistêmica que, embora monogênica, tem efeito pleiotrópico horizontal ou mosaico associado a episódios de crises agudas e dano progressivo de órgãos (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). A DF apresenta grande heterogeneidade na gravidade clínica decorrente de hemólise e de vaso-oclusão, reflexos da polimerização da HbS (REED; VICHINSKY, 1998), além do genótipo responsável pela forma da doença.

2.3.1 Polimerização

A mutação leva a alterações na carga líquida da molécula de Hb (ROBERTS-HAREWOOD, 2009), permitindo a formação de interações intermoleculares estáveis (polímeros lineares dos tetrâmeros de Hb) entre as cadeias de desoxihemoglobina S (LUX; JOHN; KARNOVSKY, 1976; SCHECHTER, 2008). A modificação é orientada diretamente pelo resíduo de valina substituído que se liga a uma região hidrofóbica entre um resíduo de fenilalanina e um resíduo de leucina na cadeia β globina vizinha (AZAR; WONG, 2017). À medida que a concentração de HbS nos eritrócitos se aproxima de 30 g/dL, um gel semissólido se forma dentro da célula (DONG; CHADWICK; SCHECHTER, 1992).

A polimerização da HbS acontece especialmente com a própria HbS. A HbS na presença de outras Hbs, como a HbA e a HbF se polimeriza de forma muito menos efetiva (DONG; CHADWICK; SCHECHTER, 1992). Para que o processo de falcização ocorra é necessário que a HbS esteja em alta concentração (ZAGO; PINTO, 2007).

A rede de proteínas que estrutura a membrana da hemácia é deformada pelos microfilamentos orientados de HbS (LUX; JOHN; KARNOVSKY, 1976). As fibras de HbS também danificam os eritrócitos ao aumentar a viscosidade citoplasmática, induzindo vazamentos de cátions através da membrana, o que provoca desidratação e aumenta a expressão de moléculas de adesão (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). A desidratação das hemácias é importante para a polimerização da HbS, levando à formação irreversível de eritrócitos em forma de foice. Os cotransportadores de cloreto de potássio (KCC), presentes na membrana da hemácia, transportam os íons cloreto (Cl⁻) e potássio (K⁺) para fora da célula juntamente com o efluxo de água, colaborando com o quadro de desidratação decorrente da polimerização da HbS (ELLORY, 2015; ZAGO; PINTO, 2007).

Ocorre também a diminuição da capacidade da HbS fixar o oxigênio (AZAR; WONG, 2017; RAMOS et al., 2015), assim como aumento da fragilidade dos glóbulos vermelhos, hemólise e obstrução microvascular (REN et al., 2017). Quando a HbS está oxigenada, estes polímeros se desintegram (AZAR; WONG, 2017). De modo que os eritrócitos passam por ciclos de oxigenação e desoxigenação, fazendo com que os polímeros de HbS danifiquem repetidamente a membrana (QUINN, 2016). Todos esses fatores geram o enrijecimento da membrana da hemácia, distorcendo seu formato para foice (Figura 5).

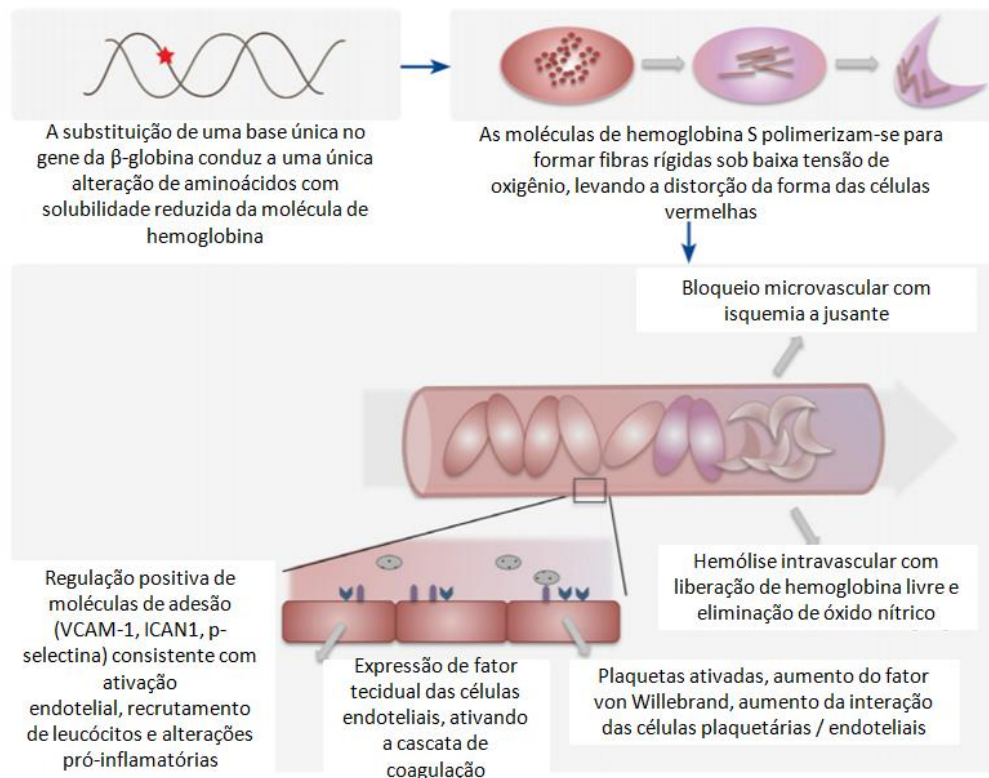
As alterações afetam os componentes lipídicos e proteicos da membrana da hemácia falciforme e alteram a interação com leucócitos, plaquetas e endotélio vascular (AZAR; WONG, 2017). As células endoteliais sofrem alterações, gerando regulação positiva de várias moléculas de adesão, incluindo E-selectina, P-selectina e molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1) (AZAR; WONG, 2017; HEBBEL et al., 1980). Há ativação dos leucócitos e plaquetas que então secretam várias citocinas e quimiocinas as quais promovem a inflamação e obstrução da vasculatura, prejudicando o endotélio. Além disso, a hemólise crônica libera grandes quantidades de hemoglobina livre, que se liga ao óxido nítrico (NO), levando a manifestações amplas que afetam a maioria dos órgãos vitais (BENDER, 2017; ZHANG et al., 2016) (Figura 6).

Figure 5: Ilustração da hemácia falciforme



Adaptado de Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved. Tirado de VACCA; BLANK, 2017.

Figure 6: Esquema dos principais mecanismos fisiopatológicos da doença falciforme



A alteração genética na anemia falciforme resulta em uma molécula de hemoglobina que é menos solúvel do que o normal em condições hipóxicas. As moléculas de hemoglobina polimerizantes causam a formação de tactoídes insolúveis, que resultam na distorção da célula vermelha na forma falciforme característica. Ocorrem vaso-oclusão recorrente, isquemia e dano de reperfusão. Estudos também demonstraram aumento da expressão de marcadores de ativação de células endoteliais, plaquetas e cascata de coagulação, gerando um cenário pró-inflamatória. A presença de hemólise intravascular também libera hemoglobina livre que é capaz de eliminar o óxido nítrico - um regulador chave da reatividade e do tônus vascular normal.

Adaptado de HAY; ATOYEBI, 2016.

2.3.2 Hemólise crônica

A vida útil de uma hemácia falciforme pode ser reduzida de 120 dias para apenas dez, em decorrência dos altos níveis de hemólise ou como resultado da retirada das hemácias falciformes da circulação pelo sistema reticuloendotelial (KESSE-ADU; HOWARD, 2013). A hemólise que acompanha a DF pode ser classificada em dois tipos: intravascular e extravascular. A lesão da membrana eritrocitária contribui para ambas (AZAR, WONG, 2017). A hemólise intravascular é decorrente da fragmentação da membrana do eritrócito já danificada pelas forças de cisalhamento geradas à medida que os eritrócitos deformados passam pela microvasculatura. Também ela pode ocorrer pelo alto acúmulo de Imunoglobulina G (IgG) e complemento na superfície dos eritrócitos, que podem levar à destruição da hemácia (TEST; WOOLWORTH, 1994). Já a hemólise extravascular acontece pela remoção das hemácias danificadas da circulação por macrófagos esplênicos e teciduais e monócitos (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

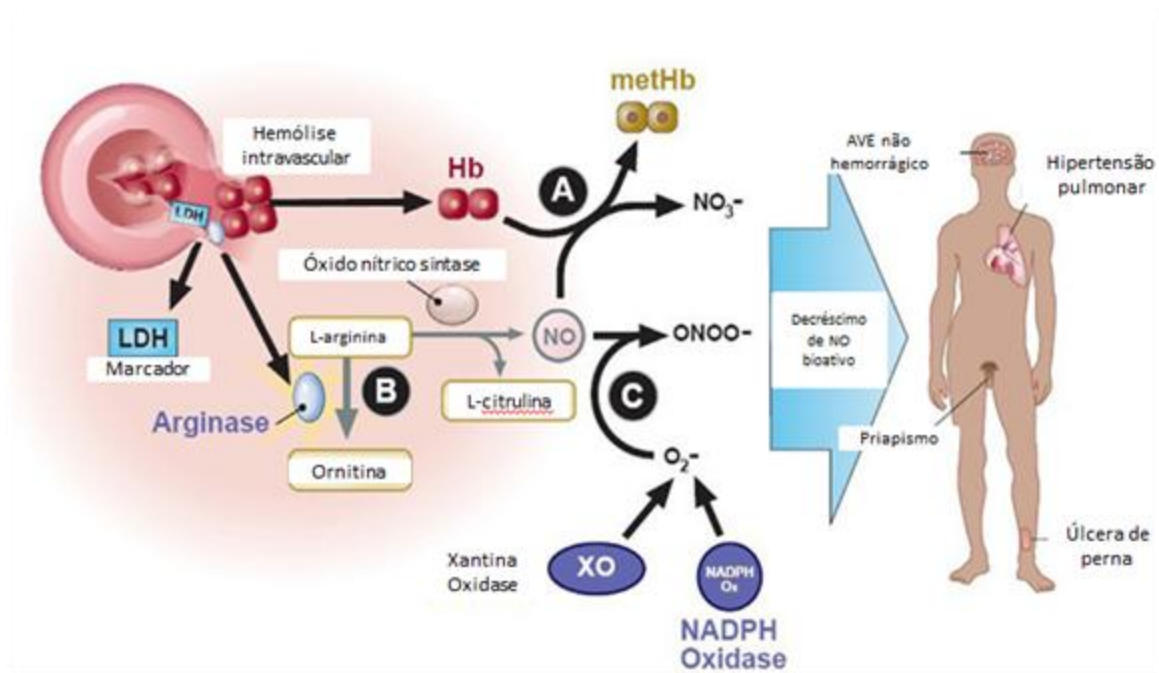
A hemólise crônica, característica patológica de maior atenção na DF, dá origem à diminuição da biodisponibilidade do NO, estresse oxidativo e ativação endotelial (BEREAL-WILLIAMS et al., 2012; KATO et al., 2006a; YESIM et al., 2011).

O NO é importante na manutenção do tônus vasomotor, é produzido pelas células do revestimento vascular (endoteliais), com a ajuda da enzima óxido nítrico sintase 3 ou endotelial (NOS3) (MIRANDA et al., 2015). O NO se liga a guanilato ciclase solúvel, que converte GTP em GMPc no músculo vascular liso, causando relaxamento e vasodilatação (SWITZER et al., 2006).

A Hb plasmática liberada de eritrócitos falciformes destruídos por via intravascular, rapidamente inativa o NO, formando nitrato e metahemoglobina. Adicionalmente, o grupo heme e o ferro hemínico catalisam a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen species*), que também consomem NO, gerando um estado de biodisponibilidade endotelial reduzida de NO na DF. Essa baixa biodisponibilidade de NO prejudica algumas de suas funções, como a inibição de ativação e agregação de plaquetas e repressão transcricional de moléculas de adesão celular, VCAM-1, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), P-selectina e E-selectina (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; MORRIS et al., 2005; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Somado a estes eventos, a

ruptura das hemácias também libera a enzima arginase, que destrói a L-arginina, o substrato para produção de NO, fornecendo outro mecanismo para a deficiência de NO endotelial (GILLI et al., 2016; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; MORRIS et al., 2005) (Figura 7).

Figure 7: Esquema das consequências da hemólise e da depleção do óxido nítrico na doença falciforme



A hemólise intravascular reduz a bioatividade do óxido nítrico. O óxido nítrico (NO) é produzido por isoformas de óxido nítrico sintase, utilizando como substrato a L-arginina. A hemólise intravascular libera simultaneamente hemoglobina, arginase e lactato desidrogenase (LDH) das células vermelhas ao plasma sanguíneo. A hemoglobina livre no plasma inibe estequiometricamente o NO, gerando metahemoglobina e nitrato inerte (A). A arginase no plasma consome L-arginina plasmática, gerando ornitina e esgotando sua disponibilidade para a produção de NO (B). A LDH também liberada da célula vermelha para o soro sanguíneo serve como um marcador da liberação de hemoglobina e arginase. O NO também é consumido por reações com espécies reativas de oxigênio (O²⁻) produzidas pelos altos níveis de atividade da xantina oxidase e da NADPH oxidase observada na doença falciforme, produzindo radicais de oxigênio como o peroxinitrito (ONOO⁻) (C). A diminuição da bioatividade do NO resultante na doença falciforme está associada à hipertensão pulmonar, priapismo, ulceração nas pernas e possivelmente com acidente vascular cerebral não hemorrágico. Fisiopatologia semelhante é vista em outras anemias hemolíticas crônicas intravasculares.

Adaptado de Kato; Gladwin; Steinberg, 2007.

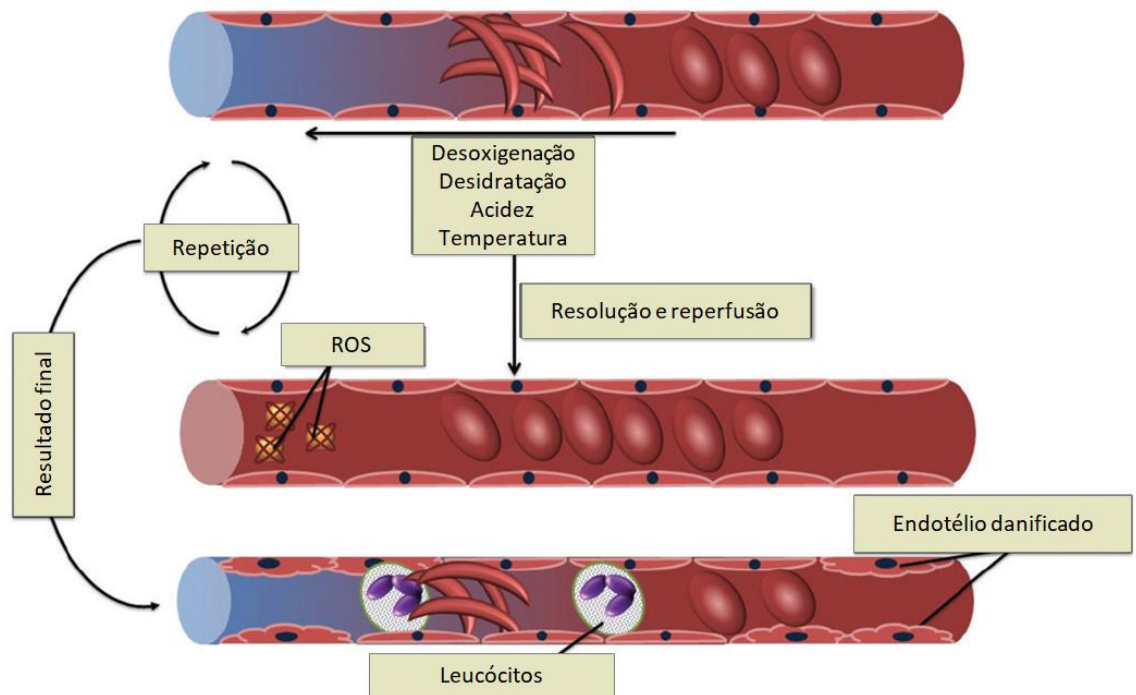
A hemólise é o mecanismo patológico que leva a manifestações cardiovasculares, pulmonares, gastrointestinais e renais em diversas doenças humanas, não sendo diferente na DF (GILLI et al., 2016). Na DF, a hemólise tem sido conhecida por causar anemia, fadiga, coletíase, úlceras cutâneas de perna, hipertensão pulmonar e contribuir para o desenvolvimento de vasculopatia progressiva (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

2.3.3 Vaso-oclusão

As hemácias falcizadas passam a apresentar enrijecimento, alteração de proteínas da membrana e aumento da expressão de moléculas de adesão. Essas moléculas de adesão estão mais presentes em reticulócitos, tornando-os protagonistas do processo de vaso-oclusão (SANKARAN, et al., 2010). Conseqüentemente, ocorre adesão das hemácias e reticulócitos ao endotélio, desencadeamento de um fenômeno inflamatório, ativação da coagulação, hipóxia, isquemia e infarto local, causando dano e dor (SANKARAN, et al., 2010; STEINBERG, 2008). A falcização *in vivo* é precipitada por infecção, hipóxia, desidratação, excesso de esforço e exposição ao frio. A desidratação de células vermelhas, pH, adesão de moléculas, NO, plaquetas e leucócitos também desempenham um papel em vaso-oclusão (ALEXY et al., 2010; ROBERTS-HAREWOOD, 2009).

As hemácias falcizadas prejudicam a circulação microvascular, produzindo isquemia ou infarto de tecido e danos endoteliais (STEINBERG, 2008). Adicionalmente, as hemácias falcizadas se tornam mais aderentes e realizam ligações entre elas, com eritrócitos não falcizados, com células nucleadas e com o endotélio vascular, gerando a vaso-oclusão (STUART; NAGEL, 2004). O endotélio na DF, de fato, é anormalmente ativado. A célula endotelial na DF exibe mais moléculas de adesão (entre elas VCAM e selectinas), maior produção de mediadores inflamatórios, bem como de ativadores celulares (por exemplo, interleucina 6 - IL6, Proteína quimioatraente de monócitos 1 - MCP-1, fator ativador de plaqueta - PAF). Além disso, a célula adquire um fenótipo procoagulante pela diminuição da trombomodulina e do inibidor da via do fator tecidual, além do fator tecidual aumentado, que inicia a cascata da coagulação, liberando múltiplos de fator de *von Willebrand* (FVW) que participam da hemostasia primária (HEBBEL; OSAROGIAGBON; KAUL, 2004; ZAGO; PINTO, 2007) (Figura 8). Este quadro observado em indivíduos com DF indica o estado inflamatório crônico que está presente, evidenciado por elevação crônica da leucometria, ativação anormal de granulócitos e monócitos (SWITZER et al., 2006), aumento de proteína C reativa (PCR) e da velocidade de hemossedimentação (VHS) (AZAR, 2017; REES; GIBSON, 2011).

Figure 8: Mecanismo de vaso-oclusão falciforme



O dano eritrocitário e a deformação (falciforme) ocorrem como resultado da polimerização do desoxiHbS e também de altas concentrações de HbS oxidada não polimerizada, modulada pelos níveis celulares de HbF, cátion eritrocitário e conteúdo de água, pH, temperatura e tensões mecânicas que resultam em danos na membrana e eventual falha. Anemia hemolítica e vaso-oclusão causam hipóxia tecidual. Quando esta oclusão é resolvida e a perfusão é estabelecida no tecido hipóxico, os radicais livres são produzidos. Esses radicais livres causam danos ao endotélio, tornando-os viscosos para hemácias e também para leucócitos. A parede vascular, finalmente, torna-se mais vulnerável à oclusão. Adaptado de: Habara; Steinberg, 2016.

Os principais mecanismos de inflamação estão ligados à adesão de hemácias, granulócitos, monócitos e plaquetas ao endotélio vascular que geram citocinas e alterações no metabolismo de NO (ZAGO; PINTO, 2007; KUTLAR, 2005). Além disso, uma série de mediadores inflamatórios e reagentes de fase aguda estão aumentados na DF, e estes estão listados na Tabela 3. Entre os mediadores da inflamação, encontra-se o fator de necrose tumoral alfa (TNFA), que é expresso por células endoteliais e é regulado em resposta ao estímulo inflamatório (BOWERS et al., 2013). O próprio processo de vaso-oclusão, independentemente da causa imediata, causa isquemia de tecido e lesões, que certamente incitam a inflamação (HEBBEL; OSAROGIAGBON; KAUL, 2004).

Tabela 3: Mediadores inflamatórios e reagentes de fase aguda elevados na doença falciforme

Trombina	VEGF	Leucotrieno B4
TNF alfa	G-CSF	Fatorativador de plaqueta
IFN gama	GM-CSF	P-selectinasolúvel
IL-1 beta	Endotelina-1	VCAM1 solúvel
IL-2	HETE-12	Microvesículas
IL-4	Secreção de peroxinitrito	Fosfolipase A2
IL-6	Soroamiloide	Alfa-2 macroglobulina
IL-8	Endotoxina	Homocisteína
TGF beta	PG E2	Imunoglobulina
TSP	PG12	Receptor IL2 solúvel
PCR	Fibrinogênio	FvW

PCR: proteína C reativa, CSF: fator estimulante das colônias; HETE-12, ácido 12-hidro xieicosatetraenóico; IL, interleucina; IFN, interferón; PG, prostaglandina; TNF, fator de necrose tecidual; TGF β , fator transformador de crescimento β ; TSP, trombospondina; VCAM, molécula de adesão de célula vascular; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; FvW, fator de von Willebrand.

Adaptado de Hebbel; Osarogiagbon; Kaul (2004).

2.3.4 Marcadores hematológicos e bioquímicos da Doença Falciforme

A DF caracteriza-se por diversos fenótipos clínicos decorrentes das alterações celulares como apresentado nas seções anteriores. Na literatura alguns marcadores hematológicos e bioquímicos relacionados à gravidade da doença têm sido investigados e relatados (ADAMKIEWICZ et al., 2009; AZEVEDO et al., 2017; KALHAN et al., 2017; LAND et al., 2013; SWITZER, 2006).

Os níveis de reticulócitos representam um importante marcador hematológico da DF, visto que, em indivíduos que possuem maior gravidade da doença seus níveis estão aumentados (HABARA; STEINBERG, 2016). Além disso, o aumento da contagem de reticulócitos na DF foi associado ao maior risco de desenvolvimento de DCV (BELISÁRIO et al., 2016a; SILVA; GIOVANI; VIANA, 2011). O reticulócito é a célula antecessora ao eritrócito no processo da eritropoese, mostrando-se um pouco maior que este último. Seu

aumento no sangue periférico é decorrente da resposta do sistema eritropoiético a um grave estresse, como anemia aguda ou crônica provocadas pela DF (MANKELOW et al., 2016).

Outro marcador importante da hemólise crônica é a alta concentração da lactato desidrogenase (LDH), uma enzima intracelular (LAND et al., 2013). A LDH foi correlacionada significativamente com contagens de reticulócitos, sendo relacionada à gravidade da doença. A LDH correlaciona-se com moléculas de adesão solúveis derivadas do endotélio, consideradas marcadores de ativação endotelial que são normalmente reprimidas por NO (GILLI et al., 2016).

A bilirrubina é um pigmento extremamente tóxico para os sistemas biológicos e especialmente para o sistema nervoso. É um produto de degradação do catabolismo do agrupamento heme da hemoglobina (CAMPISTOL et al., 2012). A maior destruição de eritrócitos em pacientes com DF resulta em hiperbilirrubinemia crônica e leva a formação de cálculos biliares (AZEVEDO et al., 2017; CHAAR et al., 2005).

Já o ferro, advindo da degradação da hemoglobina, se liga à transferrina circulante no plasma. Quando a taxa de saída de ferro do macrófago excede a capacidade de transferralização, o ferro não transferrino é produzido, especialmente em pacientes em regime de transfusão (YASSIN et al., 2017). Este ferro pode causar danos oxidativos e aumentar o risco infeccioso (L'ACQUA et al., 2015; KALHAN et al., 2017).

A elevada concentração de ferro e ferritina séricos e a saturação de transferrina no plasma podem ser marcadores bioquímicos dos distúrbios do metabolismo do ferro (YASSIN et al., 2017). Entretanto, a ferritina sérica pode ser pouco confiável em indivíduos com DF devido à condição inflamatória crônica, visto que os níveis de ferritina sérica aumentam em estados inflamatórios de modo que os níveis podem ser variáveis em prazos relativamente curtos, mesmo no estado clínico estacionário (ADAMKIEWICZ et al., 2009).

A elevação crônica da leucometria, a ativação anormal de granulócitos e de monócitos (SWITZER, 2006), o aumento da PCR e da Velocidade de Hemossedimentação (VHS) (AZAR, 2017; REES; GIBSON, 2011) identificam o estado inflamatório crônico em indivíduos com DF e servem como marcadores de gravidade da DF.

A Tabela 4 contempla alguns marcadores de hemólise e de vaso-oclusão da DF.

Tabela 4: Marcadores de hemólise e de vaso-oclusão na Doença Falciforme

Marcadores de Hemólise	Marcadores de Vaso-oclusão
Níveis elevados de LDH	Maior contagem de leucócitos
Baixo nível de Hb	Nível mais baixo de HbF
Alta contagem de reticulócitos	Sobrecarga de ferro (secundária a transfusões)
Bilirrubinas	Aumento da ativação plaquetária ou o aumento da liberação do fator von Willebrand pelo endotélio

LDH: lactato desidrogenase; Hb: hemoglobina; hbF: hemoglobina fetal.
Bender, 2017; Kato; Gladwin; Steinberg, 2007; Quinn, 2016

2.3.5 Diferenças entre Hemoglobinopatia SC e Anemia Falciforme

Além do quadro clínico menos grave, a hemoglobinopatia SC possui peculiaridades em relação à AF. Algumas diferenças laboratoriais estão apresentadas na Tabela 5.

Na hemoglobinopatia SC, os eritrócitos contêm quantidades aproximadamente iguais de HbC e HbS e níveis baixos (1-3%) de HbF (GUALANDRO et al., 2015; NAGEL et al., 2003). Em altas concentrações de HbC oxigenada, formam-se cristais, mas no estado desoxigenado eles se dissolvem rapidamente (PECKER, et al., 2017). A nosogenia da doença HbSC é articulada pelas interações entre as hemoglobinas S e C, bem como a desidratação dos eritrócitos, devido a alteração de função do transportador de membrana (MOZZARELLI; HOFRICHTER; EATON, 1987).

Tabela 5: Valores de alguns marcadores laboratoriais observados em indivíduos com Anemia Falciforme e hemoglobinopatia SC

	Hemoglobina (g/dL)	Reticulócitos (%)	HCM (pg)	HbF
HbSS	6-9	10-25	26-34	7,4 ± 6,7
HbSC	9-12	5-10	26-32	2,8 ± 2,8

Adaptado de QUINN, 2016; ZAGO; PINTO, 2007.

HCM: hemoglobina corpuscular média; HbF: hemoglobina fetal.

Por consequência a formação dos cristais de HbC, há a desidratação eritrocitária, que favorece a polimerização da hemoglobina S (falcização intracelular), resultando em diminuição da elasticidade das hemácias. Esses fenômenos levam ao aumento a viscosidade do sangue, uma das características marcantes da hemoglobinopatia SC (GARNIER et al., 2017).

Os indivíduos HbSC apresentam taxas mais baixas de hemólise, níveis superiores de Hb, menor contagem de leucócitos, anemia mais leve, menos episódios de dor vaso-oclusiva (no geral) e expectativa de vida significativamente maior quando comparada a AF (GARNIER et al., 2017; NAGEL et al., 2003; PECKER et al., 2017).

Por outro lado, portadores da doença SC mostram uma tendência peculiar a trombozes e embolia pulmonar, especialmente na gravidez (GARNIER et al., 2017; NAGEL et al., 2003; PECKER et al., 2017). A esplenomegalia e o risco associado ao sequestro esplênico podem persistir após a primeira infância (BENDER, 2017), além da doença SC estar associada à maior prevalência de algumas complicações, como retinopatia, distúrbios otológicos, osteonecrose e esplenomegalia duradoura em comparação com a AF. Evidências sugerem maior proporção de pacientes SC com priapismo e crises vaso-oclusivas (em crianças) (LIONNET et al., 2012).

Os demais sintomas da hemoglobinopatia SC são complicações esplênicas, Acidente Vascular Cerebral (AVC), doenças hepato-biliares, complicações renais, pulmonares e cardiovasculares, que apesar de mais comuns na AF não podem ser desconsiderados em SC (PECKER et al., 2017; SUMMARELL; SHEEHAN, 2016).

2.4 EVENTOS CLÍNICOS NA DOENÇA FALCIFORME

Os sintomas clínicos e sistêmicos na DF geralmente não são percebidos até a segunda metade do primeiro ano de vida, quando os níveis de HbF ainda são suficientes para limitar uma falcização clinicamente importante. Com o aumento da produção da HbS, iniciam-se os sinais e sintomas da doença (FERNANDES et al., 2010; SANKARAN et al., 2010).

As manifestações primárias da DF surgem de dois subfenótipos, anemia hemolítica crônica e crise aguda vaso-oclusiva (HABARA; STEINBERG, 2016; KATO; GLADWIN; STEINBERG 2007). Pacientes com o subfenótipo viscosidade/vaso-oclusão (VVO) têm um nível de hemoglobina relativamente alto e apresentam frequentes crises de dor vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e osteonecrose. Na outra extremidade do quadro clínico estão os pacientes com o subfenótipo de disfunção hemólise endotelial (HED). Tais pacientes têm altos níveis de LDH e alta contagem de reticulócitos e seu quadro clínico é caracterizado por AVC, Hipertensão Pulmonar (HP), priapismo e úlceras nas pernas (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; QUINN, 2016). A Tabela 6 resume as principais manifestações clínicas decorrentes dos subfenótipos da DF. Na Tabela 7 estão descritas as principais características laboratoriais, com relação à HbF e alfa-tal de acordo com os subfenótipos da DF.

Tabela 6: Principais manifestações clínicas de acordo com o subfenótipo da Doença Falciforme

Manifestações clínicas na Doença falciforme	
Disfunção endotelial hemólise	Viscosidade-vaso-oclusão
Anemia crônica	Episódios de dor vaso-oclusiva
Fadiga	Dactilite
Vasculopatia progressiva	Sequestro esplênico e infarto
Hipertensão pulmonar	Infecção
Priapismo	Síndrome torácica aguda
Úlceras nas pernas	AVC isquêmicos
Crise aplástica	Infartos cerebrais silenciosos
Nefropatia	Episódios de dor aguda
Doença pulmonar restritiva	Osteonecrose
Colelitíase	
Retinopatia	
Cardiomiopatia	
Crescimento e maturação sexual tardios	

Bender, 2017; Kato; Gladwin; Steinberg, 2007; Quinn, 2016

Tabela 7: Subfenótipos da Doença Falciforme e principais características laboratoriais, com relação a hemoglobina fetal e alfa-talassemia

Tipo de subfenótipo/ características	Viscosidade/vaso-oclusão	Disfunção endotelial hemólise
Laboratorial	Baixo LDH Alto hematócrito	Alto LDH Baixo hematócrito
HbF	Exerce alta proteção	Menos protetora
Co-herança de Alfa-tal	Ausência associada ao aumento de viscosidade	Presença é protetiva por reduzir HCM, densidade de eritrócitos e hemólise

HbF: hemoglobina fetal; LDH: lactato desidrogenase; HCM: hemoglobina corpuscular média. Habara; Steinberg, 2016

As manifestações clínicas mais comuns em crianças são as crises algicas, a Síndrome Torácica Aguda (STA), o sequestro esplênico agudo, a anemia aplástica aguda, infecções e o AVC (TARER et al., 2006). É conhecido que certas complicações de DF podem derivar da vasculopatia associada à hemólise progressiva, incluindo a HP, úlcera cutânea da perna, priapismo e AVC (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

As complicações neurológicas mais graves da DF, conseqüentes do subfenótipo de vaso-oclusão, incluem: infarto cerebral isquêmico, infartos cerebrais silenciosos, hemorragia cerebral, anormalidades do fluxo cerebral, incluindo a doença de Moyamoya e doença microvascular cerebral. Acima de 50% dos indivíduos com DF manifestarão algum grau de Doença Cerebrovascular (DCV) por volta dos 14 anos de idade (BERNAUDIN et al., 2011).

2.5 MODULADORES OU MODIFICADORES DA DOENÇA FALCIFORME

Embora a DF seja uma doença monogênica, decorrente de uma única mutação que leva a produção de HbS, a extensa diversidade de dados hematológicos e manifestações clínicas é sugestiva da presença de moduladores fenotípicos adicionais. Vários genótipos que levam a DF, em homozigose da HbS (a anemia falciforme) e heterozigotos compostos da variante S com as variantes tais como HbC, HbE, e HbD, ou HbS- β talassemia, explicariam, pelo menos em parte, esta variabilidade clínica (CONNES; VERLHAC; BERNAUDIN, 2013; HABARA; STEINBERG, 2016). Outros fatores genéticos e ambientais também parecem

contribuir para modular a gravidade desta anemia hemolítica e gerar a ampla diversidade clínica e hematológica observada na DF que não poderia ser explicada somente pelos efeitos de outras variantes de Hb (HABARA; STEINBERG, 2016; TEWARI et al., 2015).

Em relação aos fatores não genéticos que podem modificar a gravidade da DF agindo como fatores epigenéticos (RAKYAN et al., 2011) destacam-se: mudanças climáticas, qualidade do ar, atividade física (PIEL; STEINBERG; REES, 2017; TEWARI et al., 2015), doenças infectocontagiosas, condições socioeconômicas, deficiências de saneamento básico, moradia, assistência médica, entre outras condições (SANKARAN et al., 2010). Zago e Pinto (2007) dividem os fatores ambientais em três classes principais: (a) meio ambiente, (b) deficiência alimentar e qualidade nutricional inadequada (c) deficiência nas assistências médica, social e psicológica.

Os efeitos aditivo e epistático de outros genes podem modular o risco e a gravidade do fenótipo clínico da DF (NAGEL; STEINBERG, 2001). A contribuição dos fatores genéticos tem sido amplamente estudada na tentativa de explicar parte da variabilidade fenotípica clínica e laboratorial observada nas várias formas da DF (SMITH; ORKIN, 2016). Número crescente de estudos genótipo-fenótipo como os de genes candidatos e de associação ampla do genoma (GWAS) têm sido publicados (CHATURVEDI et al., 2017; LIU et al., 2016). Os estudos de GWAS identificaram vários locos gênicos, porém estes, em geral, explicariam apenas parte da variação fenotípica da DF (FERTRIN; COSTA, 2010).

Tais estudos de GWAS apresentam limitações pelo número de casos da DF que é rara em muitas populações, ausência de coortes com fenótipos clínicos bem definidos para estudos de associação e replicação dos achados, quantidade insuficiente de pessoas com sinais clínicos raros para comparar com controles e predominância de alguns fenótipos por faixa etária (infartos vaso-oclusivos predominam em crianças e úlcera de perna se agrava com a idade) (HABARA;STEINBERG, 2016).

Dentre os modificadores genéticos da DF mais bem estudados se destacam os níveis de HbF e a co-herança de alfa-tal (HABARA; STEINBERG, 2016;STEINBERG; SEBASTIANI, 2012; THEIN et al., 2009).

Geralmente os indivíduos que tem níveis mais altos de HbF tendem a ter um curso clínico relativamente leve, porque esta reduz a tendência de polimerização da HbS dentro do eritrócito (AKINSHEYE et al., 2011; HIGG; WOOD, 2008). Além da HbF inibir a

polimerização da HbS ela também diminui a precipitação da HbC; portanto, serve como poderoso agente de redução de falcização e cristalização (SANKARAN, et al., 2010; SUMMARELL; SHEEHAN, 2016).

Existem ainda cinco haplótipos do agrupamento cromossômico de beta-globina que foram associados aos níveis de HbF e à gravidade clínica da DF. Eles são nomeados de acordo com as regiões geográficas onde eles têm a maior frequência: CAR ou Bantu (República Centro-Africana), BEN ou Benin (África Ocidental), SEN ou Senegal (África Ocidental), CAM de Camarões, (África Ocidental) e ARAB (Ásia, Índia e a Península de árabe), além de haplótipos atípicos (LABIE et al., 1985; MAKANI et al., 2013).

Indivíduos que possuem os haplótipos SEN e ARAB apresentam níveis elevados de HbF, podendo apresentar manifestações clínicas mais leves. Os indivíduos que herdaram o haplótipo CAR apresentam níveis mais baixos de HbF, podendo apresentar manifestações clínicas mais graves. E aqueles que carregam o haplótipo BEN expressam níveis intermediários de HbF, podendo apresentar manifestações clínicas intermediárias (CAMILO-ARAÚJO et al., 2014). No entanto, em geral estas associações são bastante controversas entre os estudos (SERJEANT; VICHINSKY, 2017).

O segundo principal modificador de fenótipo clínico na DF é a expressão dos genes de alfa-globina (*HBA1/HBA2*) (LIU et al., 2016). Juntamente com a DF a coexistência de mutações deletórias nos genes de alfa-globina, que levam a α -tal, uma anemia hipocrômica microcítica, estão presentes em um terço nos pacientes de origem africana (RUMANEY et al., 2014; STEINBERG; EMBURY, 1986), bem como na população brasileira (ALELUIA et al., 2017a; BELISÁRIO et al., 2010a; DOMINGOS et al., 2014; LEMOS 2010). A deleção de 3.7 Kb (alelo $-\alpha^{3.7Kb}$) leva a um gene híbrido entre *HBA1* e *HBA2* é a mais frequente entre os indivíduos com ancestralidade africana. As formas de α -tal comumente encontradas entre os indivíduos com AF são as que envolvem uma deleção com a presença de um único gene *HBA* híbrido num dos cromossomos, $\alpha^-/\alpha\alpha$ também denominado heterozigoto α^+ -tal, α -tal silenciosa, ou talassemia 2 e aquelas em que o indivíduo tem o genótipo α^-/α^- , conhecido como α^+ -tal homocigótica ou traço talassêmico pela herança das deleções de ambos os genitores (SERJEANT; VICHINSKY, 2017).

A alfa-tal reduz a HbS dentro das hemácias o que leva a redução da polimerização (EMBURY et al., 1982; SCHECHTER, 2008) levando a redução da hemólise (CEULAER et

al., 1983) o que resulta em aumento do nível de Hb (EMBURY et al, 1982). Há um consenso que α -tal altera os parâmetros hematológicos por aumentar o conteúdo de hemoglobina total e de hemácias, diminuir reticulócitos, VCM, HCM, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e diminuir a contagem de células falciformes apresentando, porém, pouca influência sobre os níveis de HbF (BELISÁRIO; VIANA, 2011; HIGGS et al., 1982; SERJEANT; HAYES; SERJEANT, 1983). A grandeza destas mudanças está relacionada ao número de genes de alfa-globina deletados (STEINBERG; EMBURY, 1986).

A alfa-tal tem efeitos paradoxais sobre as manifestações clínicas da DF (NAGEL; STEINBERG, 2001) uma vez que em homozigotos α -tal há um aumento do nível de Hb e maior viscosidade que pode comprometer o fluxo sanguíneo nos grandes vasos. Portanto, o mecanismo de α -tal deve ser distinguido entre a deficiência do fluxo capilar daquela em vasos maiores (SERJEANT; VICHINSKY, 2017).

Há evidências de que a co-herança da α -tal atenua alguns dos sintomas da DF relacionados à disfunção hemolítica-endotelial tais como úlcera de perna, priapismo e vasculopatia cerebral (JOLY et al., 2016; PECKER, et al., 2017; TAYLOR et al., 2008). Por outro lado, estudos têm mostrado que a presença de α -tal é um fator agravante para as complicações do subfenótipo de vaso-oclusão tais como crises de dor (GILL et al., 1995; BAILEY et al., 1991; DARBARI et al., 2012), síndrome torácica aguda (PANDEY et al., 2011) e osteonecrose (BALLAS et al., 1989).

A presença de alfa-tal mostrou ser protetora de DCV e AVC em pacientes com DF (ADAMS et al., 1994; BELISÁRIO et al., 2010b; BELISÁRIO et al., 2014; FABRY et al., 1984; FLANAGAN et al., 2011; JOLY et al., 2016; KUTLAR, 2005) embora outros estudos mostraram não haver influência (BALKARAN et al., 1992; GILL et al., 1995). Belisário et al., (2010b) encontraram um índice 3,9 vezes maior de chance de um indivíduo que não apresenta deleção do gene *HBA* desenvolver DCV. Consistente com esse resultado, o mesmo autor e colaboradores em 2014 publicaram estudo com crianças com AF e confirmaram que os indivíduos sem a deleção de *HBA* tiveram um risco aumentado em três vezes de desenvolver DCV e ainda, risco sete vezes maior de desenvolver AVC (BELISARIO et al., 2014).

Os genes que modulam os níveis de HbF, a coexistência de alfa-tal e os haplótipos do gene *HBB* são insuficientes para explicar a heterogeneidade clínica e laboratorial observadas

na DF (STEINBERG; SEBASTIANI, 2012). Portanto, genes modificadores que alteram a resposta inflamatória, a adesão celular, a coagulação e a vasorregulação podem significativamente afetar a fisiopatologia da doença. Fatores genéticos independentes que afetam o metabolismo do NO, o transporte de ferro, também poderiam influenciar a expressão do fenótipo da doença. Além disso, danos em órgãos específicos tais como AVC, doença renal, HP, complicações cardiovasculares e a sensibilidade à dor são influenciados por modificadores genéticos (DRISCOLL et al., 2003; SERJEANT; VICHINSKY, 2017; STEINBERG, 2009).

2.6 DISLIPIDEMIAS

2.6.1 Lipoproteínas e dislipidemias

Os lipídios desempenham funções essenciais como constituintes de membrana, armazenamento energético, formação de hormônios, ácidos biliares, dentre outras (KHURANA; SILVERSTEIN, 2015). Ainda, podem se associar a proteínas, formando as lipoproteínas. Estas são as principais transportadoras de colesterol nos compartimentos intravasculares e extravasculares e são formadas por proteínas solúveis (apolipoproteínas) e lipídios (LUND-KATZ; PHILLIPS, 2010).

As lipoproteínas são classificadas em: (1) ricas em Triglicerídeos (TG), maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons, e pelas Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa (VLDL, sigla do inglês *very low density lipoprotein*), de origem hepática; e (2) ricas em colesterol, incluindo as Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL, sigla do inglês *low density lipoprotein*) e as de Alta Densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*) (FALUDI et al., 2017).

Quando há alteração no metabolismo e no perfil de lipídios, utiliza-se o termo dislipidemia. Esta alteração no metabolismo pode ser primária ou secundária. As dislipidemias primárias são de origem genética e as secundárias decorrem de outras doenças, como hipotireoidismo, obesidade ou insuficiência renal crônica, por exemplo. Também o

consumo excessivo de álcool, o uso de certos medicamentos tais, como bloqueadores beta-adrenérgicos, contraceptivos orais, corticosteroides, inibidores de proteases para tratamento da infecção por HIV etc. podem causar alterações no perfil lipídico (VODNALA; RUBENFIRE; BROOK, 2012).

Na população em geral, a variação genética é responsável por 43 a 83% da variabilidade nos níveis de lipídios no plasma (CHANG et al., 2010). Os estudos populacionais de associação genética identificaram mais de uma centena de genes que poderiam ter impacto direto nos níveis lipídicos (ASSELBERGS et al., 2012). Dentre estes genes estão os que causam dislipidemias monogênicas (GARCÍA; STEIN, 2016).

A dislipidemia, mais especificamente o aumento no soro dos níveis de LDL e baixo nível HDL, é considerada e reconhecida há muito tempo como um fator de risco principal e primário da doença cardiovascular aterosclerótica (DCA) coronariana e periférica (HELKIN, et al., 2016; JELLINGER et al., 2017). Estudos epidemiológicos sugerem que a hipercolesterolemia e, provavelmente, a própria aterosclerose coronariana sejam fatores de risco para acidente vascular isquêmico (NICHOLLS; LUNDMAN, 2004).

As LDLs produzidas no fígado são partículas globulares contendo um núcleo hidrofóbico, constituído principalmente por ésteres de colesterol e triglicerídeos (Tabela 8) (HELKIN et al., 2016; PRASSL, 2011). Apesar de serem a principal causa de doença cardiovascular, as LDLs têm suma importância no transporte de colesterol e fosfolipídios biologicamente ativos dentro do corpo, pois são as principais transportadoras endógenas destes componentes (GOUNI-BERTHOLD et al., 2004). As LDLs fornecem também suprimento de colesterol necessário para a manutenção de membranas celulares, crescimento celular e síntese de hormônios esteroides (GOUNI-BERTHOLD et al., 2004).

Tabela 8: Conteúdo de proteínas e fosfolipídios das partículas carreadoras de lipídios

Classes das Lipoproteínas		
LDL	VLDL	HDL
apoB-100	apoB-100	apoA-1
apoC-I	apoC-I	apoA-2
apoC-II	apoC-II	Paraoxanase
apoC-III	ApoE	Haptoglobina
ApoE	Fosfolipídios	Lecitina colesteróis aciltransferase
Fosfolipídios	Colesterol	Fosfolipídios
Colesterolis não-esterificados	Ésteres de Colesterol	Produtos da quebra de colesterol
Triglicerídios	Triglicerídios	Produtos de quebra de triglicerídios

Apo: apolipoproteína; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade.

Adaptado de Helkin, 2016

Há duas vias no catabolismo das LDLs: uma via dependente do receptor no fígado e outra via independente do receptor em tecidos não-hepáticos. Na via convencional do receptor de LDL (LDLR), partículas de LDL interagem com os hepatócitos através da ligação de alta afinidade da proteína de superfície da apolipoproteína B-100 (GOFMAN et al., 2007). A internalização de LDLs se dá por endocitose mediada pelo receptor seguida da degradação lisossomal de ésteres de colesterol e apolipoproteínas (BROWN; GOLDSSTEIN, 1986; HELKIN et al., 2016). A absorção através da via independente do receptor é determinada por concentração sérica de LDL oxidada (LDL-ox) (STEINBRECHER, 1987). A modificação do LDL em LDL-ox está vinculada ao desenvolvimento da aterosclerose (WITZTUM; STEINBERG, 2001).

Já a HDL é a menor lipoproteína que regula os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos em uma rede complexa de interações com vários tipos de células e receptores em todo o corpo. Assim como a LDL e a VLDL, a HDL é composta de muitas proteínas contidas em uma monocamada de fosfolipídio, com um núcleo de lipídios formados por produtos de degradação de colesterol e triglicerídeos (Tabela 8) (O'CONNELL; GENEST, 2001). O principal componente proteico, a apolipoproteína A1 (apoA1) é produzido por enterócitos e hepatócitos (O'CONNELL; GENEST, 2001). Enterócitos e hepatócitos são responsáveis pelo processo de adição de colesterol livre às partículas emergentes de HDL

(lipidação) para criar uma partícula circulante de HDL via adenosina trifosfato (ATP) Cassete de ligação A1 (ABCA1) (YU et al., 2013).

Também foi demonstrado que macrófagos são capazes de transferir o colesterol para HDL pelo mesmo mecanismo. Esta função da ABCA1 poderia explicar os efeitos inibitórios da HDL sobre as lesões ateroscleróticas já estabelecidas (HELKIN et al., 2016). Assim sendo, a HDL é um lipídio de proteção, conhecida pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias nas células endoteliais, nos macrófagos, nas células musculares lisas vasculares e anti-agregação plaquetária, atenuando globalmente a progressão da aterosclerose (HELKIN et al., 2016; NOFER et al., 2002).

A aterogenicidade dos níveis de HDL baixos pode depender de fatores genéticos e ambientais (GUALANDRI et al., 1985). Um dos fatores genéticos que podem influenciar é o nível de apoA1, na medida em que um nível normal em um indivíduo com baixo HDL pode ser uma indicação de menor risco, pois sugere a presença de um número adequado de partículas de HDL que contém menos colesterol (SIRTORI et al., 2001). Baixo HDL está associado à hipertrigliceridemia, diabetes mellitus tipo 2, excesso de peso ou obesidade, inatividade física, tabagismo, consumo muito elevado de carboidratos, uso de certas drogas (bloqueadores beta-adrenérgicos, esteroides anabolizantes, agentes progestacionais) e fatores genéticos (EXPERT PANEL ON DETECTION, 2001). As proporções dos índices colesterol total/HDL (CT/HDL se $> 2,8$ o risco aumenta oito vezes) e LDL/HDL (se $> 1,7$ o risco de evento cardiovascular aumenta oito vezes) foram altamente preditivas de risco para doenças cardiovasculares (BARTER et al., 2007). Por outro lado, uma relação TG/HDL de 2,4 ou superior, foi preditiva de doença coronária (LUZ et al., 2008), de resistência à insulina (MCLAUGHLIN et al., 2003; REAVEN 2002) e de disfunção endotelial (ZORCA et al., 2010). Porém, baixos níveis de HDL são preditores de risco significativo de doença cardiovascular, incluindo indivíduos com níveis mais baixos de LDL (<70 mg/dL) (BARTER et al., 2007).

Uma concentração de HDL superior a 60 mg/ dL é um fator de risco negativo independente para DCA em ambos os sexos, neste caso, um fator de risco pode ser subtraído do perfil de risco geral de um indivíduo (EXPERT PANEL ON DETECTION, 2001; WILSON et al., 1998). Estes resultados aplicam-se à população em geral, embora uma alta concentração de HDL pode não conferir cardioproteção (GOTTO-JR, 1999).

Muitos indivíduos têm concentrações normais de LDL, mas elevado TG e baixo HDL (XYDAKIS; BALLANTYNE, 2003). Além disso, em indivíduos com níveis de TG de 200 mg/dL ou maior, a VLDL também é elevada e o risco para DCA não pode ser avaliado adequadamente usando somente LDL (EXPERT PANEL ON DETECTION, 2001). Devido a estes fatos, há uma maior conscientização sobre os potenciais benefícios da triagem da fração de não-HDL. A não-HDL é a soma de VLDL e LDL, mas geralmente é calculada do seguinte modo:

$$\text{Não-HDL} = \text{colesterol total} - \text{HDL}$$

Para a maioria dos indivíduos, o nível ideal de não-HDL é superior a 30 mg/dL do valor de LDL considerado ideal. Desta forma, no risco muito alto, a meta do não-HDL deve ser < 80 mg/dL; no alto risco, < 100 mg/dL; no risco intermediário, < 130 mg/dL; e no baixo risco, < 160 mg/dL (CATAPANO et al., 2011; XAVIER et al., 2013).

A concentração de não-HDL é altamente correlacionada, mas não concordante com apolipoproteína B (apoB) total e pode ser utilizada para estimar o nível de VLDL, LDL, lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína (a) (BARTER et al., 2006; XYDAKIS; BALLANTYNE, 2003).

As VLDL são uma das principais lipoproteínas sintetizadas pelo fígado e são, em grande parte, responsáveis pelo transporte de TG endógenos (GIBBONS; WIGGINS, 1995). Os TGs são, então, transferidos de partículas HDL em troca de ésteres de colesterol. Como a LDL, a VLDL é composta de apolipoproteínas, uma variedade de fosfolipídios, colesterol e TGs (Tabela 8). Quando VLDLs circulantes entram em contato com o músculo cardíaco, o músculo esquelético ou tecido adiposo, a lipoproteína lipase remove os TGs do núcleo hidrofóbico para uso na produção ou armazenamento de energia (STEFANUTTI; LABBADIA; ATHYROS, 2014). À medida que os TGs são removidos, aumenta a densidade da partícula e ela transita para uma IDL. Essas partículas são removidas da circulação pela endocitose no fígado ou se tornam LDL após a remoção adicional de TGs (HELKIN et al., 2016). Semelhante a LDL, a VLDL afeta células endoteliais, células musculares lisas vasculares, macrófagos e fibroblastos, promovendo inflamação e progressão da doença aterosclerótica (TING et al., 2007; ZHAO; MA; SHEN, 2008).

TGs séricos elevados causam prejuízo na função da célula endotelial e promovem uma resposta inflamatória que aumenta a migração e adesão de monócitos, contribuindo para a

formação de placa aterosclerótica. Estudos *in vitro* de células endoteliais incubadas com lipoproteínas ricas em TGs de pacientes com hipertrigliceridemia mostraram expressão aumentada de moléculas de adesão (NORATA et al., 2006).

Os níveis de TGs são um componente importante da avaliação de risco de DCA em homens e mulheres (EXPERT PANEL ON DETECTION, 2001). Existem muitas evidências clínicas do significado clínico dos níveis elevados de TG que o apontam como um fator de risco independente (ASSMANN; CULLEN; SCHULTE, 1998; AZNAOURIDIS et al, 2007; EXPERT PANEL ON DETECTION, 2001; ONAT et al., 2006; SARWAR et al, 2007). Embora a hipertrigliceridemia possa ser um transtorno genético independente, pode identificar indivíduos em risco de síndrome de resistência à insulina (EINHORN et al., 2003; GRUNDY, 1998), e níveis de TG de 200 mg/dL ou superiores podem indicar um aumento substancial no risco de DCA (EXPERT PANEL ON DETECTION, 2001). A hipertrigliceridemia também está geralmente associada a um estado procoagulante e à hipertensão (RAPP et al., 1994).

O Guia para manejo de dislipidemia e prevenção de DCV (JELLINGER et al., 2017) recomenda que sejam precocemente realizados o diagnóstico e o manejo da dislipidemia para diminuir os níveis de LDL na criança e no adolescente para evitar o aumento do risco de DCV na idade adulta. Existe também um consenso de que a triagem da dislipidemia (com as medidas de colesterol plasmático total - CT, níveis de HDL, LDL e TG) em crianças e jovens seja realizada quando há outros fatores de risco para doença cardiovascular aterosclerótica tais como: obesidade, resistência à insulina, diabetes, hipertensão, tabagismo, doenças inflamatórias crônicas, HIV, síndrome nefrótica, história familiar de DCA ou de dislipidemia (SMITH et al., 2006). As recomendações dos níveis de lipídios para crianças e adolescentes estão sumarizadas na Tabela 9 elaborada a partir do “Guia para saúde e redução de risco em crianças e adolescentes” (DANIELS et al, 2012).

Tabela 9: Níveis de lipídios em crianças e adolescentes

Lipídios	Valores (mg/dL) em jejum e risco para doença cardiovascular		
	Ideal	Limítrofe *	Alto**
CT	<170	170–199	≥200
LDL	<110	110–129	≥130
Não-HDL	<120	120–144	≥145
HDL	>45	40–45	<40
Triglicerídios idade 0–9 anos	<75	75–99	≥100
Triglicerídios idade 10–19 anos	<90	90–129	≥130

CT: colesterol total; LDL: lipoproteína de baixa densidade; Não-HDL: não lipoproteína de alta densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; TG: triglicerídios.

*Valores Limítrofes: representam percentil 75, exceto para HDL que representa percentil 25; ** Valores anormais representam o percentil 95, exceto para HDL que representa percentil 10.

Adaptado de Daniel et al, 2012.

2.6.2 Dislipidemias e Doença Falciforme

Dislipidemia, caracterizada por hipocolesterolemia com diminuição do CT, da LDL e da HDL, foi documentada em muitas populações de crianças e adultos com a DF com diferentes genótipos, inclusive na população brasileira (ALELUIA et al., 2017b; EL-HAZMI; JABBAR; WARSY, 1987; EL-HAZMI et al., 1995; EPHRAIM et al., 2016; MARZOUKI; KHOJA, 2003; RAHIMI et al., 2006; SASAKI et al., 1983; SEIXAS et al., 2009; SEIXAS et al., 2010; SHORES, 2003; STONE et al., 1990; TEIXEIRA et al., 2017; VANDERJAGT et al., 2002; ZORCA et al., 2010).

Em adição à hipocolesterolemia, há também alguns relatos de hipertriglicidemia em pacientes com DF (BUCHOWSKI et al., 2007; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; MORRIS et al., 2005; OZTAS; UNAL; OZGUNES, 2009; SEIXAS et al., 2010; ZORCA et al., 2010). Também níveis elevados de VLDL encontrados em indivíduos com DF foram associados com aumento da pressão arterial sistólica (EPHRAIM et al., 2016). Além disso, hipertriglicidemia foi associada com hemólise, disfunção vascular e prevalência maior de HP (ZORCA et al., 2010).

O desequilíbrio dos níveis de lipídios na DF é associado ao perfil hemolítico, à disfunção endotelial e ao subfenótipo de vaso-oclusão. Baixos níveis de HDL foram associados à gravidade da anemia falciforme e a dois marcadores de hemólise (lactato desidrogenase e arginase) (ZORCA et al., 2010). Emokpae e Kuliya-Gwarzo (2014) avaliando pacientes com DF que apresentaram níveis baixos de HDL também observaram que estes tinham anemia mais grave, contagem de leucócitos e de plaquetas mais elevados e crises vaso-oclusivas quando comparados aos indivíduos com níveis normais de HDL. Seixas et al. (2010) propuseram que um subfenótipo adicional, denominado dislipidêmico, que foi observado em crianças com DF caracterizado por baixos níveis de HDL com hipertrigliceridemia e VLDL associado a outros biomarcadores de inflamação, o subfenótipo dislipidêmico seriam indicadores de pior prognóstico mais confiáveis para a doença.

Nos estudos realizados por Yesim et al. (2011) e Aleluia et al. (2017b), em pessoas com AF, foi encontrada potencial associação entre estresse oxidativo e baixos níveis de HDL.

Distúrbios cardiovasculares na DF incluem complicações envolvendo falhas cardíacas, infarto isquêmico, HP e insuficiência renal. Como já descrito, baixos níveis de HDL e aumento de TG é reconhecido como importante fator de risco para aterosclerose (GEARD et al., 2016). No entanto, é também conhecido que pacientes com DF apresentam taxas muito baixas de formação de ateroma (MANSI; ROSNER, 2002; YUDITSKAYA et al., 2009; ZORCA et al., 2010). Porém, complicações vasculopáticas, como infarto e HP, são observadas na DF. Como destacaram Kato e Gladwin (2008), HP e aterosclerose, uma vasculopatia proliferativa, compartilham várias características fisiopatológicas, incluindo proliferação do músculo liso vascular, diminuição da biodisponibilidade de NO, estresse oxidativo, ativação e disfunção endotelial, aumento dos níveis de inibidores de NOS endógeno, ativação plaquetária, trombose *in situ* e insuficiência renal acelerada.

Em autópsias que analisaram causa de óbito foi encontrada associação significativa entre HP e tromboembolismo, este último respondendo por 14.9% das circunstâncias de morte (DARBARI et al., 2006). Em outro estudo envolvendo 21 casos de autópsia, o tromboembolismo pulmonar foi observado em 38% dos óbitos (JASON et al., 2007). Yuditskaya et al. (2009) mostraram que baixos níveis de ApoA1, principal componente do HDL, envolvido na atividade vasculoprotetora e antioxidante, está associada a HP em pacientes com DF. Os autores sugerem que a fisiopatologia da vasculopatia falciforme tem uma distribuição anatômica diferente, sem deposição de colesterol e se sobrepõe parcialmente

com a aterosclerose. Níveis baixos de ApoA1 foram também indicados como marcador de crises de dor aguda na DF (TUMBLIN et al., 2010).

Infarto Isquêmico é uma das complicações mais graves da DF e tem sido associado a HP (KATO et al., 2006b). A histopatologia do infarto isquêmico tem características muito semelhantes à HP uma vez que envolve uma vasculopatia cerebral, caracterizada por hiperplasia da íntima e mediana, endotélio ativado e irregular e trombose *in situ* (ROTHMAN; FULLING; NELSON, 1986). Em estudo realizado por Ataga et al. (2015) não foi encontrada associação significativa com níveis de lipídios e história de infarto em indivíduos com DF.

Embora seja identificada uma alteração geral nas lipoproteínas em pacientes com DF, a etiologia e todas as implicações fisiopatológicas deste quadro dislipidêmico são pouco esclarecidas. É conhecido que na AF há um estresse eritropoiético devido à ineficiência da eritropoiese em compensar a demanda de eritrócitos pelo organismo. Assim, foi proposto que o colesterol seja consumido devido à intensa atividade eritropoiética (SASAKI et al., 1983; SHALEV et al., 2007). Além disto, foi mostrado que, como as hemácias não sintetizam colesterol, elas o captam do plasma pela troca contínua com lipoproteínas plasmáticas (NGOGANG et al., 1989).

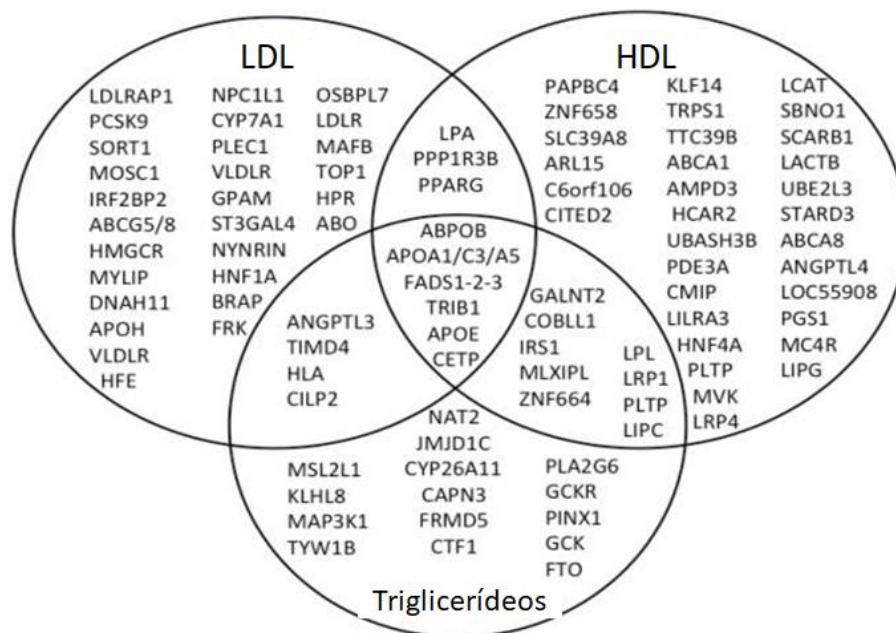
Vários trabalhos têm descrito o aumento do teor de colesterol nas hemácias associado com a diminuição do plasma ou colesterol sérico na DF (RAHIMI et al., 2006; SASAKI et al., 1983; SHORES et al., 2003; VANDERJAGT et al., 2002; WESTERMAN et al., 1979). Sabe-se que a hipocolesterolemia é uma característica coincidente entre anemias hemolíticas e não hemolíticas. Porém, é ainda controverso se a hemólise e a eritropoiese aumentadas seriam as únicas causas do desequilíbrio de lipídios observado na maioria dos estudos envolvendo a DF (ATAGA et al., 2015).

Há estudos que observam altos níveis de HDL, mas baixos níveis de TG em indivíduos com DF (RAHIMI et al., 2006) ou que não encontraram diferenças significativas nos níveis de HDL entre os pacientes com DF e o grupo controle (ATAGA et al., 2015). Isto mostra que assim como ocorre em outras características e desordens, o metabolismo e o perfil lipídico na DF em diferentes populações e grupos étnicos podem variar por estarem relacionados a variações genéticas e/ou outras enfermidades além da própria anemia hemolítica.

Assim, a dislipidemia frequentemente observada na doença falciforme além de decorrente dos efeitos fisiopatológicos (hemólise e estresse oxidativo) inerentes à herança do alelo HbS, poderia também decorrer da co-herança de outros genes com efeito epistático ou pleiotrópico, cujas variantes raras ou comuns modulam o metabolismo e perfil de lipídios. Embora a maioria dos relatos confirme que a hipocolesterolemia e a hipertrigliceridemia são características prevalentes nos pacientes com DF em diferentes populações e etnias, é pouco explorada a associação de variantes genéticas relacionadas ao metabolismo e perfil de lipídios com DF, com limitados estudos disponíveis (RAHIMI et al., 2011).

Estudos de GWAS envolvendo grandes populações identificaram variantes genéticas raras e comuns significativamente associadas ao metabolismo e perfil lipídico (Figura 9) (KATHIRESAN et al., 2007; KEENAN; RADER, 2013; LIGTHART et al., 2016; TESLOVICH et al., 2010; WILLER et al., 2013). A reprodutibilidade dos estudos destas variantes genéticas de relevância clínica, que contribuem para a variação interindividual do fenótipo, em outras populações com diferentes ancestralidades ou em subgrupos de indivíduos com a mesma doença e estudos de meta-análises é fortemente indicada para se confirmar ou refutar a associação (GOLDSTEIN, 2009; HARDY; SINGLETON, 2009).

Figure 9: Genes identificados por estudo amplo do genoma (GWAS) com significativa associação aos níveis de Lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicerídeos ($p < 5 \times 10^{-8}$)



2.7 VARIANTES GENÉTICAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DE LIPÍDIOS E DOENÇA FALCIFORME

As dislipidemias decorrem de fatores de risco multifatoriais, ambientais e influenciados por outras enfermidades, mas, principalmente, por fatores genéticos de suscetibilidade (HEGELE, 2009; RAMASAMY, 2016). Isto porque o metabolismo de lipídios decorre da ação de produtos gênicos tais como as apolipoproteínas, as enzimas e os receptores envolvidos no transporte plasmático, tráfico intracelular, síntese e catabolismo e internalização celular das lipoproteínas (RAMASAMY, 2014; TIWARI; SIDDIQI, 2012). Além disto, dislipidemias hereditárias monogênicas ou síndromes poligênicas são descritas em muitas famílias (RAMASAMY, 2016), como exemplo, a hipercolesterolemia familiar (OMIM 143890) que decorre da mutação em um único gene (HEGELE, 2009).

As pesquisas destinadas a encontrar variantes genéticas que contribuem para o metabolismo de lipídios iniciaram há pelo menos 30 anos (BRESLOW, 2000; LUSIS, 1988) e se baseiam no uso de análise de ligação clássica, modelos animais e, desde 2008, nos estudos de GWAS. Tais estudos têm identificado variantes raras e comuns em vários locos gênicos que significativamente explicam parte da variação dos níveis dos lipídios plasmáticos e distribuição das lipoproteínas na mediana das populações estudadas (COHEN, et al., 2004; KATHIRESAN, et al., 2007; KEENAN; RADER, 2013; LIGTHAR, et al., 2016; SAXENA, et al., 2007; TESLOVICH, et al., 2010; WILLER, et al., 2013). Embora a utilização clínica destas descobertas ainda seja incerta, as consequências biológicas nos mecanismos de risco de doenças e estratégias para potencial terapêutico foram identificadas em alguns estudos (HEWING; LANDMESSER, 2015; KEENAN; RADER, 2013; KRAUSS, 2008).

Rahimi et al (2011) estudando indivíduos com DF do sudeste do Irã analisaram variantes do gene *APOE*. A presença dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$ do gene *APOE* foi associada com menores níveis de LDL e CT nos pacientes com DF. Além da identificação de SNPs como marcadores que auxiliem na identificação de pacientes em risco, o entendimento da rede genética que modula os fenótipos clínicos da DF poderia contribuir com o esclarecimento fisiopatológico, com estratégias preventivas e mesmo com novos alvos terapêuticos para os fenótipos destas anemias hemolíticas (GEARD, 2016).

Diante dos reduzidos relatos na literatura especializada de pesquisa envolvendo as variantes genéticas relacionadas a dislipidemias na DF, nós propusemos o estudo de algumas variantes de menor frequência (alelo de menor frequência é $\geq 1\%$) conhecidas por estarem significativamente associadas ($P > 1 \times 10^{-6}$) com o metabolismo lipídico e a resposta inflamatória em análises GWAS.

Os genes selecionados para o presente estudo foram: *ANGPTL4*, *APOA5* e *ZNF259*. As informações gerais dos SNPs destes genes estão dispostas na Tabela 10 e serão destacados na próxima seção.

Tabela 10: Informações dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes selecionados para estudo de associação com níveis de lipídios

Gene/loco	rs e variação	Localização cromossômica do SNP	Variáveis de associação	Frequência Global do alelo de menor frequência *
<i>ANGPTL4</i> 19p13.3	rs116843064 c.118G>A, p.Glu40Lis	Chr 19:8429 323	Níveis de TG e HDL	A 0,01 – 0,03
<i>APOA5</i> 11q23.3	rs662799 g.4430C>T;c.-1131C>T; ou c.1891T>C ou c.1259T>C, 3` (na sequência Reversa do gene) ou A>G (FWD) 5` ;g.116792991G>A	Chr11:116792991	Níveis de TG, HDL e não-HDL	C (G) 0,16
<i>ZNF259</i> 11q23.3	rs964184 c.*724C>G,UTR 3`	Chr11:116778201	Níveis de TG	G 0,22

*Thermo Fisher, 2017; OMIM, 2017; Hapmap, 2017.

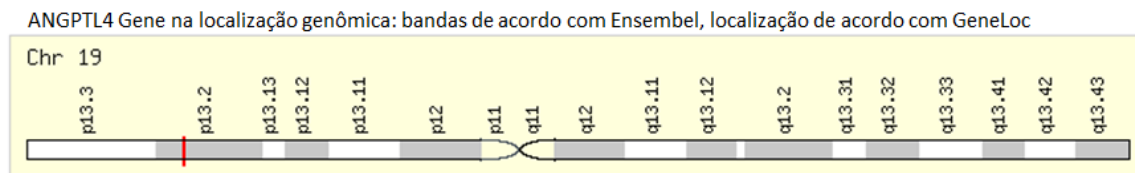
2.7.1 Gene *ANGPTL4*

O gene *ANGPTL4* localizado no loco 19p13.3 (MIM605910) (Figura 10) é considerado um loco de característica quantitativa (QTL do inglês *Quantitative Trait Loci*) envolvido no controle dos níveis de TGs plasmáticos. Ao menos cinco variantes com significado clínico foram descritas neste loco (OMIM, 2017). O gene *ANGPTL4* que contém

sete exons, codifica uma proteína glicosilada circulante de 406 aminoácidos, a Angptl4 (angiopoietin-like 4) também conhecida como fator adiposo induzido por jejum, secretada principalmente pelo fígado e pelos tecidos adiposos branco e marrom, (DIJK et al., 2015; KERSTEN et al., 2000; ZHU et al., 2012) e estruturalmente pertencentes à superfamília de fatores moduladores de angiogênese conhecidos como angiopoietinas (LA PAGLIA et al., 2017).

No plasma a Angptl4 é encontrada na forma nativa ou em fragmentos gerados pela proteólise de proproteínas convertases (ABU-FARHA et al., 2016). A proteína Angptl4 contém dois domínios, um C-terminal de 45-65 kDa (cANGPTL4) semelhante ao fibrinogênio com função provável de modular a tumorigênese (LA PAGLIA, et al., 2017; TAN et al., 2012) e também de induzir a lipólise (MCQUEEN et al., 2017); e outro domínio N-terminal denominado “coiled-coil domain” ou super enrolado (nANGPTL4) que atua como inibidor da atividade de lipoproteína lipase (LPL), portanto, inibindo a lipólise de TG plasmático (DIJK; KERSTEN, 2014; MATTIJSSEN; KERSTEN, 2012).

Figure 10: Esquema do cromossomo 19 e a localização do gene ANGPTL4



Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ANGPTL4&keywords=rs116843064> acessado em 07/01/2018.

O mecanismo molecular que explica a inibição da hidrólise de TG mediada por Angptl4 baseia-se na observação de que a maior parte dos monômeros de LPL estarem ligados aos oligômeros de nANGPTL4 (necessários para inibir LPL – GE et al., 2004) em relação aos dímeros de LPL. Desta forma, este desequilíbrio faz com que a LPL seja inibida e isso causa a alteração da liberação de TG do plasma e diminuição da absorção de ácidos graxos nos tecidos periféricos (LICHTENSTEIN et al., 2007). A intervenção da Angptl4 na LPL causa também a redução da afinidade de LPL pela proteína GPIHBP1, um transportador de célula endotelial (CHI et al., 2015). Alguns estímulos aumentam a expressão de Angptl4 como o jejum (LICHTENSTEIN et al., 2007), glicocorticoides, ácidos graxos não

esterificados e hipóxia relativa (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2011; KOLIWAD et al., 2009) e hormônio da tireoide (CATOIRE et al., 2014; YUAN et al., 2012).

Além da função na homeostase lipídica que envolve ambos os domínios cANGPTL4 e nANGPTL4 (GRAY et al., 2012), outros papéis têm sido atribuídos a Angptl4. O domínio nANGPTL4 tem papel na modulação da angiogênese (OIKE; YASUNAGA; SUDA, 2004); Angptl4 também inibe a adesão e migração de células endoteliais vasculares (CAZES et al., 2006). Angptl4 estaria envolvida na modulação da permeabilidade vascular, na inflamação (GUO et al., 2014), na diferenciação celular, na homeostase de glicose, na facilitação de cicatrização de feridas, na regulação do nível de ROS (ZHU et al., 2012).

A importância de Angptl4 na angiogênese foi mostrada pelos níveis significativamente mais elevados desta proteína na retinopatia proliferativa diabética e tem sido alvo terapêutico para esta alteração (BABAPOOR-FARROKHRAN et al., 2015). De forma similar, níveis seis vezes mais elevados de Angptl4 foram observados em autopsias de olhos de indivíduos com retinopatia proliferativa falciforme, decorrente do subfenótipo vasooclusivo observado na DF e que leva a angiogênese patológica com neovascularização da retina (JEE et al., 2017).

O papel da Angptl4 na homeostase lipídica também é demonstrado por sua concentração apresentar correlação positiva com TG em pacientes com síndrome metabólica (STEJSKAL et al., 2008). Estudo de coorte descreveu uma correlação negativa significativa entre HDL e Angptl4 (SMART-HALAJKO et al., 2010). O fenótipo hipolipidêmico observado em alguns estudos genéticos humanos suporta o papel fundamental para Angptl4 na manutenção dos níveis plasmáticos de TG (ROMEO et al., 2007; ROMEO et al., 2009a).

Variações genéticas de *ANGPTL4* associadas a distúrbios do metabolismo lipídico foram identificadas em estudos GWAS (ROMEO et al., 2007; TESLOVICH et al., 2010; VAN LEEUWEN et al., 2016). Especificamente, a variante rara de sentido trocado do SNP rs116843064, c.118G>A, p.Glu40Lis (E40K) dentro do domínio N-Terminal “coiled-coil”, que afeta a estrutura e função de Angptl4 de inibir LPL, foi associada à redução dos níveis de TG e aumento de HDL (DEWEY et al., 2016; ROMEO et al., 2007; TESLOVICH et al., 2010), atingindo significância de $P = 3.83 \times 10^{-13}$ na associação com níveis de TG em recente estudo de replicação (VAN LEEUWEN et al., 2016). A substituição do aminoácido ácido glutâmico pela lisina desestabiliza a proteína após sua secreção, impedindo o acúmulo extracelular de oligômeros de nAngptl4 e abolindo a sua capacidade de inibir LPL (ROMEO

et al., 2009b). O nível médio de TG no plasma foi reduzido em 16 mg/dl (15%) nos heterozigotos GA do SNP rs116843064. Os portadores apresentaram níveis significativamente baixos de insulina em jejum, LDL e níveis significativamente maiores de HDL (ROMEO et al., 2007).

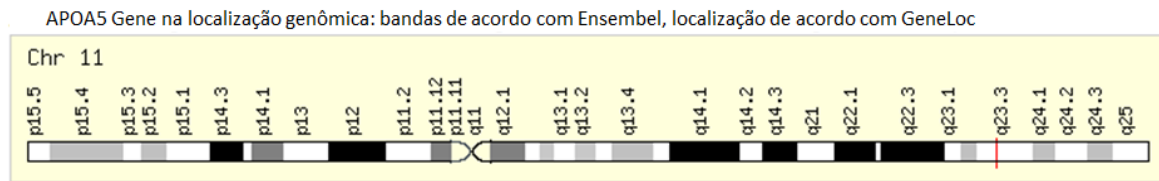
Os principais achados do estudo de Talmud e colaboradores (2008) são a confirmação de uma forte associação da variante E40K com menores níveis de TG e associações consistentes com níveis mais altos de HDL. Apesar dessas associações lipídicas benéficas, foi observada associação do alelo K40 com aumento do risco de doença arterial coronariana, independente dos efeitos nos níveis de TG e HDL e de outros fatores de risco clássicos. Sugerindo que estes efeitos vão além da associação com TG, implicando a propriedades angiogênicas de Angptl4.

Estudos com as variantes genéticas de *ANGPTL4* em pessoas afetadas pela DF não foram encontrados nos principais bancos de busca (PUBMED e MEDLINE) em recente pesquisa na literatura com as palavras chaves *ANGPTL4* ou rs116843064 X sickle cell disease ou hemolytic anemia.

2.7.2 Gene *APOA5*

O gene *APOA5* (Loco 11q23.3 - ID 116519;MIM606368) (Figura 11) composto por quatro exons codifica a apolipoproteína A5 (apoAV) que na sua forma ativa apresenta 343 aminoácidos (HUBACEK, 2016). O gene *APOA5* é um membro do agrupamento dos genes *APOA1/C3/A4/A5*, que afetam a variação dos níveis de lipídios nas populações em geral. Sendo quase exclusivamente expressado no fígado e no plasma e é detectado em concentrações muito baixas (PENNACCHIO et al., 2001). A apoAV se associa a quilomicrons e as lipoproteínas VLDL, HDL, mas não a LDL (WANG et al., 2016). ApoAV é responsável pela regulação dos níveis plasmáticos de TG através de três vias: por ativar a LPL (hidrólise de TG e estabilização do dímero ativo de LPL), por aumentar a lipólise de quilomicrons e lipoproteínas ricas em TG (VLDLs), e por acelerar a captação hepática de lipoproteínas remanescentes pela ligação a membros da família do Receptor de LDL (LDLR) e proteoglicanos de heparan sulfato (GONZALES et al., 2013; NILSSON et al., 2011).

Figure 11: Esquema do cromossomo 11 mostrando no traço vermelho a localização cromossômica do gene APOA5



Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=APOA5> acessado em 07/01/2018

Os níveis de TG são resultantes da ação combinada de suscetibilidade genética, dieta (consumo de gordura e álcool são fatores negativos), atividade física (diminui os níveis de TG), sexo (em homens os níveis de TG tendem a ser maiores), idade (os níveis de TG aumentam com a idade) e tabagismo (aumenta os níveis de TG) (HUBACEK, 2016). Há mais de dez anos, tem sido dada ênfase aos SNPs e haplótipos encontrados no agrupamento dos genes *APOA1/C3/A4/A5* que afetam independentemente a variação dos níveis de lipídios nas populações em geral (CHIEN et al., 2008; DELGADO-LISTA et al., 2010). O papel fundamental do gene *APOA5* em explicar parte da variação nos níveis de TG tem sido amplamente demonstrado através de estudos genéticos em associação com hipertrigliceridemia grave ou moderada. Os estudos sugerem que as variantes de *APOA5* afetam não apenas as concentrações totais de TG, mas também a distribuição de outras subclasses de lipoproteínas, como LDL e HDL, gerando uma dislipidemia aterogênica em indivíduos de alto risco (GUARDIOLA et al., 2015; MERCHED; CHAN, 2013).

Além disto, estudos de GWAS têm confirmado esta associação significativa dos polimorfismos comuns de *APOA5* para determinação dos níveis plasmáticos de TG (CHASMAN et al., 2008; KATHIRESAN et al., 2008; WATERWORTH et al., 2010). SNPs relatados dentro do gene *APOA5* são: rs662799 (g.T-1131>C; c.1891T>C ou c.1259T>C, 3' ou A>G 5'), rs3135506 (C56G, Ser19 > Trp), rs3135507 (G448A, Val150Met), rs2075291 (G553T, Gln185 > Cys), rs651821 (c. -3A-G), rs2266788 (c.*158C>T 3'UTR ou c.1891T-C ou c.1259T-C) e rs2072560 (IVS3 + G476A) (HUBACEK, 2016). As variantes rs662799, rs3135506, rs651821 e rs2072560 formam o haplótipo *APOA5* * 2 que foi associado com uma elevação de 20 a 30% nos níveis de TG no plasma em homens e mulheres caucasianos e três vezes mais comum nos indivíduos que apresentavam concentrações plasmáticas de TG superiores ao percentil 90 em relação aqueles com níveis de TG abaixo do percentil 10 corrigidos para idade e sexo (PENNACCHIO et al., 2002). Caussy et al. (2014) propuseram

que indivíduos com o haplótipo *APOA5* * 2 exibem a expressão reduzida de ApoAV no nível pós-transcricional regulada por um miRNA que se liga na região não traduzida 3'UTR do mRNA de *APOA5* (CAUSSY et al., 2014).

Especificamente sobre o SNP rs662799 do gene *APOA5* localizado na região intrônica 3' UTR, a frequência do alelo de menor frequência (C 3' ou G 5') difere muito entre as populações, variando desde 8% em europeu, 29% no leste asiático e até 35% em japoneses e é estimada em 16% na população em geral (dados do projeto 1000 Genome). Há muitos trabalhos que relatam interação significativa entre o alelo C do SNP -1131 T/C, com maior concentração de TG (KIM et al., 2013; HAHNE et al., 2008; OLIVA et al., 2016).

A presença do alelo de menor frequência g.4430C3' (ou G5') do SNP rs662799 no modelo de dominância (genótipos TC + CC ou A/G + GG) apresentou diminuição significativa na concentração plasmática de apoAV em comparação com indivíduos com o genótipo g.4430 TT (ou AA) (HAHNE et al., 2008). Em outro estudo, Kim et al. (2013) forneceram evidências para a relevância dos níveis plasmáticos de apoAV nas concentrações plasmáticas de TG. Este estudo mostrou claramente uma estreita associação inversa entre apoAV e TG em uma coorte de 754 indivíduos adultos hipertrigliceridêmicos (TG>150 mg/dl). Em comparação com os indivíduos com o genótipo selvagem g.4430 T/T (A/A), os indivíduos com genótipos TC e CC (ou AG e GG) apresentaram diminuição de 11% e 19% de apoAV, respectivamente, associada a aumento de 9% e 18% de TG, respectivamente.

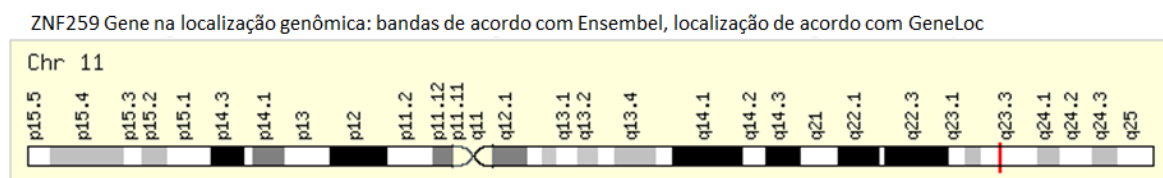
Em recente estudo, envolvendo crianças e adolescentes chinesas, o alelo de risco C (G) de rs662799 foi identificado como um preditor significativo e independente tanto de TG (coeficiente β padronizado = 0,184; $p < 0,001$) e variações do não-HDL (coeficiente β padronizado = 0,177; $p < 0,001$).

Estudos com o SNP rs662799 de *APOA5* em pessoas afetadas pela DF não foram encontrados nos principais sites de busca (PUBMED e MEDLINE) em recente pesquisa na literatura com as palavras chaves *APOA5* ou rs662799 *x*sickle cell disease ou *hemolytic anemia*.

2.7.3 Gene *ZNF259* (*ZPR1*)

Numa ampla região do cromossomo 11q23.3 estão sobrepostos os agrupamentos de genes *APOA5-ZNF259-BUD13*. O gene *ZNF259* (ID: 8882; OMIM: 603901) também identificado como *ZPR1* (Figura 12) contém 14 exons e codifica a proteína *Zinc finger 259* com 459 aminoácidos. A proteína *ZNF259* é expressa em vários tecidos e é essencial para a função nucleolar normal em células em proliferação podendo ser encontrada no citoplasma de células em repouso (quiescentes) e no nucléolo das células em estágio proliferativo (GALCHEVA-GARGOVA et al., 1998) A deficiência de *ZNF259* causa defeitos na expressão do gene das histonas, impede a síntese de DNA e provoca a ruptura da localização subnuclear de proteínas que estão associadas à síntese de DNA, incluindo o antígeno nuclear das células da proliferação da subunidade de DNA polimerase (PCNA) e o fator de transcrição do gene da histona, *NPAT* (GANGWANI, 2006). O receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma, fator de transcrição mais relevante que se liga à região promotora de *ZPR1*, é que desempenha um papel importante na sensibilidade à insulina e na obesidade. A região promotora de *ZPR1* também está ligada pelo fator nuclear dos hepatócitos, que ativa uma variedade de genes envolvidos no metabolismo de glicose, ácidos graxos e colesterol. Assim como o gene *APOA5*, que se localiza na mesma região de *ZNF259* (*ZNF259* está distante a aproximadamente 1.3 kb de *APOA5*), este também mostra associação significativa com concentrações de TG (KVALØY et al., 2015; ZHOU et al., 2015; FU et al., 2015).

Figure 12: Esquema do cromossomo 11 mostrando no traço vermelho a localização cromossômica do gene *ZPR1* ou *ZNF259*



Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZPR1&keywords=rs964184> acesso em 07/01/2018.

Dentre as variantes mais estudadas do gene *ZNF259* está o SNP rs964184 c.*724C>G, localizado em região 3' não traduzida (UTR 3' *untranslated region*). A frequência do alelo de menor frequência G mostra variação étnica significativa com média global de 22%, mas com frequências mais altas em populações nativas americanas e hispânicas (acima de 40%) do que em populações europeias (PARRA et al., 2017). Nas populações europeias, a frequência do alelo G está entre 12% e 16% (BOYLE et al., 2012).

Em estudo recente, foi confirmado que na região *BUD13/ZNF259/APOA5* o SNP rs964184 mostrou ser uma variante líder/causal por apresentar um alto valor de significância com níveis de TG ($p = 5.32 \times 10^{-37}$) (PARRA et al., 2017). Para os autores, este polimorfismo pode estar exercendo seu efeito através de três mecanismos potenciais: 1) modificação da atividade intensificadora, 2) regulação da expressão de vários genes em cis e/ou trans, ou 3) modificação dos padrões de metilação do promotor do gene *APOA5*. Em estudos anteriores e em outras populações, esta variante havia também sido indicada como um SNP causal por apresentar alta significância com níveis de TG ($p = 1.75 \times 10^{-157}$) na região *BUD13/ZNF259/APOA5* (SURAKKA et al., 2015).

Num estudo da população japonesa envolvendo 2354 indivíduos com dislipidemia (hipertrigliceridemia, hipo-HDL-colesterolemia ou hiper-LDL-colesterolemia) e 3106 indivíduos controles, a análise de regressão logística multivariada com ajuste para idade, sexo e índice de massa corporal revelou que a variante rara G rs964184 de *ZNF259/ZP1* ($P = 5,1 \times 10^{-7}$; razão de chance, 1,37; modelo dominante), foi significativamente associada à hipertrigliceridemia (ABE et al., 2015). Além da presença do alelo G estar associada a maiores níveis de TG (12% maior), a variante foi também associada a concentrações menores de HDL (efeito de 3%) e maiores de não-HDL, bem como ao risco de síndrome metabólica, mas não foi associada a novos eventos vasculares (VAN DE WOESTIJNE et al., 2014). Associações com SNP rs964184 com doença arterial coronária foi observada (SCHUNKERT et al., 2011).

Em recente pesquisa nos principais bancos de busca (PUBMED e MEDLINE) com as palavras chaves *ZNF259* ou *ZP1* ou rs964184 and *sickle cell disease* ou *hemolytic anemia* não foram encontradas publicações indexadas envolvendo a DF.

2.8 POLIMORFISMO RELACIONADO À INFLAMAÇÃO E AO METABOLISMO DE LIPÍDIOS

Nós selecionamos uma variante comum (rs800629 *TNFA*) conhecida por estar associada ao aumento da expressão da proteína TNFA, envolvida na resposta pró-inflamatória, além dos níveis de lipídios. Na Tabela 11 estão descritas as principais características da variante rs800629 *TNFA*.

Tabela 11: Informações do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene selecionado para estudo de inflamação

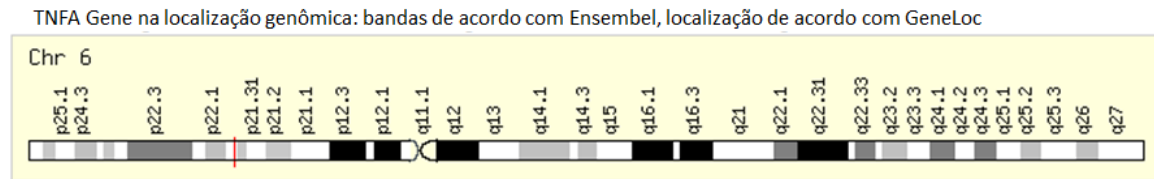
Gene/loco	rs e variante	Localização cromossômica do SNP	Frequência Global do alelo de menor frequência *
<i>TNFA</i>	rs1800629		
6p21.33	c.-488G>A, g.4682G>A (Região Promotora)	6:31575254	A 0,09

Projeto 1000genomes

2.8.1 Gene *TNFA*

O gene *TNFA* codificador dessa citocina pró inflamatória encontra-se localizado no cromossomo 6p21.31 (Figura 13) na região classe III do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC do inglês *major histocompatibility complex*) central ao Antígeno B Leucocitário Humano (HLA-B, do inglês *human leukocyte antigen-B*) (KLEIN; SATO, 2000).

Figure 13: Esquema do cromossomo seis indicando no traço vermelho a localização do gene TNFA



Disponível em: http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNF&keywords=TNF_rs1800629 acessado em 07/01/2018.

O TNFA, membro dois da superfamília de TNF, é um importante mediador da inflamação (VASSALLI, 1992; WANG; TRAYHURN, 2006), especialmente secretado por macrófagos (WILSON et al., 1997), que também regula a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose. (BARONE et al., 2011).

A influência de TNF em mediar o metabolismo lipídico, embora não esteja completamente esclarecida, tem sido apresentada por Chen et al. (2009), que descrevem cinco vias deste efeito modulador: (1) suprime a absorção de ácidos graxos livres e promove a lipogênese; (2) induz a lipólise; (3) inibe a atividade enzimática relacionada ao metabolismo lipídico; (4) regula o metabolismo do colesterol; (5) regula outras adipocinas derivadas de adipócitos que por sua vez podem alterar o metabolismo de lipídios.

Muitos estudos envolvem os polimorfismos do gene *TNFA*: *TNFA* -238G/A (rs361525), -308G/A (rs1800629), -857C/T (rs1799724), -863C/A (rs1800630) e -1031T/C (rs1799964). Dentre as variantes genéticas no gene *TNFA* a mais estudada é rs1800629, também conhecida como *TNF*-308G/A, que faz parte do haplótipo de MHC (HLA-A1-B8-DR3-DQ2) (WILSON et al., 1997). Estudos sugerem que o alelo de menor frequência A aumenta em duas vezes a expressão de *TNF* (WILSON et al., 1997). A frequência do alelo de menor frequência A é de 9% na população em geral, mas menos frequente em japoneses (2%) e mais comum em europeus (17%) (HAPMAP, 2018). O polimorfismo rs1800629 é bem explorado principalmente na área de farmacogenética pela sua significância clínica na resposta a drogas inibidoras de TNFA.

Em recente revisão de Belisário et al. (2017) sobre os fatores de risco envolvidos no infarto isquêmico na DF, discutiram o SNP *TNFA* -308 G>A, como um exemplo de biomarcador molecular cujos resultados em diferentes coortes apresentaram controvérsias.

Segundo os autores há relatos que mostraram a homozigose do alelo comum -308G associada ao aumento do risco de AVC (HOPPE et al., 2004; HOPPE et al., 2007), porém em dois estudos da equipe o alelo de menor frequência -308A foi associado com o aumento do risco de AVC (BELISÁRIO et al., 2016b; BELISÁRIO et al., 2015). No entanto, dois outros estudos não relataram associação (HOPPE et al., 2001; VICARI et al., 2011).

Citocinas fazem um papel relevante na fisiopatologia da DF, especificamente no subfenótipo de vaso-oclusão (PATHARE et al., 2003). Na DF, as crises de dor são decorrentes do subfenótipo de vaso-oclusão, em que a inflamação frequentemente precede ou está associada a estas crises (LIPOWSKY; CHIEN, 1989; PATHARE et al., 2003). Já que o perfil de citocinas em DF é caracterizado por elevados níveis de citocinas tais como IL-1 e TNFA, e que estas aumentam durante a inflamação (CROIZAT, 1994) e visto que TNFA pode modular o metabolismo de lipídios (CHEN et al., 2009), nós achamos importante investigar o polimorfismo rs1800629 de *TNFA* e sua associação aos fenótipos da DF. Nós não encontramos relatos na literatura com estudos entre os polimorfismos de *TNFA* e metabolismo de lipídios na DF.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar biomarcadores bioquímicos e moleculares relacionados aos níveis de lipídios e verificar a associação destes com variáveis bioquímicas, hematológicas e clínica, em indivíduos com Doença Falciforme (genótipos HBSS e HBSC) acompanhados nos Hemocentros Regionais de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia - Hemominas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e correlacionar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e do lipidograma dos indivíduos com DF do estudo.
- Comparar os resultados dos exames hematológicos, e bioquímicos entre os participantes da pesquisa com DF e dos grupos HbSS e HbSC.
- Verificar se há hipocolesterolemia e hipertrigliceridemia nos indivíduos com DF comparado ao grupo controle.
- Determinar o perfil aterogênico dos indivíduos com DF e correlacionar com parâmetros hematológicos e bioquímicos.
- Investigar se a terapia com hidroxiuréia interfere nos parâmetros hematológicos e das variáveis bioquímicas analisadas, incluindo os níveis de lipídios dos indivíduos com AF.
- Genotipar polimorfismos de variantes de genes implicados no metabolismo de lipídios e de inflamação na população do estudo.

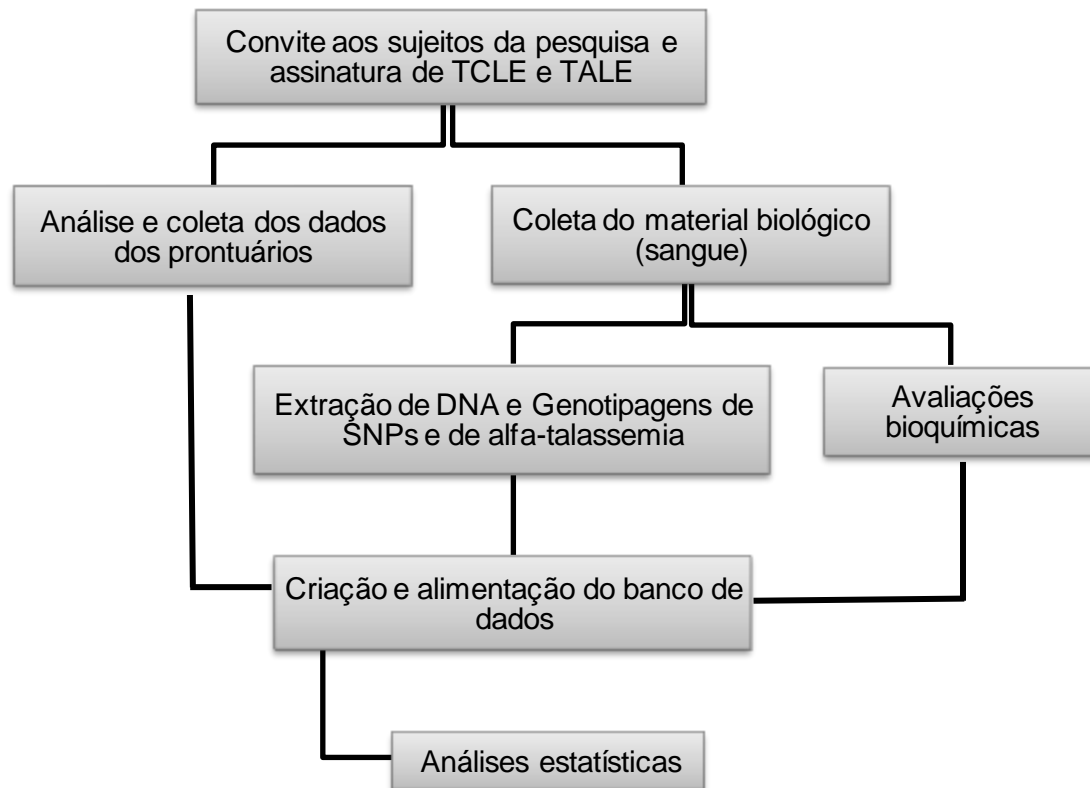
- Analisar o efeito dos alelos de menor frequência e os modelos de dominância e recessividade dos genes *ANGPTL4*, *APOA5* e *ZNF259* sobre os dados hematológicos, bioquímicos e clínicos nos indivíduos com doença falciforme genotipados.
- Pesquisar a presença de co-herança de alfa-talassemia nos indivíduos com DF e avaliar se a deleção do gene *HBA* está associada as alterações nos perfis hematológico, bioquímico e clínico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO E LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo transversal com coleta de alguns dados retrospectivos, realizado com crianças e adolescentes com DF (genótipos HbSS e HbSC), diagnosticadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal - Minas Gerais (PETN-MG), nascidos entre janeiro de 2001 e dezembro de 2010, acompanhadas nos Hemocentros Regionais de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas. A utilização de grupo vulnerável se deve ao fato de que foram estudados apenas pacientes triados pelo teste de triagem neonatal pelo NUPAD (iniciadas em março de 1998, portanto, menores de 18 anos), por ser o grupo que possui seguimento documentado desde o nascimento, seguem o mesmo protocolo de tratamento e os dados clínicos e laboratoriais que foram avaliados são mais confiáveis. Ademais, dados como, por exemplo, resultado de Doppler, sequestro esplênico e outras, somente são possíveis de avaliar em crianças. A coleta de sangue das crianças abaixo de cinco anos de idade geralmente é mais difícil de ser realizada e algumas intercorrências clínicas importantes como critério de exclusão ainda não foram manifestadas. O estudo iniciou-se em setembro de 2015 e foi finalizado em novembro de 2017. As etapas principais da pesquisa são apresentadas de forma resumida no fluxograma da Figura 14.

Figure 14: Desenho experimental



TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; TALE: Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.

4.2 POPULAÇÃO ESTUDADA E ASPECTOS ÉTICOS

A população estudada foi composta por indivíduos com doença falciforme, em estado clínico estável, nascidos entre 01 de janeiro de 2001 e 31 de dezembro de 2010, homocigotos HbSS e heterocigotos compostos HbSC, que foram triados pelo PETN-MG e encaminhados para tratamento inicial na Fundação Hemominas e cadastrados nos Hemocentros Regionais de Governador Valadares de Uberaba. De um total de 195 indivíduos cadastrados em Governador Valadares em setembro de 2015, 149 (76,41%) aceitaram participar, oito foram excluídos (4,10%), totalizando neste estudo 141 indivíduos (72,31%).

Este estudo foi registrado e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora sob número de CAAE 36767114.1.0000.5147 e no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (parecer nº 933.478; CAAE 36767114.1.3001.5118). A partir de uma relação cedida pelo Hemocentro contendo nome, número de prontuário, data de nascimento dos pacientes com anemia falciforme (HbSS) ou Hemoglobinopatia SC (HbSC), estes foram selecionados por faixa etária e convidados no dia da consulta a participar da pesquisa. Inicialmente foi explicada a proposta de trabalho incluindo os objetivos e os procedimentos envolvidos. Para o consentimento na participação da pesquisa, os responsáveis pelo menor de idade assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndices A e B). O Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (Apêndices C e D) foi apresentado e assinado pelos maiores de 12 anos de idade de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975 e suas revisões. A consulta aos prontuários foi feita de modo a garantir o sigilo das informações pessoais de cada sujeito da pesquisa.

Após o consentimento do participante, foi feita análise do prontuário médico e a coleta de dados para avaliar se o indivíduo possuía algum dos critérios de exclusão. Aqueles que não apresentaram nenhum dos critérios de exclusão tinha coletado o material biológico para as análises laboratoriais.

Foram considerados critérios de exclusão:

- A presença de comprometimento crônico de órgãos que venham a interferir nos parâmetros avaliados tais como diabetes mellitus, em regime de hipertransfusão e infecção grave (HIV, hepatite, sífilis);
- Indivíduos com outros subtipos de doença falciforme, ($S\beta^+$ -talassemia, $S\beta^0$ -talassemia, SD, SJ e persistência hereditária de HbF);
- Participantes que durante a pesquisa vieram a óbito;
- Transferidos para outros centros de tratamento e acompanhamento;
- Indivíduos que não retornaram ao Hemocentro durante o período de coleta de material biológico;
- Indivíduos e/ou pais ou responsáveis que não aceitaram participar do estudo.

4.3 EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

4.3.1 Exames coletados de prontuário

Os dados bioquímicos e hematológicos antes e após o uso de hidroxiuréia (HU) (hemoglobina total - Hb, hemoglobina corpuscular média - HCM, volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina fetal - HbF, reticulócitos, leucograma com leucometria global - LG, segmentados neutrófilos e monócitos, plaquetograma, níveis de ferro sérico e dosagem de ferritina), foram extraídos dos registros médicos dos participantes e compilados em um formulário específico (Apêndice F). Foram feitas médias dos valores dos exames, respeitando a terapia com HU. O resultado foi depositado em um banco de dados no programa *SPSS* e alimentado de forma permanente até 20 meses de início da investigação. Foram utilizadas nas análises as médias dos resultados com terapia com HU quando o indivíduo estava em tratamento e sem HU quando o indivíduo não estava em terapia com HU.

Os resultados dos exames bioquímicos e hematológicos datados no período de 90 dias após transfusões sanguíneas ou de eventos clínicos significativos (crise de dor, infecção grave, sequestro esplênico agudo e crise aplástica) não foram coletados.

Os exames, onde foram realizados/ coletados, metodologias, valores de referência, kits/equipamentos e referências estão descritos na tabela 12.

4.3.2 Exames realizados em laboratório contratado

Para a realização dos exames bioquímicos incluindo o lipidograma, os participantes da pesquisa foram orientados a manter uma dieta habitual nos dias que antecederam a avaliação, mantendo jejum de 10h-12h, e sem atividade física vigorosa nas 24 horas anteriores à coleta. Antes da coleta foi confirmado o jejum do paciente, se o paciente tinha passado por transfusão sanguínea nos últimos três meses e se estava em crise de dor no momento da coleta. A punção venosa na prega do cotovelo foi realizada no dia da consulta ao Hemocentro, entre 7:00 e 10:00 horas, antes da avaliação médica. O participante permaneceu sentado por pelo menos 10 a 15 minutos para evitar variações ortostáticas da volemia e garantir a consistência das dosagens.

Amostras de 4,5 mL de sangue venoso foram acondicionadas em tubos com gel separador, com ativador de coagulação. O soro foi imediatamente separado por centrifugação, e as análises bioquímicas foram realizadas conforme metodologia especificada na tabela 12, em laboratório de análises clínicas conveniado e acreditado, com base nos requisitos estabelecidos na norma ABNT NBR NM ISO 15189.

As informações gerais sobre os exames bioquímicos realizados nas amostras biológicas coletadas dos indivíduos neste estudo estão descritas na tabela 12.

Tabela 12: Informações sobre exames hematológicos e bioquímicos utilizados na pesquisa

Exame	Onde foi realizado / coletado	Metodologia	Valor de Referência	Kit/ Equipamento	Referência
Ferro sérico	Hemominas BH / Prontuário	Espectrofotométrica	Ferro: homem: 65 a 175 ug/dL; mulher: 50 a 170 ug/dL	WIENER®	WIENER LAB, 2000; HEMOMINAS, 2018
Ferritina	Hemominas BH / Prontuário	Turbidimétrica	Ferritina: 6 meses a 15 anos: 7-1 µg/L	EBRAM®	EBRAM, 2014; HEMOMINAS, 2018
HbF	Hemominas BH / Prontuário	Cromatografia líquida de alta eficiência		BIORAD®	HEMOMINAS, 2018
Hb	Hemominas GV / Prontuário	Tecnologia de impedância e fotometria	11,00-16,5 g/dL	ABX Micros 60 da marca HORIBA®	HEMOMINAS, 2018
VCM	Hemominas GV / Prontuário	Tecnologia de impedância e fotometria	80-97 fL	ABX Micros 60 da marca HORIBA®	HEMOMINAS, 2018
HCM	Hemominas GV / Prontuário	Tecnologia de impedância e fotometria	26,5-33,5 pg	ABX Micros 60 da marca HORIBA®	HEMOMINAS, 2018
LG	Hemominas GV / Prontuário	Tecnologia de impedância e fotometria	3500-10000 /mm ³	ABX Micros 60 da marca HORIBA®	HEMOMINAS, 2018
Neutrófilos	Hemominas GV / Prontuário	Tecnologia de impedância e fotometria	595-4800/mm ³	ABX Micros 60 da marca HORIBA®	HEMOMINAS, 2018
Monócitos	Hemominas GV / Prontuário	Tecnologia de impedância e fotometria	300-800/mm ³	ABX Micros 60 da marca HORIBA®	HEMOMINAS, 2018
Plaquetas	Hemominas GV / Prontuário	Tecnologia de impedância e fotometria	150000-390000/mm ³	ABX Micros 60 da marca HORIBA®	HEMOMINAS, 2018
Reticulócitos	Hemominas GV / Prontuário	Coloração com azul de cresil brilhante 1%	Adulto: 0,5-1,5%	Microscópio óptico Olympus®	MINAS GERAIS, 2009; HEMOMINAS, 2018

Continuação da Tabela 12: Informações sobre exames hematológicos e bioquímicos utilizados na pesquisa

APOA1	Laboratório contratado	Imunoturbidimetria	Homem 1-12 anos: 93-172 mg/dL; mulher 1-12 anos: 86-179 mg/dL; homem 12-60 anos 95-186 mg/dL; mulher 12-60 anos 101-223 mg/dL	Analizador Bioquímico Cobas Mira Plus	RITCHIE, 1996; CLINICAL CHEMISTRY, 2010
APOB	Laboratório contratado	Imunoturbidimetria	homem 1-12 anos: 48-125 mg/dL; mulher 1-12 anos: 51-126 mg/dL; homem 12-60 anos: 49-173; mulher 12- 60 anos: 53-182 mg/dL	Analizador Bioquímico Cobas Mira Plus	RITCHIE, 1996; CLINICAL CHEMISTRY, 2010
CT	Laboratório contratado	Dosado diretamente, pelo método enzimático colesterol oxidase/peroxidase em aparelho espectrofotométrico	≥ 150 mg/dL	Analizador Bioquímico Cobas Mira Plus	DANIELSet al, 2012
Não-HDL	Laboratório contratado	Determinado pela equação: Não-HDL = Colesterol total - HDL	≥ 130 mg/dL	Fórmula	DANIELSet al, 2012
HDL	Laboratório contratado	Dosado diretamente, pelo método reativo precipitante	< 45 mg/dL	Analizador Bioquímico Cobas Mira Plus	DANIELSet al, 2012
TG	Laboratório contratado	Dosado diretamente, por método enzimático	0-9 anos: ≥ 100 mg/dL; 10-19 anos: ≥ 130 mg/dL	Analizador Bioquímico Cobas Mira Plus	DANIELSet al, 2012
BD	Laboratório contratado	Dosado diretamente por método de Sims/ Horn	< 0,4 mg/dL	Analizador Bioquímico Cobas Mira Plus	SOLDIN; BRUGNARA; WONG, 2009; LABTEST, 2009
BI	Laboratório contratado	Sims/ Horn por fórmula: Bilirrubina Indireta = Bilirrubina Total – Bilirrubina Direta	0,60- 0,90 mg/dL	Fórmula	SOLDIN; BRUGNARA; WONG, 2009; LABTEST, 2009
BT	Laboratório contratado	Dosado diretamente por método de Sims/ Horn	< 1,20 mg/dL	Analizador Bioquímico Cobas Mira Plus	SOLDIN; BRUGNARA; WONG, 2009; LABTEST, 2009
LDH	Laboratório contratado	Enzimático colorimétrico	2-15 anos: 125,00 a 220,00 U/L	Analizador Bioquímico Cobas Mira Plus	PAGANI, et al., 2003; CLINICAL CHEMISTRY, 2011

BH: Belo Horizonte; GV: Governador Valadares; HbF: hemoglobina Fetal; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; LG: leucometria global; APOA1: apolipoproteína A1; APOB: apolipoproteína B; CT: colesterol total; Não-HDL: não lipoproteína de alta densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; TG: triglicerídios; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; BT: bilirrubina total; LDH: lactato desidrogenase.

4.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos foram obtidos por meio da coleta das informações contidas no registro médico. Foi estruturado um formulário (Apêndice E) para orientação da coleta da história clínica do participante buscando informações sobre eventos clínicos e resultados de Doppler transcraniano cerebral (DTC).

4.5 ANÁLISES MOLECULARES

4.5.1 Coleta do material biológico, extração e quantificação do DNA genômico

A coleta de sangue dos participantes para análises moleculares foi realizada no dia da consulta ao Hemocentro da Fundação Hemominas. Coletaram-se cerca de 3mL de sangue venoso em tubomarca VACUPLAST contendo 1,0 mg/mL do anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). No laboratório de pesquisa da UFJF *campus* Governador Valadares e da UFTM realizou-se a centrifugação dos tubos a 3000 rotações por minuto (rpm) por cinco minutos para separação da camada de leucócitos que foi retirada com o auxílio de micropipeta e microponteira com filtro, livres de DNase e RNase.

Os leucócitos foram armazenados em microtubos de 1,5 mL, livres de DNase e RNase, identificados com um código definido pelas iniciais de cada participante, seguidas do número de prontuário e armazenados a -20°C. A extração do DNA genômico (gDNA) foi realizada com alíquota de 250 µL da camada de leucócitos utilizando o kit comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, de acordo com instruções do fabricante.

A quantificação e o grau de pureza do gDNA extraído foram realizados no espectrofotômetro *Nano Vue plus* (GE®). A amostra foi previamente incubada à 56°C durante cinco minutos em banho seco e homogeneizada posteriormente para garantir que a solubilidade do gDNA. Dois µL da amostra de DNA foram depositados no espectrofotômetro previamente calibrado com tampão AE. O grau de pureza foi determinado a partir das razões dos valores de absorbância nos comprimentos de onda A260/A280 e A260/A230. A razão A260/A280 representa a contaminação por proteínas, e o valor desta razão deveria estar ente

1,7 e 1,9. A razão de A260/A230 deveria estar no intervalo entre 1,5 e 2,5. Valores fora desses intervalos indicavam contaminação por compostos orgânicos e o gDNA era descartado. O gDNA foi armazenado a - 20°C devidamente identificado no biorrepositório da pesquisa. No momento de uso, o gDNA era diluído para a concentração requerida nas reações.

4.5.2 Genotipagens dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) de genes selecionados

Todas as amostras de gDNA extraídas foram diluídas para a concentração de 5 ng/μL em água ultra-pura, livre de DNase e RNase. As variantes de baixa frequência (entre 0,01 e 0,05) e as variantes comuns (frequência >0,05) de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) em genes selecionados por sua associação com o metabolismo de lipídios plasmáticos ou de resposta inflamatória foram genotipadas na população em estudo. Os dados dos genes e as referências dos respectivos SNPs estão descritos na Tabela 13.

Para os ensaios de genotipagens de SNPs foi utilizada a metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR do inglês *quantitative Polymerase Chain Reaction*), baseada em fluorescência usando sondas TaqMan MGB e um par de iniciadores de PCR para detectar alvos SNPs específicos (ThermoFisher®) validados. Estes ensaios foram desenvolvidos na plataforma do sistema da 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems®). As sondas que distinguiam os dois alelos do SNP, marcadas com fluoróforos VIC/MGB-NFQ (alelo um) ou FAM/MGB-NFQ (alelo dois), na concentração de 40X foram diluídas duas vezes em tampão TE (20 μL de Tris 100 mM e dois μL de EDTA 100 mM). Em um microtubo, foram adicionados solução Master Mix TaqMan® GTXpress™ Master Mix (2X), sonda (20x), água ultrapura, livre de DNase e RNase com volumes calculados para o volume total de ensaios e de acordo com as especificações do fabricante. Seis μL desta mistura foram aliqüotados em microplaca e adicionados, em cada poço correspondente a um teste individual, 20 ng de DNA (4μL de gDNA a 5ng/ μL). No equipamento Termociclador 7500 Fast, (Applied Biosystems®) foi definido o programa de amplificação nos seguintes ciclos de temperatura: Pré qPCR: 60°C por 1 minuto e 95°C por 20 segundos, seguindo-se de 40 ciclos a 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos e uma etapa final de 60°C por 1 minuto. Os resultados da amplificação e a determinação dos genótipos foram obtidos com auxílio da

plataforma Thermo Fisher Cloud (disponível em: <<https://apps.thermofisher.com/apps/dashboard/#/>>).

Tabela 13: Dados dos genes e SNPs selecionados para genotipagens

Gene/ loco	Referência SNP	Alelo do SNP e fluoroforo	Região	Número do ensaio (Applied Biosystems)	MAF
<i>ANGPTL4</i> 19p13.2	rs116843064	VIC A/ FAM G	Éxon	C_156222000_10	A 0,01
<i>APOA5</i> 11q23.3	rs662799	VIC A/ FAM G	5'UTR	C_2310403_10	G 0,16
<i>TNFA</i> 6p21.33	rs1800629	VIC A/ FAM G	Promotora	C_7514879_10	A 0,09
<i>ZPFI</i> 11q23.3	rs964184	VIC C/ FAM G	3'UTR	C_8907629_10	G 0,22

SNP: polimorfismo de único nucleotídeo; MAF: frequência do alelo menor retirada do 1000Genome; *ANGPTL4*: Angiopoietin-like 4; *APO*: apolipoproteína; *TNFA/TNF- α* : Fator de necrose tumoral- α .

4.6 GENOTIPAGEM DE ALFA-TALASSEMIA

Foi realizada a genotipagem de alfa-Talassemia (alfa-tal) para detecção de duas mutações deletoriais dos genes *HBA1* e *HBA2* da alfa-globina: a variante deletorial de 3.700 pares de bases (pb) (α -3.7Kb) e a de 4.200 pb (α -4.2Kb) por apresentarem maior frequência na população de Minas Gerais. Os ensaios de genotipagem foram realizados por gap-PCR múltipla com reagentes do Kit comercial de PCR Multiplex Qiagen® e oligonucleotídeos sintéticos específicos para cada uma das deleções analisadas causadoras de α -tal (TAN et al., 2001).

O controle positivo da amplificação do gDNA foi um segmento de 2.350 pb, referente à região 3' não transcrita do gene *LISI* do fator plaquetário. A especificidade da técnica de PCR múltipla para o diagnóstico das deleções causadoras de alfa-tal foi confirmada utilizando-se controles positivos para as duas deleções testadas, cedidos gentilmente pelo Dr. Samuel S. Chong (Universidade de Cingapura). Na Tabela 14 estão descritos os oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de genotipagens.

Nos ensaios de gap PCR múltipla utilizaram-se 12,5 μL de Master Mix Qiagen[®] na concentração 2X, 2,5 μL de *Q solution*, mistura de oligonucleotídeos, nas concentrações descritas na Tabela 14. Em cada microtubo teste foram adicionados 4 μL de gDNA com concentração mínima de 50 ng/ μL . O volume final da reação foi de 25 μL . Os microtubos foram acondicionados no bloco térmico do Termociclador modelo Veriti (Applied Biosystems[®]), programado para os ciclos de temperatura: inicial de 96°C por 15 minutos; seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 98°C para desnaturação do gDNA, 62°C por 90 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C durante 135 segundos para extensão do DNA e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para a resolução dos fragmentos amplificados e definição do genótipo, 10 μL do material amplificado contendo 1 μL do corante fluorescente Gel Red[®] e 2 μL de *Loading dye* foram aplicados na canaleta do gel de agarose 1%. Em seguida, o gel foi acondicionado em uma cuba contendo tampão TE 1X e realizada a corrida de eletroforese a 90 volts durante duas horas. Após o fim da corrida, a visualização das bandas de fragmentos amplificados foi realizada sob luz ultravioleta e a imagem do gel captada no sistema de fotodocumentação Gel Doc[™] XR⁺, (Bio Rad[®]). A determinação do genótipo foi realizada de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados em comparação com o padrão de massa molecular 1Kb, faixa de massa molecular de 250 pares de base (bp) a 10000pb(Kasvi[®]).

Tabela 14: Dados dos oligonucleotídeos utilizados na reação de genotipagens da alfa-talassemia

Nome	oligonucleotídeo 5'-3'	Concentração	Tamanho esperado do fragmento
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCCATGAGC	0,5 μM	2350 pb
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	0,5 μM	
$\alpha 2/\alpha$-3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0,2 μM	2022/2029 pb
α-3.7/α-20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0,2 μM	
$\alpha 2$-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0,2 μM	1800 pb
α-4.2- F	GTTTACCCATGTGGTGCCTCC	0,5 μM	1628 pb
α-4.2 R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	0,5 μM	

4.7 GRUPO CONTROLE

Para análise do perfil lipídico do grupo controle, os dados de 40 indivíduos, sem DF, nascidos entre 01 de janeiro de 2001 e 31 de dezembro de 2010 foram coletados mantendo proporção semelhante de sexo e idade. Os exames de lipidograma (TG, CT, HDL e não-HDL) foram realizados durante o mesmo período e nas mesmas condições metodológicas em que os sujeitos da pesquisa fizeram suas análises bioquímicas. Os resultados foram adicionados ao banco de dados da pesquisa e utilizados para comparação dos perfis lipídicos dos grupos HbSS e HbSC.

4.7.1 Cálculo amostral do grupo controle

O cálculo do tamanho amostral do grupo controle foi realizado utilizando a fórmula de comparação entre grupos:

$$n = \left(\frac{Z \times 2 \times dp}{d} \right)^2$$

Onde:

n = número de indivíduos (amostra)

Z = Valor crítico que corresponde ao grau de confiança de 95% de confiança

dp = desvio padrão

d = diferença entre saudáveis e indivíduos com DF

Baseado no estudo desenvolvido por Teixeira et al. (2017), realizamos os cálculos utilizando os desvios padrão e as diferenças entre os pacientes com DF e controles saudáveis para níveis de CT e TGs. Como o n encontrado para os TGs foi maior, adotamos esse valor (n = 39 indivíduos). O cálculo está apresentado a seguir.

$$n = \left(\frac{1,96 \times 2 \times 39}{26} \right)^2$$

$$n = \sim 35 + 10\%$$

$$n = 39 \text{ indivíduos}$$

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contidos no banco de dados criado exclusivamente para esta pesquisa foram analisados utilizando o SPSS versão 22.0. Dados descritivos foram apresentados utilizando frequências, médias e desvio padrão.

4.8.1 Análise univariada

4.8.1.1 Testes de normalidade

A distribuição normal ou não normal dos dados contínuos foi verificada antes de cada análise de associação e correlação, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov quando o número de indivíduos ou dados (n) era maior do que 50 e Shapiro-Wilk quando este número era menor do que 50.

4.8.1.2 Perfis hematológico e bioquímico dos indivíduos com Doença Falciforme

Realizaram-se análises bioquímicas de marcadores de hemólise (Lactato desidrogenase - LDH, bilirrubinas total, direta e indireta – BT, BD, BI) e perfil lipídico (Apolipoproteína A1 - APOA1, Apolipoproteína B - APOB, Colesterol total - CT, lipoproteína de alta densidade - HDL, não lipoproteína de alta densidade - não-HDL e triglicerídeos - TG). Já os resultados dos exames hematológicos (Hemoglobina - Hb,

Hemoglobina Corpuscular Média - HCM, Volume Corpuscular Médio - VCM, Hemoglobina Fetal - HbF, Leucometria Global - LG, Reticulócitos - Ret., neutrófilos, monócitos, plaquetas, ferro e ferritina) foram compilados dos prontuários médicos. Nesta análise verificou-se a associação das variáveis laboratoriais entre si entre todos os indivíduos (DF) e em cada grupo de pacientes (SS e SC). Também foi realizada comparação entre os grupos SS e SC. A verificação da associação de variáveis nominais foi realizada utilizando o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando necessário. A verificação da associação de variáveis contínuas com distribuição normal foi realizada utilizando-se o teste T de Student; para as variáveis contínuas com distribuição não normal analisou-se utilizando o teste de U de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

4.8.1.3 Correlações

As correlações entre as variáveis laboratoriais entre si (para o grupo DF e os subgrupos SS e SC) foram realizadas utilizando o teste de correlação de Spearman, visto que a maioria dos dados apresentou distribuição não normal. As correlações foram consideradas quando o $p < 0,05$ e classificadas como: muito forte (1 a 0,8; -1 a - 0,8), forte (0,8 a 0,6; -0,8 a - 0,6), moderada (0,6 a 0,4; -0,6 a - 0,4), fraca (0,4 a 0,2; - 0,4 a - 0,2) e muito fraca (0,2 – 0 e - 0,2 a 0), além de positiva (+) ou negativa (-) de acordo com o sinal que apresentaram.

4.8.1.4 Cálculo de razão de chance e intervalo de confiança

Os dados foram analisados através do teste do qui quadrado e do cálculo da razão de chances (OR) considerando o valor de $p < 0,05$ e o intervalo de confiança (IC) de 95%.

4.8.1.50 Perfil lipídico dos indivíduos com doença falciforme comparado aos indivíduos do grupo controle

Para comparar os três grupos de indivíduos (SS, SC e controle) para os resultados de CT, Não-HDL, HDL e TG foram utilizados para associação de variáveis nominais o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando necessário; para verificação da associação de variáveis contínuas com distribuição normal foi utilizado o teste ANOVA; para as variáveis contínuas com distribuição não normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

4.8.1.6 Análises dos perfis hematológicos e bioquímicos dos indivíduos com Doença Falciforme em relação à Triglicerídios

A fim de verificar se os níveis dos TGs influenciavam parâmetros bioquímicos e hematológicos dos indivíduos com DF, os resultados dos exames dos pacientes foram divididos de acordo com o valor de referência para TG, sendo que resultados ≤ 100 mg/dL para crianças até 10 anos e ≤ 130 mg/dL para indivíduos entre 10-19 anos eram considerados normais e resultados > 100 mg/dL para crianças até 10 anos e > 130 mg/dL para indivíduos entre 10-19 anos eram considerados altos (DANIELS, et al., 2012). Primeiro foi realizado teste qui-quadrado para verificar a distribuição dos indivíduos em relação aos níveis de TGs (para os grupos SS, SC e controle). Posteriormente, os resultados dos exames laboratoriais estratificados de acordo com os níveis de TGs, foram comparados entre os indivíduos com DF. Foi realizado teste de normalidade antes de cada análise. A verificação da associação de variáveis contínuas com distribuição normal foi realizada utilizando-se o teste T de Student; para as variáveis contínuas com distribuição não normal utilizou-se o teste de U de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

4.8.1.7 Análises dos perfis hematológicos e bioquímicos dos indivíduos com doença falciforme em relação à lipoproteína de alta densidade

A fim de verificar se os níveis da HDL influenciavam parâmetros bioquímicos e hematológicos dos indivíduos com DF, os resultados dos exames dos pacientes foram

divididos de acordo com o valor de referência para HDL, sendo que resultados ≥ 40 mg/dL foram considerados normais e resultados < 40 mg/dL foram considerados baixos (DANIELS, et al., 2012). Primeiro foi realizado teste qui-quadrado para verificar a distribuição dos indivíduos em relação aos níveis de HDL (para os grupos SS, SC e controle). Posteriormente, os resultados dos exames laboratoriais estratificados de acordo com os níveis de HDL, foram comparados entre os indivíduos com DF e entre os subgrupos SS e SC separadamente. Foi aplicado o teste de normalidade antes de cada análise. A verificação da associação de variáveis contínuas com distribuição normal foi realizada utilizando-se o teste T de Student; para as variáveis contínuas com distribuição não normal utilizou-se o teste de U de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

4.8.1.8 Perfil Aterogênico

O perfil aterogênico dos indivíduos foi calculado utilizando as razões TG/HDL e APOB/APOA1. Foram considerados normais os valores da razão TG/HDL $< 2,4$ (LUZ et al., 2008; MCLAUGHLIN et al., 2003; REAVEN 2002; ZORCA et al., 2010) e para a razão APOB/APOA1 $< 0,9$ para meninas e $< 0,8$ para meninos (JUN et al., 2018; YUSUF et al., 2004; JUN et al., 2018; SNIDERMAN et al., 2003). Os indivíduos foram separados de acordo com valores das razões e foi realizado teste qui-quadrado para verificar se a distribuição de indivíduos estava dentro do valor esperado. Foi realizado teste Mann-Whitney para comparar as médias dos valores das razões de APOB/APOA1 entre os grupos SS e SC. Também foi aplicado o teste Kruskal-Wallis para comparar as médias dos valores das razões TG/HDL entre os grupos SS, SC e controle. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

4.8.1.9 Influência da terapêutica com Hidroxiuréia nos perfis hematológico e bioquímico dos indivíduos com doença falciforme

Primeiramente foi realizado teste qui-quadrado para verificar se havia diferença de distribuição de indivíduos SS e SC quanto à utilização de HU. Posteriormente, a fim de verificar se a terapia com HU influenciava os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos

indivíduos com AF, os resultados dos exames foram comparados entre aqueles que faziam uso de HU e que não o faziam. Foi realizado teste de normalidade antes de cada análise e para a verificação da associação de variáveis contínuas com distribuição normal foi aplicado o teste T de Student; para as variáveis contínuas com distribuição não normal utilizou-se o teste de U de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

4.8.1.10 Biomarcadores Genéticos

Para o cálculo do Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) foi utilizada a calculadora do programa livre da Enciclopédia virtual para estudos de epidemiologia genética (*Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies- OEGE*) desenvolvida por Rodriguez et al (2009) e disponível em: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>.

Para realizar as análises de efeito de dominância do alelo de menor frequência foram comparados os resultados dos exames laboratoriais dos indivíduos de genótipo heterozigoto e homozigotos com os dados dos indivíduos homozigotos para o alelo comum. Para as análises de efeito de recessividade do alelo de menor frequência foram comparados os resultados dos exames dos indivíduos homozigotos com os resultados dos indivíduos homozigotos selvagens somados aos heterozigotos.

Foi realizado teste de normalidade antes de cada análise e para a verificação da associação de variáveis contínuas com distribuição normal foi aplicado o teste T de Student; para as variáveis contínuas com distribuição não normal utilizou-se o teste de U de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. Também foi verificado efeito de dominância e recessividade, pelo teste do qui-quadrado, dos alelos de menor frequência dos genes *ANGPTL4*, *APOA5*, *TNFA* e *ZNF259* sobre a concentração de HDL. Outra análise realizada foi a avaliação da distribuição dos genótipos do gene *TNFA* rs1800629 no modelo de dominância em relação ao uso da terapia com HU entre os indivíduos com DF.

4.8.1.11 Influência da co-herança de Alfa Talassemia

Foi realizado teste qui-quadrado para verificar a distribuição de indivíduos portadores de deleção (ões) de alfa-tal de acordo com o genótipo SS e SC. Para avaliar se a co-herança com a alfa-tal influenciava os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos indivíduos com DF, foram comparados os resultados dos exames dos indivíduos portadores de deleção (ões) para alfa-tal com os indivíduos isentos de deleções. Foi realizado teste de hipóteses para verificar se havia diferença significativa entre ter deleção (ões) do gene *HBA* ou não, entre os parâmetros bioquímicos e hematológicos. Foi realizado teste de normalidade antes de cada análise e para a verificação da associação de variáveis contínuas com distribuição normal foi aplicado o teste T de Student; para as variáveis contínuas com distribuição não normal utilizou-se o teste de U de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. Também foi verificado efeito de co-herança da deleção do gene *HBA* sobre a concentração de HDL pelo teste do qui-quadrado.

4.9 FINANCIAMENTO

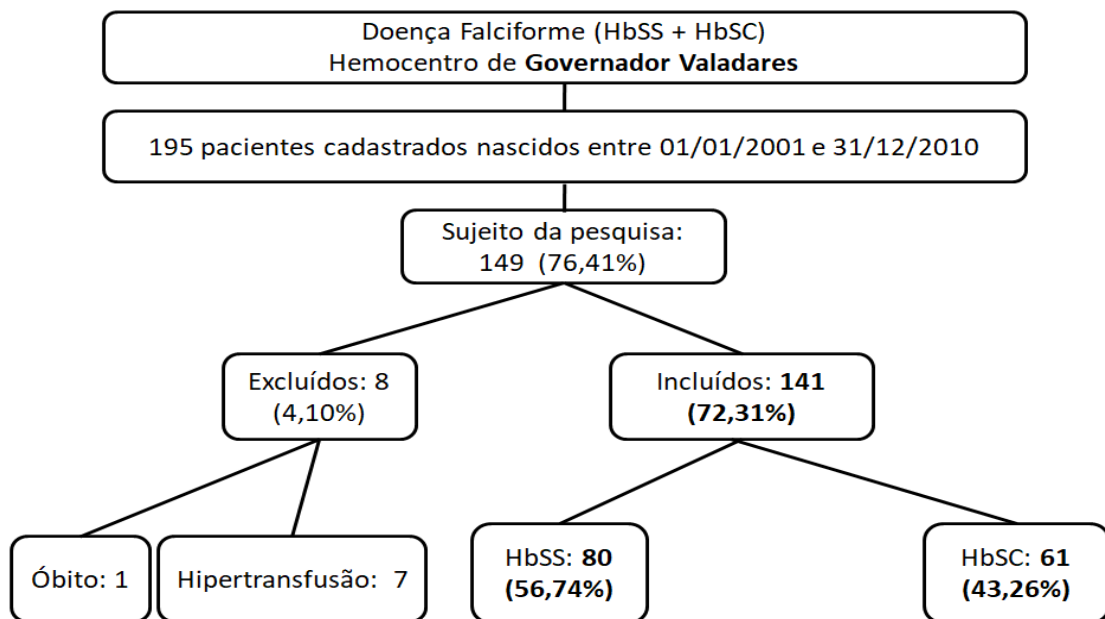
A aquisição de materiais consumíveis de laboratório e o pagamento de serviços para alguns exames bioquímicos foram feitos com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Os equipamentos utilizados na pesquisa foram adquiridos com recursos do projeto destinado ao Edital CT-INFRA/2013 da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da FAPEMIG (EDITAL 14/2013 - Programa de pesquisa para o SUS - PPSUS - Processo CDS - APQ-03522-13) e recursos da UFJF. As bolsas de iniciação científica (BIC) para os estudantes de graduação envolvidos no estudo foram financiadas pela FAPEMIG ou pela UFJF (através de Editais da Pró-reitora de Pós-graduação e Pesquisa nos anos de 2015, 2016 e 2017). A UFJF através do seu programa de incentivo a qualificação de servidores (PROQUALI) concedeu bolsa para a mestranda que também é servidora.

5. RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Os indivíduos participantes deste estudo foram pacientes cadastrados nos hemocentros Regionais de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas. Os números de indivíduos que participaram da pesquisa estão descritos nas Figuras 15 e 16.

Figure 15: Fluxograma do número de indivíduos que participaram da pesquisa cadastrados e acompanhados no Hemocentro Regional de Governador Valadares



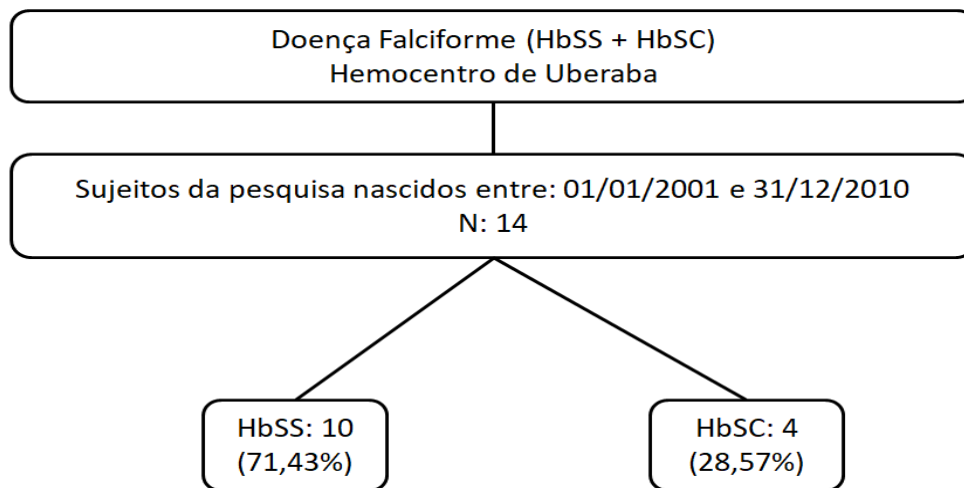
N: Número de participantes; HbSS: anemia falciforme; HbSC: hemoglobinopatia SC

A população do estudo consistiu de um total de 155 crianças com DF, divididas entre os Hemocentros Regionais de Governador Valadares (GV) (141) e de Uberaba (UB) (14), sendo 90 com AF - HbSS (GV: 80, UB: 10) e 65 com Hemoglobinopatia HbSC (GV: 61, UB: 4), 55,5% do sexo masculino. A média geral de idade foi de 12,54 anos (dp: 2,72), mediana: 12,77 anos. Grupo SC: média 12,70 anos (dp: 2,54), mediana: 12,9 anos; Grupo SS: média

12,43 anos (dp: 2,84), mediana: 12,71 anos. Já o grupo controle para os dados dos exames de lipidograma contou com 40 indivíduos com média de idade 12,98 anos (dp: 2,34), sendo 62,5% de meninos. Os dados demográficos estão detalhados na Tabela 15.

O número de indivíduos com DF que tiveram exames laboratoriais extraídos de prontuário, exames bioquímicos realizados em laboratório de análises clínicas acreditado, genotipagem de polimorfismos genéticos, genotipagem para alfa-tal, resultado de DTC e o número de indivíduos que não realizaram as análises encontram-se na tabela 16.

Figure 16: Fluxograma do número de indivíduos que participaram da pesquisa, advindos do Hemocentro Regional de Uberaba e o número de indivíduos analisados



N: Número de participantes; HbSS: anemia falciforme; HbSC: hemoglobinopatia SC

Tabela 15: Dados demográficos dos participantes da pesquisa

Grupo	Hemocentro	N	%	Idade		Sexo			
				Média	Dp	N	Feminino %	N	Masculino %
DF	UB	14	9,00			5	64,30	9	35,70
	GV	141	91,00			64	45,40	77	54,60
	Total	155	100	12,54	2,72	69	44,50	86	55,50
HbSS	UB	10	11,10			5	50,00	5	50,00
	GV	80	88,90			35	43,80	45	56,20
	Total	90	100	12,43	2,84	40	44,40	50	55,60

Continuação da Tabela 15: Dados demográficos dos participantes da pesquisa

Grupo	Hemocentro	N	%	Idade		Sexo			
				Média	Dp	Feminino	Masculino	N	%
HbSC	UB	4	6,20			0	0	4	100
	GV	61	93,80			29	47,50	32	52,50
	Total	65	100	12,70	2,54	29	44,50	36	55,40
Controle	GV	40	100			15	37,50	25	62,50
	Total	40	100	12,98	2,34	15	37,50	25	62,50

N: número de participantes e porcentagem de participantes; n: número bruto de participantes; GV: Governador Valadares; UB: Uberaba; DF: doença falciforme; HbSS: anemia falciforme; HbSC: hemoglobinopatia SC.

Tabela 16: Descrição quantitativa dos dados laboratoriais dos indivíduos estudados

Exame	Diagnóstico	Válidos		Perdidos	
		N	%	N	%
Hemoglobina	HbSS	87	96,7%	3	3,3%
	HbSC	64	98,5%	1	1,5%
HCM	HbSS	87	96,7%	3	3,3%
	HbSC	64	98,5%	1	1,5%
VCM	HbSS	87	96,7%	3	3,3%
	HbSC	64	98,5%	1	1,5%
Hb Fetal	HbSS	56	62,2%	34	37,8%
	HbSC	24	36,9%	41	63,1%
Leucócitos	HbSS	87	96,7%	3	3,3%
	HbSC	64	98,5%	1	1,5%
Reticulócitos	HbSS	87	96,7%	3	3,3%
	HbSC	64	98,5%	1	1,5%
Neutrófilos	HbSS	87	96,7%	3	3,3%
	HbSC	64	98,5%	1	1,5%
Monócitos	HbSS	87	96,7%	3	3,3%
	HbSC	64	98,5%	1	1,5%
Plaquetas	HbSS	86	95,6%	4	4,4%
	HbSC	64	98,5%	1	1,5%
Ferro	HbSS	70	77,8%	20	22,2%
	HbSC	57	87,7%	8	12,3%
Ferritina	HbSS	70	77,8%	20	22,2%
	HbSC	59	90,8%	6	9,2%
Genotipagem TNFA	HbSS	74	82,2%	16	17,8%
	HbSC	52	80,0%	13	20,0%

Continuação da Tabela 16: Descrição quantitativa dos dados laboratoriais dos indivíduos estudados.

Exame	Diagnóstico	Válidos		Perdidos	
		N	%	N	%
Genotipagem ZNF259	HbSS	81	90,0%	9	10,0%
	HbSC	57	87,7%	8	12,3%
Genotipagem ANGPTL4	HbSS	81	90,0%	9	10,0%
	HbSC	57	87,7%	8	12,3%
Genotipagem ApoA5	HbSS	81	90,0%	9	10,0%
	HbSC	57	87,7%	8	12,3%
Alfa Talassemia	HbSS	81	90,0%	9	10,0%
	HbSC	57	87,7%	8	12,3%
APOA1	HbSS	49	54,4%	41	45,6%
	HbSC	30	46,2%	35	53,8%
APOB	HbSS	49	54,4%	41	45,6%
	HbSC	30	46,2%	35	53,8%
Colesterol total	HbSS	59	65,6%	31	34,4%
	HbSC	35	53,8%	30	46,2%
HDL	HbSS	59	65,6%	31	34,4%
	HbSC	34	52,3%	31	47,7%
Não HDL	HbSS	50	55,6%	40	44,4%
	HbSC	31	47,7%	34	52,3%
Triglicerídeos	HbSS	59	65,6%	31	34,4%
	HbSC	35	53,8%	30	46,2%
Bilirrubina total	HbSS	38	42,2%	52	57,8%
	HbSC	22	33,8%	43	66,2%
Bilirrubina direta	HbSS	38	42,2%	52	57,8%
	HbSC	22	33,8%	43	66,2%
Bilirrubina indireta	HbSS	38	42,2%	52	57,8%
	HbSC	22	33,8%	43	66,2%
LDH	HbSS	36	40,0%	54	60,0%
	HbSC	21	32,3%	44	67,7%
DTC	HbSS	67	74,4%	23	25,6%
	HbSC	7	10,8%	58	89,2%

HbSS: Anemia Falciforme; HbSC: Hemoglobinopatia SC; %: porcentagem. N: Número de participantes; Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; LG: leucometria global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; Não-HDL: não lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicerídeos; DTC: Doppler Transcraniano Cerebral.

5.2 PERFIS HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DOS INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME

Os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos de Hb, HCM, VCM, HbF, LG, reticulócitos, neutrófilos, monócitos, plaquetas, ferro, ferritina, CT, HDL, Não-HDL, TG, BT e BI apresentaram distribuição não normal. Já os resultados de APOA1, APOB, BD e LDH apresentaram distribuição normal. O número de indivíduos que realizou as análises hematológicas e bioquímicas, a média e o desvio padrão e valores de p estão descritos na Tabela 17.

Os resultados dos exames Hb, HCM, VCM, HbF, LG, reticulócitos, neutrófilos, monócitos, plaquetas, ferro e ferritina dos indivíduos HbSC foi significativamente diferente dos indivíduos do grupo HbSS ($p < 0,001$). O grupo HbSC apresentou maior valor de média de Hb e menores valores de média de HCM, VCM, HbF, LG, reticulócitos, neutrófilos, monócitos, plaquetas, ferro e ferritina. Para alguns parâmetros bioquímicos, indivíduos do grupo HbSC diferiram dos do grupo HbSS [BT ($p = 0,013$), BD ($p = 0,002$), BI ($p = 0,019$) e LDH ($p < 0,001$)]. Porém não houve diferença significativa nos valores médios do lipidograma entre os grupos de pacientes HbSS e HbSC.

Tabela 17: Dados dos exames hematológicos e bioquímicos na população de estudo

Parâmetros	Doença Falciforme (HbSS+ HbSC)			Anemia Falciforme (HbSS)			Hemoglobinopatia SC (HbSC)			P
	N	Média	Dp	N	Média	Dp	N	Média	Dp	
Hb g/dL	150	9,43	1,70	87	8,34	1,29	63	10,94	0,82	<0,001*
HCM pg	150	28,96	4,00	87	30,92	3,93	63	26,25	2,09	<0,001*
VCM fL	150	87,18	10,98	87	92,16	1,20	63	80,30	0,73	<0,001*
HbF %	80	11,02	7,80	56	13,41	7,80	24	5,47	4,26	<0,001*
LG /mm ³	150	9644,84	3386,76	87	10999,77	3326,00	63	7773,75	2467,27	<0,001*
Reticulócitos %	150	2,61	1,72	87	3,44	1,80	63	1,46	0,59	<0,001*
Neutrófilos /mm ³	150	5203,84	1932,34	87	5718,87	2008,11	63	4492,61	1579,18	<0,001*
Monócitos /mm ³	150	469,71	323,93	87	555,81	355,99	63	350,82	227,21	<0,001*
Plaquetas /mm ³	149	370444,90	154795,90	87	455386,69	124158,70	63	254492,57	111333,85	<0,001*
Ferromcg/dL	126	87,20	35,10	70	93,18	40,96	56	79,74	24,36	<0,001*
Ferritina µg/L	128	223,88	609,38	70	225,84	264,12	58	221,51	861,93	<0,001*
APOA1 mg/dL	79	107,68	15,47	49	106,47	12,38	30	109,67	19,57	0,376

Continuação da Tabela 17: Dados dos exames hematológicos e bioquímicos na população de estudo

Parâmetros	Doença Falciforme (HbSS+ HbSC)			Anemia Falciforme (HbSS)			Hemoglobinopatia SC (HbSC)			P
	N	Média	Dp	N	Média	Dp	N	Média	Dp	
APOB mg/dL	79	60,67	16,72	49	62,18	18,73	30	58,20	12,69	0,307
CT mg/dL	94	124,16	21,58	59	124,67	21,74	35	123,29	21,58	0,873
HDL mg/dL	93	39,42	7,08	59	38,93	6,43	34	40,26	8,11	0,397
Não-HDL mg/dL	81	85,14	22,08	50	86,93	24,20	31	82,26	18,17	0,553
TG mg/dL	94	85,76	34,16	59	86,68	37,28	35	84,23	28,59	0,935
BT mg/dL	60	1,94	1,10	38	2,21	1,18	22	1,48	0,76	0,013*
BD mg/dL	60	0,42	0,16	38	0,46	0,16	22	0,34	0,11	0,002*
BI mg/dL	60	1,52	1,00	38	1,74	1,09	22	1,14	0,71	0,019*
LDH U/L	57	435,21	195,75	36	513,97	201,75	21	300,19	78,85	<0,001*

N: Número de participantes; Dp: desvio padrão; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL: Lipoproteína de alta densidade HDL; Não-HDL: Não-HDL; TG: Triglicerídeos; * = diferença significativa.

Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney.

5.2.1 Correlação dos parâmetros Hematológicos e Bioquímicos dos indivíduos com doença falciforme

Os resultados completos das correlações de Spearman para DF, HbSS e HbSC entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos entre si estão descritos nas Tabelas 18 para DF, 19 para HbSS e 20 para HbSC.

Para os indivíduos com DF foram encontradas várias correlações significativas entre os dados hematológicos e bioquímicos. Abaixo destacamos algumas que consideramos importantes e que estarão presentes na discussão:

- Correlação negativa forte entre Hb e reticulócitos ($p < 0,001$).
- Correlações negativas moderadas dos níveis de Hb com LG ($p < 0,001$), com neutrófilos ($p < 0,001$), com monócitos ($p < 0,001$), com plaquetas ($p < 0,001$), com BT ($p = 0,001$), com BD ($p = 0,001$), com BI ($p = 0,001$) e com LDH ($p < 0,001$).
- Correlação positiva intermediária de HCM com HbF ($p = 0,001$), com LG ($p < 0,001$), com reticulócitos ($p < 0,001$), com plaquetas ($p < 0,001$) e com LDH ($p = 0,001$).
- Correlação positiva intermediária de VCM com HbF ($p = 0,002$), com LG ($p < 0,001$), com reticulócitos ($p < 0,001$), com plaquetas ($p < 0,001$), com ferritina ($p < 0,001$) e com LDH ($p = 0,001$).
- Correlação positiva fraca de VCM com neutrófilos (0,013), com monócitos ($p = 0,006$), com ferro ($p = 0,039$), e com APOB (0,041).
- Correlação positiva intermediária de LG com reticulócitos ($p < 0,001$), com plaquetas ($p < 0,001$), com BT ($p = 0,002$), com BD ($p = 0,009$), com BI ($p = 0,002$) e com LDH ($p < 0,001$).
- Correlações positivas intermediárias de reticulócitos com neutrófilos ($p < 0,001$), com monócitos ($p < 0,001$), com plaquetas ($p < 0,001$), com ferritina ($p < 0,001$), com BT ($p < 0,001$), com BD ($p < 0,001$), com BI ($p < 0,001$) e com LDH ($p < 0,001$).
- Correlações positivas intermediárias de neutrófilos com plaquetas ($p < 0,001$), com LDH ($p = 0,007$).

- Correlações positivas intermediárias de monócitos com plaquetas ($p < 0,001$), com BT ($p = 0,001$), com BI ($p = 0,001$), com LDH ($p = 0,006$).
- Correlações positivas intermediárias de plaquetas e ferritina ($p < 0,001$) e com LDH ($p < 0,001$).
- Correlações positivas intermediárias de CT e TG ($< 0,001$) e com HDL ($< 0,001$).
- Correlação intermediária positiva entre BT, BI e BD com LDH ($p < 0,001$).

Para os sujeitos da pesquisa com AF destacamos as seguintes correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos:

- Correlações positivas intermediárias de Hb com HbF ($p = 0,001$) e com APOA1 ($p = 0,013$).
- Correlações negativas intermediárias de Hb com LG ($p = 0,001$), com neutrófilos ($p < 0,001$), com monócitos ($p < 0,001$) e com LDH ($p = 0,001$).
- Correlações negativas intermediárias de HbF com BT ($p = 0,006$), com BD ($p = 0,030$), com BI ($p = 0,008$) e com LDH ($p = 0,018$).
- Correlações positivas intermediárias de reticulócitos com monócitos ($p < 0,001$), com BT ($p < 0,001$), com BD ($p = 0,008$), com BI ($p < 0,001$) e com LDH ($p = 0,002$).
- Correlação intermediária negativa entre reticulócitos e HDL ($p = 0,019$).
- Correlações positivas intermediárias de monócitos com BT ($p = 0,029$), com BI ($p = 0,027$).
- Correlações intermediárias negativas de APOA1 com BT ($p = 0,003$), com BI ($p = 0,002$) e com LDH ($p = 0,026$).
- Correlação positiva intermediária entre CT e TG ($p < 0,001$).
- Correlações negativas intermediárias de CT com BT ($p = 0,016$) e com BI ($p = 0,012$).
- Correlação negativa intermediária entre HDL e TG ($p = 0,003$).
- Correlações positivas intermediárias de BT ($p = 0,001$), BD ($p = 0,023$) e BI com LDH ($p = 0,001$).

Para os indivíduos com Hemoglobinopatia SC realçamos as seguintes correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos:

- Correlações negativas intermediárias de HbF com plaquetas ($p = 0,030$) e com APOA1 ($p = 0,050$).
- Correlações positivas intermediárias de LG e plaquetas ($p < 0,001$).
- Correlação positiva intermediária entre reticulócitos e ferritina ($p = 0,014$).
- Correlação positiva fraca entre reticulócitos e monócitos ($p = 0,021$).
- Correlações positivas intermediárias de neutrófilos com plaquetas ($p = 0,001$) e com ferro ($p = 0,014$).
- Correlações positivas intermediárias de monócitos com plaquetas ($p < 0,001$) e com TG ($p = 0,034$).
- Correlações positivas intermediárias de ferro com BT ($p = 0,017$), com BD ($p = 0,047$), com BI ($p = 0,013$) e com LDH ($p = 0,047$).
- Correlação positiva intermediária entre ferritina e APOA1 ($p = 0,033$).
- Correlação positiva intermediária de APOA1 com CT ($p = 0,002$) e com Não-HDL ($p = 0,043$).
- Correlação positiva forte entre APOB e CT ($p < 0,001$) e com Não-HDL ($p < 0,001$).
- Correlação positiva intermediária entre HDL e Não-HDL.

Tabela 18: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos de todos os indivíduos com doença falciforme participantes do estudo

Doença Falciforme (HbSS + HbSC)														
Parâmetros	Hb		HCM		VCM		HbF		LG		Reticulócitos		Neutrófilos	
	R	P	r	P	R	P	R	P	r	P	r	P	r	P
Hb g/dL	1,000	-												
HCM pg	-0,504*	<0,001	1,000	-										
VCM fL	-0,468*	<0,001	0,911*	<0,001	1,000	-								
HbF %	-0,71	0,129	0,357*	0,001	0,338*	0,002	1,000	-						
LG /mm ³	-0,575*	<0,001	0,337*	<0,001	0,306*	<0,001	0,61	0,588	1,000	-				
Reticulócitos %	-0,708*	<0,001	0,554*	<0,001	0,465*	<0,001	0,151	0,181	0,500*	<0,001	1,000	-		
Neutrófilos /mm ³	-0,416*	<0,001	0,228*	0,005	0,203*	0,013	0,077	0,500	0,791*	<0,001	0,339*	<0,001	1,000	-
Monócitos /mm ³	-0,528*	<0,001	0,278*	0,001	0,222*	0,006	-0,004	0,973	0,678*	<0,001	0,608*	<0,001	0,531*	<0,001
Plaquetas /mm ³	-0,614*	<0,001	0,450*	<0,001	0,439*	<0,001	0,099	0,384	0,621*	<0,001	0,544*	<0,001	0,496*	<0,001
Ferro mcg/dL	-0,152	0,088	0,206*	0,021	0,184*	0,039	0,166	0,180	0,243*	0,006	0,193*	0,031	0,210*	0,018
Ferritina µg/L	-0,279*	0,001	0,279*	0,001	0,305*	<0,001	-0,022	0,858	0,152	0,087	0,420*	<0,001	0,090	0,310
APOA1 mg/dL	0,163	0,163	-0,023	0,847	0,025	0,833	0,023	0,880	-0,189	0,104	-0,108	0,358	-0,260*	0,034
APOB mg/dL	-0,068	0,563	0,166	0,153	0,236*	0,041	0,201	0,191	-0,041	0,728	0,070	0,548	-0,037	0,750

Continuação da Tabela 18: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos de todos os indivíduos com doença falciforme participantes do estudo.

Parâmetro	Doença Falciforme (HbSS + HbSC)													
	Hb		HCM		VCM		HbF		LG		Reticulócitos		Neutrófilos	
	R	P	r	P	R	P	R	P	r	P	r	P	r	P
CT mg/dL	-0,028	0,795	0,132	0,215	0,157	0,136	0,063	0,637	-0,031	0,772	-0,009	0,931	-0,023	0,829
HDL mg/dL	0,144	0,177	-0,045	0,673	-0,047	0,662	-0,003	0,985	-0,025	0,819	-0,179	0,094	0,008	0,939
Não-HDL mg/dL	-0,076	0,512	0,151	0,191	0,218	0,057	0,147	0,330	-0,050	0,664	0,101	0,380	-0,038	0,744
TG mg/dL	-0,057	0,593	0,058	0,585	0,115	0,281	-0,140	0,296	-0,005	0,961	0,029	0,783	-0,063	0,558
BT mg/dL	-0,440*	0,001	0,177	0,185	0,187	0,161	-0,103	0,542	0,407*	0,002	0,494*	<0,001	0,276*	0,036
BD mg/dL	-0,437*	0,001	0,213	0,108	0,248	0,060	-0,078	0,645	0,341*	0,009	0,506*	<0,001	0,182	0,171
BI mg/dL	-0,421*	0,001	0,171	0,198	0,181	0,173	-0,075	0,659	0,395*	0,002	0,483*	<0,001	0,279*	0,034
LDH U/L	-0,632*	<0,001	0,492*	<0,001	0,435*	0,001	-0,057	0,743	0,487*	<0,001	0,661*	<0,001	0,360*	0,007

Continuação da Tabela 18: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos de todos os indivíduos com doença falciforme participantes do estudo.

Doença Falciforme (HbSS + HbSC)														
Parâmetro	Monócitos		Plaquetas		Ferro		Ferritina		APOA1		APOB		CT	
	R	P	R	P	R	P	R	P	r	P	R	P	r	P
Monócitos /mm ³	1,000	-												
Plaquetas /mm ³	0,499*	<0,001	1,000	-										
Ferro mcg/dL	0,187*	0,036	0,221*	0,013	1,000	-								
Ferritina µg/L	0,213*	0,016	0,306*	<0,001	0,200*	0,026	1,000	-						
APOA1 mg/dL	-0,180	0,122	0,091	0,439	-0,036	0,777	0,226	0,072	1,000	-				
APOB mg/dL	-0,073	0,533	0,058	0,624	-0,132	0,295	-0,079	0,535	0,079	0,491	1,000	-		
CT mg/dL	-0,096	0,369	0,157	0,143	-0,087	0,460	-0,059	0,609	0,323*	0,004	0,850*	<0,001	1,000	-
HDL mg/dL	-0,112	0,294	0,103	0,339	-0,095	0,420	0,101	0,385	0,728*	<0,001	-0,124	0,276	0,455*	<0,001
Não-HDL mg/dL	-0,066	0,566	0,056	0,634	-0,093	0,453	-0,023	0,855	0,112	0,325	0,924*	<0,001	0,842*	<0,001
TG mg/dL	0,075	0,480	-0,005	0,961	0,053	0,651	0,108	0,348	-0,107	0,349	0,494*	<0,001	0,301*	<0,001
BT mg/dL	0,408*	0,001	0,117	0,188	0,279*	0,045	0,208	0,143	-0,129	0,330	-0,181	0,171	-0,231	0,076
BD mg/dL	0,246	0,063	0,244	0,068	0,177	0,209	0,067	0,638	0,081	0,540	0,033	0,803	0,071	0,589
BI mg/dL	0,423*	0,001	0,168	0,212	0,279*	0,045	0,217	0,126	-0,148	0,264	-0,188	0,155	-0,251	0,053
LDH U/L	0,367*	0,006	0,517*	<0,001	0,264	0,067	0,186	0,206	-0,158	0,244	0,155	0,255	0,074	0,582

Continuação da Tabela 18: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos de todos os indivíduos com doença falciforme participantes do estudo.

Parâmetro	HDL		Não-HDL		TG		BT		BD		BI	
	R	P	R	P	r	P	r	P	r	P	r	P
HDL mg/dL	1,000	-										
Não-HDL mg/dL	0,051	0,579	1,000	-								
TG mg/dL	-0,260*	0,002	0,378*	<0,001	1,000	-						
BT mg/dL	-0,107	0,415	-0,190	0,147	0,139	0,289	1,000	-				
BD mg/dL	-0,084	0,524	0,087	0,507	0,255*	0,049	0,725*	<0,001	1,000	-		
BI mg/dL	-0,122	0,355	-0,204	0,117	0,128	0,331	0,993*	<0,001	0,672*	<0,001	1,000	-
LDH U/L	-0,137	0,308	0,143	0,290	0,166	0,218	0,557*	<0,001	0,585*	<0,001	0,541*	<0,001

Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; LG: leucometria global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; Não-HDL: não lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicerídeos. * = Diferença significativa. Correlação de Spearman.

Tabela 19: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos de todos os indivíduos com anemia falciforme participantes do estudo

Anemia Falciforme (HbSS)														
Parâmetro	Hb		HCM		VCM		HbF		LG		Reticulócitos		Neutrófilos	
	r	P	r	P	R	p	R	p	r	p	r	p	r	p
Hb g/dL	1,000	-												
HCM pg	0,021	0,847	1,000	-										
VCM fL	0,068	0,531	0,897*	<0,001	1,000	-								
HbF %	0,427*	0,001	0,087	0,525	0,071	0,601	0,001	-						
LG /mm ³	-0,414*	0,001	-0,156	0,148	-0,151	0,164	-0,220	0,104	1,000	-				
Reticulócitos %	-0,290*	0,006	0,169	0,119	0,066	0,544	-0,253	0,160	0,248*	0,020	1,000	-		
Neutrófilos /mm ³	-0,406*	<0,001	-0,093	0,391	-0,122	0,261	-0,111	0,417	0,683*	<0,001	0,086	0,426	1,000	-
Monócitos /mm ³	-0,429*	<0,001	-0,062	0,567	-0,142	0,189	-0,146	0,283	0,593*	<0,001	0,582*	<0,001	0,396*	<0,001
Plaquetas /mm ³	-0,177	0,104	-0,061	0,574	-0,079	0,468	-0,221	0,104	0,292*	0,006	0,007	0,947	0,283	0,008
Ferro mcg/dL	0,007	0,951	0,030	0,803	-0,057	0,642	-0,010	0,946	0,012	0,919	0,149	0,220	-0,019	0,875
Ferritina µg/L	0,051	0,677	0,039	0,747	0,051	0,675	-0,126	0,397	-0,069	0,570	0,179	0,139	-0,160	0,186
APOA1 mg/dL	0,360*	0,013	0,003	0,985	0,005	0,976	0,250	0,153	-0,202	0,174	-0,306*	0,036	-0,281	0,056
APOB mg/dL	0,133	0,371	0,020	0,896	0,119	0,427	0,223	0,205	-0,221	0,136	-0,015	0,923	-0,147	0,324

Continuação da tabela 19: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos de todos os indivíduos com anemia falciforme participantes do estudo.

Parâmetro	Anemia Falciforme (HbSS)													
	Hb		HCM		VCM		HbF		LG		Reticulócitos		Neutrófilos	
	R	P	r	p	R	p	R	p	r	p	r	p	r	p
CT mg/dL	0,083	0,539	0,075	0,582	0,140	0,299	0,124	0,428	-0,189	0,159	-0,143	0,288	-0,044	0,748
HDL mg/dL	0,085	0,530	0,091	0,503	0,072	0,594	0,138	0,377	0,067	0,622	-0,311*	0,019	0,090	0,504
Não-HDL mg/dL	0,049	0,740	-0,009	0,951	0,112	0,449	0,173	0,321	-0,200	0,172	0,007	0,960	-0,099	0,505
TG mg/dL	-0,009	0,946	-0,028	0,837	0,086	0,527	-0,182	0,243	-0,087	0,518	0,102	0,451	-0,108	0,423
BT mg/dL	-0,281	0,092	-0,134	0,428	-0,109	0,521	-0,510*	0,006	0,293	0,078	0,559*	<0,001	0,150	0,374
BD mg/dL	-0,109	0,521	-0,173	0,307	-0,092	0,586	-0,411*	0,030	0,221	0,189	0,430*	0,008	0,111	0,515
BI mg/dL	-0,268	0,108	-0,117	0,489	-0,096	0,572	-0,488*	0,008	0,282	0,091	0,561*	<0,001	0,133	0,434
LDH U/L	-0,523*	0,001	0,128	0,465	0,056	0,749	-0,450*	0,018	0,236	0,172	0,505*	0,002	0,183	0,291

Continuação da tabela 19: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos de todos os indivíduos com doença falciforme participantes do estudo.

Anemia Falciforme (HbSS)														
Parâmetro	Monócitos		Plaquetas		Ferro		Ferritina		APOA1		APOB		CT	
	r	p	R	p	R	P	R	p	r	p	r	p	r	p
Monócitos /mm ³	1,000	-												
Plaquetas /mm ³	0,198	0,068	1,000	-										
Ferro mcg/dL	0,094	0,438	0,037	0,762	1,000	-								
Ferritina µg/L	0,061	0,615	0,084	0,487	0,194	0,113	1,000	-						
APOA1 mg/dL	-0,196	0,187	0,134	0,375	-0,028	0,866	0,089	0,595	1,000	-				
APOB mg/dL	-0,202	0,173	-0,125	0,408	-0,140	0,396	-0,140	0,402	-0,049	0,737	1,000	-		
CT mg/dL	-0,264*	0,048	0,002	0,988	-0,130	0,385	-0,169	0,256	0,172	0,237	0,880*	<0,001	1,000	-
HDL mg/dL	-0,059	0,663	0,198	0,143	-0,099	0,510	0,065	0,666	0,701*	<0,001	-0,269	0,062	0,048	0,715
Não-HDL mg/dL	-0,155	0,292	-0,123	0,411	-0,090	0,583	-0,144	0,381	-0,068	0,644	0,953*	<0,001	0,932*	<0,001
TG mg/dL	-0,045	0,740	-0,235	0,081	-0,106	0,479	0,046	0,758	-0,191	0,188	0,587*	<0,001	0,458*	<0,001
BT mg/dL	0,359*	0,029	-0,084	0,626	0,112	0,542	-0,026	0,890	-0,472*	0,003	-0,250	0,131	-0,388*	0,016
BD mg/dL	0,058	0,733	-0,080	0,644	-0,094	0,610	-0,248	0,179	-0,039	0,817	-0,004	0,979	0,027	0,874
BI mg/dL	0,363*	0,027	-0,080	0,643	0,112	0,541	0,000	0,999	-0,490*	0,002	-0,254	0,123	-0,403*	0,012
LDH U/L	0,266	0,122	0,180	0,308	0,038	0,840	0,022	0,909	-0,372*	0,026	0,034	0,842	-0,031	0,858

Continuação da tabela 19: Correlações entre os dados bioquímicos de todos os indivíduos com doença falciforme participantes do estudo.

Parâmetro	HDL		Não-HDL		TG		BT		BD		BI		LDH	
	r	p	R	p	R	p	R	p	r	p	r	p	r	p
HDL mg/dL	1,000	-												
Não-HDL mg/dL	-0,292*	0,039	1,000	-										
TG mg/dL	-0,382*	0,003	0,600*	<0,001	1,000	-								
BT mg/dL	-0,291	0,076	-0,247	0,135	0,239	0,149	1,000	-						
BD mg/dL	-0,197	0,236	0,044	0,792	0,266	0,107	0,658*	<0,001	1,000	-				
BI mg/dL	-0,300	0,068	-0,259	0,117	0,217	0,190	0,994*	<0,001	0,610*	<0,001	1,000	-		
LDH U/L	-0,196	0,253	0,051	0,768	0,191	0,266	0,540*	0,001	0,379*	0,023	0,519*	0,001	1,000	-

Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; LG: leucometria global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; HDL: não lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicérides. * = Diferença significativa. Correlação de Spearman.

Tabela 20: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos d os indivíduos com hemoglobinopatia SC participantes do estudo

Hemoglobinopatia SC (HbSC)														
Parâmetro	Hb		HCM		VCM		HbF		LG		Reticulócitos		Neutrófilos	
	r	P	r	p	R	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Hb g/dL	1,000	-	-0,036											
HCM pg	-0,036	0,782	1,000	-										
VCM fL	-0,009	0,947	0,758*	<0,001	1,000	-								
HbF %	-0,182	0,393	0,223	0,295	0,098	0,649	1,000	-						
LG /mm ³	-0,253*	0,046	0,286*	0,023	0,168	0,187	-0,108	0,614	1,000	-				
Reticulócitos %	-0,251*	0,047	0,058	0,654	-0,050	0,695	-0,174	0,415	0,219	0,085	1,000	-		
Neutrófilos /mm ³	-0,057	0,657	0,095	0,457	0,070	0,586	-0,072	0,737	0,851*	<0,001	0,185	0,146	1,000	-
Monócitos /mm ³	-0,157	0,219	0,123	0,337	0,091	0,479	-0,251	0,238	0,647*	<0,001	0,291*	0,021	0,498*	<0,001
Plaquetas /mm ³	-0,111	0,386	0,092	0,473	0,133	0,298	-0,444*	0,030	0,499*	<0,001	0,150	0,240	0,418*	0,001
Ferro mcg/dL	-0,037	0,789	0,183	0,178	0,220	0,103	0,124	0,602	0,287*	0,032	-0,074	0,588	0,325*	0,014
Ferritina µg/L	-0,101	0,450	0,217	0,102	0,200	0,133	-0,326	0,139	0,015	0,914	0,320*	0,014	0,099	0,460
APOA1 mg/dL	0,108	0,585	-0,150	0,801	0,049	0,804	-0,632*	0,050	-0,138	0,485	0,162	0,410	-0,159	0,420
APOB mg/dL	0,003	0,988	0,313	0,105	0,278	0,152	-0,267	0,455	0,080	0,685	-0,088	0,655	0,003	0,988

Continuação da tabela 20: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos dos indivíduos com hemoglobinopatia SC participantes do estudo.

Hemoglobinopatia SC (HbSC)														
Parâmetro	Hb		HCM		VCM		HbF		LG		Reticulócitos		Neutrófilos	
	r	P	r	p	R	p	r	p	r	p	r	p	r	p
CT mg/dL	-0,034	0,849	0,226	0,207	0,095	0,599	-0,300	0,277	0,070	0,698	0,064	0,725	-0,110	0,543
HDL mg/dL	0,199	0,274	-0,165	0,368	-0,177	0,331	-0,342	0,231	-0,206	0,257	0,094	0,611	-0,093	0,611
Não-HDL mg/dL	0,007	0,972	0,347	0,065	0,261	0,172	-0,405	0,216	0,012	0,949	0,037	0,850	-0,103	0,595
TG mg/dL	-0,223	0,212	0,329	0,062	0,300	0,090	-0,080	0,776	0,248	0,164	0,042	0,817	0,009	0,959
BT mg/dL	-0,081	0,729	-0,104	0,654	-0,012	0,960	0,117	0,765	0,233	0,310	-0,075	0,747	0,214	0,352
BD mg/dL	-0,096	0,680	-0,053	0,821	-0,020	0,931	0,017	0,966	0,090	0,698	0,115	0,618	-0,058	0,803
BI mg/dL	-0,089	0,701	-0,135	0,561	0,010	0,964	0,183	0,637	0,228	0,320	-0,078	0,736	0,246	0,282
LDH U/L	0,111	0,643	0,320	0,169	0,245	0,297	0,323	0,435	0,500*	0,025	-0,036	0,879	0,294	0,208

Continuação da tabela 20: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos dos indivíduos com hemoglobinopatia SC participantes do estudo.

Hemoglobinopatia SC (HbSC)														
Parâmetro	Monócitos		Plaquetas		Ferro		Ferritina		APOA1		APOB		CT	
	r	P	r	p	R	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Monócitos /mm ³	1,000	-												
Plaquetas /mm ³	0,463*	<0,001	1,000	-										
Ferro mcg/dL	0,126	0,356	0,118	0,386	1,000	-								
Ferritina µg/L	0,90	0,504	0,116	0,387	0,053	0,697	1,000	-						
APOA1 mg/dL	-0,093	0,639	0,279	0,151	-0,043	0,833	0,420*	0,033	1,000	-				
APOB mg/dL	0,013	0,946	0,343	0,074	-0,230	0,258	-0,036	0,863	0,327	0,078	1,000	-		
CT mg/dL	0,030	0,867	0,351*	0,045	-0,240	0,219	0,087	0,646	0,544*	0,002	0,802*	<0,001	1,000	-
HDL mg/dL	-0,198	0,278	0,159	0,386	-0,123	0,503	0,333	0,078	0,837*	<0,001	0,283	0,130	0,585*	<0,001
Não-HDL mg/dL	-0,072	0,710	0,295	0,120	-0,273	0,168	0,151	0,453	0,372*	0,043	0,842*	<0,001	0,936*	<0,001
TG mg/dL	0,370*	0,034	0,483*	0,004	0,245	0,209	0,256	0,272	0,070	0,712	0,276	0,140	0,287	0,095
BT mg/dL	0,210	0,360	0,048	0,836	0,527*	0,017	0,321	0,167	0,267	0,243	-0,207	0,369	-0,184	0,412
BD mg/dL	0,118	0,610	0,555	0,814	0,449*	0,047	0,288	0,218	0,318	0,160	0,022	0,925	-0,033	0,883
BI mg/dL	0,254	0,266	0,018	0,940	0,543*	0,013	0,305	0,190	0,293	0,197	-0,216	0,347	-0,205	0,361
LDH U/L	0,065	0,784	0,243	0,302	0,462*	0,047	-0,312	0,194	-0,069	0,772	0,384	0,095	0,102	0,661

Continuação da tabela 20: Correlações entre os dados hematológicos e bioquímicos dos indivíduos com hemoglobinopatia SC participantes do estudo.

Parâmetro	HDL		Não-HDL		TG		BT		BD		BI		LDH	
	R	p	R	p	R	p	r	p	r	p	r	p	r	p
HDL mg/dL	1,000	-												
Não-HDL mg/dL	0,416*	0,020	1,000	-										
TG mg/dL	-0,062	0,729	0,219	0,236	1,000	-								
BT mg/dL	0,117	0,603	-0,276	0,213	-0,060	0,789	1,000	-						
BD mg/dL	0,171	0,446	0,035	0,879	0,059	0,795	0,733*	<0,001	1,000	-				
BI mg/dL	0,090	0,690	-0,320	0,147	-0,012	0,959	0,980*	<0,001	0,659*	0,001	1,000	-		
LDH U/L	-0,008	0,973	0,191	0,408	0,110	0,636	0,096	0,680	0,244	0,286	0,115	0,620	1,000	-

Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; LG: leucometria global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL: Lipoproteína de alta densidade HDL; Não-HDL: não lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicerídeos. * = Diferença significativa. Correlação de Spearman.

5.2.2 Perfil lipídico dos indivíduos com doença falciforme comparado ao grupo controle

Os valores de lipidograma (CT, HDL, não-HDL e TG) apresentaram distribuição não normal para a população de estudo que possui DF (grupos HbSS + HbSC) e grupo de indivíduos controle sem a DF. Foi encontrada diferença significativa entre os grupos de indivíduos SS, Sc e saudáveis para CT ($p < 0,001$) e HDL ($p < 0,001$) (Tabela 21).

Por outro lado, as médias dos valores de TG dos indivíduos dos três grupos apresentaram-se dentro do valor da normalidade ($< 130 \text{ mg/dL}$ para crianças maiores de 10 anos e $< 100 \text{ mg/dL}$ para crianças de até 10 anos). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($p = 0,257$) e a razão de chance também não deu significância. Em suma, os pacientes dos Hemocentros Regionais de Governador Valadares e de Uberaba, participantes deste estudo, não apresentaram predomínio de hipertrigliceridemia, visto que apenas 8,51% dos indivíduos com DF apresentaram hipertrigliceridemia (Tabela 22). Apesar dos indivíduos não apresentarem predomínio de hipertrigliceridemia, realizamos a análise dos perfis hematológicos e bioquímicos em relação aos níveis plasmáticos de TG, apenas para o grupo DF. Apresentaram distribuição normal: HbF, LG, neutrófilos, plaquetas, APOA1, BD e LDH. Apresentaram distribuição não normal: Hb, HCM, VCM, reticulócitos, monócitos, ferro, ferritina, APOB, CT, não-HDL, HDL, BT e BI. Os resultados encontram-se na Tabela 23. Ocorreu aumento de mais de 53% nos níveis de LDH quando os TGs estavam acima do limite aceitável ($p = 0,015$).

Posteriormente, afixou-se o valor normal de referência para o HDL de 40 mg/dL e separou-se os indivíduos que possuíam valores superiores e inferiores a este. Foi encontrado que 64,52% dos indivíduos com DF apresentaram HDL $< 40 \text{ mg/dL}$. Compararam-se os três grupos (SS, SC e controle) e foi encontrada diferença significativa ($p < 0,001$) entre o número de indivíduos que possuíam valores superiores ou iguais e inferiores a 40 mg/dL (Tabela 24), sendo que os indivíduos do grupo SS apresentaram mais indivíduos com HDL $< 40 \text{ mg/dL}$. Além disso, indivíduos HbSS e HbSC apresentaram razão de chance de 0,110 e 0,197 vezes maior de apresentarem HDL $< 40 \text{ mg/dL}$, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Foi também verificada que há uma ordenação crescente de percentual de indivíduos entre os grupos HbSS, HbSC e sem DF (Figura 17).

Tabela 21: Dados das concentrações de lipoproteínas e triglicerídeos dos indivíduos com doença falciforme comparados aos indivíduos controle

	HbSS + HbSC + Controle			HbSS			HbSC			Controle			p
	N	Média	Dp	N	Média	Dp	N	Média	Dp	N	Média	Dp	
CT mg/dL	134	133,28	27,98	59	124,67	21,74	35	123,29	21,58	40	154,73	29,80	<0,001*
HDL mg/dL	133	42,49	9,88	59	38,93	6,43	34	40,26	8,11	40	49,63	11,73	<0,001*
Não-HDL mg/dL	121	85,63	22,19	50	86,93	24,20	31	82,26	18,17	40	104,60	27,25	0,618
TG mg/dL	134	86,29	35,30	59	86,68	37,28	35	84,23	28,59	40	87,53	38,25	0,937

CT: colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; Não-HDL: não lipoproteína de alta densidade; TG: triglicerídeos. * = diferença significativa. A diferença foi encontrada entre os grupos HbSS, HbSC e controle.
 Teste Kruskal-wallis.

Tabela 22: Número e porcentagem de indivíduos que apresentaram níveis de Triglicerídios normais e alterados

		TG normal	TG alterado	Total	RC	IC 95%	P
DF	HbSS	53 (44,54%)	6 (40,00%)	59 (44,03%)	1,874	0,579-6,060	0,257
	HbSC	33 (27,73%)	2 (13,30%)	35 (26,12%)	3,500	0,676-18,113	
Controle		33 (27,73%)	7 (46,70%)	40 (29,85%)	---	---	
Total		119 (100%)	15 (100%)	134 (100%)	---	---	

HbSS: anemia falciforme; HbSC: hemoglobinopatia SC; TG: triglicerídios; TG Normal: TG < 100 mg/dL para 0-9 anos e TG < 130 mg/dL para 10-19 anos; TG alterado: TG ≥ 100 mg/dL para 0-9 anos e TG ≥ 130 mg/dL para 10-19 anos. RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança.

Teste qui-quadrado p = 0,257.

Tabela 23: Análise dos níveis plasmáticos de triglicerídios em relação os parâmetros hematológicos e bioquímicos

Parâmetro	Doença Falciforme (HbSS+ HbSC)				p
	TG < 100 mg/dL para 0-9 anos TG < 130 mg/dL para 10-19 anos		TG ≥ 100 mg/dL para 0-9 anos TG ≥ 130 mg/dL para 10-19 anos		
	N	Média (dp)	N	Média (dp)	
Hb g/dL	83	9,47 (1,68)	8	8,66 (1,37)	0,210
HCM pg	83	29,77 (4,18)	8	30,44 (2,80)	0,385
VCM fL	83	89,51 (11,74)	8	91,12 (11,51)	0,604
HbF %	51	11,39 (7,87)	7	7,78 (5,10)	0,245
LG /mm ³	83	9372,94 (3120,30)	8	10108,36 (2475,92)	0,520
Reticulócitos %	83	2,88 (2,01)	8	2,60 (0,98)	0,795
Neutrófilos /mm ³	83	4973,54 (1693,18)	8	5053,66 (1407,22)	0,897
Monócitos /mm ³	83	476,48 (371,98)	8	523,58 (347,21)	0,466
Plaquetas /mm ³	82	377102,01 (159669,90)	8	446683,25 (152093,21)	0,241
Ferro mcg/dL	69	92,18 (37,85)	7	75,01 (23,18)	0,285
Ferritina µg/L	71	274,81 (804,78)	7	140,06 (62,76)	0,841
APOA1 mg/dL	72	107,35 (15,81)	7	111,14 (11,68)	0,539
APOB mg/dL	72	59,69 (16,58)	7	70,71 (15,78)	0,086
CT mg/dL	86	123,11 (21,43)	8	135,41 (21,27)	0,093
HDL mg/dL	85	39,68 (7,22)	8	36,63 (4,84)	0,410
Não-HDL mg/dL	74	83,83 (21,74)	7	99,00 (22,52)	0,088
BT mg/dL	55	1,92 (1,14)	5	2,13 (0,54)	0,346
BD mg/dL	55	0,41 (0,16)	5	0,53 (0,81)	0,099
BI mg/dL	55	1,52 (1,04)	5	1,60 (0,61)	0,403
LDH U/L	52	415,84 (177,49)	5	636,60 (281,51)	0,015*

n: Número de participantes; Dp: desvio padrão; Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; HbF: Hemoglobina fetal; Ret.: reticulócito; LG: leucometria global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL-c: Colesterol HDL; CNHDL: Colesterol Não-HDL; TG: Triglicerídeos. * = diferença significativa.

Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney.

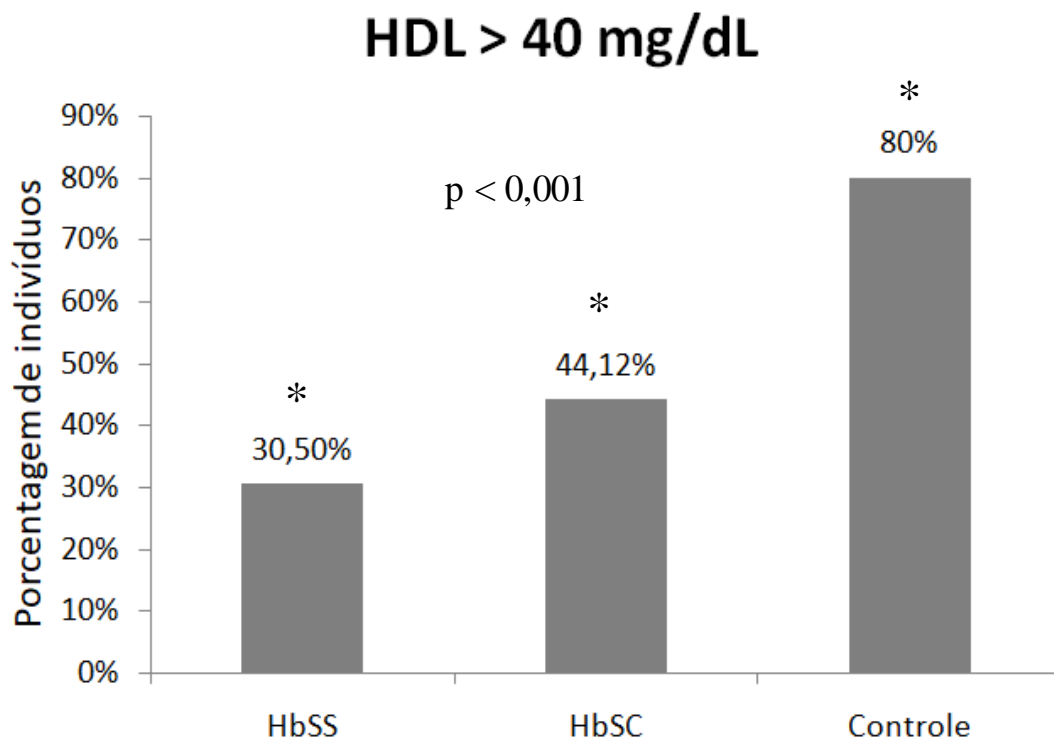
Tabela 24: Distribuição dos níveis de concentração de Lipoproteína de alta densidade na população estudada

Grupo		HDL >40mg/dL	HDL <40mg/dL	Total	RC	IC 95%	p
DF	HbSS	18 (31%)	41 (69%)	59 (100%)	0,110	0,042-0,285	< 0,001*
	HbSC	15 (44%)	19 (56%)	34 (100%)	0,197	0,071-0,552	
Controle		32 (80%)	8 (20%)	40 (100%)	---	---	
Total		65	68	133	---	---	

HbSS: anemia falciforme; HbSC: hemoglobinopatia SC; HDL: Lipoproteína de alta densidade; RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança. * = diferença significativa.

Teste do qui-quadrado $p < 0,001$.

Figure 17: Proporção de Lipoproteína de alta densidade entre os grupos de pacientes com doença falciforme estudados



HDL: Lipoproteína de alta densidade.
Teste qui-quadrado $p < 0,001$.

5.2.3 Análise dos perfis hematológicos e bioquímicos em relação aos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade

Entre os indivíduos com DF houve distribuição normal para APOA1, BD, plaquetas e leucócitos edistribuição não normal para os demais resultados de exames. O número de indivíduos, valores de média, desvio padrão e p estão descritos na Tabela 25.

Observaram-se diferenças significativas em relação ao nível de HDL no grupo de indivíduos com DF quando o valor de HDL foi superior a 40 mg/dL para os seguintes exames: aumento de Hb ($p = 0,041$), APOA1 ($p < 0,001$) e CT ($p < 0,001$); redução de reticulócitos ($p = 0,018$) e TG ($p = 0,007$).

Analisando somente o grupo de pacientes com AF com HDL superior a 40 mg/dL, observou-se diferença significativa entre os níveis de HDL e maior quantidade de APOA1 ($p < 0,001$).

Para o grupo HbSC que apresentaram o HDL superior a 40 mg/dL observaram-se diferenças significativas entre os níveis de HDL e maior Hb ($p = 0,049$), maior conteúdo de APOA1 ($p < 0,001$), maior nível de CT ($p < 0,001$) e de não-HDL ($p = 0,044$).

Tabela 25: Análise dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade em relação os parâmetros hematológicos e bioquímicos

Parâmetro	Doença Falciforme (HbSS+ HbSC)				Anemia Falciforme (HbSS)				Hemoglobinopatia SC						
	HDL >40mg/dL		HDL <40mg/dL		p	HDL >40mg/dL		HDL <40mg/dL		P	HDL >40mg/dL		HDL <40mg/dL		p
	N	Média (dp)	N	Média (dp)		N	Média (dp)	N	Média (dp)		N	Média (dp)	N	Média (dp)	
Hb g/dL	30	9,91 (1,83)	59	9,11 (1,53)	0,041*	17	8,76 (1,60)	40	8,26 (0,99)	0,299	13	11,39 (0,79)	19	10,85 (0,78)	0,049*
HCM pg	30	29,69 (4,61)	59	30,01 (3,82)	0,512	17	32,12 (4,66)	40	31,45 (3,61)	0,333	13	26,51 (1,82)	19	26,98 (2,10)	0,448
VCM fL	30	88,20 (12,04)	59	90,16 (11,52)	0,415	17	94,34 (11,91)	40	94,17 (11,35)	0,701	13	80,16 (6,13)	19	81,73 (6,13)	0,495
HbF %	19	11,34 (8,99)	38	10,78 (7,12)	0,819	13	15,04 (8,49)	30	12,67 (6,71)	0,588	6	3,32 (2,26)	8	3,77 (3,02)	0,852
LG /mm ³	30	9051,95(3289,76)	59	9712,27 (2954,58)	0,340	17	10461,89 (3013,69)	40	10479,97 (3015,50)	0,984	13	7208,18 (2746,92)	19	8096,10 (2087,97)	0,238
Reticulócitos %	30	2,31 (1,50)	59	3,17 (2,10)	0,018*	17	3,02 (1,63)	40	3,91 (2,12)	0,053	13	1,39 (0,53)	19	1,64 (0,83)	0,383
Neutrófilos /mm ³	30	4837,41 (1745,95)	59	5099,97 (1632,67)	0,655	17	5330,41 (1779,62)	40	5310,90 (1688,77)	0,613	13	4192,74 (1532,80)	19	4655,94 (1450,15)	0,404
Monócitos /mm ³	30	415,11 (303,06)	59	518,02 (398,54)	0,181	17	473,05 (296,15)	40	584,21 (434,74)	0,519	13	339,33 (306,66)	19	378,67 (268,38)	0,238
Plaquetas /mm ³	30	409242,72 (162113,43)	58	378345,65 (154317,15)	0,384	17	488347,98 (124678,38)	39	443674,34 (125485,40)	0,225	13	305797,40 (149425,28)	19	244249,95 (118067,44)	0,203

Continuação da tabela 25: Análise dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade em relação os parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Parâmetro	Doença Falciforme (HbSS+ HbSC)				Anemia Falciforme (HbSS)				Hemoglobinopatia SC						
	HDL >40mg/dL		HDL <40mg/dL		P	HDL >40mg/dL		HDL <40mg/dL		P	HDL >40mg/dL		HDL <40mg/dL		p
	N	Média (dp)	N	Média (dp)		N	Média (dp)	N	Média (dp)		N	Média (dp)	N	Média (dp)	
Ferro mg/dL	27	86,55 (28,58)	48	92,83 (41,40)	0,570	15	92,48 (25,06)	32	97,74 (47,02)	0,964	12	79,14 (32,00)	16	83,00 (25,40)	0,423
Ferritina µg/L	27	177,14 (165,25)	49	317,11 (961,35)	0,700	14	239,56 (207,77)	33	222,61 (324,50)	0,285	13	109,92 (54,50)	16	512,01 (1634,81)	0,589
APOA1 mg/dL	29	120,28 (12,70)	50	100,37 (11,84)	<0,001*	16	116,13 (9,94)	33	101,79 (10,68)	<0,001*	13	125,38 (14,23)	17	97,65 (13,72)	<0,001*
APOB mg/dL	29	56,28 (12,21)	50	63,21 (18,48)	0,194	16	51,63 (12,22)	33	67,30 (19,32)	0,007*	13	62,00 (9,87)	17	55,29 (14,07)	0,086
CT mg/dL	65	143,25 (28,23)	68	123,72 (24,57)	<0,001*	18	121,75 (17,01)	41	129,94 (23,60)	0,684	15	134,68 (113,66)	19	113,66 (19,14)	<0,001*
Não-HDL mg/dL	62	84,44 (19,85)	59	86,88 (24,50)	0,983	16	73,63 (17,53)	34	93,20 (24,55)	0,006*	14	87,00 (15,86)	17	78,35 (19,46)	0,044*
TG mg/dL	65	78,62 (28,74)	68	93,65 (39,66)	0,007*	18	65,50 (17,05)	41	95,98 (40,02)	0,001*	15	84,53 (27,52)	19	84 (30,90)	0,811

Continuação da tabela 25: Análise dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade em relação os parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Parâmetro	Doença Falciforme (HbSS+ HbSC)				Anemia Falciforme (HbSS)				Hemoglobinopatia SC						
	HDL >40mg/dL		HDL <40mg/dL		P	HDL >40mg/dL		HDL <40mg/dL		P	HDL >40mg/dL		HDL <40mg/dL		p
	N	Média (dp)	N	Média (dp)		N	Média (dp)	N	Média (dp)		N	Média (dp)	N	Média (dp)	
BT mg/dL	24	1,72 (0,90)	36	2,07 (1,21)	0,319	15	1,78 (0,91)	23	2,46 (2,27)	0,107	9	1,6 (0,92)	13	1,39 (0,65)	0,647
BD mg/dL	24	0,40 (0,18)	36	0,41 (0,13)	0,656	15	0,43 (0,20)	23	0,47 (0,13)	0,299	9	0,37 (0,13)	13	0,32 (0,1)	0,313
BI mg/dL	24	1,30 (0,80)	36	1,65 (1,11)	0,261	15	1,37 (0,77)	23	1,98 (1,21)	0,083	9	1,23 (0,30)	13	1,08 (0,58)	0,744
LDH U/L	23	400,48 (200,03)	34	458,71 (192,21)	0,305	14	461,64 (230,12)	22	547,26 (179,08)	0,311	9	305,33 (85,08)	12	296,33 (71,82)	0,862

n: Número de participantes; Dp: desvio padrão; Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; HbF: Hemoglobina fetal; Ret.: reticulócito; LG: leucometria global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL-c: Colesterol HDL; CNHDL: Colesterol Não-HDL; TG: Triglicerídeos. * = diferença significativa.

Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney.

5.2.4 Perfil aterogênico dos indivíduos estudados

Foi encontrada diferença significativa entre as médias da razão aterogênica TG/HDL entre os três grupos analisados, embora a razão entre eles não alcançou o valor de risco aterogênico. Quando foi realizada a análise dos pares para a razão TG/HDL foi encontrada diferença significativa apenas entre os grupos controle *versus* HbSS ($p = 0,022$), as análises dos demais pares não alcançaram significância estatística (HbSS *versus* HbSC $p = 0,765$; controle *versus* HbSC $p = 0,054$). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre a razão aterogênica APOB/APOA1 (Tabela26).

Tabela 26: Razões aterogênicas em indivíduos com doença falciforme, comparados ao grupo controle

Razões/ Valor de risco	Grupo	N	Média da razão	dp	p
APOB/APOA1 >0,9 para homens e >0,8 para mulheres	HbSS	49	0,59	0,19	0,198
	HbSC	30	0,54	0,13	
TG/HDL >2,4	HbSS	59	2,33	1,19	0,049*
	HbSC	34	2,19	0,99	
	Controle	40	1,90	1,02	

HbSS: anemia falciforme; HbSC: hemoglobinopatia SC; N: número de indivíduos; dp: desvio padrão. * = diferença significativa.

Teste T de Students e Teste Kruskal-Wallis.

Com relação ao índice APOB/APOA1 dos indivíduos com DF apenas oito indivíduos apresentaram risco aumentado, por possuírem a razão APOB/APOA1 superior a 0,9 e 0,8 para homens e mulheres, respectivamente, não sendo encontrada diferença significativa quando comparados os indivíduos com índices superiores e inferiores ao valor de referência tanto para HbSS quanto para HbSC.

Tabela 27: Resultado da razão aterogênica Apolipoproteína B/Apolipoproteína A1 nos indivíduos estudados

	APOB/APOA1 < 0,9 meninos e < 0,8 meninas		APOB/APOA1 > 0,9 meninos e > 0,8 meninas		p
	HbSS	HbSC	HbSS	HbSC	
N	42	29	7	1	>0,05
%	89,36	96,67	10,64	33,33	

N: número de indivíduos; HbSS: anemia falciforme; HbSC: hemoglobinopatia SC.
Teste qui-quadrado.

Com relação ao índice TG/HDL dos indivíduos HbSS, HbSC e controle não foi encontrada diferença significativa quando comparados os indivíduos com índices superiores e inferiores a 2,4 ($p > 0,05$) (Tabela 28).

Tabela 28: Resultado da razão Triglicérides/Lipoproteína de alta densidade nos indivíduos estudados

	TG/HDL < 2,4			TG/HDL \geq 2,4			p
	HbSS	HbSC	Controle	HbSS	HbSC	Controle	
N	37	24	30	21	9	9	>0,05
%	64,91	72,73	76,92	35,09	27,27	23,08	

N: número de indivíduos; HbSS: anemia falciforme; HbSC: hemoglobinopatia SC.
Teste qui-quadrado.

5.3 INFLUÊNCIA DA TERAPÊUTICA DA HIDROXIURÉIA NOS PERFIS HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DOS INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME

Houve diferença significativa entre os grupos HbSS e HbSC em relação à terapia com HU ($p < 0,001$) (Tabela 29), tendo o grupo HbSS maior número de pacientes em uso de HU. Indivíduos HbSS tem 10,280 vezes mais chance de usar HU em relação aos indivíduos HbSC. Foi avaliado se havia diferença dos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre os indivíduos que estavam em terapia com HU e os que não faziam uso.

Tabela 29: Número de indivíduos do estudo em terapia com Hidroxiuréia

	Uso de HU	Sem HU	Total	RC	IC 95%	Valor de p
HbSS	46 (51,11%)	44 (48,89%)	90 (100%)	10,280	4,032-26,213	<0,001*
HbSC	6 (9,23%)	59 (90,77%)	65 (100%)			
Total	52 (33,55)	103 (66,45)	155 (100%)	---	---	

HU: hidroxiuréia; SS: Anemia Falciforme; SC: Hemoglobinopatia SC; RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança. * = Diferença significativa.
 Teste do qui-quadrado $p < 0,001$.

Foi encontrada distribuição normal para APOA1, leucócitos, APOB, LDH, HCM, neutrófilos, plaquetas e distribuição não normal para os demais parâmetros. Analisando somente os indivíduos com AF, os que faziam uso de HU, apresentaram maiores valores de Hb ($p = 0,045$), HCM ($p < 0,001$), VCM ($< 0,001$) e menores valores de neutrófilos ($< 0,001$), BT ($p = 0,001$), BD ($p = 0,012$) e BI (0,002). Ocorreu tendência a significância entre os valores de LG ($p = 0,050$), LDH ($p = 0,074$) e HbF ($p = 0,76$) (Tabela 30).

Tabela 30: Análise dos resultados de exames bioquímicos e hematológicos em relação à terapêutica de Hidroxiuréia no grupo de indivíduos com anemia falciforme (HbSS)

Parâmetro	Em uso de Hidroxiuréia			Sem uso de Hidroxiuréia			p
	N	Média	Dp	N	Média	dp	
Hb g/dL	43	8,53	1,11	44	8,16	1,44	0,045*
HCM pg	43	32,36	4,18	44	29,50	3,11	<0,001*
VCM fL	43	97,24	11,74	44	87,20	8,01	<0,001*
HbF %	37	14,45	7,43	19	11,36	8,28	0,076
LG /mm ³	43	10295,61	3234,18	44	11687,93	3305,66	0,050
Reticulócitos %	43	3,43	2,05	44	3,45	1,52	0,183
Neutrófilos /mm ³	43	4968,34	1710,48	44	6452,34	2023,24	<0,001*
Monócitos /mm ³	43	517,36	336,68	44	593,37	373,92	0,188
Plaquetas /mm ³	43	459263,72	133432,81	43	451509,65	115597,15	0,774
Ferro mcg/dL	33	91,31	44,58	37	94,83	37,99	0,592
Ferritina µg/L	33	304,23	358,26	37	155,92	94,66	0,119
APOA1 mg/dL	32	107,52	13,07	17	104,46	11,02	0,416
APOB mg/dL	32	63,63	19,34	17	59,46	17,74	0,466
CT mg/dL	39	126,27	22,10	20	121,56	21,22	0,400
HDL mg/dL	33	88,57	24,38	17	83,75	24,23	0,499
Não-HDL mg/dL	39	39,67	6,71	20	37,50	5,76	0,232
TG mg/dL	39	87,22	39,74	20	85,60	32,87	0,962
BT mg/dL	24	1,77	0,91	14	9,94	1,25	0,001*
BD mg/dL	24	0,41	0,13	14	0,55	0,16	0,012*
BI mg/dL	24	1,36	0,83	14	2,40	1,18	0,002*
LDH U/L	23	468,81	197,88	13	593,85	190,02	0,074

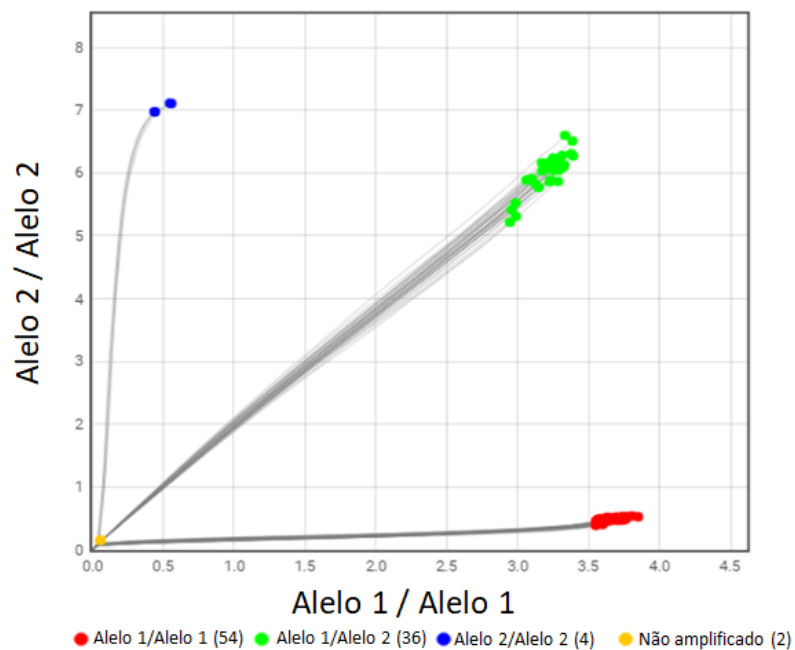
HU: hidroxiuréia; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL: Colesterol HDL; CNHDL: Colesterol Não-HDL; TG: Triglicerídeos; n: número de participantes; Dp: desvio padrão. * = Diferença significativa.

Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney.

5.4BIOMARCADORES GENÉTICOS

As análises de genotipagem foram realizadas para os polimorfismos dos quatro genes selecionados. A figura 18 ilustra graficamente uma das análises de genotipagens.

Figure 18: Resultado gráfico ilustrativo de uma das análises de genotipagem por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)



Pontos vermelhos: indivíduos homocigotos para o alelo de maior frequência; Verdes: indivíduos heterocigotos; Azuis: indivíduos homocigotos para o alelo de menor frequência; Amarelos: controle negativo.

5.4.1 Gene *ANGPTL4* rs116843064

A genotipagem do polimorfismo rs116843064 do gene *ANGPTL4* foi realizada em 138 sujeitos da pesquisa. Os resultados das frequências genotípicas e alélicas encontram-se na Tabela 31. Os genótipos estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ($p > 0,05$).

Foi realizada a análise descritiva dos parâmetros laboratoriais dos alelos A e G do gene *ANGPTL4* rs116843064. Entretanto, foi possível analisar apenas o efeito de dominância do alelo de menor frequência (genótipo GA), visto que não foi encontrado nenhum participante homocigoto do alelo raro (AA). As médias, desvios-padrões e os resultados das análises estão apresentados na Tabela 32. Apresentaram distribuição normal: APOA1, BD e LDH e apresentaram distribuição não normal: Hb, HCM, VCM, LG, neutrófilos, plaquetas, reticulócitos, monócitos, ferro, ferritina, APOB, CT, HDL, não-HDL, TG, BT e BI.

Foi encontrada diferença significativa entre os genótipos de *ANGPTL4* rs116843064, com aumento dos níveis de APOA1 ($p = 0,015$) e CT ($p = 0,026$) e redução de LG ($p = 0,032$) e monócitos ($p = 0,046$) quando se avaliaram os dois pacientes heterocigotos do alelo de menor frequência GA em relação aos homocigotos GG do alelo comum.

A presença do alelo A de menor frequência do gene *ANGPTL4* rs116843064 com relação aos valores de HDL ($>$ ou $<$ 40mg/dl) foi realizada e os resultados encontram-se na Tabela 33. Não foram encontradas diferenças significativas entre o número de indivíduos que possuem o alelo A e os que não o possuem ($p > 0,05$). Entretanto, os indivíduos portadores do alelo A possuem 0,341 vezes mais chance de apresentarem a HDL $>$ 40 mg/dL em relação aos indivíduos que não apresentam esse alelo.

Tabela 31: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs116843064, do gene *ANGPTL4* na população de estudo

Genótipos do gene <i>ANGPTL4</i> rs116843064 (G/A)	Doença Falciforme N = 138			Anemia Falciforme N = 81			Hemoglobinopatia SC N= 57		
	Frequência	N	p	Frequência	N	p	Frequência	N	p
GG	0,99	136		1	81		0,96	55	
GA	0,01	2	>0,05	0	0	----	0,04	2	>0,05
AA	0	0		0	0		0	0	
AA x (GA+GG)	0 x 1	0 x 138	---	0 x 1	0 x 81	---	0 x 1	0 x 57	---
GG x (GA+AA)	0,99 x 0,01	136 x 2	---	1 x 0	81 x 0	---	0,96 x 0,04	55 x 2	---
<i>Alelos</i>									
G	0,99	274	---	1	162	---	0,98	112	---
A	0,01	2	---	0	0	---	0,02	2	---

N: número de indivíduos que realizaram a análise.

Teste Qui-quadrado $p > 0,05$.

Tabela 32: Avaliação do Efeito de Dominância do alelo de menor frequência da variante rs116843064 do gene *ANGPTL4* dos participantes com doença falciforme

<i>ANGPTL4</i> G/A	EFEITO DA DOMINANCIA						P
	Genótipos						
	GG			GA + AA			
	N	Média	dp	N	média	dp	
Hb g/dL	133	9,43	1,73	2	10,97	1,13	0,271
HCM pg	133	29,25	3,98	2	25,24	0,65	0,102
VCM fL	133	87,86	11,01	2	79,68	2,72	0,256
HbF %	77	11,02	7,95	0	---	---	---
LG /mm ³	133	9702,17	3397,96	2	5181,50	415,07	0,032*
Reticulócitos %	133	2,68	1,80	2	1,62	0,63	0,390
Neutrófilos /mm ³	133	5224,88	1940,15	2	3690,60	985,14	0,248
Monócitos /mm ³	133	484,99	334,76	2	186,75	55,15	0,046*
Plaquetas /mm ³	132	372499,40	156016,75	2	195350,00	88883,32	0,114
Ferro mcg/dL	113	88,05	35,82	2	71,47	29,97	0,538
Ferritina µg/L	115	239,16	641,16	2	119,33	58,93	0,782
APOA1 mg/dL	71	107,01	15,15	2	134,00	1,41	0,015*
APOB mg/dL	71	59,49	16,35	2	73,00	12,73	0,220
CT mg/dL	68	122,28	20,85	2	159,50	1,54	0,026*
HDL mg/dL	85	39,09	6,94	2	51,50	9,19	0,053
Não-HDL mg/dL	73	83,35	21,45	2	108,00	12,73	0,104
TG mg/dL	86	86,59	35,27	2	72,50	23,33	0,604
BT mg/dL	55	1,93	1,12	1	1,77	---	1
BD mg/dL	55	0,41	0,16	1	0,43	---	0,922
BI mg/dL	55	1,52	1,02	1	1,34	---	1
LDH U/L	52	437,92	195,85	1	286,0	---	0,446

n: Número de participantes; Dp: desvio padrão; Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; HbF: Hemoglobina fetal; Ret.: reticulócito; LG: leucocitose global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL: Lipoproteína de alta densidade; Não-HDL: não Lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicerídeos. * = diferença significativa.

Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney.

Tabela 33: Efeito de dominância e recessividade do alelo A do polimorfismo rs116843064 do gene *ANGPTL4* sobre a concentração de lipoproteína de alta densidade em indivíduos com doença falciforme

Gene	Níveis de HDL	Efeito de dominância			RC	IC 95%	p
		GA + AA	GG	Total			
<i>ANGPTL4</i> rs116843064 (G/A)	>40mg/dL	2 (100%)	29 (34,11%)	31 (35,63%)	0,341	0,254- 0,458	0,054
	<40mg/dL	0 (0%)	56 (65,99%)	56 (64,37%)			
Total		2 (100%)	85 (100%)	87 (100%)	---	---	

n: número de indivíduos que realizaram a análise; rs: referência de SNP; RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança.

Teste qui-quadrado.

5.4.2 Gene *APOA5*rs662799

A genotipagem do polimorfismo rs662799 do gene *APOA5* foi realizada em 138 sujeitos da pesquisa. Os resultados das frequências genotípicas e alélicas encontram-se na Tabela 34. Os genótipos estavam em EHW ($p > 0,05$).

Também foram analisados os efeitos de dominância e recessividade do alelo de menor frequência do gene *APOA5* rs662799. Todas as análises, incluindo as médias e os desvios-padrões estão apresentadas na Tabela 35. Para o efeito de dominância do alelo G de menor frequência, os dados que apresentaram distribuição normal foram: plaquetas, APOA1, TG, BT, BD e LDH e os dados que apresentaram distribuição não normal: Hb, HCM, VCM, HbF, LG, reticulócitos, neutrófilos, monócitos, ferro, ferritina, APOB, CT, HDL, não-HDL e BI. Não foi possível calcular o efeito de recessividade do alelo de menor frequência do gene *APOA5* rs662799, visto que apenas um indivíduo apresentou homozigose do alelo G. Não foram encontradas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros para o polimorfismo rs662799 do gene *APOA5*.

A análise da influência do alelo de menor frequência G com relação aos valores de HDL ($>$ ou $<$ 40mg/dl) do gene *APOA5* foi realizada e os resultados encontram-se na Tabela 36. Não foram encontradas diferenças significativas entre o número de indivíduos que possuem o alelo de menor frequência e que não o possuem ($p > 0,05$).

Tabela 34: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs662799, do gene *APOA5* na população de estudo

Genótipos do gene <i>APOA5</i> rs662799 (A/G)	Doença Falciforme N = 138			Anemia Falciforme N = 81			Hemoglobinopatia SC N = 57		
	Frequência	N	P	Frequência	N	P	Frequência	N	p
AA	0,80	110		0,81	66		0,77	44	
AG	0,19	27	>0,05	0,18	14	>0,05	0,23	13	>0,05
GG	0,01	1		0,01	1		0	0	
GG x (AG+AA)	0,01 x 0,99	1 x 137	---	0,01 x 0,99	1 x 80	---	0 x 1	0 x 57	---
AA x (AG+GG)	0,80 x 0,20	110 x 28	---	0,81 x 0,19	66 x 15	---	0,23 x 0,77	13 x 44	---
<i>Alelos</i>									
A	0,89	247	---	0,90	146	---	0,89	101	---
G	0,11	29	---	0,10	16	---	0,11	13	---

N: número de indivíduos que realizaram a análise.
 Teste Qui-quadrado $p > 0,05$.

Tabela 35: Avaliação do Efeito de Dominância do alelo de menor frequência do polimorfismo rs662799 do gene *APOA5* nos indivíduos com doença falciforme

APOA5 A/G	EFEITO DE DOMINANCIA						p
	Genótipos						
	AA			AG + GG			
	n	Média	dp	N	média	dp	
Hb g/dL	105	9,50	1,73	28	9,30	1,78	0,649
HCM pg	105	29,39	3,90	28	38,77	4,23	0,341
VCM fL	105	88,24	10,51	28	86,50	12,75	0,163
HbF %	63	11,13	7,88	14	10,51	8,53	0,620
LG /mm ³	105	9740,37	3482,26	28	9278,74	3172,76	0,549
Reticulócitos %	105	2,71	1,87	28	2,55	1,51	0,987
Neutrófilos /mm ³	105	5152,00	1910,25	28	5375,47	2919,63	0,745
Monócitos /mm ³	105	468,23	297,39	28	537,80	453,56	0,791
Plaquetas /mm ³	104	376534,02	155538,07	28	346211,29	154927,13	0,361
Ferro mcg/dL	87	85,77	35,14	26	90,14	32,97	0,614
Ferritina µg/L	89	198,96	247,27	26	376,67	1278,19	0,550
APOA1 mg/dL	55	107,84	15,99	18	107,50	14,69	0,937
APOB mg/dL	55	59,62	16,08	18	60,61	17,56	0,903
CT mg/dL	68	122,46	21,78	20	125,39	20,20	0,495
HDL mg/dL	68	39,75	7,69	19	38,05	4,88	0,647
Não-HDL mg/dL	57	83,24	21,54	18	86,44	22,17	0,687
TG mg/dL	68	85,40	36,49	20	89,25	30,11	0,668
BT mg/dL	42	1,96	1,15	14	1,83	1,03	0,697
BD mg/dL	42	0,41	0,16	14	0,42	0,16	0,879
BI mg/dL	42	1,55	1,03	14	1,41	0,96	0,590
LDH U/L	39	447,08	213,32	14	401,57	132,55	0,459

n: Número de participantes; Dp: desvio padrão; Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; HbF: Hemoglobina fetal; Ret.: reticulócito; LG: leucocitose global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL: Lipoproteína de alta densidade; NÃO-HDL: não Lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicerídeos. * = diferença significativa. Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney.

Tabela 36: Efeito de dominância do alelo G do polimorfismo rs662799 do gene *APOA5* sobre a concentração de lipoproteína de alta densidade em indivíduos com doença falciforme

Gene	Níveis de HDL	Modelo de dominância		Total	RC	IC 95%	p
		Genótipos					
		AG + GG	AA				
<i>APOA5</i> rs662799 (A/G)	>40mg/dL	5 (26,32%)	26 (38,24%)	31 (35,63%)	1,733	0,559- 5,378	0,337
	<40mg/dL	14 (73,68%)	42 (61,76%)	56 (64,37%)			
Total		19 (100%)	68 (100%)	87 (100%)	---	---	

n: número de indivíduos que realizaram a análise; rs: referência de SNP; RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança.

Teste qui-quadrado.

5.4.3 Gene *ZNF259* rs964184

A genotipagem do polimorfismo rs964184 do gene *ZNF259* foi realizada em 138 sujeitos da pesquisa. Os resultados das frequências genotípicas e alélicas encontram-se na Tabela 37. Os genótipos estavam em EHW ($p > 0,05$).

Do mesmo modo, foi realizada a análise descritiva dos parâmetros laboratoriais dos alelos da variante rs964184 do gene *ZNF259* bem como a verificação do efeito de dominância e recessividade do alelo de menor frequência (Tabela 38). Apresentaram distribuição normal: plaquetas, APOA1, APOB, BT, BD e LDH e distribuição não normal: Hb, HCM, VCM, HbF, LG, reticulócitos, neutrófilos, monócitos, ferro, ferritina, CT, HDL, não-HDL, TG e BI. Para o efeito de recessividade do alelo, apresentaram distribuição normal: APOA1, BD e LDH e distribuição não normal: Hb, HCM, VCM, HbF, LG, reticulócitos, neutrófilos, monócitos, plaquetas, ferro, ferritina, APOB, CT, HDL, não-HDL, TG, BT e BI.

Para o efeito de dominância do alelo G de menor frequência da variante rs964184 do gene *ZNF259*, foram encontradas diferenças significativas, com aumento dos níveis de LG ($p = 0,026$), reticulócitos ($p = 0,010$), BT ($p = 0,037$) e BD ($p = 0,001$)

quando comparados os genótipos CG + GG versus CC. Também para o efeito de recessividade do alelo G, foi encontrado aumento dos níveis de BD ($p = 0,011$), quando comparado o genótipo GG versus os genótipos CG + CC. Foi encontrado efeito dose dependente do alelo G, quando realizado o teste ANOVA para as concentrações médias de BD e este resultado está ilustrado na figura 19.

Em relação aos níveis de BD, foi realizado Teste T de Student entre os genótipos: CC *versus* CG ($p = 0,004$), CC *versus* GG ($p = 0,001$) e CG *versus* GG ($p = 0,199$).

A presença do alelo de menor frequência da variante rs964184 do gene *ZFN259* com relação aos valores de HDL ($>$ ou $<$ 40mg/dl) foi realizada e os resultados encontram-se na Tabela 39. Não foram encontradas diferenças significativas entre o número de indivíduos que possuem o alelo G e que não o possuem ($p > 0,05$).

Nós não encontramos diferença significativa entre o número de indivíduos que apresentavam doença hepato-biliar (colelitíase) e presença do polimorfismo do gene *ZNF259* ($p > 0,05$) (Tabela 40).

Tabela 37: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs964184, do gene *ZNF259* na população de estudo

Genótipos do gene <i>ZNF259</i> rs964184 (C/G)	Doença Falciforme N = 138			Anemia Falciforme N = 81			Hemoglobinopatia SC N = 57		
	Frequência	N	P	Frequência	N	P	Frequência	N	P
CC	0,67	92		0,62	50		0,74	42	
CG	0,30	42	>0,05	0,34	28	>0,05	0,24	14	>0,05
GG	0,03	4		0,04	3		0,02	1	
CC x (CG+GG)	0,67 x 0,33	92 x 46	---	0,62 x 0,38	50 x 31	---	0,74 x 0,26	42 x 15	---
GG x (CG+CC)	0,03 x 0,97	4 x 134	---	0,04 x 0,96	3 x 78	---	0,02 x 0,98	1 x 56	---
Alelos									
C	0,82	226	---	0,79	128	---	0,86	98	---
G	0,18	50	---	0,21	34	---	0,14	16	---

N: número de indivíduos que realizaram a análise.

Teste Qui-quadrado $p > 0,05$.

Tabela 38: Avaliação do Efeito de Dominância e Recessividade do alelo de menor frequência do polimorfismo rs964184 do gene *ZNF259*

<i>ZNF259</i> C/G	MODELO DA DOMINÂNCIA						MODELO DA RECESSIVIDADE							
	CC		CG + GG		P	CG + CC			GG		p			
	n	Média	Dp	n	média	Dp	n	média	dp	n	média	dp		
Hb g/dL	88	9,63	1,70	45	9,11	1,79	0,126	130	9,47	1,73	4	8,70	1,92	0,388
HCM pg	88	28,93	3,89	45	29,89	4,09	0,170	130	29,15	3,99	4	31,32	3,42	0,275
VCM fL	88	87,00	10,53	45	89,58	11,78	0,216	130	87,58	11,00	4	94,58	9,69	0,143
HbF %	49	11,88	8,59	28	9,51	6,56	0,287	74	11,19	8,01	3	6,80	5,61	0,381
LG /mm ³	88	9221,84	4317,93	45	10467,15	3285,96	0,026*	130	9590,98	3403,11	4	12112,50	3079,87	0,111
Reticulócitos %	88	2,55	1,96	45	2,91	1,43	0,010*	130	2,66	1,81	4	3,20	1,24	0,226
Neutrófilos /mm ³	88	5073,07	2037,92	45	5445,40	1687,43	0,133	130	5209,36	1958,99	4	5519,88	844,58	0,539
Monócitos /mm ³	88	459,29	301,48	45	529,01	393,31	0,222	130	480,06	337,00	4	580,31	237,96	0,245
Plaquetas /mm ³	87	357533,38	158325,68	45	394401,11	148021,62	0,418	129	369119,15	155329,31	4	452937,50	169439,19	0,301
Ferro mcg/dL	71	84,22	34,29	42	91,09	34,99	0,189	110	88,08	35,60	4	77,71	46,69	0,890

Continuação da tabela 38: Avaliação do Efeito de Dominância e Recessividade do alelo de menor frequência do polimorfismo rs964184 do gene *ZNF259*.

<i>ZNF259</i> C/G	MODELO DA DOMINÂNCIA							MODELO DA RECESSIVIDADE						
	CC			CG + GG			P	CG + CC			GG			p
	n	Média	Dp	n	média	Dp		n	média	dp	n	média	dp	
Ferritina µg/L	71	162,96	155,94	44	362,06	1012,49	0,208	112	184,41	224,66	4	1752,55	3254,02	0,380
APOA1 mg/dL	45	107,51	16,08	28	108,14	15,03	0,868	70	107,67	15,67	3	109,67	16,26	0,830
APOB mg/dL	45	59,89	15,67	28	59,82	17,66	0,986	70	60,23	16,39	3	51,33	15,18	0,447
CT mg/dL	54	121,99	20,86	34	124,94	22,30	0,569	85	123,51	21,51	3	112,33	14,57	0,496
HDL mg/dL	54	39,35	6,71	33	39,42	8,00	0,739	84	39,50	7,26	3	36,00	3,61	0,414
Não-HDL mg/dL	46	82,17	21,86	29	86,92	21,18	0,381	72	84,33	21,77	3	76,33	17,79	0,769
TG mg/dL	54	81,85	27,11	34	93,29	44,37	0,375	85	86,89	35,07	3	68,67	34,59	0,264
BT mg/dL	37	1,71	1,03	19	2,36	1,18	0,037*	53	1,85	1,03	3	3,25	1,97	0,165
BD mg/dL	37	0,36	0,12	19	0,51	0,18	0,001*	53	0,40	0,15	3	0,64	0,22	0,011*
BI mg/dL	37	1,34	0,95	19	1,84	1,06	0,050	53	1,45	0,94	3	2,61	1,76	0,214
LDH U/L	34	400,97	163,40	19	496,05	234,24	0,089	50	431,48	193,67	3	494,67	254,29	0,591

n: Número de participantes; Dp: desvio padrão; Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; HbF: Hemoglobina fetal; Ret.: reticulócito; LG: leucometria global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL: Lipoproteína de alta densidade; NÃO-HDL: não Lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicerídeos. * = diferença significativa.

Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney.

Tabela 39: Efeito de dominância e recessividade do alelo de menor frequência do polimorfismo rs964184 do gene *ZNF259* sobre a concentração de lipoproteína de alta densidade em indivíduos com doença falciforme

Gene	HDL	Efeito de dominância		Total	RC	IC 95%	P
		Genótipos					
		CG + GG	CC				
<i>ZNF259</i> rs964184 (C/G)	>40mg/dL	10 (30,30%)	21 (38,89%)	31 (35,63%)	1,464	0,582-3,681	0,417
	<40mg/dL	23 (69,70%)	31 (61,11%)	56 (64,37%)			
Total		33 (100%)	54 (100%)	87 (100%)	---	---	
Gene	HDL	Efeito de recessividade		Total	RC	IC 95%	p
		Genótipos					
		GG	CG +CC				
<i>ZNF259</i> rs964184 (C/G)	>40mg/dL	0 (0%)	31 (36,90%)	31 (35,63%)	0,631	0,536-0,743	0,190
	<40mg/dL	3 (100%)	53 (63,10%)	56 (64,37%)			
Total		3 (100%)	84 (100%)	87 (100%)	---	---	

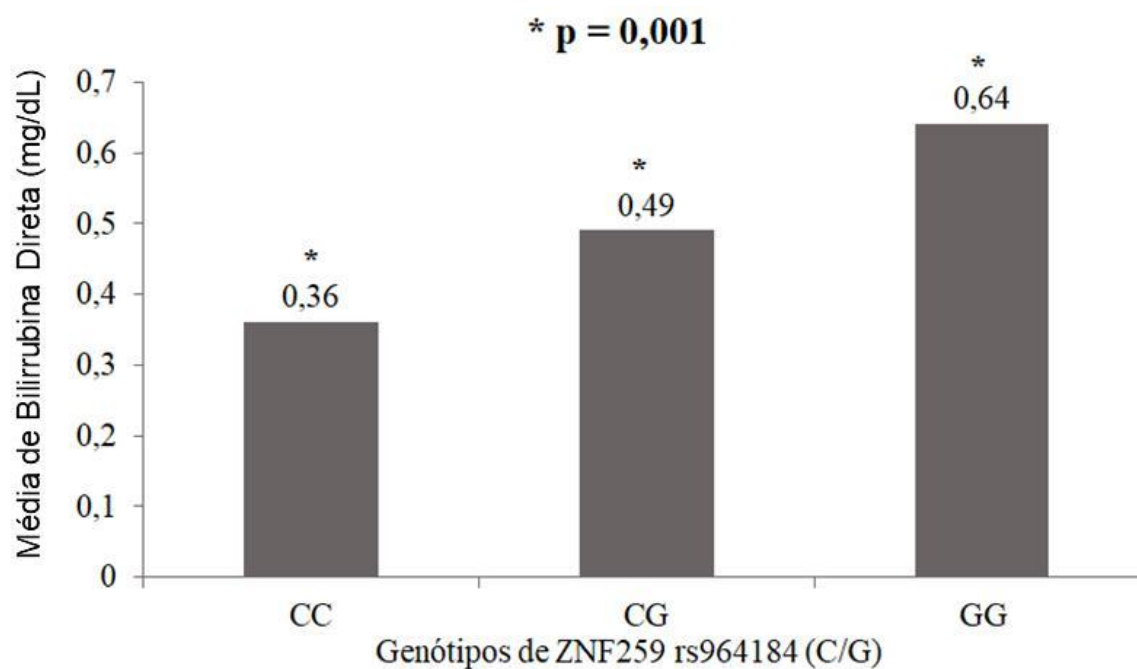
n: número de indivíduos que realizaram a análise; rs: referência de SNP; RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança.
Teste qui-quadrado.

Tabela 40: Avaliação da presença de doença hepato-biliar entre os indivíduos com DF que apresentaram o alelo G do polimorfismo do gene *ZNF259*

Genótipos do Gene <i>ZNF259</i> rs964184 (C/G)	Doença hepato-biliar		Total	RC	IC 95%	p
	Ausente	Presente				
CC	79 (95,18%)	4 (4,82 %)	83 (100 %)	---	---	
CG	36 (90,00%)	4 (10,00 %)	40 (100 %)	2,194	9,270	0,211
GG	3 (75,00 %)	1 (25,50 %)	4 (100 %)	6,583	0,553-78,305	
Total	118 (92,91 %)	9 (7,09 %)	127 (100 %)	---	---	---

RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança. Teste qui-quadrado.

Figure 19: Distribuição dos genótipos de rs964184 do gene *ZNF259* e níveis de Bilirrubina direta



Rs: Referência de SNP. * = Diferença significativa.
Teste ANOVA.

5.4.4 Gene *TNFA* rs1800629

Em 126 participantes da pesquisa foi realizada genotipagem do polimorfismo rs1800629 do gene *TNFA*. Os resultados das frequências genotípicas e alélicas encontram-se na Tabela 41. Os genótipos estavam em EHW ($p > 0,05$).

Foi realizada a análise descritiva dos parâmetros laboratoriais dos alelos do polimorfismo rs1800629 do gene *TNFA* bem como a verificação do efeito de dominância e recessividade do alelo A de menor frequência (Tabela 42). Para o modelo de dominância apresentaram distribuição normal: LG, Plaqueta, APOA1, BT, BD, LDH e distribuição não normal: Hb, HCM, VCM, HbF, reticulócitos, neutrófilos, monócitos, ferro, ferritina, APOB, CT, HDL, Não-HDL, TG e BI; para o efeito de recessividade, apresentaram distribuição normal: plaquetas e neutrófilos e distribuição não normal: Hb, HCM, VCM, HbF, LG, reticulócitos, monócitos, ferro, ferritina, APOA1, APOB, CT,

HDL, não-HDL e TG. Não foi possível realizar os testes para BT, BD, BI e LDH, pois não apresentarem nenhum paciente homocigoto para o alelo de menor frequência (AA).

Foi encontrada diferença significativa ($p = 0,027$) para BD quando se verificou o efeito de dominância do alelo A do polimorfismo rs1800629 do gene *TNFA*. A presença deste alelo foi associada a um valor médio de BD de 0,53mg/dL, ou seja, 26% maior que o genótipo GG.

A presença do alelo de menor frequência com relação aos valores de HDL ($>$ ou $<$ 40mg/dL) do gene *TNFA* foi realizada e os resultados encontram-se na Tabela 43. Não foram encontradas diferenças significativas entre o número de indivíduos que possuem o alelo de menor frequência e os que não o possuem ($p > 0,05$).

Não foi encontrada diferença entre o número de indivíduos que utilizam HU e não utilizam HU e presença do polimorfismo rs1800629 do gene *TNFA* ($p > 0,05$) (Tabela 44).

Também não foi encontrada diferença significativa entre o número de indivíduos que apresentavam doença hepato-biliar e presença do polimorfismo rs1800629 do gene *TNFA* ($p > 0,05$) (Tabela 45).

Tabela 41: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1800629, do gene *TNFA* na população de estudo

Genótipos do gene <i>TNFA</i> rs1800629 (G/A)	Doença Falciforme N = 126			Anemia Falciforme N = 74			Hemoglobinopatia SC N = 52		
	Frequência	N	P	Frequência	N	P	Frequência	N	P
GG	0,76	96		0,73	54		0,81	42	
GA	0,21	27	>0,05	0,23	17	>0,05	0,19	10	>0,05
AA	0,03	3		0,04	3		0	0	
GG x (GA+AA)	0,76 x 0,24	96 x 30	---	0,73 x 0,27	54 x 20	---	0,81 x 0,19	42 x 10	---
AA x (GA+GG)	0,03 x 0,97	123 x 3	---	0,04 x 0,96	3 x 71	---	0 x 1	0 x 52	---
Alelos									
G	0,87	219	---	0,84	125	---	0,90	94	---
A	0,13	33	---	0,16	23	---	0,10	10	---

N: número de indivíduos que realizaram a análise.

Teste Qui-quadrado $p > 0,05$.

Tabela 42: Avaliação do Efeito de Dominância e Recessividade do alelo de menor frequência do polimorfismo rs1800629 do gene *TNFA*

<i>TNFA</i> G/A	GENÓTIPOS NO MODELO DE DOMINÂNCIA							GENÓTIPOS NO MODELO DE RECESSIVIDADE						
	GG			AA + GA			p	GA + GG			AA			p
	n	Média	Dp	n	média	dp		N	média	dp	n	média	dp	
Hb g/dL	93	9,57	1,72	29	9,12	1,83	0,254	120	9,46	1,77	3	8,95	0,44	0,787
HCM pg	93	29,33	4,15	29	29,44	3,68	0,700	120	29,22	4,04	3	33,10	2,43	0,056
VCM fL	93	87,95	11,95	29	88,39	8,86	0,501	120	87,72	11,25	3	97,41	9,19	0,089
HbF %	52	10,79	8,59	18	12,63	6,92	0,206	67	11,06	8,27	3	15,91	4,30	0,155
LG /mm ³	93	9599,97	3141,91	29	10155,91	4363,69	0,452	120	9687,32	3408,34	3	12524,42	5057,84	0,290
Reticulócitos %	93	2,59	1,75	29	2,97	2,03	0,454	120	2,60	1,70	3	6,00	3,26	0,052
Neutrófilos /mm ³	93	5265,07	1929,98	29	5215,41	2061,01	0,616	120	5283,89	1969,98	3	4884,75	1723,93	0,729
Monócitos /mm ³	93	479,76	351,61	29	498,23	284,33	0,419	120	477,36	332,72	3	763,28	341,13	0,092
Plaquetas /mm ³	93	368909,91	154092,19	29	366347,69	147129,96	0,937	120	367685,04	152694,12	3	461722,20	127607,73	0,293
Ferro mcg/dL	80	87,49	35,70	25	78,00	24,48	0,404	104	86,52	35,25	2	72,55	3,46	0,561

Continuação da tabela 42: Avaliação do Efeito de Dominância e Recessividade do alelo de menor frequência do polimorfismo rs1800629 do gene *TNFA*.

<i>TNFA</i> G/A	MODELO DE DOMINÂNCIA							MODELO DE RECESSIVIDADE						
	GG			AA + GA			p	GA + GG			AA			p
	n	Média	Dp	n	média	dp		N	média	dp	n	média	dp	
Ferritina µg/L	79	238,70	742,03	27	169,18	168,98	0,879	104	217,35	649,30	3	328,17	406,04	0,742
APOA1 mg/dL	59	108,20	14,85	12	102,92	15,06	0,266	70	107,66	14,73	1	83,00	---	0,113
APOB mg/dL	59	60,47	15,60	12	54,17	19,42	0,080	70	59,37	16,45	1	62,00	---	0,761
CT mg/dL	68	123,47	20,86	15	117,87	23,57	0,210	80	122,65	21,63	3	117,47	11,58	0,881
HDL mg/dL	68	39,26	7,08	15	39,67	7,58	0,845	80	39,30	7,01	3	40,33	11,85	0,756
Não-HDL mg/dL	60	84,57	20,24	12	78,08	28,02	0,089	71	83,63	21,75	1	73,00	---	0,722
TG mg/dL	68	88,12	37,89	15	76,33	24,16	0,216	80	86,68	36,42	3	67,67	10,12	0,365
BT mg/dL	47	1,81	1,01	8	2,49	1,56	0,116	55	1,91	1,12	0	---	---	---
BD mg/dL	47	0,39	0,13	8	0,53	0,27	0,027*	55	0,41	0,16	0	---	---	---
BI mg/dL	47	1,42	0,93	8	1,96	1,38	0,328	55	1,50	1,01	0	---	---	---
LDH U/L	45	416,89	183,34	7	519,43	252,89	0,197	52	430,69	194,35	0	---	---	---

n: Número de participantes; Dp: desvio padrão; Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; HbF: Hemoglobina fetal; Ret.: reticulócito; LG: leucometria global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL-c: Colesterol HDL; CNHDL: Colesterol Não-HDL; TG: Triglicerídeos. * = diferença significativa.
Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney.

Tabela 43: Efeito de dominância e da recessividade do alelo de menor frequência do polimorfismo rs1800629 do gene *TNFA* sobre a concentração de lipoproteína de alta densidade em indivíduos com doença falciforme

Gene	HDL	Genótipos no modelo de dominância		RC	IC 95%	P
		GA + AA	GG			
<i>TNFA</i> rs1800629 (G/A)	>40mg/dL	6 (40,00%)	23 (33,82%)	0,767	0,243-2,418	0,650
	<40mg/dL	9 (60,00%)	45 (66,18%)			
Total		15 (100%)	68 (100%)	---	---	

Gene	HDL	Genótipos no modelo de recessividade		RC	IC 95%	P
		AA	GA + GG			
<i>TNFA</i> rs1800629 (G/A)	>40mg/dL	1 (33,33%)	28 (35,00%)	1,077	0,093-12,405	0,953
	<40mg/dL	2 (66,67%)	52 (65,00%)			
Total		3 (100%)	80 (100%)	---	---	

n: número de indivíduos que realizaram a análise; rs: referência de SNP; RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança.
Teste qui-quadrado.

Tabela 44: Avaliação da distribuição dos genótipos do gene *TNFA* rs1800629 no modelo de dominância em relação ao uso da terapia com hidroxiuréia entre os indivíduos com doença falciforme

Terapia com HU	Genótipos Modelo de dominância			RC	IC 95%	p
	GG	AA + AG	Total			
Sim	36 (37,50%)	9 (30,00%)	45 (35,71%)	1,40	0,579-3,387	0,454
Não	60 (62,50%)	21 (70,00%)	81 (64,29%)			
Total	96 (100%)	30 (100%)	126 (100%)	---	---	

RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança.
Teste qui-quadrado.

Tabela 45: Avaliação da distribuição dos genótipos do gene *TNFA* rs1800629 no modelo de dominância em relação ao acometimento de doença hepatobiliar entre os indivíduos com DF

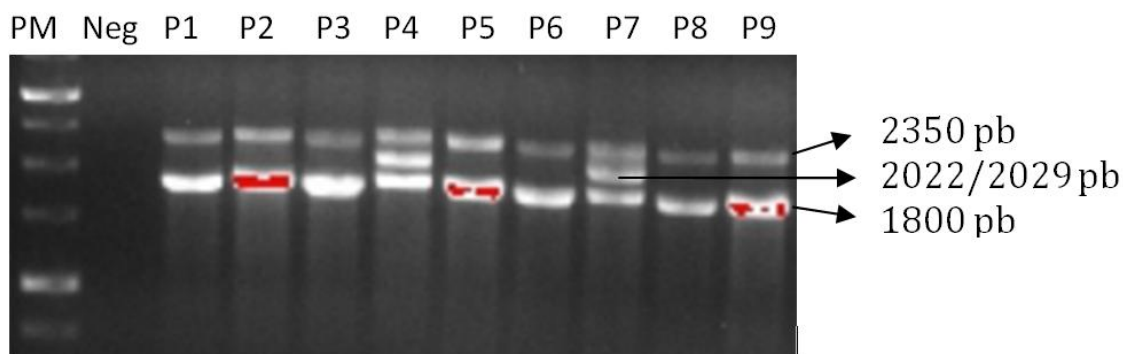
Doença hepato-biliar	Genótipos Modelo de dominância		Total	RC	IC 95%	p
	GG	AA + AG				
Ausente	86 (93,48%)	24 (88,89%)	110 (92,44%)	1,792	0,417-7,699	0,428
Presente	6 (6,52%)	3 (11,11%)	9 (7,56%)			
Total	92 (100%)	27 (%)	119 (100%)	---	---	

RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança.
Teste qui-quadrado.

5.5 CO-HERANÇA DE ALFA TALASSEMIA

Foi realizada genotipagens de alfa-tal para as variantes $\alpha^{-3,7}$ Kb e $\alpha^{-4,2}$ Kb em 138 pacientes com DF participantes do estudo. Foram encontrados 32 indivíduos (23,19%) que portavam ao menos uma deleção $\alpha^{-3,7}$ Kb. Nenhum dos participantes do estudo portava a deleção $\alpha^{-4,2}$ Kb. A partir do teste do qui-quadrado não foi encontrada diferença significativa entre os grupos HbSS e HbSC e o número de deleções de alfa-tal. A figura 20 mostra a revelação do resultado de um exame de alfa-tal realizado nos pacientes, como exemplo de resultados. Os valores das frequências de alfa-tal em cada grupo estão descritos na Tabela 46.

Figure 20: Fotografia do gel de agarose da genotipagem de alfa-tal em indivíduos com doença falciforme



Fotografia do gel de agarose a 1% visualizado sob luz ultravioleta após corrida eletroforética dos amplicons da PCR de genotipagem de alfa-tal. As canaletas e as bandas do gel indicam: PM: padrão de

peso molecular; Neg: controle negativo; P: paciente; P1, P2, P3, P5, P6, P8 e P9: sem deleção do gene *HBA* (genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$); P4 e P7: uma deleção do gene *HBA* (genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$). O fragmento de 2350 pb corresponde ao gene LIS, controle positivo interno da reação; O fragmento de 2022/2029 pb do gene *HBA* com deleção de 3.7 Kb; O fragmento de 1800 pb indica o gene *HBA* (alfa 2) sem deleção.

Tabela 46: Distribuição de Alfa-talassemia (alelo $\alpha^{-3.7}$ Kb) na população estudada

Alfa-talassemia							
	Uma deleção	Duas deleções	Frequência de alfa-tal	Sem deleção	RC	IC 95%	p
HbSS	21 (70%)	1 (50%)	0,27	59 (55,7%)	0,598	0,257-1,392	0,359
HbSC	9 (30%)	1 (50%)	0,18	47 (44,3%)			
DF	30 (100%)	2 (100%)	0,23	106 (100%)	---	---	

DF: doença falciforme; HbSS: anemia falciforme; HbSC: hemoglobinopatia SC; RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança.

Teste do qui-quadrado.

Apresentaram distribuição normal: APOA1, BD e LG e os demais parâmetros apresentaram distribuição não normal. Foi encontrada diferença significativa, com redução dos valores de HCM ($p = 0,003$) e VCM ($p = 0,005$) para quem possuía alguma deleção $\alpha^{-3.7}$ Kb do gene *HBA* (Tabela 47).

A presença de deleção (ões) do gene *HBA* com relação aos valores de HDL ($>$ ou <40 mg/dl) foi analisada e os resultados encontram-se na Tabela 48. Não foi encontrada diferença significativa entre o número de indivíduos com DF que apresentam alfa-tal e os que não a possuem ($p > 0,05$).

Foi realizada a análise de verificação se indivíduos que possuíam alguma deleção de gene *HBA* possuía menor chance de desenvolver doença hepato-biliar, entretanto, pelo teste do qui-quadrado não foi encontrada diferença ($p > 0,05$).

Tabela 47: Comparação dos perfis bioquímico e hematológico de pacientes com DF e co-existência de alfa-talassemia

	Sem alfa-Tal			Com Alfa-Tal			p
	N	Média	Dp	n	média	Dp	
Hb g/dL	103	9,57	1,75	30	9,08	1,68	0,196
HCM pg	103	29,83	4,00	30	27,25	3,10	0,003*
VCM fL	103	89,43	11,43	30	82,54	7,23	0,005*
HbF %	67	10,88	8,35	10	11,83	4,66	0,253
LG /mm ³	103	9670,61	3341,46	30	9548,99	3706,50	0,864
Reticulócitos %	103	2,71	1,90	30	2,56	1,40	0,919
Neutrófilos /mm ³	103	5220,62	1968,12	30	5124,96	1814,01	0,821
Monócitos /mm ³	103	476,23	287,28	30	505,70	470,50	0,353
Plaquetas /mm ³	102	366874,54	154759,62	30	381074,98	159358,15	0,684
Ferro mcg/dL	88	85,40	33,85	25	91,61	37,21	0,557
Ferritina µg/L	90	231,79	699,31	25	265,54	371,59	0,136
APOA1 mg/dL	57	107,91	16,55	16	107,19	11,94	0,871
APOB mg/dL	57	59,58	16,07	16	60,89	17,76	0,779
CT mg/dL	69	123,78	21,60	19	120,75	20,81	0,500
HDL mg/dL	58	83,69	21,54	17	85,10	22,33	0,899
Não-HDL mg/dL	69	88,01	37,20	19	79,95	25,38	0,441
TG mg/dL	58	14,71	7,32	15	14,07	7,53	0,753
BT mg/dL	47	0,41	0,17	9	0,43	0,11	0,542
BD mg/dL	47	1,43	0,94	9	1,86	1,33	0,337
BI mg/dL	45	437,01	202,22	8	424,00	151,37	0,913

n: Número de participantes; Dp: desvio padrão; Hb: hemoglobina; HCM: hemoglobina corpuscular média; VCM: volume corpuscular médio; HbF: Hemoglobina fetal; Ret.: reticulócito; LG: leucometria global; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; LDH: Lactato desidrogenase; APOA1: Apolipoproteína A1; APOB: Apolipoproteína B; CT: Colesterol total; HDL: Lipoproteína de alta densidade; Não-HDL: não Lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicerídeos. * = diferença significativa. Teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney.

Tabela 48: Efeito da co-herança da deleção do gene *HBA* sobre a concentração de lipoproteína de alta densidade em indivíduos com doença falciforme

	HDL	Alfa-tal	Sem alfa-tal	Total	RC	IC 95%	p
<i>HBA</i>	>40mg/dL	5 (26,32%)	26 (38,24%)	31 (31,63%)	1,733	0,559- 5,378	0,337
α - 3,7Kb	<40mg/dL	14 (73,68%)	42 (61,76%)	56 (64,37%)			
Total		19 (100%)	68 (100%)	87 (100%)	---	---	

HDL: lipoproteína de alta densidade; RC: razão de chance; IC: intervalo de confiança. Teste qui-quadrado.

6. DISCUSSÃO

6.1 PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DOS INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME

No estudo foi possível comparar os dados laboratoriais dos grupos HbSS e HbSC dos pacientes com DF e verificar que, em geral, os valores hematológicos e bioquímicos dos indivíduos HbSS mostraram pior perfil de marcadores de anemia hemolítica (nível de Hb menor) e de indicadores indiretos de hemólise (reticulócitos, LDH e bilirrubinas). Achados semelhantes têm sido relatados na literatura recente (DUBERT et al., 2017; RICHARD; BILLET, 2002). Dados comparativos compilados de vários estudos indicaram maior gravidade clínica da AF em relação a hemoglobinopatia SC (NAGEL; FABRY; STEINBERG, 2003; QUINN, 2016).

As médias de Hb e VCM dos pacientes HbSS e HbSC estavam dentro dos intervalos dos valores relatados por Quinn (2016) e Habara e Steinberg (2016). Da mesma forma as médias de Hb, VCM, LG e plaquetas de pessoas com genótipo HbSS também estavam próximas às descritas no grupo de pacientes estudadas por Teixeira et al. (2017) com de idade entre 6 e 18 anos e em estado clínico estacionário. Dubert et al. (2017) encontraram valores menores de Hb para HbSS (7,9 g/dL) e maiores para HbSC (11,2 g/dL), maiores valores de LDH tanto para HbSS (822 UI/L) quanto para HbSC (391 UI/L) e com diferenças significativas, resultados diferentes dos encontrados no presente estudo. Semelhante aos nossos resultados, estes autores também encontraram diferença significativa entre os valores de reticulócitos, LG, plaquetas e BT, com maiores médias para HbSS em comparação a indivíduos com HbSC.

A média de contagem de reticulócitos da população HbSS (3,44%) apresentou valor superior ao valor normal de referência. Para o grupo HbSC (1,46%) os valores médios estavam dentro da normalidade. Novamente se observa outro parâmetro de gravidade de anemia que distingue as duas formas da DF. Entretanto, a média da contagem de reticulócitos nos pacientes HbSS e HbSC foram inferiores aos valores indicados nas revisões de Quinn (2016) (HbSS: 10-25%; HbSC: 5-10%) e Habara e

Steinberg (2016) (HbSS: 8%; HbSC: 3%). Além disso, os valores de reticulócitos da população HbSS também estavam valores abaixo dos encontrados por Teixeira et al. (2017) (7,4%), que estudaram pacientes brasileiros com idade de 6 a 18 anos com diagnóstico HbSS, sendo 50% em uso de HU e Seixas et al. (2010) (7,61%) que avaliaram crianças HbSS, HbSC e HbSD, sem descrição do uso da terapia de HU. As diferenças encontradas poderiam estar relacionadas a vários fatores tais como: terapia de HU, idade, condições nutricionais e variantes genéticas que podem influenciar nos parâmetros hematológicos e conseqüentemente na gravidade clínica, como os haplótipos do gene *HBB* (SEN, BENIM, CAR), e a co-herança de alfa-tal. A contagem de reticulócitos está correlacionada com hemólise intra e extra vascular, mas reflete principalmente a resposta da medula óssea (DUBERT et al., 2017). A alta contagem de reticulócitos apresenta-se significativamente associada ao risco de AVC (BELISÁRIO et al., 2016a; SILVA; GIOVANI; VIANA, 2011). A cada um por cento a mais na contagem de reticulócitos, o risco médio de isquemia cerebral aguda aumenta em torno de 1,3% e o alto risco no DTC aumenta aproximadamente 1,5% em indivíduos com AF (BELISÁRIO et al., 2016a).

Dois parâmetros indicadores de hemólise que mostraram diferença significativa entre os pacientes dos grupos HbSS e HbSC foi o da enzima LDH e os níveis de BT. A média de BT com níveis acima de 2 mg/mL nos indivíduos com AF caracterizou a hiperbilirrubinemia (CHAOUCH et al., 2013) que pode acarretar doença hepato-biliar (CHAAR et al., 2005).

Semelhante a outros estudos, os pacientes HbSC apresentaram menor contagem de LG e das classes de leucócitos, menores valores de média de HCM, VCM, bilirrubinas e LDH em comparação com o grupo HbSS, dados esses concordantes com o trabalho realizado por Aleluia et al. (2017a) e Colella et al. (2015). Contagem elevada de leucócitos, também foi associada com um risco aumentado de AVC em indivíduos com AF (BELISÁRIO et al., 2016a). Belisário et al. (2016a) verificaram que o aumento de mil leucócitos por milímetro cúbico representou um aumento de um terço no risco de isquemia cerebral aguda em indivíduos com DF.

Nos pacientes com hemoglobinopatia SC foram encontrados menores valores médios de ferro e ferritina. Os dados indicam que o grau de anemia hemolítica é mais acentuado em indivíduos com AF como já observado em vários estudos e nos nossos

dados citados anteriormente, levando a pior prognóstico da doença. Os valores de ferritina apresentaram-se muito variáveis. Além de ser a principal proteína de armazenamento de ferro nos tecidos, a ferritina também é uma proteína de fase aguda, que se eleva quando o indivíduo é exposto à inflamação crônica, infecção e distúrbios hepáticos associados à DF (AKINSEGUN et al., 2013; BURHMAN et al., 1978).

Os pacientes HbSS também apresentaram maior contagem de plaquetas em relação aos HbSC. As plaquetas também são responsáveis por induzir inflamação e durante eventos vaso-oclusivos na DF é encontrado aumento na ativação plaquetária (ALELUIA et al., 2017a; WUN et al., 1997).

Os valores médios de HbF da população deste estudo (HbSS: 13,41%; HbSC: 5,47%) foram superiores aos encontrados por Habara e Steinberg (2016) (HbSS: 5%; HbSC: 2%) e Dubert et al. (2017) (HbSS: 8,3%; HSC: 1%) mas mantiveram a proporção maior em indivíduos HbSS. A HU é um medicamento que tem como principal ação a elevação da expressão de gama-globina (SUMMARELL; SHEEHAN, 2016). Os valores de HbF mais elevados em ambos os grupos de pacientes poderiam ser justificados pelo uso da HU em mais de 50% dos indivíduos HbSS e em apenas 9% de pacientes HbSC.

Estudo publicado por Rezende et al. (2017) com uma coorte de indivíduos SC com mediana de idade de 9,2 anos relataram valores de Hb (10,5 g/dL), VCM (75,8 fL; p75 de 80,1 fL), HCM (média 24,9 pg; p75 de 26,5 pg) e HbF (4,9%; p75 de 6%) próximos ou dentro dos valores de p75; mas contagem de reticulócitos (3,4 %), de LG (11236/mm³) e de plaquetas (337098/mm³) superiores se comparados aos indivíduos deste estudo.

6.2 CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Quando se analisa indivíduos com DF, esperam-se correlações positivas entre os índices preditores de maior gravidade que indicam maiores níveis de hemólise / inflamação / vaso-oclusão, conhecidos subfenótipos da doença. No nosso estudo o valor

de VCM teve correlação positiva com reticulócitos, LG, neutrófilos, monócitos, plaquetas, ferritina e ferro. Do mesmo modo, as correlações positivas de LG com bilirrubinas e de reticulócitos com plaquetas e ferro, neutrófilos com BT e BI, monócitos e plaquetas com ferro e ferritina, HCM com HbF, reticulócitos, neutrófilos, monócitos, plaquetas, ferro e ferritina, são esperadas e explicam a fisiopatologia dos subfenótipos da DF (ALEXY et al., 2010; ROBERTS-HAREWOOD, 2009).

A LDH é um biomarcador clássico de hemólise intravascular (LAND et al., 2013) e é considerada marcador diagnóstico e prognóstico de complicações agudas e crônicas na DF (ALELUIA et al., 2017b; STOJANOVIC; LIONNET, 2016). Neste estudo, foi observado que a LDH se correlacionou positivamente com outros biomarcadores clássicos de hemólise, como monócitos (DF), HCM (DF), VCM (DF), bilirrubinas (DF e HbSS), e negativamente com Hb (DF e HbSS), semelhante aos achados de Aleluia et al. (2017b). O aumento de monócitos pode estar associado com a hemólise devido ao aumento da atividade fagocítica e remoção do excesso de hemácias lisadas do sangue periférico (ALELUIA et al., 2017b). O valor normal de Bilirrubina indireta ou não conjugada é: 0,6- 0,9 mg/dL e nossos pacientes estavam com média de 1,14 em HbSC e 1,72 em HbSS. Além disso a correlação intermediária positiva entre BI e LDH ($p = 0,001$), em HbSS mas, não em HbSC, indica a hemólise crônica e permanente da AF (TAYLOR et al., 2008). A LDH também se correlacionou positivamente com reticulócitos (DF e HbSS), plaquetas (DF), LG (DF e HbSC), neutrófilos (DF) e se correlacionou negativamente com HbF (HbSS). A correlação com reticulócitos também é esperada, visto que o aumento destas células está relacionado a maior grau de hemólise (BENDER, 2017; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; QUINN, 2016). A hemólise intravascular está associada com ativação plaquetária (STOJANOVIC; LIONNET, 2016), de modo que se torna justificável a correlação positiva entre LDH e plaquetas. O aumento de LG e neutrófilos são mais observados em eventos vaso-oclusivos e também infecções, que podem ser desencadeados pela hemólise (SWITZER et al., 2006). A correlação negativa de LDH com HbF pode ser justificada porque maiores níveis de HbF reduzem a polimerização da HbS, reduzindo a hemólise (AKINSHEYE et al., 2011; HIGGS; WOOD, 2008).

Sobre os dados hematológicos nos grupos de indivíduos com DF, e isolados em grupos HbSS e HbSC, as correlações negativas entre os níveis de Hb e o percentual de reticulócitos e LG confirmam que, quando a Hb está mais baixa, num quadro de anemia

e resposta inflamatória, ocorre maior atividade proliferativa compensatória da medula óssea, com aumento dos reticulócitos (DUBERT et al., 2017; MANKELOW et al., 2016).

Também as correlações positivas entre: HCM e VCM nos grupos de pacientes com DF e nos subgrupos de HbSS e HbSC, que pode ser explicada pelo fato de pacientes com DF geralmente apresentarem anemia normocítica e normocrômica (BENDER, 2017), de maneira que esses índices hematimétricos estão sempre correlacionados positivamente.

Além disso, na DF e nos subgrupos de HbSS e HbSC, a correlação positiva entre contagem de LG com neutrófilos e monócitos, indicam presença de inflamação característica de indivíduos com DF (ZHANG et al., 2016). A correlação positiva entre LG e plaquetas implica em maior inflamação / vaso oclusão (SWITZER, 2006), pois as plaquetas também podem desencadear inflamação e se ligar a eritrócitos, monócitos e neutrófilos para formar agregados (ZHANG et al., 2016).

O percentual de reticulócitos e a quantidade de monócitos correlacionados positivamente em nosso estudo (DF, HbSS e HbSC), implica, possivelmente, em um quadro de maior inflamação e hemólise. Os monócitos, na DF estão anormalmente ativados e promovem a inflamação (ZHANG et al., 2016), além disso, os monócitos também estão elevados na DF em decorrência da hemólise, visto que há o aumento da atividade fagocítica para remoção do excesso de hemácias lisadas do sangue periférico (ALELUIA et al., 2017b). Os reticulócitos apresentam mais moléculas de adesão, tornando-os protagonistas do processo de vaso-occlusão (SANKARAN, et al., 2010), aliás, os reticulócitos estão ligados a hemólise intra e extra vascular (DUBERT et al., 2017).

Entre as correlações negativas nos indivíduos com DF destacam-se o nível de Hb com o número de plaquetas e com níveis de bilirrubinas. A hemólise intravascular está associada com vasoconstrição, ativação de plaquetas, dano endotelial e complicação vascular (STOJANOVIC; LIONNET, 2016). De modo que a redução da Hb devido à hemólise intravascular gera maiores níveis de plaquetas. A redução de Hb e o aumento de bilirrubinas estão associados ao subfenótipo hiper-hemólise e disfunção endotelial (DUBERT et al., 2016).

Os grupos DF e HbSS apresentaram em comum as correlações negativas entre: Hb com neutrófilos, monócitos e LDH. Essas correlações indicam que havia anemia mais grave pela redução de Hb, logo há mais marcadores de inflamação (neutrófilos e monócitos) e de hemólise (LDH). Esses mesmos grupos apresentaram correlações positivas de reticulócitos com LG, bilirrubinas e LDH, monócitos com bilirrubinas e LDH, e de LDH com BD e, BI. Estes parâmetros que indicam quadro de hemólise / vasooclusão / inflamação tiveram suas correlações significativas somente em HbSS. Provavelmente, os parâmetros hematológicos e bioquímicos implicados nos subfenótipos da doença, nos indivíduos HbSC por apresentarem menor gravidade clínica, não alcançaram significância para estas correlações.

Correlações positivas foram encontradas nos grupos DF, HbSS e HbSC da ferritina com monócitos e plaquetas, que são conhecidos marcadores de inflamação (KUTLAR, 2005; ZAGO; PINTO, 2007). Também foi encontrado que a ferritina tinha correlação positiva esperada com ferro, mas também com reticulócitos, HCM e VCM. As avaliações de VCM, HCM e CHCM podem estar anormais em pacientes com DF devido à inflamação crônica e hemólise associada à doença, mesmo quando estes indivíduos estão em fase clínica estacionária e sem perturbação do *status* do ferro (AKINSEGUN et al., 2013; BURHMAN et al., 1978).

Entre a Hb e ferritina foi observada correlação negativa, no grupo DF, diferente do achado de Al-Saqladi, Bin-Gadeem e Brabin, (2012) que encontraram correlação positiva entre estes parâmetros. Entretanto, esses pesquisadores estudaram apenas pacientes com AF e incluíram no estudo mais de 30% de indivíduos com complicações em crise aguda e também àqueles que receberam transfusão. Em nosso estudo trabalhamos com dados colhidos de prontuário nos últimos três meses dos indivíduos HbSS e HbSC em estado estacionário da doença. Geralmente, mesmo em estado estacionário, as concentrações de ferritina podem estar elevadas na maioria das pessoas com DF, independente se elas receberam nenhuma ou única transfusão esporádica (AL-SAQLADI; BIN-GADEEM; BRABIN, 2012). De modo que a elevação da ferritina, em DF, pode ocorrer pela presença de ferro aumentado nas células reticuloendoteliais, devido à degradação excessiva de Hb, que leva ao aumento da síntese e secreção de ferritina (PAKBAZ et al., 2007). Entretanto, somente esse mecanismo não pode explicar a elevação de ferritina em indivíduos com DF (HUSSAIN et al., 1978). Portanto, vários

fatores diferentes podem levar ao aumento da ferritina, como crises falciformes (AL-SAQLADI; BIN-GADEEM; BRABIN, 2012), doença hepática, infecção crônica ou as inflamações (AL-SAQLADI; BIN-GADEEM; BRABIN, 2012) e transfusões (PAKBAZ et al., 2007). Deste modo, a correlação da ferritina com a Hb pode estar positiva ou negativa, dependendo da situação que os pacientes apresentam no momento da dosagem.

6.3 ANÁLISES DO PERFIL LIPÍDICO

A dislipidemia caracterizada pela hipocolesterolemia e hipertrigliceridemia é um achado recorrente em indivíduos com DF. Baixos níveis de colesterol estariam associados à gravidade da anemia hemolítica na DF (EPHRAIM et al., 2016; SEIXAS, 2010; ZORCA et al., 2010). Além disso, hipertrigliceridemia foi associada com hemólise, disfunção vascular e prevalência maior de HP em indivíduos com DF (ZORCA et al., 2010).

A análise do perfil lipídico dos pacientes dos grupos HbSS e HbSC em relação ao grupo controle sem DF revelou níveis significativamente mais baixos de CT e HDL ($p < 0,001$), indicando que há um quadro de hipocolesterolemia na nossa população com DF. Resultados similares foram relatados por Akinlade et al. (2014), Ephraim et al. (2016), Shores et al. (2003), Teixeira et al. (2017) e Zorca et al. (2010). Em indivíduos HbSS, Alassane et al. (2014), Emokpae et al. (2010), Essohana et al. (2016), Monnet et al. (1996), Ozturk et al. (2013), Rahimi et al. (2006) e Sasaki et al. (1983) também confirmaram menores valores de CT e HDL. Adegoke et al. (2016) investigando indivíduos HbSS confirmaram menores valores de CT, mas não de HDL, resultado semelhante ao encontrado por Ataga et al. (2015) para indivíduos com DF.

Aleluia et al. (2017a) encontraram diferença entre os valores de CT entre os grupos HbSS e HbSC, (HbSS: 122 mg/dL; HbSC: 133,5 mg/dL; $p = 0,012$) e de HDL (HbSS: 32 mg/dL; HbSC: 37 mg/dL; $p < 0,001$) diferente dos nossos resultados em que esta diferença não foi significativa.

Uma explicação para o desequilíbrio de lipídios no plasma de indivíduos com DF foi sugerida há muitos anos por Akinyanju e Akinyanju (1976) que apontaram distúrbio no equilíbrio do colesterol de membrana das hemácias, uma vez que, encontraram uma correlação inversa entre o percentual de colesterol plasmático e de membrana. Como hemácias não sintetizam colesterol é provável que ocorra uma redução na remoção de colesterol de membrana ou na troca com lipoproteínas plasmáticas (NIESOR et al., 2015) em função das alterações provocadas na membrana pela desoxigenação dos glóbulos vermelhos (KAVECANSKY et al., 1995). Segundo Daak et al. (2011), a hipocolesterolemia observada nos pacientes com DF pode ser um reflexo do aumento da absorção do colesterol por membranas de hemácias e transferência reduzida do colesterol para o HDL circulante.

A HDL, além de sua função de transporte reverso do colesterol, também possui ações antioxidante e anti-inflamatória e é considerada, portanto, um biomarcador independente de inflamação, da ativação endotelial e do estresse oxidativo, processos importantes no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose (WAN et al., 2015). Desta forma, a redução de HDL observada em indivíduos com DF seria reflexo secundário de processos hemolíticos / inflamatórios agravando os fenótipos da DF e sendo consequente fator de risco para aterosclerose. Por outro lado, a diminuição dos níveis de HDL também pode colaborar com aumento de eventos inflamatórios e oxidativos (HELKIN et al., 2016) agravando a doença. Aleluia et al (2017a) mostraram que indivíduos com DF diminuíram os níveis plasmáticos de lipídios durante o estresse hemolítico quando comparados com indivíduos controle.

Zorca et al. (2010) avaliando uma população de até 18 anos de idade, com diferentes genótipos de DF, também encontraram correlações negativas entre CT e BT e HDL e reticulócitos encontrado como neste presente estudo no grupo de indivíduos HbSS. Essas correlações indicam que o aumento do colesterol está associado a uma anemia menos grave (ZORCA et al., 2010). No entanto, algumas correlações encontradas nos parâmetros avaliados por aqueles pesquisadores não foram coincidentes com os nossos achados (positivas: CT com Hb, HDL com Hb, TG com LG; negativas: CT com reticulócitos, HDL com BT e LG, TG e Hb), embora, assim como neste estudo, eles não encontraram correlações entre CT com LG, TG com reticulócitos e BT.

Emokpae e Kulia-Gwarzo (2011) estudaram pacientes com DF em estado clínico estacionário da doença, e assim como neste estudo, não encontraram correlações de HDL com Hb, LG, plaquetas, VCM, HCM e neutrófilos. Entretanto, diferente dos nossos achados, estes autores não encontraram correlação entre HDL e CT ($r = 0,079$; $p = 0,06$) e HDL e TG ($r = 0,078$; $p = 0,06$). Estas variações devem refletir o perfil diferente das populações em relação à etnicidade, influências de fatores genéticos e regime alimentar e terapêutico.

Considerando que as alterações nos níveis de lipídios não são causais, mas refletem o quadro geral da AF, correlações negativas de CT com BT, BI e monócitos, de HDL com não-HDL e reticulócitos nos indivíduos HbSS, sugerem que o aumento do colesterol (total e HDL) poderia ser consequência dos baixos níveis de marcadores de hemólise (reticulócitos, BT e BI) e de inflamação (monócitos). Sendo causa ou agravante da doença, os resultados indicam a HDL como um importante marcador da gravidade da doença (ZORCA et al, 2010).

Maior proporção de indivíduos HbSS (69%) apresentavam HDL inferior a 40 mg/d se comparados aos grupos HbSC (56%) e controle (20%). Valores mais baixos de HDL poderiam ser um fator de risco que contribuiria para acentuar a gravidade da AF e risco de aterosclerose em relação à HbSC. Emokpae e Kulia-Gwarzo (2014) encontraram em seus estudos, envolvendo indivíduos com DF, mais de 70% deles classificados como graves com HDL inferior a 40 mg/dL. Por outro lado, no grupo classificado como moderado-leve em torno de 60% dos indivíduos apresentaram HDL dentro do valor da normalidade.

Shores et al. (2003) relataram menor risco de hemólise e anemia naqueles pacientes que possuíam maiores valores de HDL seguindo um raciocínio de causa. No entanto, embora a equipe de Ataga et al (2015) tenha também encontrado níveis menores de CT e sem diferença nos níveis de HDL em pacientes com DF, quando estes foram agrupados de acordo com a gravidade da doença (SS/S β^0 talassemia *versus* SC/S β^+ talassemia), não detectaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de CT, HDL ou pro-HDL.

Nosso estudo mostrou maiores níveis de Hb nos grupos de DF ($p = 0,041$) e HbSC ($p = 0,049$) quando os indivíduos possuíam HDL > 40 mg/dL mas não nos

pacientes com AF. Diferindo dos estudos de Aleluia et al. (2017b), Emokpae e Kulia-Gwarzo (2014) e Seixas et al. (2010) que verificaram que havia maior conteúdo de Hb em indivíduos com AF quando a HDL era superior a 40mg/dL. Nossos resultados também não mostraram correlação com os níveis de HbF em nenhum dos grupos de DF em relação aos níveis de HDL, diferentemente de Aleluia et al. (2017b) que relataram aumento de HbF nos pacientes com AF ($p = 0,005$) quando o HDL era superior a 40mg/dL.

No presente estudo, no grupo DF, foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de HDL superiores a 40 mg/dL com redução de reticulócitos ($p = 0,018$), assim como no estudo de Seixas et al. (2010). Sugere-se que há melhor prognóstico para indivíduos que apresentam maiores níveis de HDL e, que, a gravidade dos subfenótipos da DF poderia ser predita por menores níveis de HDL e CT.

Nossos resultados diferiram dos estudos de Seixas et al. (2010) e de Emokpae e Kulia-Gwarzo (2014) que encontraram reduções significativas, para LG ($p = 0,001$; $p = 0,02$, respectivamente) e plaquetas ($p = 0,015$; $p < 0,001$, respectivamente) quando a concentração de HDL era superior a 40 mg/dL. Os achados da literatura em relação às associações de HDL com parâmetros laboratoriais são contraditórios, uma vez que Seixas et al. (2010) encontraram redução de neutrófilos ($p = 0,002$) quando o HDL era superior a 40 mg/dL, enquanto Emokpae e Kulia-Gwarzo (2014) encontraram aumento destas células. A equipe de Seixas et al. (2010) diferente dos nossos achados, em que não houve diferença significativa, encontrou, redução dos valores de VCM ($p = 0,003$), HCM ($p = 0,001$), monócitos ($p = 0,004$), BT ($p < 0,001$), BD ($p < 0,001$), BI ($p = 0,002$), ferro ($p = 0,029$) e LDH ($p < 0,001$) quando HDL era superior a 40 mg/dL. E segundo Zorca et al. (2010) baixos níveis de HDL foram associados a LDH, a arginase e à gravidade da AF. Estas comparações mostram a grande variação que pode ocorrer nos níveis de lipídios entre as populações e falsas associações positivas e falsas ausências de associações podem estar implicadas nas análises realizadas.

Nos indivíduos analisados nesta pesquisa, os valores médios de APOA1, principal constituinte de HDL, encontravam-se dentro do valor de referência. Ozturk et al. (2013) e Monnet et al. (1996) que avaliaram indivíduos com genótipos HbSS, em estado clínico estacionário, encontraram menores níveis de APOA1 em relação aos controles. Nos três grupos de pacientes (DF, HbSS e HbSC) com HDL superior a 40

mg/dL houve aumento significativo de APOA1 ($p < 0,001$). Apesar do baixo nível de HDL ser considerado um fator de risco aterosclerótico, quando associado ao nível normal de APOA1 este risco torna-se menor, pois sugere a presença de um número adequado de partículas de HDL que contém menos colesterol (SIRTORI; CALABRESI; FRANCESCHINI, 2001). Baixos níveis de APOA1 podem funcionar como marcador potencial de risco de HP na DF (ANJUM et al., 2013; YUDITSKAYA et al., 2009). Além disso, níveis mais baixos de APOA1 foram associados a resposta vasodilatadora prejudicada, indicando associação de disfunção endotelial com níveis inferiores de APOA1 na DF (YUDITSKAYA et al., 2009). Monnet et al. (1996) quando avaliaram pacientes com AF durante crises de dor encontraram valores menores para APOA1 se comparado aos indivíduos em estado clínico estável. Por isto, os valores de APOA1 poderiam ser utilizados como um fator de risco adicional para HP.

Ressalta-se a correlação negativa encontrada entre neutrófilos e APOA1 na população com DF e entre APOA1 e BT, BI, LDH nos indivíduos HbSS. Portanto, menores níveis de APOA1 correlacionaram-se com maiores índices de hemólise e portanto, indicador de um ambiente oxidativo. A correlação negativa entre APOA1 e neutrófilos no grupo de pessoas HbSS ficou próxima ao nível de significância, mas, não foi significativa dentre os indivíduos com hemoglobinopatia SC provavelmente devido ao número de indivíduos avaliados.

Os estudos de Soupene et al. (2016) indicaram que o ambiente altamente oxidativo do sangue na DF provoca alterações nas sulfidrilas dos componentes essenciais do plasma e dos eritrócitos para manter a formação de ésteres de colesterol. Este conjunto de alterações induziria a disfunção de hemácias e lipoproteínas plasmáticas que poderia levar ao desequilíbrio no metabolismo do colesterol observado em pacientes com DF. Os autores também mostraram que, durante episódios inflamatórios agudos, houve uma correlação positiva entre a disfunção da troca HDL-ApoA-I no plasma falciforme com o aumento dos níveis da enzima fosfolipase A2 secretora da fase aguda (sPLA2). Finalmente, Soupene et al (2016) propõem que a anormalidade do colesterol plasmático observada na DF vem da combinação do aumento do nível de sPLA2 durante a fase aguda, a disfunção do sistema de esterificação do colesterol e o remodelamento da partícula de HDL da

ApoA-I. Para estes autores os danos provenientes desses defeitos podem contribuir para o desenvolvimento de disfunção endotelial vascular na DF.

Para os grupos HbSC e DF também foi encontrado aumento significativo de CT ($p < 0,001$) quando os níveis de HDL eram superiores a 40 mg/dL, resultado também encontrado por Seixas et al. (2010) para indivíduos com DF.

No presente estudo, os valores de APOB das crianças / adolescentes avaliados encontravam-se dentro do valor de referência e os níveis de não-HDL também estavam normais ($VR < 145$ mg/dL). Semelhante a Ozturk et al. (2013) que não encontraram diferença significativa no nível de APOB entre pacientes com DF e controle. Houve redução significativa nos níveis de APOB quando HDL era superior a 40 mg/dL para os indivíduos com genótipo HbSS ($p = 0,007$), assim como Monnet et al. (1996), que encontraram menores valores de APOB em indivíduos com DF ($p < 0,05$). A APOB fornece uma medida direta do número de partículas de lipoproteínas aterogênicas na circulação, visto que é um componente de todas as partículas de lipoproteínas potencialmente aterogênicas tais como VLDL, IDL, LDL e lipoproteína A (SNIDERMAN; VU; CIANFLONE, 1991). Geralmente, mais de 90% de todas as APOB do sangue são encontradas em LDL (WALLDIUS; JUNGNER et al., 2006; SNIDERMAN et al., 2003). Sniderman et al. (2003) realizaram uma revisão e concluíram que a medida de APOB é melhor do que os valores de CT ou LDL para prever o risco de doença vascular. Conforme revisado por Contois et al. (2009) as partículas de LDL, não apenas o colesterol de LDL, desempenham um papel central na aterogênese.

Diferenças significativas entre os níveis de HDL com redução de TG quando HDL era superior a 40 mg/dL nos grupos DF ($p = 0,007$) e HbSS ($p = 0,001$) também foram relatadas por Seixas et al. (2010) mas não por Emokpae e Kulia-Gwarzo (2014) que encontraram aumento de TG ($p = 0,02$).

Os níveis de TG são um componente importante da avaliação de risco de doença cardiovascular aterosclerótica em homens e mulheres (EXPERT PANEL ON DETECTION, 2001). No presente estudo os valores médios de TG apresentaram-se dentro do valor da normalidade (< 130 mg/dL para crianças maiores de 10 anos e < 100 mg/dL para crianças de até 10 anos), não tendo sido encontrada diferença

significativa entre os grupos com DF, HbSS, HbSC e controle, semelhante ao observado em estudos anteriores (EMOKPAE et al., 2010; EPHRAIM et al., 2016; ESSOHANA et al., 2016, RAHIMI et al., 2006). Na população estudada, a hipertrigliceridemia foi encontrada em apenas 8,51% dos pacientes com DF. Desta forma, nossa população de estudo não apresentou predominância de hipertrigliceridemia como observado em outras populações. Em pacientes com AF, em diferentes faixas etárias, foram relatados níveis significativamente maiores de TG (ADEGOKE et al., 2016; ALASSANE et al., 2014; MOKONDJIMOBÉ et al., 2012; OZTURK et al. 2013; TEIXEIRA et al., 2017; ZORCA et al., 2010). Shores et al. (2003) também encontraram os maiores valores de TG presentes em indivíduos HbSS do sexo masculino ($p = 0,02$), em relação aos controles masculinos. Essas diferenças nos níveis de TG podem ter ocorrido pelo número de indivíduos estudados, faixa etária avaliada nos diferentes estudos, dieta, peso, sexo, etnia, diferenças metodológicas, controle do jejum na coleta do sangue, tamanho das populações, diferentes faixas de gravidade da doença e regime de tratamento, além de fatores genéticos.

Encontramos aumento significativo para os níveis de LDH ($p = 0,015$), nos pacientes com DF quando os níveis de TGs estavam acima dos valores de referência estabelecidos. A LDH é um marcador de hemólise intravascular (LAND et al., 2013) e a hipertrigliceridemia é associada com hemólise, disfunção vascular e prevalência maior de HP em indivíduos com DF (ZORCA et al., 2010).

6.4 RAZÕES ATEROGÊNICAS

Algumas razões entre as partículas de lipoproteínas apresentam significado clínico para a saúde humana, entre elas as relações TG/HDL e APOB/APOA1, que quando alteradas são preditivas de doença vascular aterosclerótica (SNIDERMAN et al., 2003). A elevação na proporção de TG/HDL é preditora de doença coronária (LUZ et al., 2008), de resistência à insulina (REAVEN, 2002) e de disfunção endotelial (ZORCA et al., 2010). Nossos estudos revelaram maiores valores da razão TG/HDL para HbSS, com diferença significativa ($p = 0,049$), entre os grupos HbSS, HbSC e sem DF, porém, sem alcançar o valor de risco ($>2,4$). Os resultados estão em conformidade

com o estudo de Alassane et al. (2014), que também encontraram diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores da razão TG/HDL quando compararam indivíduos HbSS, HbAS e HbAA. Entretanto, Ephraim et al. (2016), que estudaram indivíduos HbSS e HbSC, comparados a grupo controle, não encontraram diferença significativa ($p = 0,119$) entre os valores das razões TG/HDL.

A relação APOB/APOA1 é um marcador do equilíbrio de colesterol aterogênico e anti-aterogênico no plasma (JUN et al., 2018) e mostrou ser o fator de risco mais fortemente associado ao infarto do miocárdio (YUSUF et al., 2004) e aterosclerose carotídea em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo II (JUN et al., 2018). O cálculo da relação APOB/APOA1, é significativamente aumentado em indivíduos com DF com HP (YUDITSKAYA et al., 2009). A razão APOB/APOA1 é considerada melhor do que a razão CT/HDL como índice geral de risco de doença vascular (SNIDERMAN et al., 2003). Não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,198$) no índice APOB/APOA1 entre os pacientes com DF e seus valores mantiveram-se no intervalo normal.

A hipocolesterolemia e os baixos índices aterogênicos, em geral encontrados na nossa população de estudo e em outras populações, contribuem para a baixa incidência de aterosclerose observada nos pacientes com DF (MANSI; ROSNER, 2002). Porém, embora aterosclerose contribua significativamente para os agravos clínicos da DF, tais como hipertrofia arterial pulmonar e esplênica e infarto cerebral (ELSHARAWY; MOGHAZY; SHAWARBY, 2009). Os estudos têm sido dedicados a esclarecer também os mecanismos que geram o efeito vasculoprotetor (menor incidência de aterosclerose e trombose) na DF observado em humanos e animais experimentais (WANG et al., 2013). Foi sugerido por Elsharawy, Moghazy e Shawarby (2009) que a disfunção endotelial, o aumento de homocisteína e a ativação de plaquetas seriam mecanismos prováveis de aterosclerose na DF. Mesmo em indivíduos sem DF já estão bem definidos os fatores que contribuem para o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose: a ativação endotelial, a inflamação e o estresse oxidativo (AHMAD et al., 2015), eventos característicos em indivíduos com DF.

6.5 INFLUÊNCIA DA TERAPIA COM HIDROXIURÉIA

O uso da HU é recomendado para adultos, adolescentes e crianças com AF e DF grave, com frequentes crises de dor, STA, hipoxemia, DTC alterado, priapismo e anemia crônica. Há ainda poucos estudos sobre a indicação da HU em pacientes SC, devido a suspeita de aumento de viscosidade do sangue e aumento do VCM. Entretanto estudos revelaram que a HU foi bem tolerada nestes pacientes, mas a dose, a duração do tratamento e a eficácia laboratorial e clínica variaram (YAWN et al., 2014). O uso da HU revela vantagens além do já conhecido aumento de produção de HbF, como o aumento do VCM, melhora da reologia das hemácias, redução das micropartículas circulantes e da inflamação, redução da contagem absoluta de neutrófilos e de reticulócitos, além de aumentar a produção intravascular e intraeritrocitária de NO, o que facilita a vasodilatação (LUCHTMAN- JONES et al., 2016; PECKER, et al., 2017; SUMMARELL; SHEEHAN, 2016).

Os indivíduos HbSS (51,11%) apresentaram maior frequência em relação ao uso de HU quando comparado aos indivíduos HbSC (9,23%). Diante disso, optou-se por investigar a influência desta terapia somente no grupo HbSS, para que o resultado não se tornasse falseado pelos melhores parâmetros hematológicos e bioquímicos dos indivíduos do grupo HbSC, mesmo sem a terapia com HU (QUINN, 2016).

Nos indivíduos HbSS que faziam uso de HU, foram encontrados maiores valores de Hb, HCM, VCM, menores valores de neutrófilos e das quantidades de bilirrubinas. As maiores concentrações de HbF intraeritrocitária aumentam a sobrevivência das hemácias e, por consequência, diminuem o quadro hemolítico (STEINBERG, 1999). A redução dos níveis das bilirrubinas, que também foi verificada no estudo de Heeney et al. (2003), indiretamente mostra diminuição de hemólise nos indivíduos reafirmando o efeito minimizador significativo da terapia com HU. A indicação do melhor quadro clínico gerado pelo uso da HU também foi observada em outros estudos como de Figueiredo et al. (2017), que estudaram pacientes HbSS e HbS β^0 , com idade entre cinco e 21 anos, em tratamento com HU, encontraram associação positiva do uso de HU com Hb e VCM, HCM e HbF, juntamente com diminuição da contagem de reticulócitos, LG e neutrófilos. O estudo de Teixeira et al., (2017) também mostrou maiores valores de

VCM ($p = 0,03$) nos indivíduos em uso de HU. Apesar de não ter sido alcançada diferença significativa entre os valores de HbF dos pacientes que fazem uso e não usam HU, provavelmente pelo número de indivíduos investigados, pela duração da terapia na faixa etária estudada, pela adesão ao tratamento e pela dose de HU, maiores percentuais de HbF estavam presentes naqueles que faziam uso do medicamento.

Embora os níveis de LDH sejam considerados indicadores de hemólise intravascular (LAND et al., 2013; STOJANOVIC; LIONNET, 2016) e considerado um importante marcador da gravidade clínica da DF (ALELUIA et al., 2017b), nós não observamos redução significativa entre os grupos de pessoas sob terapia da HU. Provavelmente, como o número de pacientes avaliados para esta enzima foi menor se comparado a outras análises, a significância para diferença entre os grupos não foi atingida. Embora no grupo de pacientes em uso de HU pode-se observar que a concentração de LDH no sangue era menor em relação aos indivíduos sem terapia.

A terapia com HU não interferiu no perfil lipídico dos pacientes HbSS avaliados. Esse resultado foi também encontrado por Daak et al. (2011) e Teixeira et al. (2017). Daak et al. (2011) também encontraram um perfil semelhante nos níveis de TG entre os indivíduos que faziam uso de HU e os controles.

6.6 GENOTIPAGENS

Não está completamente esclarecido como ocorre a alteração observada em varias populações no metabolismo de lipídios na DF (OZTAS, 2011; ZORCA et al., 2010). Do mesmo modo, também não há relatos que indiquem sea variação observada entre os individuos nos níveis de lipídios estaria relacionada a outras variantes genéticas do paciente além da própria variação entre HbSS e HbSC, provavelmente causadoras primárias da dislipidemia nas anemias hemolíticas. Por isto, nosso estudo investigou se além da presença de dislipidemia, SNPs de genes do metabolismo de lipídios poderiam estar implicados na variação dos níveis de lipídios como ocorre em indivíduos sem a DF.

Com objetivo de investigar se a presença de polimorfismos (SNPs) em genes que afetam o metabolismo de lipídios também pode intervir nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de indivíduos com DF, foram selecionados e genotipadas variantes em quatro genes. As frequências genotípicas de todos os SNPs se encontravam em EHW.

Em relação ao SNP rs116843064 do gene *ANGPTL4* a frequência do alelo menor (MAF) na população estudada de pacientes com DF foi igual à frequência global de 0,01. O encontro dessa frequência deve fazer alusão à miscigenação encontrada no Brasil, visto que o MAF entre os europeus é três vezes maior ao global e o MAF africano é zero, embora o MAF nas Américas também seja 0,03.

A MAF do SNP rs662799 de *APOA5* foi de 0,11 na população de DF, ligeiramente diferente da MAF global de 0,16, porém mais próxima a da africana (0,12). Na população brasileira a frequência deste alelo foi relatada ser de 13% em dois estudos (CHEN et al., 2006; DE FRANÇA et al., 2016).

A MAF encontrada para *ZNF259* rs964184 foi mais próxima ao MAF Europeu (0,16) comparando-se com as frequências alélicas globais e africana (0,22).

Para o SNP de *TNFA*, a MAF encontrada foi de 0,13, muito próxima a MAF africana (0,12) e a encontrada em outras populações brasileiras sem (CAJADO et al., 2011) e com DF (BELISÁRIO et al., 2014; TORRES et al., 2013), porém superior a MAF global (0,09). Os valores comparativos de MAF estão descritos na Tabela 51.

Tabela 49: Comparação entre as frequências da população de estudo e frequências mundiais dos alelos menores dos genes analisados

MAF	Genes e SNPs			
	<i>ANGPTL4</i> rs116843064	<i>APOA5</i> rs662799	<i>TNFA</i> rs1800629	<i>ZNF259</i> rs964184
População de estudo	0,01	0,11	0,13	0,18
Global	0,01	0,16	0,09	0,22
EAS	0	0,29	0,06	0,24
SAS	0	0,19	0,05	0,23
AFR	0	0,12	0,12	0,22
EUR	0,03	0,08	---	0,16
AMR	0,03	0,15	0,07	0,28

rs: referência de polimorfismo de único nucleotídeo; MAF: frequência do alelo menor; EAS: leste asiático; SAS: sul da Ásia; AFR: africano; EUR: europeu; AMR: américas. SNP: single nucleotide polymorphism
1000Genome.

6.6.1 *ANGPTL4* rs116843064c.118G>A

Embora não tenha alcançado diferença significativa houve uma tendência à significância ($p = 0,053$), entre as diferenças dos valores médios de HDL em que os portadores do alelo de menor frequência do gene *ANGPTL4* rs116843064 apresentaram valor médio maior de HDL, conforme observaram Romeo et al. (2007), Dewey et al. (2016), Talmud et al. (2008) e Teslovich et al. (2010). No modelo de dominância, o alelo de menor frequência foi associado a maiores níveis de APOA1 ($p = 0,015$) e CT ($p = 0,026$).

A APOA1, principal componente do HDL, foi significativamente superior nos dois indivíduos heterozigotos do rs116843064, dentro dos valores da normalidade (média = 134,00 mg/dL), embora na população estudada, em média, os níveis desta apolipoproteína também se encontravam normais. O alelo A apresentou efeito de dominância, embora para ser confirmado seja necessário aumentar o número de indivíduos avaliados.

Além da variante rara de *ANGPTL4* rs116843064 estar associada com níveis aumentados de HDL, ela também foi associada à redução dos níveis de TG (TALMUD et al., 2008). A meta análise conduzida por Van Leeuwen et al. (2016) associou significativamente o polimorfismo deste gene aos níveis mais reduzidos de TGs. Em um estudo de haplótipos do gene *ANGPTL4* observou-se associação altamente significativa entre os níveis elevados de HDL e o haplótipo com o alelo raro da variante, no entanto não influenciou significativamente o futuro risco cardiovascular (MUENDLEIN et al., 2014). Na população estudada não foi observada diferença estatística significativa para os valores de TG entre os genótipos. Provavelmente, este resultado é reflexo do número pequeno de indivíduos portadores do alelo de menor frequência e também pelo perfil populacional em que predomina baixos níveis de TG.

Também para o efeito de dominância ocorreu associação do alelo raro com menores níveis de LG e monócitos o que sugere que este polimorfismo pode melhorar o perfil de marcadores de inflamação e vaso-oclusão.

6.6.2 *APOA5* rs662799g.116792991 G>A

Entre os SNPs localizados no agrupamento de *APOA5*, o SNP rs662799 está na região promotora do gene *APOA5*. Essa região está fortemente associada a níveis elevados de TG (OLIVA et al., 2016; GUARDIOLA e al. 2015; SON et al., 2015; LI et al. 2014; KIM et al., 2013; HAHNE et al., 2008; HAVASI et a., 2006) e confere risco para síndrome metabólica (HAVASI et al., 2006; SON et al., 2015) e AVC (HAVASI et al., 2006). Guardiola et al. (2015) também mostraram que a variante *APOA5* (-1131G/A) foi associada, além do aumento dos níveis de TG, a um perfil de lipoproteínas aterogênicas associadas a variantes de *APOA5*.

Na população de indivíduos com DF a análise dos efeitos de dominância do alelo de menor frequência do SNP rs662799 do gene *APOA5* mostrou que não houve influência da variante de risco (alelo G) sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados.

A informação proposta por Kim et al. (2013) de que há aumento de 9% nos níveis de TGs na presença do alelo de menor frequência do polimorfismo rs662799 do gene *APOA5* não se confirmou em nossas análises, visto que não foi observado mudança significativa nos valores (AG + GG = 89,25 mg/dL e AA = 85,5 mg/dL). Provavelmente, como há um baixo número de indivíduos com hipertrigliceridemia nós não fomos capazes de detectar associação do SNP rs662799 do gene *APOA5* com níveis de TG na população de estudo. Entre os indivíduos que apresentaram hipertrigliceridemia, três apresentaram o genótipo heterozigoto (AG) e cinco apresentaram genótipo homozigoto selvagem (AA).

6.6.3 *ZNF259* rs964184c.724C>G,UTR 3'

O gene *ZNF259* é parte do agrupamento de genes *APOA5-ZNF259-BUD13* (GALCHEVA-GARGOVA et al., 1998), conhecida como uma região moduladora dos níveis de TG (PARRA et al., 2017). Os genótipos CG e GG do gene *ZNF259* rs964184

foram associados a maiores níveis das concentrações séricas de TGs (ZHOU et al., 2015) e LDL (ABE et al., 2015; MIRHAFEZ et al., 2016; PARRA et al., 2017).

Van de Woestijne et al. (2014) investigaram a associação entre rs964184 e níveis plasmáticos de lipídios em pacientes com doença vascular. Nós também encontramos em nossos resultados o aumento dos níveis de TG em mais de 12% quando os indivíduos apresentaram o alelo de menor frequência no modelo de dominância (CC = 81,85 mg/dL e CG + GG = 93,29 mg/dL). Entretanto, no modelo de recessividade, nós não encontramos aumento dos níveis de TGs, ao contrário, encontramos a redução destes valores (CC + CG = 86,89 mg/dL e GG = 68,67 mg/dL). Assim como esses pesquisadores nós também encontramos redução dos níveis de HDL em mais de 6% sob o efeito de recessividade do alelo de menor frequência (CC + CG = 39,50 mg/dL e GG = 36,00 mg/dL), embora não tenha sido observada a redução dos níveis de HDL quando foi analisado o modelo de dominância do alelo de menor frequência.

Nos pacientes com DF deste trabalho, o modelo de dominância do alelo G (CG + GG *versus* CC) mostrou associação com aumento de alguns marcadores de inflamação e hemólise (níveis de LG, reticulócitos, BT e BD). O alelo G foi associado a níveis de BD 70% mais elevado. Também para o efeito de recessividade, foi encontrado aumento dos níveis de BD, quando comparado GG x (CG + CC). Desta forma, se verificou um efeito dose dependente do alelo G, em que o heterozigoto mostrou níveis de BD intermediários entre os genótipos homozigotos.

Não encontramos significância na associação deste alelo de *ZNF259* com doença hepato-biliar na população estudada. Deste modo, o resultado do efeito do SNP rs964184 do gene *ZNF259* pode ser falso positivo atribuído a um reflexo indireto ou coincidente com distúrbios hepáticos que levam ao aumento da BD e o subfenótipo de hemólise / inflamação característico da DF. De qualquer modo, indivíduos com DF genotipados com a presença do alelo de risco do SNP *ZNF259* poderiam ser acompanhados uma vez que, no nosso estudo, eles apresentaram tendência ao aumento de marcadores inflamatórios e de hemólise.

6.6.4 *TNFA* rs1800629c.724C>G UTR 3' (-308G>A)

O TNFA, uma citocina pro-inflamatória, pode modular o metabolismo lipídico por suprimir a absorção de ácidos graxos livres e promover a lipogênese, por: indução da lipólise, pela inibição da atividade enzimática relacionada ao metabolismo lipídico; por regular o metabolismo do colesterol; pela regulação de outras adipocinas derivadas de adipócitos, que por sua vez podem alterar o metabolismo de lipídios (CHEN et al., 2009). Na nossa população os níveis de HDL estavam praticamente idênticos entre os portadores do alelo de menor frequência e da variante comum.

Constatamos no modelo dominante (GG *versus* AA+GA) que o alelo A do gene *TNFA* rs1800629 afeta os níveis de BD. O alelo de menor frequência A foi associado ao aumento de 73% nos níveis médios de BD. A dosagem de BD é utilizada para monitorar a gravidade de problemas hepáticos e estes podem acometer indivíduos com DF (FELD et al, 2015). Por sua vez o alelo A, embora haja estudos contraditórios, parece estar associado ao aumento da expressão de TNFA (HELMIG et al., 2011; WILSON et al., 1997) e sua presença agrava os sintomas da hepatite C viral (PACHKORIA et al., 2008) e outras doenças inflamatórias (MANOLOVA et al, 2015). Bulatova et al. (2016) também sugerem que, determinar o nível de TNFA, permite avaliar a gravidade da doença do fígado e a progressão da velocidade de fibrose hepática no carcinoma hepato celular.

Feld et al. (2015) investigaram complicações relacionadas ao fígado em indivíduos com DF e um dos parâmetros bioquímicos investigados foi a origem da BD. Como conclusão os pesquisadores sugeriram que as elevações de BD refletem a patologia do fígado em maior medida do que a hemólise e que BD é um parâmetro independentemente associado com a mortalidade na DF. Já a elevação da BI reflete maior hemólise (RICHARD;BILLETT, 2002).

Nós investigamos se a presença do alelo de menor frequência do gene *TNFA* rs1800629, aliada a condição hemolítica de indivíduos com DF que aumenta a excreção de bilirrubina pelo fígado, leva ao desenvolvimento de doença hepática crônica como a colelitíase, relativamente comum na DF (CHAAR et al., 2005; EBERT; NAGAR; HAGSPIEL, 2010). Nós não encontramos diferença significativa entre o número de

indivíduos com doença hepato-biliar na presença do alelo A de menor frequência em relação aos que não possuíam a variante. Nosso estudo é o primeiro a mostrar que a variante A de *TNFA* rs1800629 está associada a altos níveis de BD em pacientes com DF. Provavelmente, pode-se tratar de associação falso-positiva ou indireta uma vez que na DF existe um quadro pro-inflamatório e que a hiperbilirrubinemia que causa a colelitíase pode gerar um estado inflamatório agudo do trato biliar (colecistite). Recentemente foi mostrado que o genótipo TA7/TA7 do gene *UGT1A1* que codifica a enzima uridina 5 -difosfo-glucuronosil transferase envolvida no controle negativo da síntese da bilirrubina, está associado a hiperbilirrubinemia mas não com colelitíase na DF (AZEVEDO et al., 2017). Tais resultados são conflitantes em relação a outros estudos envolvendo indivíduos com AF (CHAAR et al., 2005; CHAOUCH et al., 2013).

Há alguns estudos envolvendo o SNP *TNFA* rs1800629 na DF, Cajado et al (2011) mostraram que o alelo A de *TNFA* rs1800629 está associado ao risco aumentado de sequestro esplênico em pacientes brasileiros com AF. O AVC em crianças com DF pode sofrer impacto direto das proteínas pró-inflamatórias codificadas pelo gene *TNFA*. Uma vez que crianças com DF possuem inflamação vascular, a alta expressão de *TNFA* pode contribuir com o processo de AVC (HOPPE et al., 2007). Os mesmos autores afirmam que o alelo menor do gene *TNFA* rs1800629 pode ser protetivo contra AVC (HOPPE et al., 2004; HOPPE et al., 2007). Contrário a esse relato, o alelo A do polimorfismo do gene *TNFA* rs1800629 foi significativamente associado a AVC (BELISÁRIO et al., 2015), mas não com DCV (BELISÁRIO et al., 2015). Segundo estes autores o achado implica que o alelo A produziria alguma modificação fenotípica que aumenta o risco de AVC (a última etapa da DCV), mas não o risco de estágios anteriores, como as anormalidades de DTC e concluem que essa falta de associação pode indicar resultado verdadeiro negativo e a associação entre *TNFA* -308G>A e AVC pode ser considerada mais provavelmente como um resultado falso positivo. Entretanto, dois outros estudos não relataram associação de AVC com nenhuma das variantes de rs1800629 (HOPPE et al., 2001; VICARI et al., 2011). A conclusão de uma meta análise, conduzida por Kumar et al. (2015) é de que o polimorfismo do gene *TNF- α* -308G/A é mais provável ser protetor contra AVC isquêmico nas populações asiáticas em comparação com as populações caucasianas.

6.7 ALFA TALASSEMIA

Um dos principais modificadores do fenótipo clínico na DF é a expressão dos genes de alfa-globina (*HBA1/HBA2*) (LIU et al., 2016). A alfa-tal reduz a HbS dentro das hemácias o que leva a redução da polimerização (QUINN, 2016; SCHECHTER, 2008), levando a redução da hemólise (QUINN, 2016).

Os indivíduos apresentaram a frequência da deleção α -^{3.7Kb} no gene *HBA* que causa alfa-tal (0,23) nos indivíduos com DF (grupos HbSS e hemoglobinopatia SC) semelhante ao observado em outras populações brasileiras e de descendência africana. A incidência de alfa-tal em afro-americanos foi de 0,30 (HABARA; STEINBERG, 2016; STEINBERG; EMBURY, 1986) e no restante da população de 0,02 (STEINBERG; EMBURY, 1986). Na África, há uma alta frequência de deleção de *HBA* (0,58) e DF (MCGANN et al., 2014). Figueiredo et al. (2017), em estudo realizado em Nova York com indivíduos HbSS e HbS β^0 , encontraram a frequência de 0,42 de α -^{3.7Kb}. Liu et al. (2016) propuseram que aproximadamente um terço dos indivíduos africanos e seus descendentes que possuíam algum tipo de DF possuem co-herança de alfa-tal. No Brasil, a co-herança de alfa-tal em indivíduos com DF encontrada por Figueiredo et al. (1996) foi de 17,5% e a prevalência no restante da população está em torno de 1 e 3%. Na Bahia, a frequência da co-herança da deleção α -^{3.7Kb} tal e AF, foi de 0,14 (ALELUIA et al., 2017b). Já no estudo realizado por Lyra et al. (2005), a frequência de alfa-tal em São Paulo e Salvador foram 28,2% e 22,5% respectivamente. Em Minas Gerais, Belisário et al. (2015), realizaram a genotipagem de alfa-tal em crianças com DF (genótipos SS, S β^0 -tal, ou S β^+ -tal tipo I) e encontraram a prevalência de 25,5% de indivíduos com uma deleção de α -^{3.7Kb} e de 1,7% com deleção α -^{4.2Kb} em ambos os cromossomos de *HBA*.

Na população estudada de DF, redução significativa dos valores de HCM e VCM para os indivíduos genotipados com uma ou duas deleções do gene *HBA* foi semelhante à relatada em vários estudos (ALELUIA et al., 2017b; BELISÁRIO et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2017; HSU et al., 2003).

Na literatura o efeito da coexistência de alfa-tal na DF sobre os níveis de bilirrubina é controverso. Semelhante ao estudo de Adekile et al. (2005) e mais

recentemente de Azevedo et al. (2017) (AZEVEDO et al., 2017) nós não encontramos que a co-existência de alfa-tal esteja ligada a diminuição de bilirrubinas como mostrado por Hamad et al. (2013) e Vasavda et al. (2007). Hamad et al. (2013) também mostraram que a co-existência de alfa-tal reduziu o risco de colelitiase (HAMAD et al., 2013) o que também não foi verificado nas nossas análises.

Diferentemente de vários estudos, dentre eles o de Belisário et al. (2010b) que estudaram indivíduos genótipos HbSS e HbS β^0 , com idades entre dois e dez anos nós não identificamos alterações significativas nos valores de LG ($p = 0,864$) e reticulócitos ($p = 0,919$) para os indivíduos que portavam alfa-tal.

Nosso estudo também mostrou que a co-herança de alfa-tal na DF não influencia os níveis de lipídios.

7.0 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Embora nosso estudo teve poder para detectar uma associação entre piores índices de marcadores de hemólise e anemia em indivíduos com AF em relação aos indivíduos com hemoglobinopatia HbSC, nós identificamos algumas limitações neste trabalho. A natureza retrospectiva do estudo pode levar a ausência de dados. As discrepâncias com alguns resultados publicados anteriormente podem ser devidas a diferenças no desenho do estudo, diferenças metodológicas, ao baixo número de indivíduos participantes e variabilidade genética da população, interações com fatores ambientais, tais como condições geográficas, padrões alimentares que podem afetar a ingestão de gordura e o metabolismo energético. Enfatizamos a importância dos estudos de replicação para confirmar os resultados originais.

Como a população estudada não apresentou hipertrigliceridemia, as associações dos níveis de TG com os polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo de lipídios ficaram limitadas. Nós avaliamos um alelo raro (de frequência menor que 1%) do SNP de *ANGPTL4* rs116843064, foi muito baixa a frequência do genótipo heterozigoto (dois indivíduos) nenhum homozigoto para o alelo raro, o que diminuiu o poder estatístico das análises envolvendo este gene.

Finalmente, em decorrência de poucas informações clínicas e somente trabalhamos com indivíduos que não estavam em crise aguda e/ou regime de transfusão regular, a maioria dos pacientes, felizmente, apresentaram baixo risco nos resultados do Doppler transcraniano. Por isso, não foi possível realizar as análises de associação e correlação com as variáveis estudadas. A investigação do genótipo de indivíduos com alto risco de acidente vascular cerebral seria indicada para um estudo posterior, visto que algum desses polimorfismos gênicos poderia ser coadjuvante no desenvolvimento do acidente vascular cerebral.

8. CONCLUSÕES

O estudo possibilitou caracterizar o perfil demográfico e laboratorial dos grupos de pacientes HbSS e HbSC nascidos entre 2001 e 2010 com doença falciforme (genótipos HBSS e HBSC) acompanhados nos Hemocentros Regionais de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas.

Foram destacadas as diferenças entre a Anemia Falciforme e a Hemoglobinopatia SC, com base na caracterização laboratorial de ambos os genótipos. Constatou-se que o genótipo HbSS tem perfil laboratorial com marcadores de anemia e indicadores indiretos de hemólise mais elevados em comparação com os indivíduos com Hemoglobinopatia SC.

A população estudada de pacientes com doença falciforme apresenta dislipidemia caracterizada por hipocolesterolemia, mas não apresentaram predomínio de hipertrigliceridemia. Menores níveis de lipoproteína de alta densidade e colesterol total foram encontrados para indivíduos com doença falciforme em comparação com o grupo controle.

Os níveis maiores de lipoproteína de alta densidade influenciaram na melhora dos valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos indivíduos com doença falciforme.

Os indivíduos com doença falciforme apresentaram perfil aterogênico na razão triglicérides / lipoproteína de alta densidade (TG/HDL).

O uso da Hidroxiuréia alterou significativamente os resultados laboratoriais indicadores de hemólise e inflamação, mas não alterou o perfil lipídico dos pacientes com DF da população estudada.

O alelo raro do gene *ANGPTL4* rs116843064, no modelo de dominância, foi associado com o aumento de colesterol total e apolipoproteína A1, mas não com lipoproteína de alta densidade e triglicéridios.

Nós verificamos, no modelo de dominância, que o alelo de menor frequência do gene *TNFA* rs1800629 foi associado ao aumento de 73% nos níveis de bilirrubina direta.

O alelo de menor frequência do gene *ZNF259* rs964184 apresentou efeito de dominância para aumento de bilirrubinas total e direta, leucometria global e reticulócitos. Para níveis de bilirrubina direta, os genótipos mostraram efeito dose dependente. Desta forma, dois genes estudados, *ZNF259* e *TNFA*, tiveram, respectivamente, os polimorfismos rs964184 e rs1800629 associados aos níveis de bilirrubina direta na população de doença falciforme do estudo.

A co-herança de alfa-talassemia foi associada a níveis reduzidos de volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média, mas não influenciou os níveis de hemoglobina fetal, reticulócitos, de bilirrubina ou o perfil lipídico dos indivíduos.

REFERÊNCIAS

ABE, S., et al. Association of genetic variants with dyslipidemia. **Mol Med Rep.** v. 12, n. 4, p. 5429-36, 2015.

ABID, K., et al. ANGPTL4 Variants E40K and T266M Are Associated with Lower Fasting Triglyceride Levels and Predicts Cardiovascular Disease Risk in Type 2 Diabetic Tunisian Population. **Lipids in Health and Dis**, v. 15, n. 63, 2016.

ABU-FARHA, M., et al. Increased ANGPTL3, 4 and ANGPTL8/ betatrophin expression levels in obesity and T2D. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 181, 2016.

ADAMKIEWICZ, T.V., et al. 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. 4632-8, 2009.

ADAMS, R.J., et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. **N Engl J Med.** v. 339, n. 1, p. 5-11, 1998.

ADAMS, R.J., et al. Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. **Am. J. Hematol**, v. 45, p. 279–282, 1994.

ADEGOKE, S.A, OKENIYI, J.A.O, AKINTUNDE, A.A. Electrocardiographic abnormalities and dyslipidaemic syndrome in children with sickle cell anaemia. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 22, n. 1, p. 16-20, 2016.

ADEKILE A, et al. The influence of uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A promoter polymorphisms, beta-globin gene haplotype, co-inherited alpha-thalassemia trait and Hb F on steady-state serum bilirubin levels in sickle cell anemia. **Eur J Haematol.** , v. 75, n. 2, p. 150-5, 2005.

AHMAD, W.N.H.W. et al. Low serum high density lipoprotein cholesterol concentration is an independent predictor for enhanced inflammation and endothelial activation. **PloS one**, v. 10, n. 1, p. e0116867, 2015.

AKINLADE, K.S., et al. Defective lipid metabolism in sickle cell anaemia subjects in vaso-occlusive crisis. **Niger Med J**, v. 55, n. 5, p. 428–431, 2014.

AKINSEGUN, A. Serum ferritin levels in adults with sickle cell disease in Lagos, Nigeria. **J Blood Med**, v. 2013: 4, p. 59–63, 2013.

AKINSHEYE, I., et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 19-27, 2011.

AKINYANJU, P.A; AKINYANJU, C.O. Plasma and red cell lipids in sickle cell disease. **Ann Clin Lab Sci**, v.6, n. 6, p. 521–4, 1976.

ALASSANE, D., et al. Serum lipids and oxidized low density lipoprotein levels in sickle cell disease: Assessment and pathobiological significance. **Journal of Biochemistry Research, African**, v.8, n. 2, p. 39-42, 2014. Disponível em :<http://www.academicjournals.org/AJBR>

ALELUIA, M.M., et al. Association of classical markers and establishment of the dyslipidemic sub-phenotype of sickle cell anemia. **Lipids Health Dis**, v. 16, n.1 , p. 74, 2017b.

ALELUIA, M.M., et al. Comparative study of sickle cell anemia and hemoglobin SC disease: clinical characterization, laboratory biomarkers and genetic profiles. **BMC Hematology**, v. 17, p. 15, 2017a.

ALEXY, T. et al. Sickle cell disease: selected aspects of pathophysiology. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 44, n. 3, p. 155-166, 2010.

AL-SAQLADI, A.W.M., BIN-GADEEM, H. A., BRABIN, B. J. Utility of plasma transferrin receptor, ferritin and inflammatory markers in children with sickle cell disease. **Paediatrics and International Child Health**, v. 32 n. 1, 2012.

AMARAL, J.L., et al. Perfil sociodemográfico, econômico e de saúde de adultos com doença falciforme. **Rev Rene**, v. 16, n. 3, p. 296-305, 2015.

ANGIOPOIETIN-LIKE 4; ANGPTL4. **Online Mendelian Inheritance in Man**.

Disponível em:

<<https://www.omim.org/entry/605910?search=rs116843064&highlight=rs116843064>>.

Acesso em: 05 de março de 2018.

ANJUM, F., et al. Dysregulation of ubiquitin-proteasome pathway and apolipoprotein A metabolism in sickle cell disease-related pulmonary arterial hypertension. **Pulm Circ**, v. 3, n. 4, p. 851–855, 2013.

APOLIPOPROTEIN A-V; APOA5. **Online Mendelian Inheritance in Man.**

Disponível em:

<<https://www.omim.org/entry/606368?search=rs662799&highlight=rs662799>>. Acesso em: 05 de março de 2018.

ASSELBERGS, F.W., et al. Large-scale gene-centric meta-analysis across 32 studies identifies multiple lipid loci. **Am J Hum Genet**, v. 91, n. 5, p. 823-38, 2012.

ASSMANN, Gerd; CULLEN, Paul; SCHULTE, Helmut. The Münster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. **European heart journal**, v. 19, p. A2-11, 1998.

ATAGA, K.I., et al. Association of Pro-Inflammatory High Density Lipoprotein Cholesterol with Clinical and Laboratory Variables in Sickle Cell Disease. **Hematology**, Amsterdam, Netherlands, v. 20, n.5, p. 289-296, 2015.

AZAR, S., WONG, TE. Sickle Cell Disease A Brief Update. **Med Clin North Am**, v. 101, n. 2, p.375-393, 2017.

AZEVEDO L. A., et al. Do Alpha Thalassemia, Fetal Hemoglobin, and the UGT1A1 Polymorphism have an Influence on Serum Bilirubin Levels and Cholelithiasis in Patients with Sickle Cell Disease? **Mol Diagn Ther**, v. 21, n.4, p. 437-442, 2017.

AZNAOURIDIS, K., et al. Triglyceride level is associated with wave reflections and arterial stiffness in apparently healthy middle-aged men. **Heart**, v. 93, n. 5, p. 613-614, 2007.

BABAPOOR-FARROKHRAN, S., et al. Angiopoietin-like 4 is a potent angiogenic factor and a novel therapeutic target for patients with proliferative diabetic retinopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n.23, p. 3030-9, 2015.

BAILEY, Simon et al. Is the painful crisis of sickle-cell disease due to sickling?. **The Lancet**, v. 337, n. 8743, p. 735, 1991.

BAIN, B.J. Haemoglobinopathy diagnosis: Algorithms, lessons and pitfalls. **Blood Reviews**, v. 25, p. 205–213, 2011.

BALKARAN, B., et al. Stroke in a cohort study of patients with homozygous sickle cell disease. **J. Pediatr**, v. 120, n. 3, p. 360–366, 1992.

- BALLAS, S.K., et al. The prevalence of avascular necrosis in sickle cell anemia: correlation with α -thalassemia, **J. Hemoglobin**, p. 649–655, 1989.
- BARONE, F.C., et al. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 28:1233–1244 .1997; Stryjecki C, Mutch DM Fatty acid-gene interactions, adipokines and obesity. **Eur J Clin Nutr**, v. 65, n. 3, p.285-97, 2011.
- BARTER, P; GOTTO, A.M; LAROSA, J.C., et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. **N Engl J Med**, v. 357, n. 13, p. 1301-1310, 2007.
- BASAK A, A; SANKARAN V.G. Regulation of the fetal hemoglobin silencing factor BCL11A. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1368, n. 1, p. 25-30, 2016.
- BELISÁRIO, A.R ; VIANA, M.B. Efeitos da Talassemia Alfa nas manifestações clínicas e hematológicas da Anemia Falciforme: uma revisão sistemática. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n. 3, p. 319-330, 2011.
- BELISARIO, A.R., et al. Association of alpha-thalassemia TNF-alpha (-308G>A) and VCAM-1 (c.1238G>C) gene polymorphisms with cerebrovascular disease in a newborn cohort of 411 children with sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 54, n.1, p. 44–50, 2015.
- BELISÁRIO, A.R., et al. Association of alpha-thalassemia, TNF-alpha (-308GNA) and VCAM-1 (c.1238GNC) gene polymorphisms with cerebrovascular disease in a newborn cohort of 411 children with sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 14, p. 102-108, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcnd.2014.08.001>, acesso em 08 de agosto de 2017.
- BELISÁRIO, A.R., et al. Beta-globin Gene Cluster Haplotypes in a Cohort of 221 Children with Sickle Cell Anemia or Sb^0 -thalassemia and its Association with Clinical and Hematological Features. **ActaHaematol**, v. 124, n. 3, p. 162-70, 2010a.
- BELISÁRIO, A.R., et al. Coinheritance of alpha thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. **Hemoglobin**, v. 34, n. 6, p. 516–529, 2010b.
- BELISÁRIO, André Rolim et al. Genetic, laboratory and clinical risk factors in the development of overt ischemic stroke in children with sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2017.

BELISÁRIO, A.R., et al. Reticulocyte count is the most important predictor of acute cerebral ischemia and high-risk transcranial Doppler in a newborn cohort of 395 children with sickle cell anemia. **Ann Hematol**, v. 95, n.11, p. 1869–80, 2016a.

BELISÁRIO, AR., et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Brazilian Children With Sickle Cell Anemia is not Associated With Clinical Ischemic Stroke or High-Risk Transcranial Doppler. **Pediatr Blood Cancer**, v. 63, n. 6, p. 1046-9, 2016b.

BENDER, M. A.. Sickle Cell Disease. **GeneReviews® - NCBI Bookshelf**. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK1377/>>. Acesso em: 05 de março de 2018.

BEREAL - WILLIAMS .C., et al. Atorvastatin reduces serum cholesterol and triglycerides with limited improvement in Vascular function in adults with sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 97, n. 11, p. 1768-1770, 2012.

BERNAUDIN, F., et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. **Blood**, v. 117, n. 4, p. 1130–40, 2011.

HEWING, Bernd; LANDMESSER, Ulf. LDL, HDL, VLDL, and CVD prevention: lessons from genetics?. **Current cardiology reports**, v. 17, n. 7, p. 56, 2015.

BOWERS, Andre S. et al. Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68929, 2013.

BOYLE, A.P., et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Res**, n. 22, n. 9, p. 1790-1797, 2012.

BRESLOW, J. L. Genetics of lipoprotein abnormalities associated with coronary artery disease susceptibility. **Annu Rev Genet**, v. 34, p. 233–254, 2000.

BROWN, M.S; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34–47, 1986.

BUCHOWSKI, M.S., et al. Defects in postabsorptive plasma homeostasis of fatty acids in sickle cell disease. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 31, n. 4, p. 263-8, 2007.

- BULATOVA, I.A., et al. The influence of tumor necrosis factor alpha and polymorphism of its gene (rs1800629) on the severity and progression of chronic hepatitis and ulcerative colitis. **Eksp Klin Gastroenterol**, v. 3, p. 9-14, 2016.
- BURHMAN, E; MENTZER, W.B, LUBIN, B.H. The influence of plasma bilirubin on zinc protoporphyrin measurement by a hematofluorimeter. **J Lab Clin Med**, v. 91, p. 710–716, 1978.
- CAJADO C., et al. TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine**, v. 56, n. 2, p. 312-7, 2011.
- CAMILO – ARAÚJO, .R.F., et al. Molecular analysis and association with clinical and laboratory manifestations in children with sickle cell anemia. **Rev bras hematol hemoter**, v. 6, n. 5, p. 334–339, 2014.
- CAMPISTOL, J., et al. Neurological dysfunction induced by bilirubin Disfunción neurológica inducida por bilirrubina. **Neurologia**, v. 27, n. 4, p. 201-11, 2012.
- CANÇADO, R.D. Talassemias alfa. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2006; v. 28, n. 2, p. 86-7, 2006.
- CANÇADO, R.D; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Rev Bras hematol hemoter**, v. 29, n. 3, p. 203-6, 2007.
- CARVALHO, S.C., et al. Em busca da equidade no sistema de saúde brasileiro: o caso da doença falciforme. **Saúde Soc. São Paulo**, v. 23, n. 2, p.711-718, 2014.
- CATAPANO, Alberico L. et al. 2016 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: the task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). **Atherosclerosis**, v. 253, p. 281-344, 2016.
- CATOIRE, M., et al. Fatty acid-inducible ANGPTL4 governs lipid metabolic response to exercise. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 111, E1043–E1052. 2014.

CAUSSY, C., et al. An APOA5 3' UTR Variant Associated with Plasma Triglycerides Triggers APOA5 Downregulation by Creating a Functional miR-485-5p Binding site. **Am J Hum Genet**, v. 94, n. 1, p. 129–134, 2014.

CAZES, A., et al. Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. **Circ Res**, v. 99, n. 11, p. 1207-15, 2006.

CEULAER, K., et al. Alpha-Thalassemia reduces the hemolytic rate in homozygous sickle-cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 309, 1983.

CHAAR V., et al. Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 90, n. 2, p. 188–99, 2005.

CHANG, M.H., et al. Genetic variants associated with fasting blood lipids in the U.S. population: third National Health and Nutrition Examination Survey. **BMC Medical Genetics**, v. 11, n. 1, 2010.

CHAOUCH L., et al. Early complication in sickle cell anemia children due to A(TA)_nTAA polymorphism at the promoter of UGT1A1 gene. **Dis Markers**, v. 35, n. 2, p. 67–72, 2013.

CHASMAN D.I., et al. Genetic loci associated with plasma concentration of low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, apolipoprotein A1, and Apolipoprotein B among 6382 white women in genome-wide analysis with replication. **Circ Cardiovasc Genet.**, v. 1, n. 1, p. 21-30, 2008. Disponível em: doi: 10.1161/CIRCGENETICS.108.773168. Acesso em 25 de Janeiro de 2018.

CHATURVEDI, S., et al. Genome-wide association study to identify variants associated with vaso-occlusive pain in sickle cell anemia. **Blood**, v. 02, n. 769661, 2017. Disponível em: DOI 10.1182/blood-2017-02-769661. Acesso em 24 de fevereiro de 2018.

CHEN, E.S., et al. APO A-V-1131T-->C polymorphism frequency and its association with morbidity in a Brazilian elderly population. **Clin. Chem. Lab**, v. 44, p. 32-36, 2006.

CHEN, X., et al. TNF-alpha, a potent lipid metabolism regulator. **Cell Biochem Funct**, v. 27, n.7, p. 407-16, 2009.

CHI, X., et al. Angiopoietin-like 4 Modifies the Interactions between Lipoprotein Lipase and Its Endothelial Cell Transporter GPIHBP1. **J Biol Chem**, v. 290, n. 19, p. 11865-77, 2015.

CHIEN, K.L., et al. Genetic association study of APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and haplotypes on triglyceride and HDL cholesterol in a community-based population. **Clin Chim Acta**, v. 388, n. 1-2, p. 78-83, 2008.

CHISTIYAKOV, D.A; MELNICHENKO, A.A; MYASOEDOVA, V.A., et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. **J Mol Med**, v. 95, n. 11, p. 1153-1165, 2017.

CHONG, S.S., et al. Simplified Multiplex-PCR Diagnosis of Common Southeast Asian Deletional Determinants of α -Thalassemia. **Clinical Chemistry**, v. 46, N. 10, p. 1692-1695, 2000.

COHEN, J.C., et al. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. **Science**, v. 305, p. 869–872, 2004.

COLELLA, M. P., et al. Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. **Haematologica**, v. 100, n. 4, p. 466–471, 2015.

CONNES, P., VERLHAC, S., BERNAUDIN, F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, v. 161, n. 4, p. 484-98, 2013.

CONTOIS, J.H., et al. Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. **Clin Chem**, v. 55, n. 3, p. 407-19, 2009.

CROIZAT, H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br. J. Haematol**, v. 87, n. 592, 1994.

DAAK, A.A. Hydroxyurea Therapy Mobilises Arachidonic Acid from Inner Cell Membrane Aminophospholipids in Patients with Homozygous Sickle Cell Disease. **Journal of Lipids**, 2011.

DANIELS, S.R. et al. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents. **National Heart, Lung, and Blood**

Institute, NIH Publication N. 12-7486a, 2012. Disponível em: https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/peds_guidelines_sum.pdf, acesso em: 04 de março de 2018.

DARBARI, D.S., et al. Circumstances of death in adult sickle cell disease patients. **Am J Hematol**, v. 81, n. 11, p. 858-63, 2006.

DARBARI, D.S., et al. Markers of severe vaso-occlusive painful episode frequency in children and adolescents with sickle cell anemia. **J. Pediatr**, v. 160, p. 286–290, 2012.

DE FRANÇA, E., et al. APOA5 polymorphisms associated with lipid metabolism in Brazilian children and adolescents. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 1, 2016.

DELGADO -LISTA .J., et al. Affects of variations in the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster on different parameters of postprandial lipid metabolism in healthy young men. **J Lipid Res**, v. 51, n. 1, p. 63-73, 2010.

DEWEY, F.E., et al. Inactivating variants in ANGPTL4 and risk of coronary artery disease. **New Engl. J .Med**, v. 374, p. 1123–1133, 2016.

DIJK, Wieneke et al. ANGPTL4 mediates shuttling of lipid fuel to brown adipose tissue during sustained cold exposure. **Elife**, v. 4, 2015.

DIJK, W; KERSTEN, S. Regulation of lipoprotein lipase by Angptl4. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 3, 2014.

DLOUHA, D., et al Variants within HNF1 α and ANGPTL4 genes and acute coronary syndrome in Czech population. The GENDEMIP study. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 33, n. 2, p. 13-6, 2012.

DOMINGOS, I.F., et al. Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Ann Hematol**, v. 93, n. 7, p. 1123-9, 2014.

DONG, C., CHADWICK, R.S., SCHECHTER A.N. Influence of sickle hemoglobin polymerization and membrane properties on deformability of sickle erythrocytes in the microcirculation. **Biophys J.**, v. 63, n. 3, p. 774–783, 1992.

DRISCOLL, M.C., et al. Stroke risk in siblings with sickle cell anemia. **Blood**, v. 101, n. 6, p. 2401-4, 2003.

DUBERT, M., et al. Degree of anemia, indirect markers of hemolysis, and vascular complications of sickle cell disease in Africa. **Blood**, v. 130, n. 20, p. 2215-2223, 2017.

EBERT, E.C., NAGAR, M., HAGSPIEL, K.D. Gastrointestinal and Hepatic Complications of Sickle Cell Disease. **Clinical Gastroenterology And Hepatology**, v. 8, n. 6, p. 383-489, 2010.

EINHORN, D; REAVEN, G.M; COBIN, R.H., et al. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. **Endocr Pract**, v. 9, n. 3, p. 237-252, 2003.

EL-HAZMI MA.et.al. Red cell genetic disorders and plasma lipids. **J Trop Pediatr**, v. 41, n. 4, p. 202-5, 1995.

EL-HAZMI, M.A; JABBAR, F.A; WARSY, A.S .Cholesterol and triglyceride level in patients with sickle cell anaemia. **Scand J Clin Lab Invest**, v.47, n. 4, p. 351-4, 1987.

ELLORY, JC. Haemoglobin C Promotes Distinct Membrane Properties in Heterozygous HbSC red Cells. **EBioMedicine**, v. 11, n.2, p. 1577, 2015.

ELSHARAWY, M.A; MOGHAZY, K.M; SHAWARBY, M.A. Atherosclerosis in sickle cell disease – a review. **Int J Angiol**, v.18, n. 2, p. 62-66, 2009.

EMBURY, S.H., et al. Concurrent sickle-cell anemia and alpha thalassemia: effect on severity of anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 306, p. 270–274, 1982.

EMOKPAE, M.A., et al. Lipid Profile in Sickle Cell Disease Patients with Chronic Kidney Disease. **Sahel Medical Journal**, v. 13, n. 1, p. 20 – 23, 2010.

EMOKPAE, M.A; KULIYA- GWARZO,A. The Influence of Decreased Levels of High Density Lipoprotein Cholesterol on Hematological Indices in Sickle Cell Disease Patients. **Ann Med Health Sci Res**, v. 4, n. 2, p. 157–161, 2014.

EMOKPAE, M. A.; UADIA, P. O. Association of oxidative stress markers with atherogenic index of plasma in adult sickle cell nephropathy. **Anemia**, v. 2012, 2012.

EPHRAIM, Richard KD et al. Normal Non-HDL Cholesterol, Low Total Cholesterol, and HDL Cholesterol Levels in Sickle Cell Disease Patients in the Steady State: A Case-Control Study of Tema Metropolis. **Journal of lipids**, v. 2016, 2016.

ESSOHANA, P., et al. Cholesterol and Triglyceride Levels in Patients with Homozygous Sickle Cell Disease at Campus Teaching Hospital of Lomé (Togo). **Science Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 2, p. 24-28, 2016. Disponível em: <http://www.sciencepublishinggroup.com/j/sjcm> 2016, acesso em 17 de agosto de 2017.

EXPERT PANEL ON DETECTION, Evaluation et al. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). **Jama**, v. 285, n. 19, p. 2486, 2001.

FABRY, M.E., et al. Dense cells in sickle cell anemia: the effects of gene interaction. **Blood**, v. 64, p. 1042–1046, 1984.

FADLON, E., et al. From the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show Enhanced Adhesion to Vascular Endothelium and Increased Expression of CD64. **Blood**, v. 91, n. 1, p. 266-274, 1998.

FALUDI, André Arpad et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose–2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, p. 1-76, 2017.

FELD, J.J., et al. Liver injury is associated with mortality in sickle cell disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 42, n. 7, p. 912-921, 2015.

FELIX, A.A; SOUZA, H.M; RIBEIRO, S.B.F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 32, n. 3, p. 203-208, 2010.

FERNANDES, A.P., et al. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. **J Pediatr**, v. 86, n. 4, p. 279-284, 2010.

FERTRIN, K.Y., COSTA, F.F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Review of Hematology**, v. 3, n. 4, p. 443–458, 2010.

FIGUEIREDO, M.S., et al. Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **Hematology**, v. 53, n. 2, p. 72–76, 1996.

FIGUEIREDO, Lisa et al. An age dependent response to hydroxyurea in pediatric sickle cell anemia patients with alpha thalassemia trait. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 66, p. 19-23, 2017.

FLANAGAN, J.M., et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 117, n.24, p. 6681-6684, 2011.

FU, Qianxi et al. Effects of polymorphisms in APOA4-APOA5-ZNF259-BUD13 gene cluster on plasma levels of triglycerides and risk of coronary heart disease in a Chinese Han population. **PLoS one**, v. 10, n. 9, p. e0138652, 2015.

GALCHEVA-GARGOVA, Z., et al. The cytoplasmic zinc finger protein ZPR1 accumulates in the nucleolus of proliferating cells. **Mol Biol Cell**, v. 9, n.10, p. 2963-71, 1998.

GANGWANI, L.J. Deficiency of the zinc finger protein ZPR1 causes defects in transcription and cell cycle progression. **Biol Chem**, v. 281, n. 52, p. 40330-40, 2006.

GARCÍA, D.G; STEIN, R. Genetics of Dyslipidemia. **Arq Bras Card**, v. 106, n. 5, p. 434-438, 2016.

GARNIER, Y., et al. Differences of microparticle patterns between sickle cell anemia and hemoglobin SC patients. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. 0177397, 2017.

GEARD, A., et al. Genetics of Sickle Cell-Associated Cardiovascular Disease: An Expert Review with Lessons Learned in Africa. **OMICS : a Journal of Integrative Biology**, v.20, n. 10, p. 581–592, 2016.

GIARDINE, B., et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 1063–1069, 2014.

GIBBONS, G.F; WIGGINS, D. The enzymology of hepatic very-low-density lipoprotein assembly. **Biochem Soc Trans**, v. 23, n. 3, p. 495-500, 1995.

GILL, F.M., et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*, v. 86, p. 776–783, 1995.

GILLI, S.C.O., et al. LDH and age are associated with hemolysis-endothelial dysfunction in HbSC patients. ***Blood Cells, Molecules and Diseases***, v. 59, p. 119–123, 2016.

GOFMAN, J.W; DELALLA, O, GLAZIER, F., et al. The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease. ***J Clin Lipidol***, v. 1, n. 2, p. 104-14, 2007.

GOLDSTEIN, D.B. Common genetic variation and human traits. ***N Engl J Med***, v. 360, n.17, p. 1696-8, 2009.

GONZALES, J.C., et al . Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. ***J Clin Invest***, v. 123, n. 6, p. 2742–51, 2013.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P., et al. Angiotensin-like protein 4/ fasting-induced adipose factor by human adipocytes. ***J Nutrigenet Nutrigenomics***, v. 4, n. 3, p. 146-53, 2011.

GOTTO – JR, A.M. Prognostic and therapeutic significance flow levels of high-density lipoprotein cholesterol: current perspectives. ***Arch Intern Med***, v. 159, p. 1038-1040, 1999.

GOUNI-BERTHOLD, I., et al. Regulation of mitogen-activated protein kinase cascades by low density lipoprotein and lysophosphatidic acid. ***Cell Physiol Biochem***, v. 14, n. 3, p. 167-176, 2004.

GRAY, N.E., et al Angiotensin-like 4 (Angpt4) protein is a physiological mediator of intracellular lipolysis in murine adipocytes. ***J. Biol. Chem***, v. 287, n. 11, p. 8444–8456, 2012.

GRUNDY, S.M. Consensus statement: Role of therapy with “statins” in patients with hypertriglyceridemia. ***Am J Cardiol***, v. 81, n. 4A, p. 1B-6B, 1998.

GUALANDRI, Valter et al. AIMilano apoprotein identification of the complete kindred and evidence of a dominant genetic transmission. ***American journal of human genetics***, v. 37, n. 6, p. 1083, 1985.

GUALANDRO, S.F.M., et al. Cohort study of adult patients with haemoglobin SC disease: clinical characteristics and predictors of mortality. **British Journal of Haematology**, v. 171, p. 631–637. doi: 10.1111/bjh.13625, 2015.

GUARDIOLA, M., et al. APOA5 variants predispose hyperlipidemic patients to atherogenic dyslipidemia and subclinical atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 240 p. 98-104, 2015.

GUO, L., et al. Role of Angptl4 in vascular permeability and inflammation. **Inflamm Res**, v. 63, n. 1, p. 13-22, 2014.

HABARA A, STEINBERG MH. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Exp Biol Med.**, v. 241, n. 7, p. 689–96, 2016.

HAHNE P., et al. Determinants of plasma apolipoprotein A-V and APOA5 gene transcripts in humans. **J. Intern. Med**, v. 264, n. 5, p. 452–462, 2008.

HAMAD Z., et al. UGT1A1 promoter polymorphism associated with serum bilirubin level in Saudi patients with sickle cell disease. **Ann Saudi Med.** , v. 33, n. 4, p. 372-6, 2013.

HARDY, J; SINGLETON, A. Genome wide association studies and human disease. **N Engl J Med**, v. 360, n.17, p.1759-68, 2009.

HAVASI, Viktória et al. Apolipoprotein A5 gene promoter region T-1131C polymorphism associates with elevated circulating triglyceride levels and confers susceptibility for development of ischemic stroke. **Journal of molecular neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 177-183, 2006.

HAY, D.,ATOYEBI, W. Update on sickle cell disease.**British Journal of Hospital Medicine**, v. 77, N. 4, p. C55-C59, 2016.

HEBBEL R.P., et al. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. **J Clin Invest**, v. 65, n. 1, p. 154-60, 1980.

HEBBEL, R.P.,OSAROGIAGBON, R., KAUL, D. The Endothelial Biology of Sickle Cell Disease: Inflammation and a Chronic Vasculopathy.**Microcirculation**, New York, v. 11, p.129–151, 2004.

HEENEY, M.M., et al. GT1A promoter polymorphisms influence bilirubin response to hydroxyurea therapy in sickle cell anemia. **J Lab Clin Med.**, v. 141, n. 4, p. 279-82, 2003.

HEGELE, R.A. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 2, p. 109-121, 2009.

HELKIN, A., et al. Dyslipidemia Part 1—Review of Lipid Metabolism and Vascular Cell Physiology. **Vascular and Endovascular Surgery**, v. 50, n. 2, p. 107 – 118, 2016.

HELMIG, S., et al. TNF- α -308 genotypes are associated with TNF- α and TGF- β_1 mRNA expression in blood leucocytes of humans. **Cytokine**, v. 53, n. 3, p. 306-10, 2011.

HIGGS, D.R., et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 306, n. 24, p. 1441–1446, 1982.

HIGGS, D.R.; WOOD, W.G. Genetic complexity in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, n. 33, p. 11595–11596, 2008.

HOPPE, C., et al. A novel multilocus genotyping assay to identify genetic predictors of stroke in sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, v. 114, n.3, p. 718–20, 2001.

HOPPE, C., et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke**, v. 38, n. 8, p. 2241–6, 2007.

HOPPE, C., et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2391–6, 2004.

HORVATOVICH, K., et al. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in obese pediatric patients. **Int J Pediatr Obes**, v. 6, n. 2-2, p. 318-25, 2011.

HSU, L.L., et al. Alpha Thalassemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 25, n. 8, p. 622-8, 2003. disponível em: <http://www.internationalgenome.org/>, acessado em 19 de janeiro de 2018.

HUBACEK, J.A. Apolipoprotein A5 fifteen years anniversary: Lessons from genetic epidemiology. **Gene**, v. 592, n. 1, p. 193-199, 2016.

HUSSAIN, M. A. M., et al. Value of serum ferritin estimation in sickle cell anaemia. **Archives of Disease in Childhood**, v. 53, p. 319-321, 1978.

JANUÁRIO, J.N. **Incidência da doença falciforme em um milhão de nascidos vivos em Minas Gerais (1998-2001)**. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, p. 124. 2002.

JASON, K., et al. Sickle Cell Lung Disease and Sudden Death: A Retrospective/Prospective Study of 21 Autopsy Cases and Literature Review. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 28, n. 2, p. 168-172, 2007.

JEE, Kathleen et al. Expression of the angiogenic mediator, angiopoietin-like 4, in the eyes of patients with proliferative sickle retinopathy. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0183320, 2017.

JELLINGER, Paul S. et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology guidelines for management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. **Endocrine Practice**, v. 23, n. s2, p. 1-87, 2017.

JOLY, P., et al. G6PD deficiency and absence of α -thalassemia increase the risk for cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. **Eur J Haematol**, v. 96, n. 4, p. 404-8, 2016.

JUN, J.E., et al. ApoB/ApoA-I ratio is independently associated with carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus with well-controlled LDL cholesterol levels. **Korean J Intern Med.**, v. 33, n. 1, p. 138-147, 2018.

KALHAN, T.G., et al., Effect of red blood cell storage time on markers of hemolysis and inflammation in transfused very low birth weight infants. **Pediatric Research**, v. 82, n. 6, p. 964–969, 2017.

KATHIRESAN, S., et al. A genome-wide association study for blood lipid phenotypes in the Framingham Heart Study. **BMC Med Genet**, v. 8, n.1, 2007.

KATHIRESAN, S., et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. **Nat Genet.**, v. 40, n. 2, p. 189–197, 2008.

KATO G. J., et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2279-2285, 2006a.

KATO, G. J., et al. Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. **Am J Hematol**, v. 81, n. 7, p. 503-10, 2006b.

KATO, G.J; GLADWIN, M.T. Evolution of novel small-molecule therapeutics targeting sickle cell vasculopathy. **Journal of the American Medical Association**, v. 300, p. 2638–2646, 2008.

KATO, G.J; GLADWIN, M.T; STEINBERG, M.H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev**, v. 21, n. 1, p. 37-47, 2007.

KATO, Gregory J. et al. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **American journal of hematology**, v. 84, n. 9, p. 618-625, 2009.

KAVECANSKY, J; SCHROEDER, F; JOINER, C.H. Deoxygenation-induced alterations in sickle cell membrane cholesterol exchange. **Am J Phys**, v. 269, p. C1105–11, 1995.

KEENAN ,T.E; RADER, D.J. Genetics of Lipid Traits and Relationship to Coronary Artery Disease. **Curr Cardiol Rep**, v. 15, n.9, p. 396, 2013.

KERSTEN, S., et al Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. **J Biol Chem**, v. 275, n. 37, p. 28488-93, 2000.

KESSE-ADU, R., HOWARD, J. Inherited anaemias: sickle cell and thalassaemia. **Medicine**, v. 41, n. 4, p. 219-224, 2013.

KHURANA, M; SILVERSTEIN, M.D. Etiology and management of dyslipidemia in children with chronic kidney disease and end-stage renal disease. **Pediatr Nephrol**, v. 30, n. 12, p. 2073-2084, 2015.

KIM, J.Y., et al. Association of apolipoprotein A-V concentration with apolipoprotein A5 gene -1131T>C polymorphism and fasting triglyceride levels. **J. Clin. Lipidol**, v. 7, p. 94–101, 2013.

KLEIN, J. A. N.; SATO, Akie. The HLA system. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 10, p. 702-709, 2000.

KOLIWAD, S.K., et al. ANGPTL4, fasting-induced adipose factor is a direct glucocorticoid receptor target and participates in glucocorticoid-regulated triglyceride metabolism. **J Biol Chem**, v. 284, n. 38, p. 25593-601, 2009.

KRAUSS, R. M. What can the genome tell us about LDL cholesterol? **Lancet**, v. 371, p. 450–452, 2008.

KUMAR, P., et al. Association between Tumor Necrosis Factor- α (-238G/A and -308G/A) Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke: A Meta-Analysis. **Pulse**, v. 3, n. 3-4, p. 217-228, 2015.

KUTLAR, A. Sickle Cell Disease: A Multigenic Perspective of a Single-Gene Disorder. **Med Princ Pract**, v.14, n.1, p. 15 –19,2005.

KVALØY, Kirsti et al. Genetic effects on longitudinal changes from healthy to adverse weight and metabolic status—the HUNT study. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0139632, 2015.

LA PAGLIA, Laura et al. Potential role of ANGPTL4 in the cross talk between metabolism and cancer through PPAR signaling pathway. **PPAR research**, v. 2017, 2017.

LABIE, D., et al. Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 2111–2114, 1985.

L'ACQUA, Camilla et al. Red blood cell transfusion is associated with increased hemolysis and an acute phase response in a subset of critically ill children. **American journal of hematology**, v. 90, n. 10, p. 915-920, 2015.

LAND, V.V.L., et al. Markers of endothelial dysfunction differ between subphenotypes in children with sickle cell disease. **Thrombosis Research**, v. 132, n. 2013, p. 712–717, 2013.

LEMOS, C.G, GUERREIRO, J.F Molecular characterization of sickle cell anemia in the Northern Brazilian state of Pará. **Am J Hum Biol**, v. 22, n. 5, p. 573-7, 2010.

LETTRE, G., et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and β -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 105, n. 33, p. 11869-11874, 2008.

LETTRE, G; BAUER D.E . Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies. **Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2554-64, 2016.

LI, S., et al. Influences of APOA5 Variants on Plasma Triglyceride Levels in Uyghur Population. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. 110258, 2014.

LICHTENSTEIN, L., et al. Angpt4 upregulates cholesterol synthesis in liver via inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 11, p. 2420-7, 2007.

LIGTHART, S; VAEZ, A; HSU, Y-H., et al. Bivariate genome-wide association study identifies novel pleiotropic loci for lipids and inflammation. **BMC Genomics**, v. 17, n. 443, 2016.

LIONNET, F., et al. Hemoglobin SC disease complications: a clinical study of 179 cases. **Haematologica**, v. 97, n. 8, p. 1136-1141, 2012.

LIPOWSKY, Herbert H.; CHIEN, Shu. Role of Leukocyte- Endothelium Adhesion in Affecting Recovery from Ischemic Episodes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 565, n. 1, p. 308-315, 1989.

LIU, L., et al. Original Research: A case-control genome-wide association study identifies genetic modifiers of fetal hemoglobin in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 7, p. 706-718, 2016.

LUCHTMAN-JONES L., et al. Effects of hydroxyurea treatment for patients with hemoglobin SC disease. **Am J Hematol.**, v. 91, n. 2, p. 238-42, 2016.

LUND-KATZ, S; PHILLIPS, M.C. High Density Lipoprotein Structure–Function and Role in Reverse Cholesterol Transport. **Subcell biochem**, v. 51, p. 183-227, 2010.

LUSIS, A. J. Genetic factors affecting blood lipoproteins: the candidate gene approach. **J. Lipid Res**, v. 29, p. 397–429, 1988.

LUX, S.E., JOHN, K.M., KARNOVSKY, M.J. Irreversible Deformation of the Spectrin-Actin Lattice in Irreversibly Sickled Cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 58, p. 955-963, 1976.

LUZ, P.L., et al. Hight ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. **Clinics**, v. 64, p.427-32, 2008.

LYRA, I.M. et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 21, n. 4, p. 1287-1290, 2005.

MAKANI, J. et al. Sickle cell disease: new opportunities and challenges in Africa. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

MANKELOW, T.J., et al. The ins and outs of reticulocyte maturation revisited: The role of autophagy in sickle cell disease. **Autophagic Punctum**, v. 12, n. 3, p. 590–591, 2016.

MANOLOVA, I., et al. Polymorphisms in TNFA and IL10 gene promoters and risk of rheumatoid arthritis in bulgarian population. **Trakia Journal of Sciences**, v. 13, n. 2, p. 16-20, 2015.

MANSI, I.A; ROSNER, F. Myocardial infarction in sickle cell disease. **J Natl Med Assoc**, v. 94, n. 6, p. 448-52, 2002.

MARTINS, P.R.J; MORAES, S.H; SILVEIRA, T.B. Morbimortalidade em doença falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n. 5, p. 378-383, 2010.

MARZOUKI , Z.M; KHOJA, S.M. Plasma and red blood cells membrane lipid concentration of sickle cell disease patients. **Saudi Med J**, v. 24, n. 4, p. 376-9, 2003.

MATTIJSEN, F; KERSTEN, S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1821, n. 5, p. 782–789, 2012.

MCGANN, P.T., Sickle cell anemia: an underappreciated and unaddressed contributor to global childhood mortality. **The Journal of Pediatrics**, v. 165, n. 1, p. 18-22, 2014.

MCLAUGHLIN, T., et al. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. **Ann Intern Med**, v. 139, n. 10, p. 802-809, 2003.

MCQUEEN, AE., et al. The C-terminal fibrinogen-like domain of angiopoietin-like 4 stimulates adipose tissue lipolysis and promotes energy expenditure. **J Biol Chem**, v. 292, n. 39, p. 16122- 16134, 2017.

MERCHED, AJ; CHAN, L. Nutrigenetics and Nutrigenomics of Atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, v. 15, n. 6, p. 328, 2013.

MIRANDA, J.A., et al. The effects of endothelial nitric oxide synthase tagSNPs on nitrite levels and risk of hypertension and obesity in children and adolescents. **Journal of Human Hypertension**, v. 29, p. 109–114, 2015.

MIRHAFEZ, S.R.,. Et al. Zinc Finger 259 Gene Polymorphism rs964184 is Associated with Serum Triglyceride Levels and Metabolic Syndrome. **Int J Mol Cell Med Winter**, v. 5, n., 1, 2016.

MODELL, B., DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived servisse Indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, n. 6, p. 480–487, 2008.

MOKONDJIMOBÉ, E., et al. Évaluation Du profil lipoprotéique et du risque athérogène chez les drépanocytaires homozygotes et hétérozygotes de Brazzaville. **Ann Biol Clin**, v. 70, n. 2, p. 183-8, 2012.

MONNET, D., et al. Lipid, apolipoprotein AI and B levels in Ivorian patients with sickle cell anaemia. **Annales de biologie clinique**, v. 54, p. 285–8, 1996.

MORRIS, C.R., et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. **JAMA**, v. 294, n. 1, p. 81-90, 2005.

- MOZZARELLI, A., HOFRICHTER, J., EATON, W.A. Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo. **Science**, v. 237, n. 4814, p. 500-6, 1987.
- MUENDLEIN, A., et al. Angiopoietin-like protein 4 significantly predicts future cardiovascular events in coronary patients. **Atherosclerosis**, v. 237, p. 632-638, 2014.
- NAGEL, R.L; FABRY,M.E; STEINBERG, M.H. The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Reviews**, v. 17, p. 167–178, 2003.
- NAGEL, R.L; STEINBERG M. H. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. **Pediatr Pathol Mol Med**, v. 20, n. 2, p. 123-36, 2001.
- NGOGANG, Jeanne et al. Erythrocyte and plasma cholesterol exchange in sickle cell anemia. **Clinica chimica acta**, v. 179, n. 3, p. 295-304, 1989.
- NICHOLLS, S; LUNDMAN, P. The emerging role of lipoproteins in atherogenesis: beyond LDL cholesterol. **Semin Vasc Med**, v. 4, p. 187-195, 2004.
- NIESOR, E.J., et al. Adenylyl Cyclase 9 Polymorphisms Reveal Potential Link to HDL Function and Cardiovascular Events in Multiple Pathologies: Potential Implications in Sickle Cell Disease. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 29, p. 563–572, 2015.
- NILSSON, S.K., et al. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. **Atherosclerosis**, v. 219, n. 1, p. 15–21, 2011.
- NNODIM, JK., et al. Plasma lipid profile in sickle cell disease patients in Owerri, Nigeria. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 64–65, 2012.
- NOFER, J.R., et al. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 1, p. 1–16, 2002.
- NORATA, G.D, GRIGORE, L; RASELLI, S., et al. Triglyceride-rich lipoproteins from hypertriglyceridemic subjects induce a proinflammatory response in the endothelium: Molecular mechanisms and gene expression studies. **J Mol Cell Cardiol**, v. 40, n. 4, p. 484-494, 2006.

O'CONNELL, B.J; GENEST, J Jr. High-density lipoproteins and endothelial function. **Circulation**, v. 104, n. 16, p. 1978-1983, 2001.

OHENE- FREMPONG, K., et al. CerebroVascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**, v. 91, n. 1, p. 288-94, 1998.

OIKE, Y; YASUNAG, K; SUDA T. Angiopoietin-related/angiopoietin-like proteins regulate angiogenesis. **Int J Hematol**, v. 80, n. 1, p. 21-8, 2004.

OLIVA, I., et al. APOA5 genetic and epigenetic variability jointly regulate circulating triacylglycerol levels. **Clin Sci (Lond)**, v. 130, n. 22, p. 2053-2059, 2016.

ONAT, A., et al. Plasma triglycerides, an independent predictor of cardiovascular disease in men: a prospective study based on a population with prevalent metabolic syndrome. **Int J Cardiol**, v. 108, n. 1, p. 89-95, 2006.

ORKIN, S.H. Recent advances in globin research using genome-wide association studies and gene editing. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1368. n. 1, p. 5-10, 2016.

OZTAS, Y.E., et al. Hypocholesterolemia is associated negatively with hemolysate lipid peroxidation in sickle cell anemia patients. **Clin Exp Med.**, v. 11, n. 3, p. 195-8, 2011.

OZTAS, Yesim; UNAL, Selma; OZGUNES, Nuriman. Plasma Protein Oxidation and Triglyceride Levels in Sickle Cell Anemia. **American Society of Hematology**, v. 114, 2009.

OZTURK, O.H., et al. Lipoprotein Subfraction Profile and HDL-Associated Enzymes in Sickle Cell Disease Patients. **Lipids**, v. 48, p. 1217–1226, 2013.

PACHKORIA, K., et al. Analysis of IL-10, IL-4 and TNF- α polymorphisms in drug-induced liver injury (DILI) and its outcome. **J Hepatol**, v. 49, n. 1, p. 107-14, 2008.

PAKBAZ, Z., et al. Serum ferritin underestimates liver iron concentration in transfusion independent thalassemiapatient as compared to regularly transfused thalassemia and sickle cell patients. **Pediatr Blood Cancer**, v. 49, n. 3, p. 329-32, 2007.

PANDEY S., et al. Genotypic influence of α -deletions on the phenotype of Indian sickle cell anemia patients. **Korean J Hematol**, v. 46, n. 3, p. 192-5, 2011.

PARRA, E.J., et al. Admixture Mapping in Two Mexican Samples Identifies Significant Associations of Locus Ancestry with Triglyceride Levels in the BUD13/ZNF259/APOA5 Region and Fine Mapping Points to rs964184 as the Main Driver of the Association Signal. Ed. Tesfaye B. Mersha. **PLOS ONE**, v. 12, n.2 ,p. 0172880, 2017.

PATHARE, A., et al. Cytokines in sickle cell disease. **Hematology**, v. 8, n. 5, p. 329-37, 2003.

PECKER, L.H; SCHAEFER, B.A; LUCHTMAN, J.L. Knowledge insufficient: the management of haemoglobin SC disease. **British Journal of Haematology**, v. 176, n. 4, p. 515–526, 2017.

PENNACCHIO, L.A., et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. **Science**, v.294, n. 5540, p. 169–173, 2001.

PENNACCHIO, L.A., et al. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. **Hum. Mol. Genet**, v. 11, n. 24, p. 3031–3038, 2002.

PIEL, F.B., STEINBERG, M.H., REES, D.C. Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, p. 302-305, 2017.

PLATT, O.S. Preventing Stroke in Sickle Cell Anemia. **N Engl J Med**, v. 353, p. 2743-2745, 2005.

PLATT, O.S., et al., Mortality in Sickle Cell Disease Life expectancy and risk factors for early death. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 23, p. 1639-1644, 1994.

PRASSL, R. Human low density lipoprotein: the mystery of core lipid packing. **J Lipid Res**, v. 52, n. 2, p. 187-188, 2011.

QUINN, C.T. Clinical severity in sickle cell disease: the challenges of definition and prognostication. **Experimental Biology and Medicine**, 241, p. 679–688, 2016.

RAHIMI, Z., et al. Plasma lipids in Iranians with sickle cell disease: hypocholesterolemia in sickle cell anemia and increase of HDL cholesterol in sickle cell trait. **Clin Chim Acta**, v. 365, p. 217–220, 2006.

- RAHIMI, Z; VAISI-RAYGANI, A; POURMOTABBED, T. Association between apolipoprotein ϵ 4 allele, factor V Leiden, and plasma lipid and lipoprotein levels with sickle cell disease in southern Iran. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 2, p. 703-710, 2011.
- RAKYAN, Vardhman K. et al. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nature Reviews Genetics*, v. 12, n. 8, p. 529, 2011.
- RAMASAMY, I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. **Clin Chem Lab Med**, v. 52, p. 1695-727, 2014.
- RAMASAMY, I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. **Clinica Chimica Acta**, v.454, n. 1-2, p. 143-185, 2016.
- RAMOS, J.T., et al Mortalidade por doença falciforme em estado do nordeste brasileiro. **R. Enferm. Cent. O. Min**, v. 5, n. 2, p. 1604-1612, 2015.
- RAPP, Joseph H. et al. Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 14, n. 11, p. 1767-1774, 1994.
- REAVEN, G. Metabolic Syndrome Pathophysiology and Implications for Management of Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 106, p. 286-288, 2002.
- REED, W; VICHINSKY, E.P. New considerations in the treatment of sickle cell disease. **Annu Rev Med**, v. 49, p. 461-74, 1998.
- REES, D.C., GIBSON, J.S.. Biomarkers in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 156, n. 4, p. 433–445, 28 de Novembro de 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2011.08961.x/epdf>. Acesso em: 15 de dezembro de 2017.
- REES, D.C., WILLIAMS, T.N., GLADWIN, M.T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, n., p.2018–31, 2010.
- REFERENCE SNP (refSNP) Cluster Report: rs116843064. **HapMap**. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=116843064&pt=1FyvK3X9GNBjQ

OYRKTgKcprR4vteGZcyavN7LTSKTRBBCEO4Qj0>. Acesso em: 05 de março de 2018.

REFERENCE SNP (refSNP) Cluster Report: rs1800629. **HapMap**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800629&pt=1XsMSCLtR3OqAFa7cI37-gc8ooBPsyQV_86vGLE0BZ-_zbkI>. Acesso em: 05 de março de 2018.

REFERENCE SNP (refSNP) Cluster Report: rs662799. **HapMap**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=662799&pt=1tScP2OsB2PLjpy2beoeoiywoFjPi-MhUvSDXJLw6ig1Caz>. Acesso em: 05 de março de 2018.

REFERENCE SNP (refSNP) Cluster Report: rs964184. **HapMap**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=964184&pt=1fOIOzr52Wz9bqpV7CVG088XAKVLnmizhAd4ggyWlxBg37e>. Acesso em: 05 de março de 2018.

REN, J., et al. Cardiorespiratory pathogenesis of sickle cell disease in a mouse model. **Scientific Reports**. V. 7, p.8665, 2017.

REZENDE, P.V., et al. Clinical and hematological profile in a newborn cohort with hemoglobina SC. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, 29 de Novembro de 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021755717302449?via%3Dihub>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2018.

RICHARD, S; BILLET, H.H. Liver function tests in sickle cell disease. **Clin Lab Haematol**, v. 24, n. 1, p. 21-7, 2002.

ROBERTS-HAREWOOD, M. Inherited haemolytic Anaemias. **Medicine**, v. 37, n. 3, p. 143-148, 2009.

RODRIGUES, D., et al. Historia da triagem neonatal para doença falciforme no Brasil – capítulo de Minas Gerais. **Rev Med Minas Gerais**, v. 22, n. 1, p. 1-128, 2012.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T.R.; DAY, I. N.M.. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *American Journal of Epidemiology*. Advance Access published on January 6, 2009, DOI 10.1093/aje/kwn359.

ROMEO, S., et al. Genetic variation in ANGPTL4 provides insights into protein processing and function. **J Biol Chem**, v. 284, n. 19, p. 13213-22, 2009b.

ROMEO, S., et al. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 4, p. 513–516, 2007.

ROMEO, S., et al. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 1, p. 70 – 79, 2009a.

ROTHMAN, S.M; FULLING K.H; NELSON J.S. Sickle cell anemia and central nervous system infarction: a neuropathological study. **Ann Neurol**, v. 20, n. 6, p. 684-90, 1986.

RUMANNEY, M.B., et al. The co-inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell anemia is associated with better hematological indices and lower consultations rate in Cameroonian patients and could improve their survival. **Plos One**, v. 9 p. 100516, 2014.

SABARENSE, A.P., et al. Characterization of mortality in children with sickle cell disease diagnosed through the Newborn Screening Program. **J Pediatr**, v. 91, n. 3, p. 242-7, 2015.

SANKARAN VG, ORKIN SH. The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 1, p. a011643–a011643, 2013.

SANKARAN, V.G., et al. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, v. 1214 p. 47–56, 2010.

SARWAR, N; DANESH, J; EIRIKSDOTTIR, G., et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. **Circulation**, v. 115, n. 4, p. 450-458, 2007.

SASAKI, J., et al. Plasma and erythrocyte lipids in sickle cell anaemia. **Clin Lab Haematol**, v. 5, p. 35–44, 1983.

SAXENA, R., et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. **Science**, v. 316, p. 1331–1336, 2007.

SCHECHTER, A.N., Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.

SCHUNKERT, H., et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. **Nat Genet**, v. 43, n. 4, p. 333–338, 2011.

SEIXAS, M.O., et al. Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 91, 2010.

SEIXAS, M.O., et al. Lipoprotein Cholesterol and Triglycerides in Children with steady-state sickle cell anemia. **Blood**, v. 5, n. 2, 2009.

SERJEANT GR. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 350, n. 9079, p. 725–730, 1997.

SERJEANT, B.E; HAYES R.J; SERJEANT, G.R. Effect of alpha thalassaemia on the rheology of homozygous sickle cell disease. **Br. J. Haematol**, v. 55, p. 479–486, 1983.

SERJEANT, G.R; VICHINSKY, E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. **Blood Cells Mol Dis**, v. S1079-9796, n. 17, p. 30123-7, 2017.

SHALEV, H., et al. Hypocholesterolemia in chronic anemias with increased erythropoietic activity. **Am J Hematol**, v. 82, n.3, p. 199-202, 2007.

SHORES, J., et al. Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease. **J Natl Med Assoc**, v. 95, n. 9, p. 813-7, 2003.

SILVA, C.A., et al. Triagem neonatal de hemoglobinopatias no município de São Carlos, São Paulo, Brasil: análise de uma série de casos. **Rev Paul Pediatr**, v. 33, n. 1, p. 19-27, 2015.

SILVA, C.M; GIOVANI, P; VIANA, M.B. High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. **Pediatr Blood Cancer**, v. 56, n. 1, p. 116-21, 2011.

SILVA, H.D., et al. Anemia falciforme e seus aspectos psicossociais: o olhar do doente e do cuidador familiar. **Rev. Cuid**, v. 4, n. 1, p. 475-83, 2013.

SIRTORI, C.R; CALABRESI, L; FRANCESCHINI, G., et al. Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I (Milano) mutant: the Limone sul Garda study. **Circulation**, v. 103, n. 15, p. 1949-1954, 2001.

SMART-HALAJKO, M.C., et al. The relationship between plasma angiopoietin-like protein 4 levels, angiopoietin-like protein 4 genotype, and coronary heart disease risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.30, n.11, p. 2277-82, 2010.

SMITH, Elenoe C.; ORKIN, Stuart H. Hemoglobin genetics: recent contributions of GWAS and gene editing. **Human molecular genetics**, v. 25, n. R2, p. R99-R105, 2016.

SMITH, S.C., et al. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update: endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute. **Circulation**, v. 113, n. 19, p. 2363-2372, 2006.

SNIDERMAN, A.D., et al. Apolipoproteins versus lipids as indices of coronary risk and as targets for statin treatment. **The Lancet**, v. 361, n. 9359, p. 777-780, 2003.

SNIDERMAN, A; VU, H; CIANFLONE, K. Effect of moderate hypertriglyceridemia on the relation of plasma total and LDL apo B levels. **Atherosclerosis**, v. 89, n. 2-3, 1991.

SON, K.Y. et al. Genetic association of APOA5 and APOE with metabolic syndrome and their interaction with health-related behavior in Korean men. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 105, 2015. Disponível em: 10.1186/s12944-015-0111-5, acesso em 22 de Julho de 2017.

SONG, G.G., et al. Association between TNF- α (-308 A/G, -238 A/G, -857 C/T) polymorphisms and responsiveness to TNF- α blockers in spondyloarthritis, psoriasis and Crohn's disease: a meta-analysis. **Pharmacogenomics**, v. 6, n. 12, p. 1427-37, 2015.

SOUPENE, Eric et al. Alterations of lecithin cholesterol acyltransferase activity and apolipoprotein AI functionality in human sickle blood. **Exp Biol Med (Maywood)**, 2016.

SOUPENE, Eric et al. Featured Article: Alterations of lecithin cholesterol acyltransferase activity and apolipoprotein AI functionality in human sickle blood. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 17, p. 1933-1942, 2016.

STEFANUTTI, C; LABBADIA, G; ATHYROS, V.G. Hypertriglyceridaemia, postprandial lipaemia and non-HDL cholesterol. **Curr Pharm Design**, v. 20, n. 40, p. 6238-6248, 2014.

STEINBERG, M.H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **Scientific World Journal**, v. 18, p. 46–67, 2009.

STEINBERG, M.H. Management of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 340, n. 13, p.1021–30, 1999.

STEINBERG, M.H; EMBURY S.H. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood**, v. 68, p. 985–90, 1986.

STEINBERG, M.H; SEBASTIANI, P. Genetic Modifiers of Sickle Cell Disease **Am J Hematol**, v. 87, n. 8, p. 795–803, 2012.

STEINBERG, Martin H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **The Scientific World Journal**, v. 8, p. 1295-1324, 2008.

STEINBRECHER, U. P. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 8, p. 3603-3608, 1987.

STEINER M.J., SKINNER A.C., PERRIN E.M. Fasting might not be necessary before lipid screening: a nationally representative cross-sectional study. **Pediatrics**, v. 128, n. 3, p. 463-70, 2011.

STEJSKAL, D., et al. Angiotensin-like protein 4: development, analytical characterization, and clinical testing of a new ELISA. **Gen Physiol Biophys**, v. 27, n. 1, p. 59-63, 2008.

STOJANOVIC, S.K; LIONNET, F. Lactate dehydrogenase in sickle cell disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 458, p. 99-102, 2016.

STONE, W.L; PAYNE, P.H; ADEBONOJO, F.O. Plasma-vitamin E and low plasma lipoprotein levels in sickle cell anemia patients. **Journal of the Association for Academic Minority Physicians**, v. 1, p. 12–16, 1990.

STUART, M.J; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1343-60, 2004.

SUMMARELL, C.C., SHEEHAN, V.A. Original Research: Use of hydroxyurea and phlebotomy in pediatric patients with hemoglobin SC disease. **Exp Biol Med** (Maywood), v.241, n. 7, p.737-44, 2016.

SURAKKA, I., et al. The impact of low-frequency and rare variants on lipid levels. **Nat Genet**, v. 47, n. 6, p. 589-97, 2015.

SWITZER, J.A., et al. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. **Lancet Neurol**, v. 5, p. 501–512, 2006.

TALMUD, P.J., et al. *ANGPTL4* E40K and T266M Effects on Plasma Triglyceride and HDL Levels, Postprandial Responses, and CHD Risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, p. 2319-2325, 2008.

TAN, A.S., et al. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. **Blood**, v. 98, n. 1, p. 250-1, 2001.

TAN, M.J., et al. Emerging roles of angiopoietin-like 4 in human cancer. **Mol Cancer Res**, v. 10, n. 6, p. 677-88, 2012.

TARER V., et al. Sickle cell anemia in Guadeloupean children: pattern and prevalence of acute clinical events. **Eur J Haematol**, v.76, n. 3, p. 193-9, 2006.

TAYLOR J.G., et al. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with infrequent vasoocclusive pain. **PLoS One**, v. 3, n. 5, 2008.

TEIXEIRA, R.S., et al. Associations between endothelial dysfunction and clinical and laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184076, 2017.

TESLOVICH, T.M., et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. **Nature**, v. 466, n. 7307, p. 707–13, 2010.

TEST, S.T., WOOLWORTH, V.S. Defective Regulation of Complement by the Sickle Erythrocyte: Evidence for a Defect in Control of Membrane Attack Complex Formation. **Blood**, v. 83, n. 3, p. 842-852, 1994.

- TEWARI, S., et al. Environmental determinants of severity in sickle cell disease. **Haematologica**, v. 100, n. 9, p. 1108-116, 2015.
- THEIN, Swee Lay et al. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Human molecular genetics**, v. 18, n. R2, p. R216-R223, 2009.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC (Ed.). **Thermo Fisher Scientific**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>>. Acesso em: 06 mar. 2018.
- TING, H.J., et al. Triglyceride-rich lipoproteins prime aortic endothelium for an enhanced inflammatory response to tumor necrosis factor- α . **Circ Res**, v. 100, n. 3, p. 381-390, 2007.
- TIWARI, S; SIDDIQI, S.A. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, p. 1079-1086, 2012.
- TORRES, L.S., et al. Frequencies of -308G/A (TNFA) and -509C/T (TGFB1) polymorphisms in sickle cell anemia patients from Brazil. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 4, p. 6762-6, 2013.
- TUMBLIN, A., et al. Apolipoprotein A-I and serum amyloid A plasma levels are biomarkers of acute painful episodes in patients with sickle cell disease. **Haematologica**, v. 95, n. 9, p. 1467-72, 2010.
- VACCA, V.M.JR., BLANK, L. Sickle cell disease: Where are we now? **Nursing**, V. 47, N. 4, p. 26-34, 2017.
- VAN DE WOESTIJNE, A.P., et al. Rs964184 (APOA5-A4-C3-A1) Is Related to Elevated Plasma Triglyceride Levels, but Not to an Increased Risk for Vascular Events in Patients with Clinically Manifest Vascular Disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e101082, 2014.
- VAN LEEUWEN, E.M., et al. Meta-Analysis of 49 549 Individuals Imputed with the 1000 Genomes Project Reveals an Exonic Damaging Variant in ANGPTL4 Determining Fasting TG Levels. **J Med Genet**, v. 53, n.7, p.441-449, 2016.
- VANDERJAGT, D.J., et al. Hypocholesterolemia in Nigerian children with sickle cell disease. **J Trop Pediatr**, v. 48, p. 156-161, 2002.

VASAVDA N., et al. The linear effects of alpha-thalassaemia, the UGT1A1 and HMOX1 polymorphisms on cholelithiasis in sickle cell disease. **Br J Haematol.**, v. 138, n. 2, p. 263–70, 2007.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu Rev Immunol**, v. 1, p. 411-52, 1992.

VICARI, P., et al. Absence of association between TNF-alpha polymorphism and cerebral large-vessel abnormalities in adults with sickle cell anemia. **Acta Haematol**, v. 125, n. 3, p.141–4, 2011.

VODNALA, D; RUBENFIRE, M; BROOK, R.D. Secondary causes of dyslipidemia. **Am J Cardiol**, v. 110, n. 6, p. 823-825, 2012.

WALLDIUS, G; JUNGNER, I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy – a review of the evidence. **Journal of Internal Medicine**, v. 259, p. 493–519, 2006.

WAN AHMAD, W.N.H., et al. Low Serum High Density Lipoprotein Cholesterol Concentration is an Independent Predictor for Enhanced Inflammation and Endothelial Activation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0116867, 2015.

WANG, B; TRAYHURN, P. Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. **Pflugers Arch**, v. 452, n. 4, p. 418-27, 2006.

WANG, H., et al. Paradoxical Protection from Atherosclerosis and Thrombosis in a Mouse Model of Sickle Cell Disease. **British journal of haematology**, v. 162, n. 1, p. 120–129, 2013.

WANG, Y., et al. The APOA5 rs662799 Polymorphism Is Associated with Dyslipidemia and the Severity of Coronary Heart Disease in Chinese Women. **Lipids in Health and Dis**, v. 15, n. 170, 2016.

WARE, R.E., et al. Sickle cell disease. **Lancet**, v. 390, p. 311–23, 2017.

WATERWORTH, D.M., et al. Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30 n. 11, p. 2264-76, 2010.

WEATHERALL, D.J. Hemoglobinopathies Worldwide: Present and Future. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 592-599, 2008.

WEATHERALL, D.J. The challenge of haemoglobinopathies in resource-poor countries. **Br J Haematol**, v.154, n. 6, p. 736–744, 2011.

WESTERMAN, R.A., et al. Plasticity of motor reinnervation in the kitten. **Neural growth and Differentiation**, New York, p. 397-432, 1979.

WILLER, C.J; SCHMIDT, E.M; SENGUPTA, S. et al. Discovery and Refinement of Loci Associated with Lipid Levels. **Nature genetics**, v. 45, n. 11, p. 1274-1283, 2013.

WILSON, A.G., et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Acad Sci U S A** , v. 94, n. 7, p. 3195–3199, 1997.

WITZTUM, J.L; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? **Trends Cardiovasc Med**, v. 11, n. 3-4, p. 93–102, 2001.

WUN, T., et al. Platelet activation and aggregates in patients platelet-erythrocyte with sickle cell anemia. **J Lab Clin Med**, Sacramento, California, v. 129, n. 5, p.507-516, 1997.

XAVIER, H.T., et al. [V Brazilian Guidelines onDyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis]. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 4 Suppl 1, p. 1-20, 2013.

XYDAKIS, A.M; BALLANTYNE, C.M. Role of non-high-density lipoprotein in cholesterol in prevention of cardiovascular disease: updated evidence from clinical trials. **Curr OpinCardiol**, v. 18, n. 6, p. 503-509, 2003.

YASSIN, M., et al. Liver Iron Content (LIC) in Adults with Sickle Cell Disease (SCD): Correlation with Serum Ferritin and Liver Enzymes Concentrations in Trasfusion Dependent (TD-SCD) and Non- Transfusion Dependent (NT-SCD) Patients. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, 20 de Junho de 2017, disponível em: <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2017.037>, acesso em 01 de janeiro de 2018.

YAWN B.P., et al. Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. **Jama**, v. 312, n. 10, p. 1033-48. 2014.

YESIM , O.E., et al. Hypocholesterolemia is associated negatively with hemolysate lipid peroxidation in sickle cell anemia patients. **Clinical and Experimental Medicine**, v.11, n. 3, p.195-198, 2011.

YU, X.H.,at al. Foam cells in atherosclerosis. **Clin Chim Acta**, v. 424, p. 245-252, 2013.

YUAN, C., et al. Identical gene regulation patterns of T3 and selective thyroid hormone receptor modulator GC-1. **Endocrinology**, v. 153, n. 1, p. 501–511, 2012.

YUDITSKAYA, S., et al. Proteomic identification of altered apolipoprotein patterns in pulmonary hypertension and vasculopathy of sickle cell disease. **Blood**, v. 113, n.5, p. 1122-1128, 2009.

YUSUF, S., et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **Lancet**, v. 364, p. 937-52, 2004.

ZAGO, M.A; PINTO, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

ZHANG, D., et al. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v. 127, n. 7, p.801-9, 2016.

ZHAO, R; MA, X; SHEN, G.X. Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells induced by oxidized very low density lipoproteins. **Mol Cell Biochem**, v. 317, n. 1-2, p. 197-204, 2008.

ZHOU, S., et al. Association study of *BUDI3-ZNF259* gene rs964184 polymorphism and hemorrhagic stroke risk. **Int J Clin Exp Med**,v. 8, n. 12, p. 22503-22508, 2015 disponível em: www.ijcem.com /ISSN:1940-5901/IJCEM0016028, 2015, acesso em 23 de setembro de 2017.

ZHU, P., et al. Angiopoietin- like 4: a decade of research. **Biosci**, v. 32, n. 3, p. 211–219, 2012.

ZHU, Wei-fen et al. Triglyceride-raising APOA5 genetic variants are associated with obesity and non-HDL-C in Chinese children and adolescents. **Lipids in health and disease**, v. 13, n. 1, p. 93, 2014.

ZORCA, S., et al. Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. **Br J Haematol**, v. 149, n. 3, p. 436–445, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A: TCLE

Apêndice B: TCLE Biorrepositório

Apêndice C: TALE

Apêndice D: TALE Biorrepositório

Apêndice E: Formulário

Apêndice F: Formulário

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(No caso do responsável pelo menor)

O menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar do projeto de pesquisa “Estudos diagnóstico e avaliativo de biomarcadores de dislipidemias em indivíduos com doença falciforme (genótipos HbSS e HbSC) acompanhados nos Hemocentros de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas”. Neste projeto pretendemos realizar pesquisa de dados no prontuário, exames de laboratório e exames clínicos e medidas do corpo. O motivo que nos leva a desenvolver este projeto é que queremos saber se a quantidade de gorduras, a taxa de glicose e a de proteína (albumina) estão relacionadas à doença falciforme; se você tem também a alfa-talassemia (uma outra forma de anemia hereditária) além da doença falciforme e se algum quadro clínico apresentado está relacionado a estes exames.

Para este projeto adotaremos os seguintes procedimentos: a partir do prontuário do menor nós iremos coletar os dados pessoais, clínicos e exames de laboratório já realizados para o menor sob sua responsabilidade e montar banco de dados para facilitar as análises. Também precisaremos coletar do menor 2 mL de sangue em um tubo e 10 mL em outro tubo. O primeiro tubo será utilizado para separar o material genético, o DNA, e fazer estudos genéticos. O segundo tubo será utilizado para as análises de gorduras e proteínas do sangue. Os exames para diagnóstico das gorduras serão feitos a cada quatro meses com pelo menos três dosagens no período de 18 meses. Precisaremos também realizar uma picada no dedo para tirar uma gota de sangue e dosar a glicose em jejum. Medidas corporais também precisarão ser realizadas tais como: pressão, peso, altura, e dobras cutâneas. O exame dos vasos sanguíneos da cabeça, chamado Doppler Transcraniano cerebral, será realizado para avaliação do risco de acidente vascular cerebral. Estes materiais serão trabalhados no Laboratório de Pesquisa na Universidade Federal de Juiz de Fora – campus Governador Valadares ou da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para estudar o material genético na busca de informações que contribuem para as variações clínicas observadas na doença falciforme.

Para participar deste projeto, o menor sob sua responsabilidade não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, ele tem assegurado o direito à indenização. Ele(a) será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Você, como responsável pelo menor, poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação dele a qualquer momento. A participação dele é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador que irá tratar a identidade do menor com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade. O menor não será identificado em nenhuma publicação.

Este projeto apresenta risco mínimo. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas, em alguns casos pode acontecer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Poderá haver incomodo no momento da picada no dedo. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, esta mesma amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. Na coleta de medidas do corpo será necessário estar sem sapatos para medir e pesar e suspender a blusa para as medidas de dobras cutâneas. Estas medidas serão feitas em sala reservada na presença do responsável pelo menor. O risco de quebra de confidencialidade será minimizado com a utilização de códigos alfanuméricos para identificar as amostras coletadas, e as informações retiradas dos prontuários e os resultados da pesquisa incluídos no banco de dados estarão em um único computador com acesso protegido por senha onde somente os pesquisadores terão acesso.

Em relação aos benefícios deste projeto podemos citar: os resultados genéticos da análise de alfa-talassemia, dosagem de lipídios e glicose e do doppler e as medidas do corpo serão anexados ao seu prontuário para que o médico tenha acesso a estes dados e possa utilizá-los para alterar ou não a conduta no tratamento da doença falciforme. De forma indireta estes resultados da pesquisa poderão beneficiar outras pessoas pois poderão trazer conhecimentos para modificar o tratamento ou até mesmo a orientação nutricional.

Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada a pesquisa. O nome ou o material que indique a participação do menor não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos.

Se outra pesquisa for realizada com este sangue ou com o DNA nós entraremos em contato com você para pedir autorização.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Declaração de consentimento

Eu, _____,
portador(a) do documento de Identidade _____, responsável pelo menor

nascido em ___/___/___ com idade de _____ anos*, prontuário _____,
residente no endereço (Rua/Av) _____ Nº.
_____ complemento _____ Bairro _____ Cidade
_____ (MG), fone de contato () _____ fui
informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei
que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar a decisão do menor sob minha
responsabilidade de participar, se assim o desejar.

Declaro que concordo com a participação do menor. Recebi uma via original deste termo de consentimento
livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Local: _____, data: ___ de _____ de 20____.

Assinatura do(a) Responsável

Assinatura do(a) Pesquisador(a)

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

Comitê de Ética em Pesquisa/UFJF

Campus Universitário da UFJF
Pró-Reitoria de Pesquisa
CEP: 36036-900
Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail:
cep.propesq@ufjf.edu.br

**Comitê de Ética em
Pesquisa/Hemominas**

Alameda Ezequiel Dias, 321 – Santa
Efigênia – Belo Horizonte - Minas Gerais.
CEP 30130-110
Fone:(31)3768-4587

Pesquisador Responsável em

GOVERNADOR VALADARES:

CIBELE VELLOSO RODRIGUES
Endereço: Av. Dr. Raimundo Monteiros
Rezende, 330- Centro
CEP: 35010-177 – Governador Valadares/
MG
Fone: (33) 91506745
E-mail: cibelevelloso@ufjf.edu.br

Pesquisador Responsável em UBERABA:

HELIO MORAES DE SOUZA
Av.Frei Paulino, 30 - Bairro Abadia
CEP: 38025-180 Uberaba/MG
Fones: (34)3318-5000
E-mail: helio.moraes@dcm.uftm.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Biorrepositório do material genético)

(No caso do responsável pelo menor)

O menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar do projeto de pesquisa “*Estudos diagnóstico e avaliativo de biomarcadores de dislipidemias em indivíduos com doença falciforme (genótipos HbSS e HbSC) acompanhados nos Hemocentros de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas*”. Neste projeto pretendemos realizar pesquisa de dados no prontuário, exames de laboratório e exames clínicos e medidas do corpo. O motivo que nos leva a desenvolver este projeto é que queremos saber se a quantidade de gorduras, a taxa de glicose e a de proteína (albumina) estão relacionadas à doença falciforme; se você tem também a alfa-talassemia (uma outra forma de anemia hereditária) além da doença falciforme e se algum quadro clínico apresentado está relacionado a estes exames.

Para este projeto adotaremos os seguintes procedimentos: a partir do prontuário do menor nós iremos coletar os dados pessoais, clínicos e exames de laboratório já realizados para o menor sob sua responsabilidade e montar banco de dados para facilitar as análises. Também precisaremos coletar do menor 2 mL de sangue em um tubo e 10 mL em outro tubo. O primeiro tubo será utilizado para separar o material genético, o DNA, e fazer estudos genéticos. Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano **amostra de DNA genômico extraído a partir do sangue** cuja utilização está expressamente vinculada somente a esse projeto de pesquisa. Nesta pesquisa pretendemos analisar o material genético (DNA) para verificar se há alguma variação genética no metabolismo de gorduras que possa estar relacionado aos sintomas da doença falciforme. Também queremos realizar o teste de DNA para verificar se você tem alfa-talassemia (uma outra forma de anemia hereditária) além da doença falciforme e se quadro clínico apresentado está relacionado a esta anemia. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: 2mL de sangue serão coletados para extrair do material genético (DNA) e fazer estudos genéticos. O sangue e o material genético ficarão guardados em tubos, congelados em freezer na temperatura de -30°C e -80°C respectivamente por cinco anos.

Se outra pesquisa for realizada com este sangue ou com o DNA nós entraremos em contato com você para pedir autorização. Ao final da pesquisa, o material biológico humano armazenado no Biorrepositório poderá: a) permanecer armazenado por até cinco anos ou prorrogado por até 10 anos, após autorizado do CEP e se em conformidade com as normas pertinentes do Conselho Nacional de Saúde; b) ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, respeitando-se a sua confidencialidade e autonomia. Você será informado sobre o descarte deste material e de como ele será feito depois de finalizado o projeto ou o encerramento do biorepositório. O descarte dos materiais será feito seguindo um protocolo onde os tubos serão descartados depois de colocados em solução desinfetante e a solução descartada na pia. Os tubos serão encaminhados para o lixo hospitalar. Se uma das Instituições parceiras deste projeto quiser desfazer a parceria, ela irá fazer uma declaração assinada pelo dirigente institucional. O biorepositório ou será encerrado ou transferido para outra Instituição. Nos dois casos você será informado.

Para o menor participar desta pesquisa, **você** deverá autorizar e assinar este termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o menor tem assegurado o direito à indenização. Você será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. A participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador que irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. O menor não será identificado em nenhuma publicação.

Este projeto apresenta risco mínimo. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas, em alguns casos pode acontecer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Poderá haver incômodo no momento da picada no dedo. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, esta mesma amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. O risco de quebra de confidencialidade será minimizado com a utilização de códigos alfanuméricos para identificar as amostras coletadas, e as informações retiradas dos prontuários e os resultados da pesquisa incluídos no banco de dados estarão em um único computador com acesso protegido por senha onde somente os pesquisadores terão acesso.

Em relação aos benefícios deste projeto podemos citar: os resultados genéticos da análise de alfa-talassemia e de outros genes que serão anexados ao seu prontuário para que o médico tenha acesso a estes dados e possa utilizá-los para alterar ou não a conduta no tratamento da doença falciforme. De forma indireta estes resultados da pesquisa poderão beneficiar outras pessoas, pois poderão trazer conhecimentos para modificar o tratamento ou até mesmo a orientação nutricional.

Você, responsável pelo menor, poderá retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, A retirada do consentimento de guarda da amostra biológica humana no biorrepositório, pode ser feita em qualquer tempo, sem prejuízo, com validade a partir da data da comunicação da decisão.

Os resultados estarão à sua disposição quando finalizado. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e instrumentos utilizados no projeto ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos valendo a desistência a partir da data de formalização desta.

Este termo de consentimento de três páginas encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra via será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Declaração de consentimento

Eu, _____, portador(a)
do documento de Identidade _____, responsável pelo menor
_____, nascido
em ___/___/___ com idade de _____ anos*, prontuário _____, residente no
endereço (Rua/Av) _____ Nº.
_____ complemento _____ Bairro _____ Cidade
_____ (MG), fone de contato () _____ fui informado(a)
dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer
momento poderei solicitar novas informações e modificar a decisão do menor sob minha responsabilidade de
participar, se assim o desejar. Declaro que concordo com a participação do menor. Recebi uma via original deste
termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.
_____, _____ de _____ de 20__ .

Nome

Assinatura responsável pelo menor

Data

Nome

Assinatura pesquisador

Data

Nome

Assinatura testemunha

Data

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

Comitê de Ética em Pesquisa/UFJF

Campus Universitário da UFJF

Pró-Reitoria de Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail:

cep.propesq@ufjf.edu.br

Comitê de Ética em Pesquisa/Hemominas

Alameda Ezequiel Dias, 321 – Santa

Efigênia – Belo Horizonte - Minas Gerais.

CEP 30130-110

Fone:(31) 3768-4587

Pesquisador Responsável em

GOVERNADOR VALADARES-UFJF:

CIBELE VELLOSO RODRIGUES

Endereço: Av. Dr. Raimundo Monteiro

Rezende, 330- Centro

CEP: 35010-177 – Governador Valadares/

MG

Fone: (33) 91506745

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

Pesquisador Responsável em UBERABA-

UFTM:

HELIO MORAES DE SOUZA

Av.Frei Paulino, 30 - Bairro Abadia

CEP: 38025-180 Uberaba/MG

Fones: (34)3318-5000

E-mail: helio.moraes@dcm.uftm.edu.br

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Anuência do participante da pesquisa, criança, adolescente ou legalmente incapaz).

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

Nós precisamos coletar seu nome, endereço e outros dados seus que seu médico escreveu no prontuário, Também precisaremos coletar um pouco do seu sangue para fazer estudos. O sangue precisa ser coletado uma vez a cada quatro meses durante o período de 18 meses (um ano e 6 meses). Medidas do seu corpo também precisarão ser realizadas tais como: pressão, peso, altura, e da pele do braço. Um exame da cabeça chamado Doppler Transcraniano cerebral, também precisará ser realizado.

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

Este projeto apresenta pouco risco . A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas, em alguns casos pode acontecer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Poderá haver incômodo no momento da picada no dedo. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, esta mesma amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. Na coleta de medidas do corpo será necessário estar sem sapatos para medir e pesar e suspender a blusa para as medidas de dobras cutâneas Estas medidas serão feitas em sala reservada na presença de seu responsável.

O risco de quebra de confidencialidade será diminuído com a utilização de códigos alfanuméricos para identificar as amostras coletadas, e as informações retiradas dos prontuários e os resultados da pesquisa incluídos no banco de dados estarão em um único computador com acesso protegido por senha onde somente os pesquisadores terão acesso.

Em relação aos benefícios deste projeto podemos citar: os resultados poderão ajudar o seu médico a tratar melhor a doença falciforme; pode trazer benefícios para outras pessoas que como você tem doença falciforme.

Os resultados estarão à disposição do seu responsável. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e instrumentos utilizados no projeto ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos.

Se outra pesquisa for realizada com este sangue ou com o DNA nós entraremos em contato com seu responsável para pedir autorização.

Este termo de consentimento de duas páginas encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Declaração de consentimento

Eu, _____,
portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento),
nascido em ___/___/___ com idade de _____ anos, prontuário
_____, residente no endereço (Rua/Av)
_____ Nº. _____
complemento _____ Bairro _____ Cidade
_____ (MG), fone de contato () _____ fui informado
(a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas.
Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá
modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável
já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi uma via deste termo de
assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Local: _____, data: ___ de _____ de 20 ____.

Assinatura do (a) menor

Assinatura do (a) pesquisador (a)

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

**CEP - Comitê de Ética em
Pesquisa/UFJF**

Campus Universitário da UFJF
Pró-Reitoria de Pesquisa
CEP: 36036-900

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

**CEP - Comitê de Ética em
Pesquisa/Hemominas**

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

CEP 30130-110

Fone:(31) 3768-4587

**Pesquisador Responsável em
GOVERNADOR VALADARES-
UFJF:**

CIBELE VELLOSO RODRIGUES
Endereço: Av. Dr. Raimundo
Monteiros Rezende, 330- Centro
CEP: 35010-177 – Governador
Valadares/ MG
Fone: (33) 91506745
E-mail:
cibele.velloso@ufjf.edu.br

**Pesquisador Responsável em
UBERABA-UFTM:**

HELIO MORAES DE SOUZA
Av.Frei Paulino, 30 - Bairro
Abadia
CEP: 38025-180 Uberaba/MG
Fones: (34)3318-5000
E-mail:
helio.moraes@dcm.uftm.edu.br

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Anuência do participante da pesquisa, criança, adolescente ou legalmente incapaz).

(Biorrepositório do material genético)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar do projeto de pesquisa “*Estudos diagnóstico e avaliativo de biomarcadores de dislipidemias em indivíduos com doença falciforme (genótipos HbSS e HbSC) acompanhados nos Hemocentros de Governador Valadares e de Uberaba da Fundação Hemominas*”. Neste projeto pretendemos realizar pesquisa de dados no prontuário, exames de laboratório e exames clínicos e medidas do corpo. O motivo que nos leva a desenvolver este projeto é que queremos saber se a quantidade de gorduras, a taxa de glicose e a de proteína (albumina) estão relacionadas à doença falciforme; se você tem também a alfa-talassemia (uma outra forma de anemia hereditária) além da doença falciforme e se algum quadro clínico apresentado está relacionado a estes exames.

Para este projeto adotaremos os seguintes procedimentos: com os dados do prontuário nós iremos coletar seus dados pessoais, clínicos e exames de laboratório já realizados e montar banco de dados para facilitar as análises. Também precisaremos coletar 2 mL de sangue em um tubo e 10 mL em outro tubo. O primeiro tubo será utilizado para separar o material genético, o DNA, e fazer estudos genéticos. Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano **amostra de DNA genômico extraído a partir do seu sangue** cuja utilização é somente para este projeto de pesquisa. Nesta pesquisa pretendemos analisar algumas partes do seu sangue chamado DNA para conhecer mais sobre a doença falciforme. Também queremos realizar o teste de DNA para verificar se você tem alfa-talassemia (uma outra doença) além da doença falciforme. Para esta pesquisa nós precisamos colher um pouco do seu sangue. Deste sangue nós iremos tirar o DNA. O sangue coletado ficará armazenado congelado num freezer na temperatura de -30°C e o material genético (DNA) será guardado no freezer na temperatura de -80°C por 5 anos no biorepositório. Seu responsável será informado sobre o descarte deste material após finalizado o projeto e de como ele será feito.

Para participar desta pesquisa, **o responsável por você** deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Você será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. **O responsável por você** poderá retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório.

A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador que irá tratar a sua identidade com sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação.

Este projeto apresenta pouco risco. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas, em alguns casos pode acontecer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Poderá haver incômodo no momento da picada no dedo. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, esta mesma amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta.

Em relação aos benefícios deste projeto podemos citar: os resultados poderão trazer benefícios para outras pessoas que tem doença falciforme.

Os resultados estarão à sua disposição quando finalizado. Os resultados genéticos da análise de alfa-talassemia, dosagem de lipídios e glicose e do Doppler e as medidas do corpo serão informados se houver alterações significativas seu responsável será orientado a buscar o médico. Seu nome ou o material que



indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e instrumentos utilizados no projeto ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos.

Se outra pesquisa for realizada com este sangue ou com o DNA nós entraremos em contato com seu responsável para pedir autorização.

Este termo de consentimento de três páginas encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Declaração de consentimento

Eu, _____,
portador(a) do documento de Identidade _____, nascido em ___/___/___ com
idade de _____ anos*, prontuário _____, residente no endereço
(Rua/Av) _____ Nº.
_____ complemento _____ Bairro _____
Cidade _____ (MG), fone de contato () _____
fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas
dúvidas. E o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o
consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa.
Recebi uma via deste termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas
dúvidas.

_____ de _____ de 20 .

Nome	Assinatura do menor	Data

Nome	Assinatura pesquisador	Data

Nome	Assinatura testemunha	Data

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

Comitê de Ética em Pesquisa/UFJF

Campus Universitário da UFJF
Pró-Reitoria de Pesquisa
CEP: 36036-900
Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail:
cep.propesq@ufjf.edu.br

Comitê de Ética em Pesquisa/Hemominas

Alameda Ezequiel Dias, 321 – Santa
Efigênia – Belo Horizonte - Minas
Gerais.
CEP 30130-110
Fone:(31) 3768-4587

Pesquisador Responsável em

GOVERNADOR VALADARES:
CIBELE VELLOSO RODRIGUES
Endereço: Av. Dr. Raimundo
Monteiros Rezende, 330- Centro
CEP: 35010-177 – Governador
Valadares/ MG
Fone: (33) 91506745
E-mail: cibelevelloso@ufjf.edu.br

Pesquisador Responsável em UBERABA:

HELIO MORAES DE SOUZA
Av.Frei Paulino, 30 - Bairro Abadia
CEP: 38025-180 Uberaba/MG
Fones: (34)3318-5000
E-mail:
helio.moraes@dcm.uftm.edu.br

BANCO DE DADOS CLÍNICO**IDENTIFICAÇÃO**

Q.1 [] [] [] / [] [] [] [] [] N° na pesquisa (n° do Hemocentro + n° sequencial do participante)

Q.1.2 [] [] [] Hemocentro 01. Uberaba 02. Governador Valadares

Q.1.3 [] [] [] [] [] [] [] [] Iniciais do nome do sujeito da pesquisa

Q.1.4 [] [] [] [] [] [] [] [] [] N° do prontuário

Q.1.5. [] [] Diagnóstico 1. HbSS 2. HbSC 3. Outro. Qual? _____

Q.2 [] [] [] / [] [] [] / [] [] [] [] [] [] [] [] Data de nascimento

Q2.1. Gênero [] [] 1- Masculino 2- Feminino

Q2.2. Uso da Hidroxiureia [] [] 1- sim 2- não

Q2.3. [] [] [] / [] [] [] / [] [] [] [] [] [] [] [] Data de início uso da Hidroxiureia

DADOS CLÍNICOS

0- ausente

1- presente

7 – não informa

31/12/1900 – data não informada

Q.3 [] [] Convulsão

Datas da ocorrência – informar as mais recentes

Q.3.1 ____ / ____ / ____ Q.3.2 ____ / ____ / ____ Q.3.3 ____ / ____ / ____ Q.3.4 ____ / ____ / ____

Q.3.5 número total de ocorrências [] []

Q3.6.Observações _____

Q.4 [] [] Crise aplástica -- informar as mais recentes

Datas da ocorrência - informar as mais recentes

Q.4.1 ____ / ____ / ____ Q.4.2 ____ / ____ / ____ Q.4.3 ____ / ____ / ____ Q.4.4 ____ / ____ / ____

Q.4.5 número total de ocorrências [] []

Q4.6.Observações _____

Q.5 [] [] Crises algicas (especificar somente eventos que necessitam de hospitalização e os períodos)

Datas da ocorrência- informar as mais recentes

Q.5.1 ____ / ____ / ____ Q.5.2 ____ / ____ / ____ Q.5.3 ____ / ____ / ____ Q.5.4 ____ / ____ / ____

Q.5.5 número total de ocorrências [] []

Q5.6 Observações _____

Q.6 [] Dactilite (síndrome mão-pé)

Datas da ocorrência – informar as mais recentes

Q.6.1 ____/____/____ Q.6.2 ____/____/____ Q.6.3 ____/____/____ Q.6.4 ____/____/____

Q.6.5 número total de ocorrências [] []

Q.6.6 Observações _____

0- ausente

1- presente

7 – não informa

31/12/1900 – data não informada

Q.7 [] Diabetes mellitus

Q.7.1 [] 1. Tipo 1 2. Tipo 2 3. sem classificação

Q.7.1 Data do diagnóstico ____/____/____

Q.7.2 Observações _____

Q.8 [] Doença cerebrovascular

Datas da ocorrência de AVC isquêmico clínico - informar as mais recentes

Q.8.1 ____/____/____ Q.8.2 ____/____/____ Q.8.3 ____/____/____ Q.8.4 ____/____/____

Q.8.2 número total de ocorrências [] []

Q.8.3. Observações _____

Datas da ocorrência de AIT (ataque isquêmico transitório) - informar as mais recentes

Q.8.4 ____/____/____ Q.8.5 ____/____/____ Q.8.6 ____/____/____ Q.8.7 ____/____/____

Q.8.8 número total de ocorrências [] []

Q.8.9. Observações _____

Q.9 [] Doença hepática obstrutiva

Datas da ocorrência de cálculo – informar as mais recentes:

Q.9.1 ____/____/____ Q.9.2 ____/____/____ Q.9.3 ____/____/____ Q.9.4 ____/____/____

Q.9.5 número total de ocorrências [] []

Q.9.6 Observações _____

Q.10 [] Doença renal crônica

Q.10.1 Data do diagnóstico ____/____/____

Q.10.2 Observações _____

0- ausente

1- presente

7 – não informa

31/12/1900 – data não informada

Q.11 **Esplenectomia (retirada do baço)**

Q.11.1 Data do evento ____/____/____

Q.11.2 Observações _____
_____**Q.12** **Hipotireoidismo**

Q.12.1 Data do diagnóstico ____/____/____

Q.12.2 Observações _____
_____**Q.13** **Meningite**

Q.13.1 Data do diagnóstico ____/____/____

Q.13.2 Observações _____
_____**Q.14** **Priapismo**

Datas da ocorrência – informar as mais recentes

Q.14.1 ____/____/____ Q.14.2 ____/____/____ Q.14.3 ____/____/____ Q.14.4 ____/____/____

Q.14.5 número total de ocorrências [] []

Q.14.6 Observações _____
_____**Q.15** **Seqüestro esplênico agudo**

Datas da ocorrência– informar as mais recentes

Q.15.1 ____/____/____ Q.15.2 ____/____/____ Q.15.3 ____/____/____ Q.15.4 ____/____/____

Q.15.5 número total de ocorrências [] []

Q.15.6 Observações _____
_____**Q.16** **Síndrome Torácica Aguda**

Datas da ocorrência– informar as mais recentes

Q.16.1 ____/____/____ Q.16.2 ____/____/____ Q.16.3 ____/____/____ Q.16.4 ____/____/____

Q.16.5 número total de ocorrências [] []

Q.16.6 Observações _____
_____**Q.17** **Úlcera de perna**

Datas da ocorrência– informar as mais recentes

Q.17.1 ____/____/____ Q.17.2 ____/____/____ Q.17.3 ____/____/____ Q.17.4 ____/____/____

Q.17.5 número total de ocorrências [] []

Digitação dos dados no banco _____ realizada por:

1ª _____ data ____/____/____ e 2ª _____ data ____/____/____

Q17.6 Observações _____

REGIME DE TRANSFUSÃO

Incluir as datas no quadro abaixo a partir de janeiro de 2015

Q.18.1 ____/____/____	Q.18.7 ____/____/____	Q.18.13 ____/____/____
Q.18.2 ____/____/____	Q.18.8 ____/____/____	Q.18.14 ____/____/____
Q.18.3 ____/____/____	Q.18.9 ____/____/____	Q.18.15 ____/____/____
Q.18.4 ____/____/____	Q.18.10 ____/____/____	Q.18.16 ____/____/____
Q.18.5 ____/____/____	Q.18.11 ____/____/____	Q.18.17 ____/____/____
Q.18.6 ____/____/____	Q.18.12 ____/____/____	Q.18.18 ____/____/____

EXAMES PARA RISCO OU OCORRÊNCIA DE DCV

0- não realizado 1- realizado 7 – não informa 31/12/1900 – data não informada

Q.20 Teste de Doppler Transcraniano

Q.20.1 Data do ultimo exame ____/____/____

Q.20.2 Resultado dado pela velocidade média máxima nos segmentos arteriais (Vmm/seg):

ACM*e:	ACM*d:
Bif*e:	Bif*d:
ACAe:	ACAd:
ACPe:	ACPd:
ACI*e:	ACI*d:
A BASILAR:	

Q 20.3 Classificação de acordo com estudo STOP : []

1- indeterminado, 2- risco baixo, 3- condicional baixo, 4- condicional alto, 5- risco alto.

Q.21 Ressonância Nuclear Magnética (RNM angioRNM) do encéfalo

Q.21.1 Data do exame do ultimo exame ____/____/____

Q.21.2 Resultado _____

Q21.3 Observações _____

Nome do coletor dos dados – coloque as questões que foram coletadas e a data

Nome _____

Questões coletadas _____

Data: ____/____/____

Nome _____

Questões coletadas _____

Data: ____/____/____

Nome _____

Questões coletadas _____

Data: ____/____/____

Digitação dos dados no banco _____ realizada por:

1ª _____ data ____/____/____ e 2ª _____ data ____/____/____

USO DE MEDICAMENTOS/SUPLEMENTOS/VITAMINAS

0- não utiliza	1- utiliza	7 – não informa	31/12/1900 – data não informada	
Nome do Medicamento	Marca/Laboratório	Dose	Data de Início do uso e termino se houver	Observações
Q.22 Ácido fólico []	Q.22.1	Q.22.2	Q.22.3 Q.22.4	Q.22.5
Q.23 Anti-hipertensivos []	Q.23.1	Q.23.2	Q.23.3 Q.23.4	Q.23.5
Q.24 Contraceptivos []	Q.24.1	Q.24.2	Q.24.3 Q.24.4	Q.24.5
Q.25 Corticosteroides []	Q.25.1	Q.25.2	Q.25.3 Q.25.4	Q.25.5
Q.26 Derivados de fibratos [] 1.Gemfibrozil 2.Fenofibrato 3.Cclofibrato	Q.26.1	Q.26.2	Q.26.3 Q.26.4	Q.26.5
Q.27 Hidroxiureia []	Q.27.1	Q.35.2	Q.35.3 Q.35.4	Q.35.5
Q.28 Imunossupressores []	Q.28.1	Q.36.2	Q.36.3 Q.36.4	Q.36.5
Q.29 Inibidores da absorção de colesterol - ezetimiba (Zetia®) []	Q.29.1	Q.37.2	Q.37.3 Q.37.4	Q.37.5
Q.30 Redutores de colesterol (estatinas) [] 1.lovastatina 2.Pravastatina 3.simvastatina 4.fluvastatina 5.atorvastatina	Q.30.1	Q.38.2	Q.38.3 Q.38.4	Q.38.5

0- não utiliza

1- utiliza

7 – não informa

31/12/1900 – data não informada

Nome do Medicamento	Marca/Laboratório	Dose	Data de Início do uso e termino se houver	Observações
Q.31 Retrovirais []	Q.31.1	Q.31.2	Q.31.3 Q.31.4	Q.31.5
Q.32 Seqüestradores de ácido biliar [] 1.cholestiramina 2.colestipol 3.colesevelam 4.ácido nicotínico	Q.32.1	Q.32.2	Q.32.3 Q.32.4	Q.32.5
Q.33 Seqüestradores de ferro (quelantes) []	Q.33.1	Q.33.2	Q.33.3 Q.33.4	Q.33.5
Q.34 Vitamina B12 []	Q.34.1	Q.34.2	Q.34.3 Q.34.4	Q.34.5

Nome do coletor dos dados – coloque as questões que foram coletadas e a data

Nome _____

Questões coletadas _____

Data: ___/___/____

Nome _____

Questões coletadas _____

Data: ___/___/____

Nome _____

Questões coletadas _____

Data: ___/___/____

Nome _____

Questões coletadas _____

Data: ___/___/____

Digitação dos dados no banco _____ realizada por:

1ª _____ data ___/___/___ e 2ª _____ data ___/___/___

BANCO DE DADOS LABORATORIAL – dados do prontuário
IDENTIFICAÇÃO

Q.1 [] [] [] / [] [] [] [] [] N° na pesquisa (n° do Hemocentro + n° sequencial do participante)

Q.1.2 [] [] [] Hemocentro 01. Uberaba 02. Governador Valadares

Q.1.3 [] [] [] [] [] [] [] [] [] Iniciais do nome do sujeito da pesquisa

Q.1.4 [] [] [] [] [] [] [] [] [] [] N° do prontuário

Q.1.5. [] [] Diagnóstico 1. HbSS 2. HbSC 3.Outro. Qual? _____

Q.2 [] [] [] / [] [] [] / [] [] [] [] [] [] [] Data de nascimento

Q2.1. Gênero [] 1- Masculino 2- Feminino

Q2.2. Uso da Hidroxiureia [] 1- sim 2- não

Q2.3. [] [] [] / [] [] [] / [] [] [] [] [] [] [] Data de início uso da Hidroxiureia

ORIENTAÇÕES - as médias serão feitas no programa de entrada de dados

 - Se o paciente fizer uso da **Hidroxiureia preencher antes e depois do uso os dados**

 - **Desprezar** exames após **60 dias das transfusões sanguíneas ou eventos clínicos significativos** (crise algica, infecção grave, sequestro esplênico agudo, crise aplástica e síndrome torácica aguda).

0- não realizado

1- realizado

7 - não informa

31/12/1900 – data não informada

Exame laboratorial	Resultados ANTES DA HIDROXIUREIA		Observações
	Data	Valores c/ unidade	
Q.3 Hemoglobina Total [] []	Q.3.1	Q.3.2	Q.3.3
	Q.3.4	Q.3.5	Q.3.6
	Q.3.7	Q.3.8	Q.3.9
Q.4 HCM [] []	Q.4.1	Q.4.2	Q.4.3
	Q.4.4	Q.4.5	Q.4.6
	Q.4.7	Q.4.8	Q.4.9
Q.5 VCM [] []	Q.5.1	Q.5.2	Q.5.3
	Q.5.4	Q.5.5	Q.5.6
	Q.5.7	Q.5.8	Q.5.9
Q.6 Hb fetal -HbF [] []	Q.6.1	Q.6.2	Q.6.3
	Q.6.4	Q.6.5	Q.6.6
	Q.6.7	Q.6.8	Q.6.9
Q.7 Contagem total de leucócito -LG [] []	Q.7.1	Q.7.2	Q.7.3
	Q.7.4	Q.7.5	Q.7.6
	Q.7.7	Q.7.8	Q.7.9
Q.8 Contagem de reticulócitos -RT [] []	Q.8.1	Q.8.2	Q.8.3
	Q.8.4	Q.8.5	Q.8.6
	Q.8.7	Q.8.8	Q.8.9
Q.9 Contagem absoluta de neutrófilos -SEG [] []	Q.9.1	Q.9.2	Q.9.3
	Q.9.4	Q.9.5	Q.9.6
	Q.9.7	Q.9.8	Q.9.9
Q.10 Contagem absoluta de monócitos M [] []	Q.10.1	Q.10.2	Q.10.3
	Q.10.4	Q.10.5	Q.10.6
	Q.10.7	Q.10.8	Q.10.9

Contagem Linfócitos

Digitação dos dados no banco _____ realizada por:

1ª _____ data ____ / ____ / ____ e 2ª _____ data ____ / ____ / ____

0- não realizado 1- realizado 7 - não informa 31/12/1900 – data não informada

Exame laboratorial	Resultados ANTES DA HIDROXIUREIA		Observações
	Data	Valores c/ unidade	
Q.11 Contagem de plaquetas -PQ []	Q.11.1	Q.11.2	Q.11.3
	Q.11.4	Q.11.5	Q.11.6
	Q.11.7	Q.11.8	Q.11.9
Q.12 Dosagem de Ferro []	Q.12.1	Q.12.2	Q.12.3
	Q.12.4	Q.12.5	Q.12.6
	Q.12.7	Q.12.8	Q.12.9
Q.13 Dosagem de ferritina []	Q.13.1	Q.13.2	Q.13.3
	Q.13.4	Q.13.5	Q.13.6
	Q.13.7	Q.13.8	Q.13.9
Q.14 Dosagem da Transferrina []	Q.14.1	Q.14.2	Q.14.3
	Q.14.4	Q.14.5	Q.14.6
	Q.14.7	Q.14.8	Q.14.9

xxxxxxxxxxxxxxxx

Exame laboratorial	Resultados APÓS A HIDROXIUREIA		Observações
	Data	Valores c/ unidade	
Q.3 Hemoglobina Total []	Q.3.1	Q.3.2	Q.3.3
	Q.3.4	Q.3.5	Q.3.6
	Q.3.7	Q.3.8	Q.3.9
Q.4 HCM []	Q.4.1	Q.4.2	Q.4.3
	Q.4.4	Q.4.5	Q.4.6
	Q.4.7	Q.4.8	Q.4.9
Q.5 VCM []	Q.5.1	Q.5.2	Q.5.3
	Q.5.4	Q.5.5	Q.5.6
	Q.5.7	Q.5.8	Q.5.9
Q.6 Hb fetal -HbF []	Q.6.1	Q.6.2	Q.6.3
	Q.6.4	Q.6.5	Q.6.6
	Q.6.7	Q.6.8	Q.6.9
Q.7 Contagem total de leucócito-LG []	Q.7.1	Q.7.2	Q.7.3
	Q.7.4	Q.7.5	Q.7.6
	Q.7.7	Q.7.8	Q.7.9
Q.8 Contagem de reticulócitos -RT []	Q.8.1	Q.8.2	Q.8.3
	Q.8.4	Q.8.5	Q.8.6
	Q.8.7	Q.8.8	Q.8.9
Q.9 Contagem absoluta de neutrófilos -SEG []	Q.9.1	Q.9.2	Q.9.3
	Q.9.4	Q.9.5	Q.9.6
	Q.9.7	Q.9.8	Q.9.9

Contagem Linfócitos

0- não realizado 1- realizado 7 - não informa 31/12/1900 – data não informada

Exame laboratorial	Resultados APÓS A HIDROXIUREIA		Observações
	Data	Valores c/ unidade	
Q.10 Contagem absoluta de monócitos []	Q.10.1	Q.10.2	Q.10.3
	Q.10.4	Q.10.5	Q.10.6
	Q.10.7	Q.10.8	Q.10.9
Q.11 Contagem de plaquetas-PQ []	Q.11.1	Q.11.2	Q.11.3
	Q.11.4	Q.11.5	Q.11.6
	Q.11.7	Q.11.8	Q.11.9
Q.12 Dosagem de Ferro []	Q.12.1	Q.12.2	Q.12.3
	Q.12.4	Q.12.5	Q.12.6
	Q.12.7	Q.12.8	Q.12.9
Q.13 Dosagem de ferritina []	Q.13.1	Q.13.2	Q.13.3
	Q.13.4	Q.13.5	Q.13.6
	Q.13.7	Q.13.8	Q.13.9
Q.14 Dosagem da transferrina []	Q.14.1	Q.14.2	Q.14.3
	Q.14.4	Q.14.5	Q.14.6
	Q.14.7	Q.14.8	Q.14.9

GENOTIPAGEM DE ALFA-TALASSEMIA

Q16. Teste de alfa-talassemia [] 0- não realizado 1- realizado

Q16.1. Resultado do genótipo: []

Genótipo Deleção Alfa 3.7 1 – uma deleção, genótipo: $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 2 - duas deleções, genótipo: $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	Genótipo Deleção alfa 4.2 3 – uma deleção, genótipo: $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 4 - duas deleções, genótipo: $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{4.2}$	Genótipo Duplo heterozigoto Deleções Alfa3.7 e alfa4.2 5 - $-\alpha^{4.2}/-\alpha^{3.7}$ []
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------

Nome do coletor dos dados – coloque as questões que foram coletadas e a data

 Nome _____
 Questões coletadas _____
 Data: ___/___/____

 Nome _____
 Questões coletadas _____
 Data: ___/___/____

 Nome _____
 Questões coletadas _____
 Data: ___/___/____

 Nome _____
 Questões coletadas _____
 Data: ___/___/____

Digitação dos dados no banco _____ realizada por:

1ª _____ data ___/___/___ e 2ª _____ data ___/___/___