



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MARIA LUISA PRADELLA NOGUEIRA

**Genotipagem do polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* em
pacientes do Hemoap diagnosticados com anemia ferropriva**

**Macapá
2018**

MARIA LUISA PRADELLA NOGUEIRA

**Genotipagem do polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* em
pacientes do Hemoap diagnosticados com anemia ferropriva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Deyse de Souza
Dantas

Co-orientador: Prof. Dr. Madson Ralide
Fonseca Gomes

**Macapá
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Mara Patrícia Corrêa Garcia CRB2/1248

616.15

N778g Nogueira, Maria Luisa Pradella

Genotipagem do polimorfismo A1298C do gene MTHFR em
pacientes do HEMOAP diagnosticados com anemia ferropriva /
Maria Luisa Pradella Nogueira ; orientadora, Deyse de Souza
Dantas ; co-orientador, Madson Ralide Fonseca Gomes. –
Macapá, 2018.

27 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do
Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Poliformismo. 2. Gene MTHFR. 3. Homocisteína. 4. Anemia
ferropriva. I. Dantas, Deyse de Souza, orientadora. II. Gomes,
Madson Ralide Fonseca, co-orientador. III. Fundação Universidade
Federal do Amapá. IV. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Maria Luisa Pradella Nogueira

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Deyse De Souza Dantas

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes



Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes / Presidente
Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá,
UNIFAP.



Prof. Dr. Rafael Lima Resque / Membro Titular
Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá,
UNIFAP.



Prof^a. Dr^a. Mayara Tânia Pinheiro / Membro Titular
Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá,
UNIFAP.

Data: 11/07/2018

*Dedico este trabalho à minha mãe,
Rosalina Pradella, pelo amor, carinho,
força e apoio no decorrer de toda
a minha trajetória acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela proteção na realização deste sonho. Ao meu pai Jairo de Castro Nogueira e à minha mãe Rosalina Pradella pelo estímulo ao conhecimento e ao crescimento profissional. Ao Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá (Hemoap) que sempre foi parceiro e solícito para a realização deste sonho, em particular à Dra. Márcia Munhoz, Dra. Luciane Quadros, Rosângela Souza, Silvio Mendes, Aldenilson Lobato Pinheiro, Simone Silva e Mylner Oliveira Fermiano De Souza pelo apoio e estímulo oferecido.

Aos professores da Unifap Prof. Dr. Rafael Lima Resque, Profa Dra Lílian Solon, Prof. Dr. Emerson Augusto Castilho Martins e sua orientanda Jemima Cordeiro Messias Malcher Miranda. Quero principalmente e especialmente agradecer à Profa Dra Artemis Socorro do Nascimento Rodrigues e aos seus alunos pelo grande apoio dado, auxiliando-me em um momento de dificuldade na realização da metodologia com a disponibilização de tempo e materiais.

À Professora Dra. Deyse de Souza Dantas, pelo aceite de orientação, tempo dedicado e por ter contribuindo no meu crescimento profissional. Minha especial gratidão. Ao professor Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes, pela coorientação, pelo apoio em momentos difíceis, pelas cobranças de prazos e tudo mais. Vocês são parte desta vitória!

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A INFLUÊNCIA DA CISTEÍNA NA REGULAÇÃO DOS NÍVEIS DE FERRO NO ORGANISMO.....	3
1.2 O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA ANEMIA FERRORPIVA E O POLIMORFISMO DO GENE <i>MTHFR</i>	4
2 OBJETIVOS	6
2.1 OBJETIVO GERAL.....	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	7
3.2 TIPO DE ESTUDO.....	7
3.3 ANÁLISES MOLECULARES.....	7
3.3.1 População Amostral.....	7
3.3.2 Amostras Biológicas.....	8
3.3.3 Extração do DNA.....	8
3.3.4 PCR e sequências de <i>primers</i> utilizados.....	8
3.3.5 Eletroforese e visualização dos fragmentos de DNA.....	9
3.4 APLICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO.....	9
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4.1 RESULTADOS MOLECULARES.....	10
4.2 RESULTADOS HEMATOLÓGICOS.....	11
4.3 RESULTADOS SOCIOECONÔMICOS.....	12
4.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	12
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	15
REFERÊNCIAS	16
ANEXOS E APÊNDICES	19

LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

Tabela 1 - Resultado da genotipagem dos 42pacientes com anemia ferropriva.....	10
Tabela 2 - Comparação dos indivíduos com e sem polimorfismo A1298C do gene <i>MTHFR</i> nos pacientes e grupo controle.....	10
Tabela 3 - Renda Familiar Mensal.....	12
Tabela 4 - Nível de Escolaridade.....	12
Quadro 1 - Sequências dos fragmentos dos <i>primers</i> utilizados com os repectivos tamanhos e temperaturas.....	8
Quadro 2 - Resultados do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), ferro sério (Fe), ferritina e saturação da transferina (ST) verificados no hemograma dos pacientes.....	11
Figura 1 - Metabolismo da Homocisteína.....	2
Figura 2 - Estrutura Molecular do Centro Fe-S.....	3
Figura 3 - Ligação IRP-IRE.....	4
Figura 4 - Eletroforese de 10 pacientes com polimorfismo A1298C do gene <i>MTHFR</i> , sendo todos heterozigotos(AC).....	11

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	19
ANEXO B - Termo de Assentimento.....	21
ANEXO C - Termo de Anuência.....	23
ANEXO D - Parecer Consubstanciado do CEP.....	24
APÊNDICE 1 - Questionário socioeconômico.....	27

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

cAcn	Aconitase Citosólica
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
Fe	Ferro
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HEMOAP	Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá
IRE	Elemento de Resposta ao Ferro
IRP	Proteína Reguladora do Ferro
MTHFR	Metileno-tetra-hidrofolato redutase
S	Enxofre
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THF	Tetra-hidrofolato
VCM	Volume Corpuscular Médio

Genotipagem do polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* em pacientes do HEMOAP diagnosticados com anemia ferropriva

RESUMO

Introdução: As anemias, caracterizadas pela baixa concentração dos níveis de hemoglobina, são causadas por diversos fatores. A anemia ferropriva é a mais comum e afeta especialmente crianças e adolescentes, mulheres em idade fértil e gestantes devido às altas exigências de ferro. A *MTHFR* ajuda a manutenção do pool de folato e metionina, evitando o acúmulo de homocisteína. Pacientes com níveis elevados de homocisteína apresentam uma ampla gama de características clínicas. A cisteína é uma proteína derivada do metabolismo da homocisteína e tem relação com a regulação do ferro no organismo. **Objetivo:** Assim, o objetivo é identificar o polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* nos pacientes com anemia ferropriva, comparando com os dados socioeconômicos. **Metodologia:** Analisamos o polimorfismo genético das amostras sanguíneas dos doadores de sangue que fizeram parte do grupo controle e dos pacientes com anemia ferropriva do HEMOAP através das técnicas de PCR e eletroforese. Também aplicamos um questionário socioeconômico. O mesmo questionário foi aplicado ao grupo controle e aos dos pacientes que concordaram participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras e os dados hematológicos dos pacientes foram obtidos mediante a autorização do HEMOAP com a assinatura do Termo de Anuência. **Resultados e Discussão:** Em um total de 42 pacientes, 21 (50%) tiveram o genótipo AC, 5 (12%) genótipo CC e 16 (38%) genótipo normal AA. Em relação aos dados socioeconômicos, a maioria dos pacientes apresentou baixa renda familiar e com nível de escolaridade de até o ensino médio concluído. **Conclusão:** Através dos resultados das análises moleculares e a comparação com os dados dos questionários apresentados nas tabelas, pode-se concluir que o polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* e as características sociais e econômicas podem contribuir no desenvolvimento da anemia ferropriva.

Palavras-Chave: Polimorfismo; gene *MTHFR*; perfil socioeconômico; homocisteína; anemia ferropriva.

Agradecimentos: HEMOAP e UNIFAP

Genotyping of A1298C polymorphism of the *MTHFR* gene in HEMOAP patients diagnosed with iron deficiency anemia

Introduction: Anemia, characterized by low concentration of hemoglobin levels, is caused by several factors. Iron deficiency anemia is the most common and especially affects children and adolescents, women of childbearing age and pregnant women due to the high iron requirements. *MTHFR* helps maintain the pool of folate and methionine, avoiding the accumulation of homocysteine. Patients with elevated levels of homocysteine have a wide range of clinical features. Cysteine is a protein derived from the metabolism of homocysteine and is related to the regulation of iron in the body. **Objective:** To identify the A1298C polymorphism of the *MTHFR* gene in patients with iron deficiency anemia, compared with socioeconomic data. **Methods:** We analyzed the genetic polymorphism of the blood samples from the blood donors who were part of the control group and the patients with HEMOAP iron deficiency anemia through PCR and electrophoresis techniques. We also applied a socioeconomic questionnaire. The same questionnaire was applied to the control group and to the patients who agreed to participate in the study through the signing of the Informed Consent Term. Samples and hematological data of the patients were obtained by authorization of HEMOAP with the signature of the Term of Consent. **Results and Discussion:** In a total of 42 patients, 21 (50%) had the AC genotype, 5 (12%) CC genotype and 16 (38%) normal AA genotype. Regarding the socioeconomic data, the majority of the patients presented low family income and with education level up to high school completed. **Conclusion:** Through the results of the molecular analyzes and the comparison with the questionnaire data presented in the tables, it can be concluded that the A1298C polymorphism of the *MTHFR* gene and the social and economic characteristics may contribute to the development of iron deficiency anemia.

Keywords: Polymorphism; *MTHFR* gene; socioeconomic profile; homocysteine; iron deficiency anemia.

Acknowledgements: HEMOAP and UNIFAP.

1 INTRODUÇÃO

A anemia foi estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), adotando os níveis hemoglobina (Hb) inferiores de 11 g/dL para crianças até 6 anos e gestantes, 12 g/dL para crianças de 6 a 14 anos e mulheres adultas e 13 g/dL para homens adultos (GERMANO, 2002). A etiologia da anemia pode ser dividida em causas agudas ou crônicas (TURNER; BHIMJI, 2018). Causas agudas incluem perda aguda de sangue, radioterapia, infecções e outras causas de hemólise, por exemplo, crises hemolíticas na doença falciforme. As causas crônicas podem ser por perda crônica de sangue, como na menorragia ou no sangramento gastrointestinal (GI), e por deficiências alimentares levando às anemias carenciais com baixo nível de ferro, folato ou vitamina B12. Doenças crônicas, medicamentos e álcool também podem causar anemia (TURNER; BHIMJI, 2018).

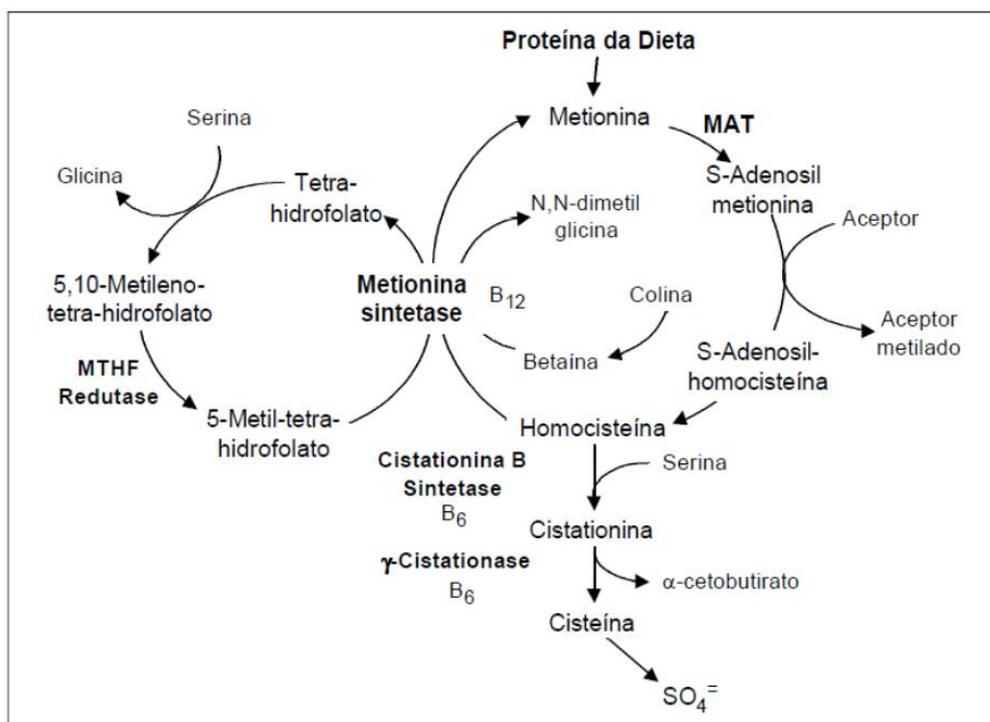
Estima-se que 2 bilhões de pessoas no mundo sofram de deficiência de micronutrientes (CHRISTIAN; STEWART, 2010). A deficiência de ferro é a mais comum e uma preocupação global de saúde, afetando especialmente crianças e adolescentes, mulheres em idade fértil e gestantes devido às altas exigências sanguíneas de ferro (AN; WANG; GUAN et al., 2012). Os sinais e sintomas da anemia refletem a hipóxia tecidual com dores de cabeças, tonturas e fraqueza muscular (SANTANA; COSTA; SILVA et al., 2016). O ferro é um mineral essencial para a produção da molécula de Hb, sendo obtido principalmente da dieta e da reciclagem de hemácias senescentes. A maior parte do ferro inorgânico (Fe^{3+}) é fornecida por vegetais e cereais. A aquisição do ferro na forma heme é proveniente da hemoglobina e mioglobina contidas na carne vermelha (DE FALCO; SANCHEZ; SILVESTRI et al., 2013). Uma dieta normal contém de 13 a 18 mg de ferro, dos quais somente 1 a 2 mg serão absorvidos (GROTTO, 2008).

Assim como na deficiência do ferro, as deficiências de catecolaminas (vitamina B12) e folatos (ácido fólico) causam anemias, além de danos ao sistema nervoso e nas gestantes, risco de má-formação fetal devido à diminuição da síntese proteica (SANTANA; COSTA; SILVA et al., 2016). Estudos sugerem que a deficiência de vitamina B12 pode ser precedida por deficiência de ferro (HERSHKO; RONSON;

SOUROUJON et al., 2018). Em uma dieta ocidental, obtém-se de 5 a 15 mcg de vitamina B12 por dia, mais que a dose diária recomendada de 2 mcg, mas por ser encontrada apenas em ovos, carnes e leite, sua deficiência é comum em vegetarianos e veganos (OH; BROWN, 2003).

O ácido fólico está presente no feijão, frutas e vegetais. A diminuição da síntese proteica devido ao déficit de folatos pode ocorrer por diversos fatores, como: aumento do consumo (na amamentação ou gestação) e aumento da perda no uso excessivo de álcool e na ingestão de alguns medicamentos (SANTANA; COSTA; SILVA et al., 2016). O ácido fólico funciona como co-enzima em reações de metilação envolvidas na síntese de purinas e pirimidinas e no metabolismo de aminoácidos. O ciclo de remetilação da homocisteína tem o tetrahydrofolato dietético (THF) como molécula central desta via. A metilação do THF depende da serina (que se converte em glicina); a partir daí, a enzima metileno-tetrahydrofolato redutase MTHFR prepara o composto de folato atual (5,10-metileno-tetrahydrofolato) para doar o grupamento metil (5-metil-THF) à homocisteína gerando a metionina (Figura 1) (BALUZ; DO CARMO; ROSAS, 2002).

Figura 1 – Metabolismo da homocisteína.



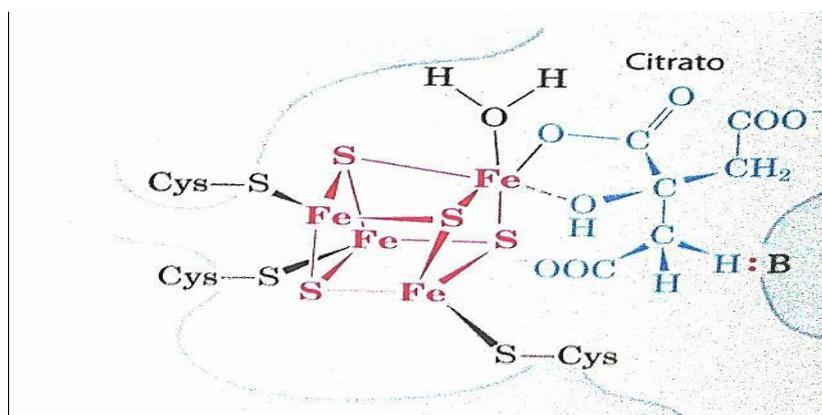
Fonte: Bydlowski et al., 1998.

Durante o ciclo da regeneração de metionina, o THF é recuperado e utilizado para a síntese de timidilato e para a síntese de purina, ambos são formadores do DNA (BALUZ; DO CARMO; ROSAS, 2002). As reações de metilação são influenciadas pela ingestão de folato e vitaminas B12 e B6, e também pelo polimorfismo genético da enzima *MTHFR*, que podem levar à hiper-homocisteinemia e como mecanismo de regulação, a partir da via de transulfuração, a homocisteína será convertida em cistationina, em seguida em α cetoglutarato e cisteína (SELHUB, 1999).

1.1 A INFLUÊNCIA DA CISTEÍNA NA REGULAÇÃO DOS NÍVEIS DE FERRO NO ORGANISMO

Após absorvido, o ferro é armazenado no interior da célula na forma de ferritina ou liberado e distribuído em todo o corpo pela transferrina. Qualquer desequilíbrio na absorção ou distribuição resulta em desordens como hemocromatose ou anemia (GROTTO, 2008; DUPUY; VOLBEDA; CARPENTIER et al., 2006). Um dos mecanismos responsáveis pela regulação do ferro envolve duas proteínas: IRP1 e IRP2 (proteínas reguladoras do ferro) que se ligam aos IREs (elementos de resposta ao ferro). O IRP1 pode se ligar aos IREs ou montar um centro Fe-S e funcionar como uma aconitase citosólica (cAcn), catalisando a conversão de citrato em isocitrato (DUPUY; VOLBEDA; CARPENTIER et al., 2006) que fornece o substrato para a síntese de ácidos graxos e outros processos anabólicos. O centro Fe-S possui quatro átomos ferro e quatro de enxofre, onde três resíduos de cisteína (Cys) da enzima se ligam com três átomos ferro e um quarto ferro está ligado a um dos grupos carboxil do citrato (Figura 2) (NELSON; COX, 2014).

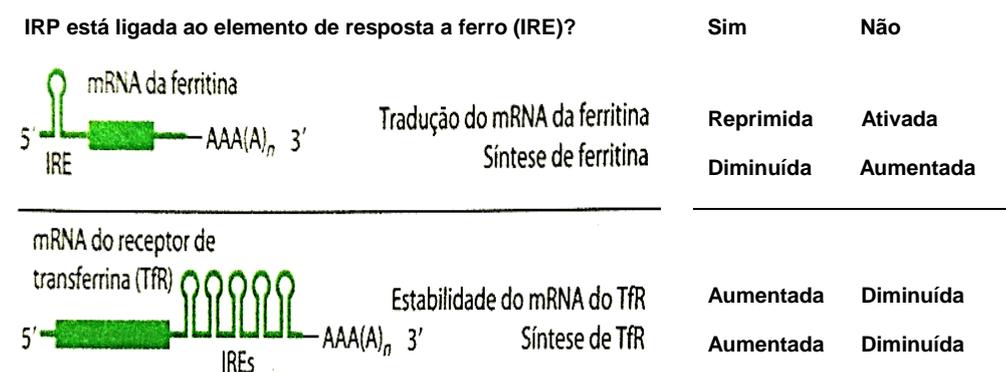
Figura 2 – Estrutura molecular do centro Fe-S DA cAcn.



Fonte: Nelson; Cox, 2014.

As proteínas IRP1 e IRP2 se ligam em regiões estruturais dos IREs localizadas nas extremidades 3' e 5' dos mRNA (Figura 3). Quando ligadas às sequências IRE da região 5' não traduzida do mRNA da ferritina, as IRP bloqueiam a síntese de ferritina; quando ligadas às sequências IRE da região 3' não traduzida do mRNA do receptor de transferrina, as IRP estabilizam o mRNA, impedindo sua degradação e possibilitando a síntese de mais cópias da proteína receptora. Assim, em células com deficiência de ferro, a captação de ferro torna-se mais eficiente e o armazenamento de ferro (ligado a ferritina) é reduzido. Quando a concentração de ferro retorna aos níveis normais, IRP1 é convertida em aconitase, e IRP2 é degradado por proteólise, encerrando a resposta aos baixos níveis de ferro. Portanto a aconitase tem uma função-chave na regulação do ferro (NELSON; COX, 2014).

Figura 3 – Ligação IRP-IRE.



Fonte: Nelson; Cox, 2014.

1.2 O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA ANEMIA FERROPIVA E O POLIMORFISMO DO GENE *MTHFR*

A anemia ferropriva apresenta característica semelhante com as talassemias, anemia de doença crônica, anemia sideroblástica e envenenamento por chumbo, pois como todas costumam apresentar microcitose (VCM baixo) e hipocromia (diminuição de HCM e CHCM), ocorre dificuldade no diagnóstico diferencial por apresentarem valores hematológicos semelhantes (VICARIL; FIGUEIREDO, 2010). Portanto, a diferenciação e a identificação das anemias devem ser obtidas também pela realização de exames que avaliam o metabolismo do ferro e ácido fólico e a eletroforese de hemoglobina (MATOS; DUSSE; GOMES et al., 2012).

Outras técnicas como o diagnóstico molecular vêm sendo utilizadas em vários estudos com o objetivo de identificar polimorfismo que podem causar anemias, mutações e polimorfismos genéticos são diferenças na sequência de DNA entre indivíduos (COSTA; GARCIA; COPRESKI, 2007). Polimorfismos na enzima *MTHFR* foram demonstrados em casos de hiper-homocisteinemias, encontrada em muitas doenças hematológicas e tumorais (KANDEL; ROHAN, 2004). Um importante determinante genético da hiper-homocisteinemia é uma mutação comum 677C→T no *MTHFR* e um segundo polimorfismo 1298A→C foi relatado recentemente em famílias com espinha bífida e com na diminuição da atividade nos linfócitos (WEISBERG; JACQUES; SELHUB et al., 2001).

No ano de 2001, Weisberg et al. concluíram que a hiper-homocisteinemia é causada não apenas fatores nutricionais, mas também por polimorfismos no gene *MTHFR*. No mesmo ano Ueland et al. demonstraram que a distribuição de folato alterada de sujeitos com polimorfismo no gene *MTHFR* tem efeitos metabólicos secundários. Friedman et al. concluíram que a mutação A1298C resulta em uma diminuição na atividade da *MTHFR* que é mais pronunciado no polimorfismo homozigoto (CC) do que no heterozigoto (AC) ou no homozigoto sem o polimorfismo (AA). Portanto, verificamos com a presente pesquisa se o polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* e os fatores sociais e econômicos estão causando alterações nos índices hematológicos e desvios na eficácia do tratamento de pacientes do HEMOAP com anemia por deficiência de ferro.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar se o polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* e fatores socioeconômicos estão influenciando no tratamento de pacientes do HEMOAP identificados com anemia ferropriva.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar o polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* tanto em pacientes como em doadores de sangue, através das técnicas de biologia moleculares: PCR e eletroforese;
- b) Comparar os resultados das análises moleculares e do questionário socioeconômico dos pacientes e do grupo controle;
- c) Observar se existe uma relação entre os dados obtidos e os valores hematológicos encontrado nos pacientes com anemia por deficiência de ferro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O referido trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) por meio da Plataforma Brasil, requerendo avaliação da referida pesquisa científica, conforme regulamentação estabelecida pelo Comitê Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP), de número 466/2012. Obteve aprovação a partir do registro de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – CAAE, sob o número 61936616.6.0000.0003, com parecer consubstanciado apresentado no anexo D.

O título do projeto da presente dissertação consta diferente no parecer consubstanciado, pois primeiramente havíamos como um dos objetivos a análise molecular de outro gene que não foi possível devido ao atraso no recebimento dos *primers* necessários a sua realização.

O questionário, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Termo de Assentimento (no caso de menores de idade) foram explicados de forma clara e objetiva e assinados por todos os participantes da pesquisa. Todos os dados referentes ao preenchimento dos questionários foram mantidos de forma sigilosa, idônea a fim de preservar os participantes de qualquer tipo de exposição ou divulgação de suas informações. Em relação aos riscos, foram considerados como mínimos.

3.2 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de uma pesquisa experimental e epidemiológica, com abordagens quantitativas e qualitativas.

3.3 ANÁLISES MOLECULARES

3.3.1 População Amostral

A população amostral constou de 58 amostras de sangue de doadores voluntários de sangue e de 42 de amostras de pacientes dianosticados com anemia ferropriva do Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá (Hemoap).

3.3.2 Amostras Biológicas

As amostras de sangue foram coletadas após a assinatura do TCLE e em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia (BIOMOL) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) do curso de Ciências Biológicas.

3.3.3 Extração de DNA

Utilizamos para a extração o Blood/Tissue DNA Mini Kit, que é um simples e rápido sistema para purificação de DNA genômico de alta qualidade para amostras de sangue total. Todo o procedimento é rápido – 20-25 min - com um rendimento típico de 2-10 µg de DNA genômico a partir de 0,2 mL de sangue.

3.3.4 PCR e Sequências de *Primes* Utilizados

Através do termociclador THERMO ELECTRON CORPORATION PxE 0.2 Thernal Cycler, realizamos a amplificação A1298C do gene *MTHFR* pela técnica de PCR alelo-específico segundo Ranjith et al. (2003), utilizando: 11µl de água, 12µl do reagente MixPCR, 1µl de cada *primers* e 5µl de DNA extraído das amostras, com um volume final de 30µl. Após seguimos as seguintes condições:

- 94°C por 5 minutos;
 - 94°C por 30 segundos;
 - 58°C por 30 segundos;
 - 72°C por 50 segundos;
- } 30 ciclos e extensão final 72°C por 5 minutos.

Os *primers* utilizados na amplificação com os respectivos tamanhos de pares de bases e temperaturas para a identificação dos alelos C e A do gene *MTHFR* podem ser observadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Sequências dos fragmentos dos *primers* utilizados com os respectivos tamanhos e temperaturas.

Fragmento anelado	tamanho	temp
1298 CF: 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA-3'		
1298 CR: 5'-ACA AAG ACT TCAAAG ACA CTT G-3'	120 bp	58°C
1298 AF: 5' GGA GCT GAC CAG TGA AGA-3'		
1298 AR: 5' TGT GAC CAT TCC GGT TTG-3'	77 bp	58°C

Para cada alelo A e C foram necessários utilizar dois *primers*: um complementar à sequência de DNA *anti-sense* (*primer sense - forward*), identificado com a letra **F**; e outro complementar à sequência de DNA *sense* (*primer anti-sense – reverse*), identificado com a letra **R**.

3.3.5 Eletroforese e visualização dos fragmentos de DNA

As amostras foram submetidas à técnica de eletroforese para identificação e visualização dos fragmentos, observados em gel de agarose a 1,5%, onde obtivemos os seguintes padrões para o polimorfismo A1298C.

- fragmentos de 120pb e 77pb, identifica heterozigoto (AC);
- fragmento de 120pb, identifica homozigoto (CC);
- fragmento de 77 pb identifica homozigo (AA).

3.4 APLICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO

Em cada questionário o participante que aceitasse fazer parte da pesquisa deveria responder de forma objetiva as seguintes informações:

- 1 - Gênero: M/F;
- 2 - Renda Familiar Mensal;
- 3 - Escolaridade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES MOLECULARES

Das 42 amostras analisadas de pacientes para o polimorfismo A1298C do gene *MTHFR*, 26 pacientes apresentaram o polimorfismo, sendo 21 pacientes com genótipo heterozigoto (AC) e 5 genótipo homozigoto (CC), e 16 não apresentaram o polimorfismo com genótipo homozigoto (AA). Nas amostras controles, foram analisadas 58 amostras de doadores de sangue, sendo que 44 apresentaram o genótipo (AA) e 14 amostras foram identificadas com genótipo heterozigoto do polimorfismo (AC), não foram identificadas amostras com genótipo CC. Os resultados das análises moleculares podem ser observados nas tabelas 1 e 2.

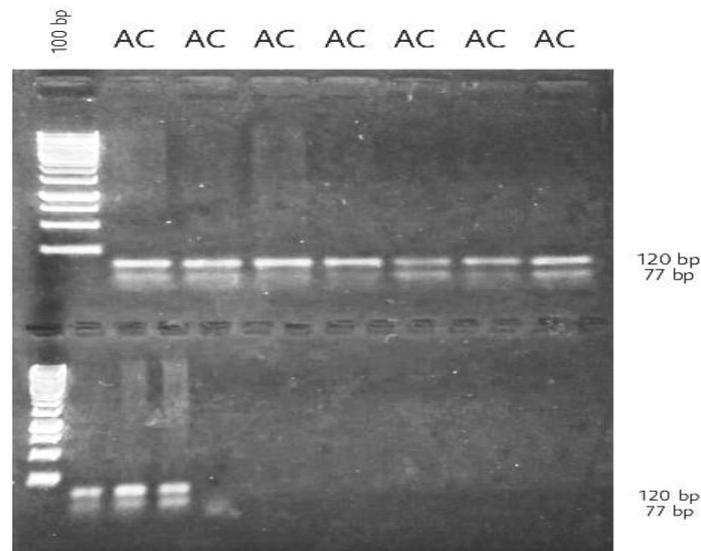
Tabela 1 – Resultado da genotipagem dos 42 pacientes com anemia ferropriva.

A1298C	C1298C	A1298A
n= 21	n= 5	n= 16
50%	12%	38%

Tabela 2 – Comparação dos indivíduos com e sem polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* nos pacientes e grupo controle.

Gene	Pacientes (n= 42)				Grupo controle (n= 58)			
	com	%	sem	%	com	%	sem	%
<i>MTHFR</i>	26	62	16	38	14	24	44	76

Figura 4 – Eletroforese de 10 pacientes com polimorfismo A1298C do gene *MTHFR*, sendo todos heterozigotos (AC).



4.2 RESULTADOS HEMATOLÓGICOS

Obtivemos os valores máximos e mínimos, as médias e os desvios padrão (DP) de cada índice hematológico que podem ser verificados no Quadro 2.

Quadro 2 – Resultados do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), ferro sério (Fe), ferritina e saturação da transferina (ST) verificados no hemograma dos pacientes.

	Valores Máximos	Valores Mínimos	Médias	DP
VCM (fl) *81-95	93,17	56,25	78	10,24062
HCM (pg) *26-34	32,73	16,45	25	4,401217
Fe (µg/dL) *30-160	199	28	54,2	57,81484
Ferritina (µg/dL) *Homens: 30-300 *Mulheres: 10-200	Homens: 32,2 Mulheres: 74,8	Homens: 18,2 Mulheres: 4	Homens: 25,6 Mulheres: 30	Homens: 6,018 Mulheres: 28,83
ST (%) *20-45	36	9	20	10,83846

* Valores de referência

4.3 RESULTADOS SOCIOECONÔMICOS

Nas tabelas 3 e 4, podemos analisar os valores de porcentagens dos grupos de pacientes e dos doadores referentes à renda familiar mensal e ao nível de escolaridade que foram obtidos com a aplicação do questionário socioeconômico no momento da coleta sanguínea:

Tabela 3 – Renda Familiar Mensal

	Pacientes	Grupo Controle
Até 1 sal. Mínimo	44%	6%
1-2 sal. Mínimos	20%	16%
2-3 sal. Mínimos	6%	5%
3-4 sal. Mínimos	6%	16%
+4 sal. Mínimos	24%	57%

Tabela 4 – Nível de Escolaridade

	Pacientes	Grupo Controle
Fundamental	14%	10%
Médio	56%	36%
Superior	30%	54%

4.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O Projeto Genoma Humano tem cumprido o seu potencial para acelerar a descoberta de genes subjacentes a doenças genéticas (NELSON; COX, 2014). Descobertas de genes, tais como *GRX5*, *DMT1* ou *TMPRSS6*, envolvidos na deficiência de ferro, sugerem que esta condição possa ser mais frequente do que se supunha (SAAD, 2010). Estas descobertas de novos genes que vêm sendo realizadas por diferentes pesquisas no campo da biologia molecular mostram que a anemia ferropriva não é apenas de origem nutricional como se acreditava.

Apesar de não havermos verificado na bibliografia estudos sobre a influência do polimorfismo do gene *MTHFR* em pacientes com anemia por deficiência de ferro até o momento, podemos ressaltar que complicações gástricas estão relacionadas à baixa absorção de ferro da dieta. Desse modo, das mais variadas pesquisas realizadas sobre o polimorfismo *MTHFR*, destacamos a de Miao et al. e seus dois estudos na população chinesa, o primeiro relacionado o polimorfismo com a incidência de câncer de esôfago e outro com o adenocarcinoma gástrico. Outra importante pesquisa, foi a de Curtin et al. que observaram a existência da relação do polimorfismo *MTHFR* do gene A1298C com o câncer de colón e concluíram, através de seus resultados, que a presença deste polimorfismo pode aumentar o risco.

Em um estudo realizado por Ueland et al. sobre as implicações clínicas do polimorfismo *MTHFR*, relataram que este pode estar associado ao risco de diversas doenças, possivelmente mediado pelo metabolismo alterado de folatos e homocisteína. Assim, obtivemos dados inéditos referentes à população amapaense os quais demonstram uma frequência de 0,62 e 0,14 da mutação A1298C do gene *MTHFR* para o grupo dos pacientes e grupo controle respectivamente. Estes dados demonstram uma frequência maior no grupo dos pacientes em comparação ao do grupo controle (4,43 vezes maior), sendo possível haver uma relação do polimorfismo A1298C com o desenvolvimento da anemia ferropriva devido à regulação deficiente de ferro no organismo pela produção inadequada da enzima *MTHFR* que é responsável por atuar em diversas vias metabólicas e, conseqüentemente, estar relacionado ao metabolismo alimentar de proteínas, entre elas a cisteína que é um dos fatores essenciais na regulação do ferro.

Comparando nossos resultados ao de outro estudo, os dados obtidos na presente pesquisa foram maiores que o encontrado em 1999 por Friedman et al. que verificaram a frequência alélica de ambas as mutações pontuais no gene *MTHFR*, A1298C e C677T, examinando seus efeitos nas concentrações plasmáticas de homocisteína total e a associação com o risco cardiovasculares em uma pesquisa com judeus em Jerusalém. Os dados do estudo de Friedman et al. demonstraram uma frequência de 0,34 para o gene *MTHFR* com o polimorfismo A1298C.

No estudo realizado por Glahn e Campen em 1997 sobre a adsorção de ferro por

cisteína e outros aminoácidos, foi visto que a cisteína e a cisteinil-glicina reduzida aumentaram a solubilidade do ferro. Mas este efeito é diferente do provocado pela vitamina C, que ao ser combinada com o ferro resulta em pH 2 com redução e maior solubilização do ferro no intestino. Através da pesquisa de Glan e Campen, pode-se verificar a relação do polimorfismo do gene *MTHFR* com a dieta deficiente no desenvolvimento da anemia que, por sua vez, é diretamente relacionada aos fatores socioeconômicos.

De acordo com as análises socioeconômicas verificadas nas tabelas 3 e 4, é possível ver que 44% dos pacientes têm renda familiar menor que um salário mínimo, enquanto no grupo controle é de apenas 6%. Portanto, pacientes de baixa renda possuem maior probabilidade de desenvolver anemia pelo fato de não conseguirem suprir as suas necessidades de ferro e de outros alimentos essenciais por apresentarem uma situação econômica precária. Quanto à escolaridade podemos verificar que a maioria dos pacientes relatou ter o ensino médio (56%) e no grupo controle a maioria ensino superior (54%). Consequentemente, podemos observar através dos nossos resultados dos dados socioeconômico que a escolaridade está diretamente ligada à diferença de renda encontrada entre os grupos e ao compararmos estes mesmos resultados com os resultados apresentados das análises das amostras sanguíneas, levaram a um pior quadro clínico hematológico e pior prognóstico em pacientes com polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* diagnosticados com anemia ferropriva.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acreditamos que nossa pesquisa é essencial tanto na área da hematologia como na da biologia molecular, principalmente por se tratar de um polimorfismo genético que ainda não havia sido encontrado na literatura até momento em relação aos casos de anemia ferropriva. Outra importância diz respeito à comparação com as questões econômicas e sociais, pois observamos que o levantamento epidemiológico sobre as condições de vida dos pacientes com anemia ferropriva é algo ainda não realizado no estado do Amapá e de extrema relevância em casos de deficiência nutricional, como é no caso do ferro.

Assim, através das análises moleculares utilizando as técnicas de PCR e eletroforese e a comparação com os dos dados hematológicos e do questionário socioeconômico obtidos em nossa pesquisa, podemos concluir que os fatores como renda e escolaridade levam a uma dieta nutricional insuficiente que pode piorar um quadro de anemia ferropriva em pacientes com maior predisposição genética devido ao fato de apresentar polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* em seu organismo, o qual prejudica a regulação dos níveis de ferro, através do metabolismo da homocisteína e da cisteína.

A deficiência de ferro leva a problemas físicos e metais como fadiga, vertigem, dificuldade de manter a temperatura corporal, mas também pode levar a consequências clínicas irreversíveis como a dificuldade de aprendizado e deformidades óssea em crianças. Portanto, os resultados encontrados em nossa pesquisa iram enriquecer ainda mais o campo da prevenção, diagnóstico molecular e, conseqüentemente, melhorar o tratamento dos pacientes com deficiência de ferro causado por polimorfismo, através da correta suplementação de ferro alimentar e intravenosa que é mais facilmente e rapidamente absorvida.

REFERÊNCIAS

AN, P. et al. *TMPRSS6*, but not *TF*, *TFR2* or *BMP2* variants are associated with increased risk of iron-deficiency anemia. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 2124-2131, 2012.

BALUZ, K.; CARMO, M. G. T. do.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 4, p. 597-607, 2002.

CHRISTIAN, P.; STEWART, P. S. Maternal micronutrient deficiency, fetal development, and the risk of chronic disease. **Journal of Nutrition**, Oxford, v. 140, p. 437–445, 2010.

COSTA, A. P. P. et al. Estudo de polimorfismo de DNA associados à distúrbios de desenvolvimento. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, São Paulo, v. 7, n. 1, p.112-131, 2007.

CURTIN, K. et al. *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms: diet, estrogen, and risk of colon cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 13, p. 285–292, 2004.

DUPUY, J. et al. Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. **Structures**, London, v. 14, p. 129–139, 2006.

FALCO, L. de. et al. Iron refractory iron deficiency anemia. **Haematologica**, Pavia, v. 98, n. 6, 2013.

FRIEDMAN, G. et al. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. **Journal of Nutrition**, Oxford, v. 129, p. 1656–1661, 1999.

GANZ, T.; NEMETH, E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. **Hematology ASH Education Program**, Washington, v. 2011, n. 1, p. 538–542, 2011.

GERMANO, R. M. **A Disponibilidade de ferro na presença do b-caroteno e o efeito dos interferentes em combinações de alimentos**. 2002. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GLAHN, R. P.; VAN CAMPEN, D. R. Iron uptake is enhanced in caco-2 cell monolayers by cysteine and reduced cysteinyl glycine. **Journal of Nutrition**, Oxford, v. 127, n. 4, p. 642-647, 1997.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

HERSHKO, C. et al. Variable hematologic presentation of autoimmune gastritis: age-related progression from iron deficiency to cobalamin depletion. **Blood**, Washington, v. 107, n. 4, p. 1673- 1679, 2006.

MATOS, J. F. et al. O hemograma nas anemias microcíticas e hipocrômicas: aspectos diferenciais. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 4, p. 255-258, 2012.

MCCARTHY, C.; RYAN, F.; VAUGHAN, J. Increased frequency of the *MTHFR* A1298C mutation in an Irish population. **Clinical Chemistry**, Dublin, v. 50, n. 12, p. 2462-2463, 2004.

MIAO, X. et al. Susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma and genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase in an at-risk chinese population. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 11, p. 1454–1458, 2002.

NELSON, D; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OH, R. C.; BROWN, D. L. Vitamin B12 deficiency. **American Family Physician**, Leewood, v. 67, n. 5, p. 979-986, 2003.

RANJITH, N.; PEGORARO, R. J; ROM, L. Risk factors and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in a young South African Indian-based population with acute myocardial infarction. **Cardiovasc J S Afr**, Durban, v. 14, n. 3, p. 127-32, 2003.

SAAD, S. T. O. Causas genéticas de deficiência de ferro. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 99-104, 2010.

SANTANA, J. D. et al. Diagnóstico e exames laboratoriais da anemia megaloblástica por deficiência de vitamina B12 e ácido fólico. **Rev. Conexão Eletrônica**, Três Lagoas, v. 13, n. 1, p. 11, 2016.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annu Rev Nutr**, Palo Alto, v. 19, p. 217-246, 1999.

TURNER, J.; BHIMJI, S. S. Anemia. **StatPearls Publishing**, Treasure Island, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499994/>>. Acesso em: 19 maio 2018.

UELAND, P. M. et al. Biological and clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, Bergen, v. 22, n. 4, p. 195-201, 2001.

VICARI, P.; FIGUEIREDO, M. S. Diagnóstico diferencial da deficiência de ferro. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 29-31, 2010.

WEISBERG, I.S. et al. The 1298 A-C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): in vitro expression and association with homocysteine. **Atherosclerosis**, Montreal, v. 156, n. 2001, p. 409-415, 2001.

ANEXO A – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar da pesquisa GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO A1298C DO GENE MTHFR EM PACIENTES DO HEMOAP DIAGNOSTICADOS COM ANEMIA FERROPRIVA sob a responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Deyse de Souza Dantas, a qual pretende realizar uma pesquisa dos polimorfismos genéticos presentes na população amapaense com anemia ferropriva. A pesquisa será administrada de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS/MS) 466/12 que trata da pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Sua participação é voluntária e se dará por meio da coleta de sangue para análises, do uso das informações clínicas do prontuário médico e do questionário socioeconômicos para levantamento dos dados necessários que embasarão a investigação de polimorfismos genéticos. Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos, havendo pequenos riscos de lesões no momento da coleta. Se aceitar participar, estará contribuindo para a um diagnóstico mais eficiente e melhora no tratamento de pacientes com anemia por deficiência de ferro. Se depois de consentir em sua participação o Sr. (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração.

Ressaltamos que os dados coletados serão mantidos em absoluto sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com a pesquisadora Profa. Dra Deyse de Souza Dantas, no endereço Rodovia Juscelino Kubitschek KM 02, Bloco de Ciências Farmacêuticas, Universidade, Macapá-

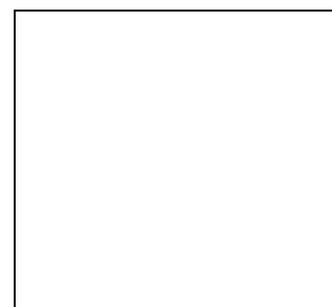
AP CEP 68.903-419, pelo telefone (96) 98140-8273, com a pesquisadora Maria Luisa Pradella Nogueira, no endereço Rodovia Juscelino Kubitschek KM 02, Bloco de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Bairro Universidade, Macapá – AP CEP: 68.903-419, pelo telefone (96) 99563573, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UNIFAP, Rod. Juscelino Kubitschek, KM-02, Bairro Universidade, Macapá – AP CEP 68.903-419, Centro Integrado de Pesquisa da Amazônia – Unifap, pelo telefone (96) 4009-2804.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pela pesquisadora, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do participante

Assinatura da Pesquisadora Responsável



Impressão do polegar

Data: ___/___/___

ANEXO B – TERMO DE ASSENTIMENTO

TERMO DE ASSENTIMENTO

Convidamos para participar da pesquisa POLIMORFISMO GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO A1298C DO GENE MTHFR EM PACIENTES DO HEMOAP DIAGNOSTICADOS COM ANEMIA FERROPRIVA de responsabilidade da Profa. Dra. Deyse de Souza Dantas. Se você aceitar participar, estará contribuindo para melhorar o tratamento das anemias no Amapá.

Você pode sair em qualquer momento da pesquisa. Suas informações pessoais não serão divulgadas de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS/MS) 466/12 que trata da pesquisa envolvendo Seres Humanos.

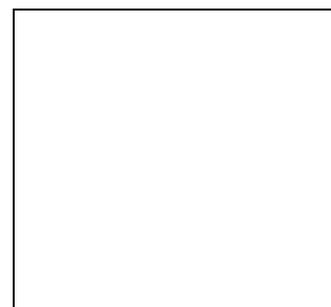
Para qualquer outra informação você pode procurar a pesquisadora Profa. Dra. Deyse de Souza Dantas no endereço Rodovia Juscelino Kubitschek KM 02, Bloco de Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Bairro Universidade, Macapá – AP CEP 68.903-419, pelo telefone (96) 98140-8273, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UNIFAP, Rodovia Juscelino Kubitschek KM 02, Bloco de Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Bairro Universidade, Macapá – AP CEP 68.903-419 Rodovia Juscelino Kubitschek KM 02, Bloco de Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Bairro Universidade, Macapá – AP CEP 68.903-419, telefone (96) 4009-2804.

Consentimento Pós–Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento

é emitido em duas vias que serão assinadas por mim e pela pesquisadora, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do responsável pelo participante



Impressão do polegar

Assinatura da Pesquisadora Responsável

Data: ___/___/_____

ANEXO C – TERMO DE ANUÊNCIA



INSTITUTO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO AMAPÁ



TERMO DE ANUÊNCIA

Declaramos para devidos fins, que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa que tem como tema "POLIMOSFISMO DO GENE Tmprss6, EM PACIENTES DO HEMOAP DIAGNOSTICADOS COM ANEMIA FERROPRIVA", referente ao Programa de mestrado em ciências farmacêuticas da UNIFAP. Fará parte da referida pesquisa, a aluna Maria Luisa Pradella Nogueira, a qual terá o apoio desta instituição e a referida pesquisa será realizada sob orientação da Professora Deyse de Souza Dantas.

Macapá, 19 de outubro de 2016.


Domingos Sávio de Souza Guerreiro
Diretor-Presidente do HEMOAP
DOMINGOS SÁVIO DE SOUZA GUERREIRO
Diretor Presidente

Nossa MISSÃO: Formular, coordenar e desenvolver a Política estadual de sangue humano prestando atendimento hemoterápico e hematológico com qualidade à rede de saúde do Estado.

ANEXO D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAPÁ - UNIFAP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: POLIMORFISMO DO GENE TMRSS6 EM PACIENTES DO HEMOAP DIAGNOSTICADOS COM ANEMIA FERROPRIVA

Pesquisador: MARIA LUISA PRADELLA NOGUEIRA

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 61936616.6.0000.0003

Instituição Proponente: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Patrocinador Principal: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.919.600

Apresentação do Projeto:

A deficiência de ferro ou anemia ferropriva é uma preocupação global de saúde, tendo como causa a perda de sangue crônica ou ingestão de ferro inadequada. A anemia ferropriva é muitas vezes confundida com outras anemias microcíticas e em casos raros, a deficiência não é suficientemente tratada pela suplementação de ferro oral. Através da utilização das técnicas de biologia molecular, foi possível identificar a anemia ferropriva refratária ao ferro ou IRIDA. Mutações no gene TMRSS6 são responsáveis por causar IRIDA, originando diversos polimorfismos. O TMRSS6 codifica a matriptase-2, uma protease de serina produzida principalmente pelo fígado e que regula a produção de hepcidina. Pacientes com IRIDA apresentam aumento de hepcidina, causando uma diminuição do metabolismo de ferro e de suas concentrações. Nosso projeto de pesquisa tem por objetivo verificar o polimorfismo do gene TMRSS6 em pacientes com anemia devido à deficiência de ferro que realizam tratamento no Instituto de Hemoterapia e Hematologia do Amapá – HEMOAP. Os resultados das análises realizadas por PCR serviram para um melhor diagnóstico e tratamento destes pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Rodovia Juscelino Kubistcheck de Oliveira - Km.02
Bairro: Bairro Universidade CEP: 68.902-280
UF: AP Município: MACAPA
Telefone: (96)4009-2805 Fax: (96)4009-2804 E-mail: cep@unifap.br

Continuação do Parecer: 1.919.600

Determinar o polimorfismo do gene Tmprss6 em pacientes identificados com anemia ferropriva que não respondem ao tratamento suplementar de ferro.

Objetivo Secundário:

- Identificar pacientes com o diagnóstico característico de anemia ferropriva que não respondem ao tratamento de ferro oral, será utilizada uma amostragem de 100 pacientes tratados no HEMOAP (Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Amapá);
- Obter os dados de valores hematológicos destes pacientes (ferro sérico, ferritina e a saturação da transferrina) e realizar análises moleculares através da utilização da técnica de PCR;
- Verificar através da análise de biologia molecular polimorfismo no gene Tmprss6;
- Demonstrar como variantes do gene Tmprss6 podem alterar a homeostase do ferro;
- Realizar uma análise sobre outros fatores que podem agravar o quadro clínico;
- Relatar se os resultados das análises moleculares auxiliaram no tratamento destes pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos podem ser considerados mínimos frente aos benefícios proporcionados pela pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE, termo de assentimento, questionário e termo de cooperação institucional de acordo com a resolução 466/12-CNS.

Recomendações:

Após realizadas as adequações, recomendo a aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de acordo com a resolução 466/12-CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_815163.pdf	19/01/2017 01:33:37		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado.doc	19/01/2017 01:30:06	MARIA LUISA PRADELLA NOGUEIRA	Aceito

Endereço: Rodovia Juscelino Kubistcheck de Oliveira - Km.02
Bairro: Bairro Universidade CEP: 68.902-280
UF: AP Município: MACAPA
Telefone: (98)4009-2805 Fax: (98)4009-2804 E-mail: cep@unifap.br

Continuação do Parecer: 1.919.600

Outros	img002.jpg	19/01/2017 01:07:56	MARIA LUISA PRADELLA NOGUEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	19/01/2017 01:05:01	MARIA LUISA PRADELLA NOGUEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.docx	10/11/2016 02:21:13	MARIA LUISA PRADELLA NOGUEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MACAPA, 14 de Fevereiro de 2017

Assinado por:

Anneli Mercedes Celis de Cárdenas
(Coordenador)

APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO

FICHA DE PARTICIPAÇÃO DE PESQUISA

Nome:

Data de Nascimento: ____/____/____

E-mail: _____

Telefone: (____) _____ Celular: (____) _____

QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO DO PACIENTE

1. Gênero:

Masculino

Feminino

2. Escolaridade (ou dos pais / responsáveis caso menor de idade):

3. Qual é a renda total mensal de sua família? (Considere a soma de todos os salários dos membros de sua família. SM = Salário Mínimo Nacional)

Até 1 SM ou até R\$ 937,00.

De 1 a 2 SM ou de R\$ 937,00 a R\$ 1874,00.

De 2,0 a 3,0 SM ou de R\$ 1874,00 a R\$ 2811,00.

De 3,0 a 4,0 SM ou de R\$ 2811,00a R\$ 3748,00.

De 4,0 SM ou mais: R\$ 3748,00.

