



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

DENNY PÂMELA MALERBA

ESTRESSE OXIDATIVO E GRAVIDADE DA ANEMIA FALCIFORME EM ASSOCIAÇÃO COM ALFA TALASSEMIA E USO DE HIDROXICARBAMIDA

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2024

DENNY PÂMELA MALERBA

**Estresse Oxidativo e Gravidade da Anemia Falciforme em
Associação com Alfa Talassemia e Uso de Hidroxicarbamida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre** em Biociências, Área Genética e Biologia Evolutiva.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Regina Domingos Bonini

São José do Rio Preto

2024

M245e	Malerba, Denny Pamela Estresse Oxidativo e Gravidade da Anemia Falciforme em Associação com Alfa Talassemia e Uso de Hidroxicarbamida / Denny Pamela Malerba. -- São José do Rio Preto, 2024 76 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Claudia Regina Bonini Domingos 1. Genética humana. 2. Hemoglobinopatias. 3. Talassemia. 4. Estresse oxidativo. 5. Anemia Hemolítica. I. Título
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DENNY PÂMELA MALERBA

ESTRESSE OXIDATIVO E GRAVIDADE DA ANEMIA FALCIFORME EM
ASSOCIAÇÃO COM ALFA TALASSEMIA E USO DE
HIDROXICARBAMIDA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre** em Biociências, Área Genética e Biologia Evolutiva, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Profa Dra. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP - São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Rizzatti Luizon
UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
FAMERP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto - São Paulo

04 de Março de 2024

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer meus pais, por acreditarem em mim e por todo apoio e dedicação. Eles são e sempre serão o meu bem mais precioso.

Aos pacientes do HEMORIO, que mesmo possuindo suas lutas diárias, se disponibilizam participar dos projetos de pesquisa, colaborando assim, com o avanço no conhecimento sobre a doença falciforme e consequentemente impactam na melhora da qualidade de vida dessas pessoas.

Ao Mamede Abou Dehn Junior e ao Carlos Albacete Junior, que foram grandes incentivadores para que eu iniciasse o mestrado e, pelos quais, tenho grande carinho.

Ao Dr. Pedro Lucas, que se dispôs a me explicar sobre o mestrado, aluno especial e inscrição quando iniciei o processo nesta fase.

Aos amigos e colegas do LHGDH, que me ajudaram nos momentos de incertezas, que riram comigo nos momentos de descontração e que colaboraram com o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Lucas Ramos Pereira, que auxiliou nas análises estatísticas do projeto.

Aos amigos Ana Clara Albertin Zucão, Jonathan Rios e Thais Fernandes Ribeiro, que estiveram ao meu lado não apenas no ambiente laboratorial, mas também nas aulas e nos momentos de lazer. Vocês estarão sempre em meu coração.

A amiga Ana Beatriz Belini dos Santos, que passou noites me ajudando a realizar um dos momentos mais felizes que tive em 2023.

Ao amigo Danilo Donizete da Silva, que apesar de não ser membro do LHGDH, se tornou meu parceiro de congressos, resumos e viagens.

A Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos por todo carinho e compreensão durante todo o mestrado, e principalmente por abrir as portas do LHGDH para mim, que até então era uma pessoa desconhecida.

Ao Dr. Édis Belini Júnior, que juntamente à Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, *campus* de Três Lagoas, se dispôs em auxiliar parte das análises do meu projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E por último, mas não menos importante, ao Júnior, meu gato, que sempre esteve deitado ao meu lado, me confortando nos momentos de estudo.

RESUMO

A anemia falciforme é uma doença genética que se caracteriza por uma mutação no gene da beta globina, estando este, presente no cromossomo 11, onde ocorre substituição de um único nucleotídeo (GAG → GTG) resultando na troca do aminoácido ácido glutâmico por valina, produzindo a hemoglobina anormal (Hb S). A presença desta proteína alterada desencadeia processo de cristalização e alteração celular, que tem como consequência a falcização do eritrócito e aumenta o estresse oxidativo, que influencia na fisiopatologia da doença, além de ocorrer o sequestro do eritrócito pelo baço, resultando em uma anemia hemolítica crônica, sendo necessária a transfusão sanguínea em casos graves. A hidroxycarbamida é um fármaco utilizado na terapia de anemia falciforme, que age na eritropoiese, influenciando o aumento da produção de Hemoglobina Fetal (Hb F), diminuindo as crises vaso-oclusivas e melhorando o quadro clínico dos pacientes. A alfa talassemia, se caracteriza pela diminuição da síntese da cadeia de alfa globina, cujo gene está presente no cromossomo 16. Uma associação de alfa talassemia com a Hb S afeta significativamente o nível dessa hemoglobina, influenciando as manifestações clínicas, sendo este, o fator mais notável dessa interação. Considerando que a relação entre a gravidade da anemia falciforme, a presença de alfa talassemia, o estresse oxidativo e o uso ou não de hidroxycarbamida foram pouco estudadas em conjunto, a realização deste estudo visou a compreensão da interação entre estes fatores nos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes, podendo assim aprimorar e adequar o tratamento e orientação dos portadores. Foram analisados quatro grupos de indivíduos [G1 (pacientes com anemia falciforme que apresentam co-herança de talassemia alfa e em tratamento com hidroxycarbamida); G2 (pacientes com anemia falciforme que apresentam co-herança de talassemia alfa que não fazem uso de hidroxycarbamida); G3 (pacientes com anemia falciforme que não apresentam co-herança de talassemia alfa em tratamento com hidroxycarbamida) e; G4 (pacientes com anemia falciforme sem co-herança com talassemia alfa e que não fazem uso de hidroxycarbamida)] em relação a gravidade. Ao analisarmos os grupos para gravidade e uso de hidroxycarbamida, não obtivemos diferença estatística, porém as porcentagens das gravidades corroboram a literatura, mostrando que os pacientes em tratamento com hidroxycarbamida apresentam o quadro clínico mais brando. Analisando o grupo de pacientes com anemia falciforme que apresentou associação com talassemia alfa, também não apresentaram diferença estatística, porém, novamente, em porcentagem, os grupos que possuíam a associação com talassemia alfa e uso de hidroxycarbamida também mostraram quadro clínico mais leve do que o grupo com genótipo normal para a talassemia

alfa e sem uso de hidroxycarbamida. Ao comparar as enzimas de detoxificação avaliadas (GSH, GST, GPx, Catalase e TBARS) entre os grupos trabalhados (G1, G2, G3 E G4) não houve diferença estatística significativa, no entanto, houve um aumento na atividade da catalase no grupo G1, indicando uma ação protetora dessa enzima; podemos verificar também a diminuição dos valores de TBARS e GST, nos mesmos grupos que apresentam a co-herança da talassemia alfa (G1 e G2) em relação ao grupo G4. Resultados inferem que esses parâmetros podem estar ligados com a melhora no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme.

Palavras-chave: Doença falciforme. Hemoglobina S. Hemoglobinopatias.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is a genetic disease that is characterized by a mutation in the beta globin gene, which is present on chromosome 11, where a single nucleotide substitution occurs (GAG → GTG) resulting in the exchange of the amino acid glutamic acid for valine, producing abnormal hemoglobin (Hb S). The presence of this altered protein triggers a process of crystallization and cellular alteration, which results in sickling of the erythrocyte and increases oxidative stress, which influences the pathophysiology of the disease, in addition to the sequestration of the erythrocyte by the spleen, resulting in chronic hemolytic anemia, requiring blood transfusion in severe cases. Hydroxycarbamide is a drug used in the therapy of sickle cell anemia, which acts on erythropoiesis, influencing the increase in the production of Fetal Hemoglobin (Hb F), reducing vaso-occlusive crises and improving the clinical condition of patients. Alpha thalassemia is characterized by a decrease in the synthesis of the alpha-globin chain, whose gene is present on chromosome 16. An association of alpha thalassemia with Hb S significantly affects the level of hemoglobin, influencing the clinical manifestations, which is the most notable factor of this interaction. Considering that the relationship between the severity of sickle cell anemia, the presence of alpha thalassemia, oxidative stress and the use or not of hydroxycarbamide have been little studied together, the aim of this study was to understand the interaction between these factors in the clinical symptoms presented by patients, thus being able to improve and adapt the treatment and orientation of patients. Four groups of individuals were analyzed [G1 (patients with sickle cell anemia who have co-inheritance of alpha-thalassemia and are being treated with hydroxycarbamide); G2 (patients with sickle cell anemia who have co-inheritance of alpha thalassemia who do not use hydroxycarbamide); G3 (patients with sickle cell anemia who do not have co-inheritance of alpha-thalassemia on hydroxycarbamide treatment) and; G4 (patients with sickle cell anemia without co-inheritance with alpha-thalassemia and who do not use hydroxycarbamide)] in relation to severity. When analyzing the groups for severity and use of hydroxycarbamide, we did not find a statistical difference, but the percentages of severity corroborate the literature, showing that patients treated with hydroxycarbamide have a milder clinical picture. Analyzing the group of patients with sickle cell anemia that was associated with alpha-thalassemia, there was also no statistical difference, however, again, in percentage, the groups that had the association with alpha-thalassemia and use of hydroxycarbamide also showed a milder clinical picture than the group with normal genotype

for alpha-thalassemia and without the use of hydroxycarbamide. When comparing the detoxification enzymes evaluated (GSH, GST, GPx, Catalase and TBARS) between the groups studied (G1, G2, G3 and G4) there was no statistically significant difference, however, there was an increase in catalase activity in the G1 group, indicating a protective action of this enzyme; we can also verify a decrease in the values of TBARS and GST in the same groups that present the co-inheritance of alpha thalassemia (G1 and G2) in relation to the G4 group. Results infer that these parameters may be linked to the improvement in the clinical condition of patients with sickle cell anemia.

Keywords: Sickle-cell disease. Hemoglobin S. Hemoglobinopathies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1—Hemoglobina humana adulta (Hb A).....	15
Figura 2 — Alteração genética no gene da beta globina (HBB) que ocasiona a síntese da Hb S 17	
Figura 3— Deleções dos genes HBA.....	20
Figura 4 — Processo gerador de estresse oxidativo na anemia falciforme.....	22
Figura 5 — Representação esquemática do ciclo vicioso da anemia falciforme.....	24
Figura 6 — Efeito fisiológico da hidroxycarbamida em pacientes com anemia falciforme.....	27
Figura 7 — Esquematização simplificada da casuística da pesquisa.....	30
Figura 8 — Esquematização do delineamento experimental da pesquisa.....	31
Figura 9 — Esquematização do delineamento experimental da pesquisa.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Dados obtidos das análises de PCR multiplex para talassemia alfa e o uso de hidroxycarbamida.....	44
Tabela 2 — Distribuição da gravidade dos pacientes com anemia falciforme classificando-as pelo tratamento com hidroxycarbamida e com co-herança de talassemia alfa.....	45
Tabela 3 — Parâmetros antioxidantes da anemia falciforme nos grupos estudados.....	46

SUMÁRIO

1. HEMOGLOBINOPATIAS.....	14
1.1. HEMOGLOBINA.....	14
1.2. HEMOGLOBINA S E A ANEMIA FALCIFORME.....	15
1.3. TALASSEMIA ALFA.....	18
1.4. ASSOCIAÇÃO DA ANEMIA FALCIFORME E TALASSEMIA ALFA.....	20
1.5. ESTRESSE OXIDATIVO.....	21
1.6. HIDROXICARBAMIDA.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. OBJETIVO GERAL.....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4. MATERIAL E MÉTODO.....	30
4.1. CASUÍSTICA.....	30
4.2. METODOLOGIA.....	31
4.2.1. Delineamento experimental.....	31
4.2.2. Hemolisado com saponina e solução de Hb com clorofórmio (Naoum,1998)...	31
4.2.3. Resistência globular osmótica em Cloreto de Sódio a 0,36% (Silvestroni; Bianco, 1975).....	32
4.2.4. Análise à fresco da morfologia eritrocitária (Bonini-Domingos, 2006).....	33
4.2.5. Eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose (Marengo; Rowe, 1965, com modificações).....	33
4.2.6. Eletroforese de diferenciação em ágar-fosfato, pH 6,2 (Vella, 1968).....	33
4.2.7. Cromatografia de Alta Performance (HPLC).....	34
4.2.8. Extração de DNA por método de precipitação salina ou salting-out (Salazar et al., 1998, adaptado por Bonini-Domingos, C.R. 2020).....	34
4.2.9. Extração de DNA com Fenol-Clorofórmio (Sambrook et al., 1989).....	35
4.2.10. Quantificação de DNA e pureza da amostra.....	36
4.2.11. PCR-RFLP para Hb S (Bonini-Domingos, 2006; Belini-Júnior; Cançado; Bonini-Domingos, 2010).....	37
4.2.12. Gap-PCR Multiplex para α -Talassemia (Chong et al., 2000).....	37
4.2.13. Para detecção de Talassemia Alfa (Protocolo de deleções -3.7 e -4.2) em multiplex.....	38
4.2.14. Gap-PCR Multiplex para α -Talassemia (Old et al., 2012, adaptado por Malerba; Bonini-Domingos).....	38
4.2.15. Determinação da atividade enzimática da Catalase (Beutler, 1975).....	40
4.2.16. Determinação da atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase (Keen et al., 1976).....	41
4.2.17. Determinação da atividade enzimática da Glutathione Peroxidase (Sies et al., 1979).....	41
4.2.18. Dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Mihara;	

Uchiyama, 1978; Shimauti et al., 2010).....	42
4.2.19. Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS.....	44
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE.....	60
ANEXO A: APROVAÇÃO CEP.....	75

1. HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias, são distúrbios hereditários, que afetam os genes da globina humana, causando doenças geneticamente determinadas que apresentam morbidade e mortalidade relevantes em todo o mundo (Orlando et al., 2000; Weatherall, 2008; Sankran; Orkin, 2013). Ocorrem por mutações nos genes da globina, que determinam hemoglobinas variantes (troca de aminoácidos que levam a alterações na estrutura da molécula) e/ou talassemias (decorrente de deficiência ou ausência da síntese de cadeias que compõem a hemoglobina), apresentando manifestações clínicas variáveis nos portadores (Batista *et al.*, 2020; Harteveld *et al.*, 2022).

A hemoglobinopatia S e algumas talassemias são endêmicas nas regiões subtropicais do mundo, em parte, devido à presença da malária, sugerindo que a seleção natural favoreceu o estado de portador heterozigoto, pois estes tendem a sobreviver melhor a infecção por *Plasmodium falciparum* do que os não portadores. Sua distribuição se estende à área do Mediterrâneo, Oriente Médio e Índia, até o Sudeste Asiático (Harteveld *et al.*, 2022). A incidência na população brasileira é considerável devido à miscigenação existente no país, tendo em vista que, as hemoglobinopatias mais estudadas são de origens africanas e mediterrâneas, povos que nortearam a formação populacional no Brasil (Calvo-Gonzales, 2017).

Dentre as hemoglobinas variantes anormais, a HbS e a HbC, são as mais frequentes na população brasileira, ambas de origem africana (Thein, 2011; Brasil; 2021). A anemia falciforme (AF) e a talassemia exercem um impacto significativo na morbidade e mortalidade entre os indivíduos que apresentam essa condição na forma grave (Alhuthali *et al.*, 2023).

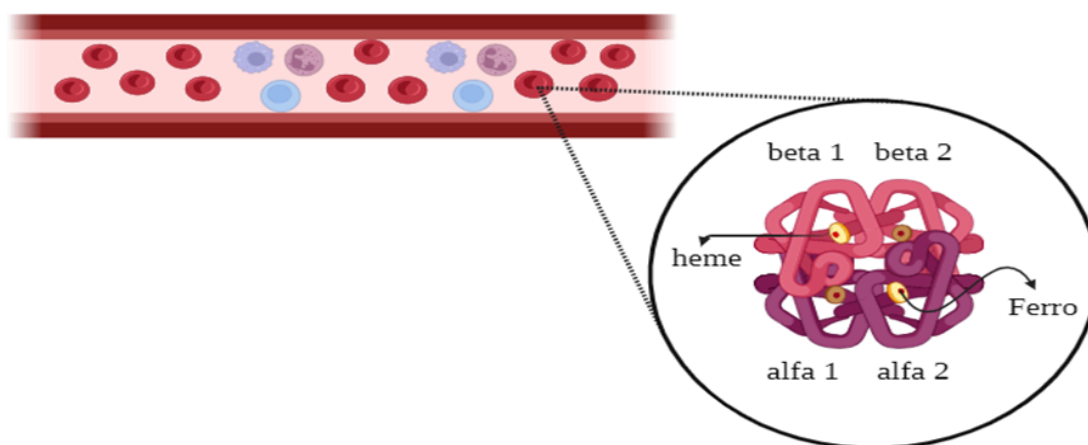
1.1. HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) presente nas hemácias, é a principal proteína responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos, e está expressa nas diferentes fases da vida (embrionária, fetal e adulta) (Harteveld *et al.*, 2022). É uma proteína tetramérica composta por quatro subunidades de cadeias globínicas, cada uma associada a um grupo heme (Harteveld *et al.*, 2022). A Hb presente em maior quantidade nos seres humanos adultos (Hb A) é formada por duas cadeias polipeptídicas denominadas alfa (α) globina (codificadas pelos genes *HBA1* e *HBA2*), com 141 aminoácidos, e duas cadeias polipeptídicas denominadas beta (β) globina (codificada pelo gene *HBB*), com 146 aminoácidos (Marzzoco; Torres, 2015; Kato *et al.*,

2018; Hartevelde *et al.*, 2022;). A Hb A tem como principal função o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos, no entanto, também pode atuar como antioxidante, ajustes de reações inflamatórias em defesa da célula e regulador metabólico, quando disponíveis em células como macrófagos, células alveolares, entre outros locais (Shafique *et al.*, 2023).

Um adulto normal, contém 97% de Hb A, composta de duas cadeias α globina e duas β globina ($\alpha_2\beta_2$), 2% de Hb A₂, composta de duas cadeias α globina e duas cadeias δ (delta) globina ($\alpha_2\delta_2$) e até 1% de hemoglobina fetal (Hb F), sendo composta de duas cadeias α globina e duas cadeias γ (gama) globina ($\alpha_2\gamma_2$) (Vrettou *et al.*, 2018; Shafique *et al.*, 2023). A Figura 1 ilustra esquematicamente a estrutura tridimensional da Hb A.

Figura 1—Hemoglobina humana adulta (Hb A)



Fonte: elaborada pela autora, 2024. A Figura 1 apresenta a hemoglobina humana adulta (Hb A), formada por duas cadeias beta globínicas (β_1 e β_2) e duas cadeias alfa globínicas (α_1 e α_2), sendo que cada cadeia globínica está associada a um grupo heme e uma molécula de ferro, responsável pelo transporte de oxigênio.

1.2. HEMOGLOBINA S E A ANEMIA FALCIFORME

A hemoglobina S (Hb S) é uma variante da hemoglobina causada por uma mutação no gene da β globina (*HBB*) (Chakravorty; Williams, 2015; Dutra; Biassi; Figueiredo, 2023), presente no cromossomo 11, em que ocorre a substituição de uma adenina por uma timina ($GAG \rightarrow GTG$) no códon que corresponde ao sexto aminoácido da cadeia, resultando na produção de uma valina, no lugar de um ácido glutâmico (Costa, 2001; Galiza Neto; Pitombeira, 2002; Brandow; Liem, 2022).

A Hb S apresenta perfil eletroforético específico (Costa, 2001), tem origem africana (Naoum *et al.*, 1986), e estudos mostram que em heterozigose (HbAS), a Hb S oferece proteção contra malária grave, causada por *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897; Taylor *et al.*, 2012). Mais da metade da população brasileira apresenta traços afrodescendentes, o que faz da doença falciforme (DF) o distúrbio hereditário mais comum no Brasil (Naoum *et al.*, 1986). A média anual de novos casos de crianças com doença falciforme (DF) no Brasil, entre 2014 e 2020, foi de 1.087 (uma incidência de 3,78 a cada 10 mil nascidos vivos), estimando que há entre 60 mil e 100 mil pacientes com DF atualmente (Frasão, 2022). Os registros do Sistema de Informações de Mortalidade do Sistema Único de Saúde mostram que, entre 2014 e 2019, a maior parte dos pacientes com DF faleceram entre os 20 e 29 anos de idade (Frasão, 2022).

O genótipo da doença pode se apresentar de maneira heterozigota (Hb AS), denominada traço falciforme, ou homozigota (Hb SS), denominada anemia falciforme (AF) (Kato, 2018). A AF se tornou um problema de saúde pública devido ao alto custo das internações e tratamento das comorbidades, sendo uma realidade no Brasil, onde o Sistema Único de Saúde (SUS) financia esses custos (Dutra; Biassi; Figueiredo, 2023). A Hb S pode ainda aparecer em associação com outras hemoglobinopatias, como talassemia alfa e talassemia beta, e variantes como Hb C, Hb D e Hb E (Jesus, 2010; Brandow; Liem, 2022).

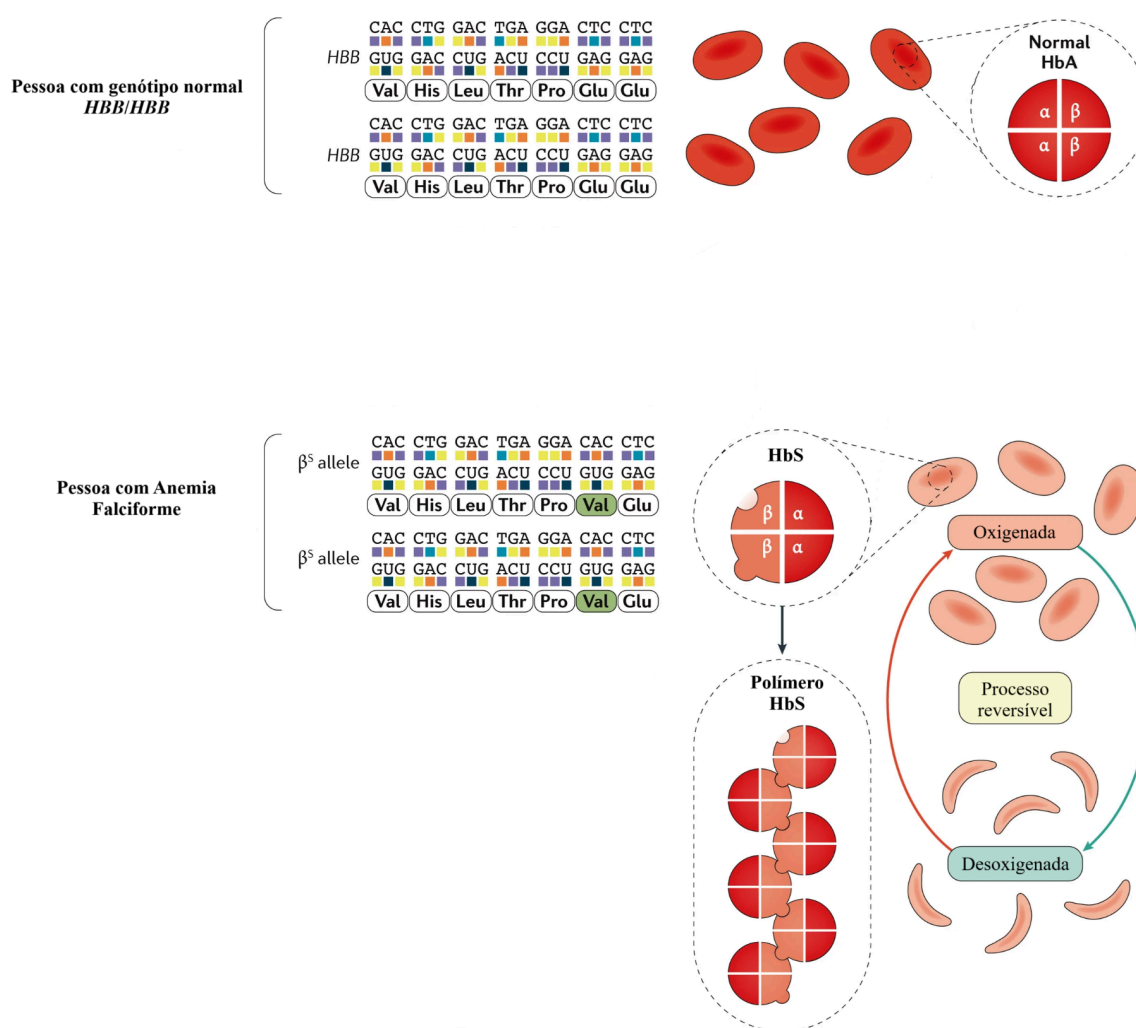
A Hb S reduz a solubilidade e aumenta a polimerização, contribuindo para a falcização dos eritrócitos, adesão celular, hemólise, vaso-occlusão, estado pró-inflamatório, lesão oxidativa, disfunção endotelial e hipercoagulabilidade (Brandow; Liem, 2022). Dentre as manifestações clínicas apresentadas pelos homozigotos, estão: anemia, crises de dor, infecções recorrentes, icterícia, sequestro esplênico, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral, priapismo, crise aplásica, úlcera de perna, osteonecrose ou necrose avascular. Crises de dor, anemia, icterícia e infecções recorrentes são os sintomas mais comuns (Ballas, 2014).

Uma das características da Hb S é a falcização do eritrócito pela polimerização da hemoglobina. Quando a saturação de oxigênio na hemoglobina é menor, a polimerização se inicia. Se o eritrócito estiver desoxigenado, sofre alterações na sua membrana, forma e flexibilidade, assumindo forma de foice, como consequência da polimerização (Zago *et al.*, 2007; Ladeia; Sales; Dias, 2020). A falcização é reversível por meio da reoxigenação das hemoglobinas, que interrompe a polimerização (Kato, 2018; Ladeia; Sales; Dias, 2020). Caso haja alterações definitivas na membrana, o eritrócito torna-se irreversivelmente falcizado, e permanentemente deformado, independente do estado da hemoglobina em seu interior

(Shaklai *et al.*, 1981, Ladeia; Sales; Dias, 2020). A falcização faz com que o eritrócito seja retirado da circulação, no baço principalmente, resultando em uma anemia hemolítica crônica (Costa; Fertrin; Conran, 2013), criando a necessidade de transfusão de sangue em casos mais graves (Brunetta *et al.*, 2010).

A taxa de polimerização está proporcionalmente ligada à concentração de Hb S dentro dos eritrócitos, e inversamente proporcional à concentração de Hb F, pois quanto maior a concentração de Hb F intraeritrocitária, menor será a concentração de Hb S (Noguchi *et al.*, 1988). A Hb F tem sido o modulador genético mais estudado na AF, uma vez que inibe a polimerização da Hb S, melhorando o quadro clínico dos pacientes (Steinberg, 2005). A figura 2 ilustra o mecanismo de falcização.

Figura 2 — Alteração genética no gene da beta globina (*HBB*) que ocasiona a síntese da Hb S



Fonte: Adaptada de KATO *et al.*, 2018. Em sua forma normal a hemoglobina A (HbA) é formada por duas subunidades de cadeias α -globina (codificadas pelos genes *HBA1* e *HBA2*) e duas subunidades de cadeias

β -globina (codificadas pelo gene *HBB*). O alelo mutante do gene *HBB*, que origina a hemoglobina falcêmica (HbS), β^S , sofre alteração no sexto códon, substituindo uma adenina por timina, resultando na troca do ácido glutâmico por uma valina. Quando ambos alelos sofrem essa alteração, ocorre então, a anemia falciforme (AF). A HbS desoxigenada pode formar polímeros que podem endurecer o eritrócito e mudar sua forma, tornando-o em forma de foice.

Em 2007 foi desenvolvida uma calculadora, com a finalidade de predizer o risco de morte em portadores da doença falciforme, que leva em consideração sete aspectos clínicos, 13 testes laboratoriais e dados demográficos para gerar um score de gravidade, que varia de 0 (menos grave) a 1 (mais grave), por meio de um modelo de rede Bayesiano, que então classifica os pacientes em três categorias: suave, intermediária ou grave (Sebastiani *et al.*, 2007). Em 2015, Belini-Júnior. *et al.*, realizaram, pela primeira vez no Brasil, um estudo para avaliar pacientes brasileiros de acordo com a gravidade da doença falciforme por meio da calculadora desenvolvida por Sebastiani *et al.* (2007). Este estudo dividiu 500 pacientes em três grupos, de acordo com suas idades: de 5 a 17 anos, de 18 a 40 anos, e acima de 40 anos. Em seguida foram comparados os resultados antes e após o uso de hidroxycarbamida. Quando contrapostos, os scores médios de gravidade de cada grupo, com os grupos semelhantes de outros países, notou-se que todos os grupos brasileiros apresentam maior *score* de gravidade em relação aos demais (Belini-Júnior *et al.*, 2015).

1.3. TALASSEMIA ALFA

As talassemias são um grupo de hemoglobinopatias causadas pela redução ou ausência da produção de uma ou mais cadeias de globina, sendo nomeadas a partir da cadeia modificada, alfa e/ou beta (Cao; Kan, 2013; Bajwa; Basit, 2023). O desequilíbrio entre as cadeias globínicas é um dos aspectos mais importantes da doença, no qual quanto maior o desequilíbrio mais grave será a doença (Shang; Xu, 2017; Jaing *et al.*, 2021).

Indivíduos com genótipo normal possuem quatro genes alfa ($\alpha_1\alpha_2/\alpha_1\alpha_2$) que codificam as cadeias alfa da globina, sendo dois em cada cromossomo 16 (Adekile *et al.*, 2020; Alhuthali *et al.*, 2023; Bajwa; Basit, 2023; Musallam *et al.*, 2024). Apesar de serem homólogos e codificarem proteínas idênticas, o gene α_2 têm expressão duas a três vezes maior que o gene α_1 no total da globina alfa produzida (Liebhaber; Cash; Ballas, 1986).

Comumente, o gene se torna disfuncional devido a deleções de sequências de DNA, sendo as deleções -3,7 Kb e -4,2 Kb as mais comuns no Brasil (Alcoforado *et al.*, 2012). A talassemia alfa também pode ser causada por deleções de uma sequência importante para a

ativação dos genes alfa. De maneira geral, podemos dizer que a perda de um único gene alfa pode resultar em diminuição leve, moderada ou grave da síntese de globina alfa dependendo de como ocorreu essa perda gênica, e qual locus foi envolvido (Liebhaber, 1989; Kazazian, 1990; Higgs, 2013).

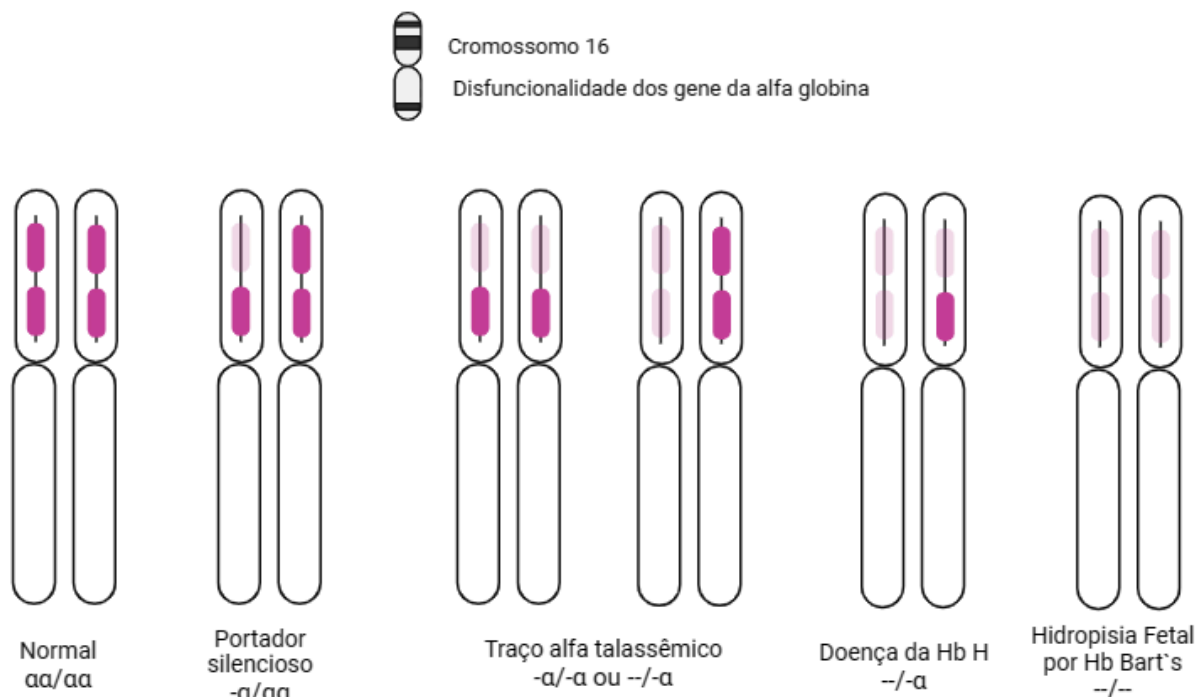
As taxas de prevalência das talassemias variam entre regiões geográficas, sendo mais comum em países tropicais e subtropicais, principalmente no Sudeste da Ásia e no Mediterrâneo (Musallam *et al.*, 2024), especialmente onde a malária é endêmica, devido a vantagem de sobrevivência contra as infecções causadas por *Plasmodium falciparum* (Higgs, 2013; Shang; Xu, 2017; Frahi; Harteveld, 2018; Musallam *et al.*, 2024).

O genótipo clínico depende do número de genes envolvidos, ou seja, do desequilíbrio na produção das cadeias alfa e não alfa (Higgs, 1993). A grande maioria das talassemias alfa é resultado da deleção de um gene (α^+) ou dois (α^0) genes da globina alfa (Higgs *et al.*, 1989).

A quantidade de genes α deletados apresenta uma correlação significativa com a hemoglobina corpuscular média (HCM), com a amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) e o volume corpuscular médio (VCM); É indicativo da presença do alelo α^0 quando observado $VCM < 70,80$ fL e $HCM < 21,90$ pg, enquanto que em indivíduos com microcitose, $HCM < 23,40$ pg, valores normais de HbF e HbA2 e sem deficiência de ferro não se correlacionam a esse alelo. Além disso, tanto $HCM < 19$ pg quanto $RDW \geq 20\%$ são indicadores de doença da Hb H (Alhuthali *et al.*, 2023).

Em relação à expressão fenotípica, a talassemia alfa pode ser dividida em quatro categorias, sendo elas: Portador Silencioso ($-\alpha/\alpha\alpha$); Traço talassêmico-alfa ($-\alpha/-\alpha$ ou $--/\alpha\alpha$); Doença da Hb H ($--/-\alpha$) e Hidropisia Fetal por Hb Bart's ($--/--$) (W.H.O., 1987; Higgs *et al.*, 1989). A figura 3 ilustra essa classificação pelo esquema de herança dos genes envolvidos.

A taxa global de portadores de uma ou mais mutações da talassemia alfa é de aproximadamente 5% (Kwaifa; Lai; Noor, 2020; Santos *et al.* 2020; Musallam *et al.*, 2024), com o estado de portador chegando atingir até 80 – 90% da população em algumas áreas (Farashi; Harteveld, 2018; Adekile *et al.*, 2020).

Figura 3— Deleções dos genes *HBA*

Fonte: elaborada pela autora, 2024. Representação das possíveis deleções dos genes da α -globina, presentes no cromossomo 16. Quando há 4 genes funcionais, temos uma expressão normal da α -globina. Quando apenas 3 genes estão funcionais, teremos então a caracterização do portador silencioso de talassemia alfa. Quando há 2 genes funcionais, denominamos traço talassêmico alfa. Apenas 1 único gene funcional, caracteriza a doença da Hb H e por fim, quando não há gene funcional, temos a caracterização da hidropisia fetal por Hb de Bart, que é incompatível com a vida.

1.4. ASSOCIAÇÃO DA ANEMIA FALCIFORME E TALASSEMIA ALFA

Os principais impactos da associação entre talassemia alfa e anemia falciforme incluem a modificação dos parâmetros laboratoriais, afetando a sobrevida geral dos pacientes e a frequência individual de complicações clínicas (Belisário; Viana, 2011). Quando em associação com mutantes de cadeias beta, como a Hb S, a talassemia alfa afeta significativamente o nível dessa hemoglobina, influenciando as manifestações clínicas do gene anormal (De-Ceulaer *et al.*, 1983; Steinberg; Embury, 1986; Sonati *et al.*, 1991).

A co-herança de deleções do gene *HBA* é um modulador da DF, onde a deleção de 3,7 Kb (deleção $\alpha^{3,7}$) está associada a diminuição da bilirrubina, plaquetas e melhores índices hematológicos com diminuição do grau de anemia nos pacientes com AF, onde a maioria dos estudos apresenta redução de eventos como acidente vascular cerebral e ulcerações nas pernas, funções esplênicas mais preservadas (Belisário; Viana, 2011; Aleluia *et al.*, 2017). A

maioria dos estudos, apesar de apresentar algumas divergências, mostram o aumento do número de eritrócitos, aumento dos níveis de Hb total e hematócrito (HCT) e diminuição dos níveis de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), reticulócitos, contagem de leucócitos e níveis de hemólise (Belisário; Viana, 2011).

Os portadores de AF que exibem a co-herança da talassemia alfa possuem menor concentração de Hb S intracelular, reduzindo assim, os episódios de polimerização e destruição dos eritrócitos. A diminuição da taxa de hemólise, contribui para melhora nos índices hematológicos, que consequentemente interferem de forma positiva no bem-estar geral e sobrevida desses pacientes (Rumaney *et al.*, 2014).

Ao analisar as medições de eritropoetina (EPO) e refletir sobre as alterações observadas na Hb, Brewin *et al.* (2022) descobriram que os valores de EPO eram mais baixos nos indivíduos que apresentam associação entre AF e talassemia alfa. Alguns estudos sugeriram que a talassemia alfa pode atenuar a resposta à hidroxycarbamida em pacientes com DF, embora outros não tenham observado o mesmo feito. No caso da análise realizada por Brewin *et al.* (2022) não houve diferença clínica significativa quanto a resposta de HU e a co-herança de talassemia alfa.

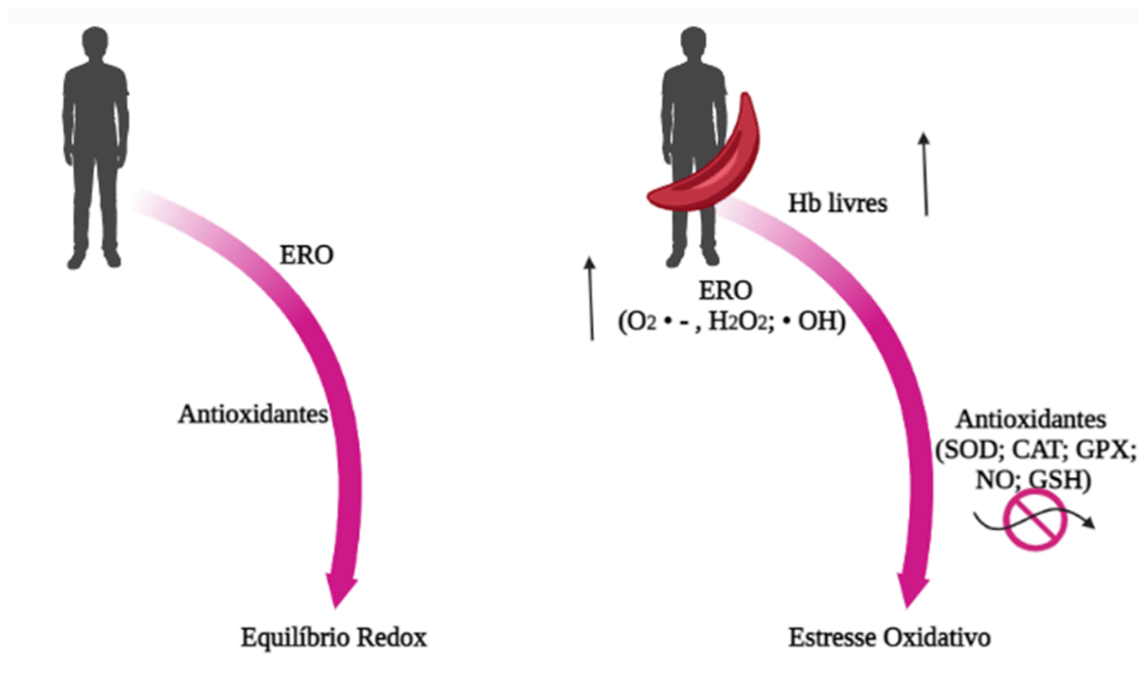
Apesar da importância da talassemia alfa na modulação da AF, sua presença ou ausência, não permite prever, de forma isolada, as características clínicas da doença, sendo necessário o estudo com outros moduladores e que possam ser utilizados em conjunto (Belisário; Viana, 2011).

1.5. ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de espécies reativas de oxigênio, resultado do metabolismo de oxigênio, ocasionam o estresse oxidativo dos eritrócitos normais, no entanto, é restaurado de forma eficiente pelo sistema antioxidante das células (Hermann *et al.*, 2016). O estresse oxidativo é gerado a partir do desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes (Barbosa *et al.*, 2010), e está cada vez mais relacionado com a fisiopatologia da doença falciforme, ocasionando danos celulares e teciduais (Rees; Gibson, 2011). Na doença falciforme (DF), o estresse oxidativo pode estar relacionado a meta-hemoglobina S, que devido a sua instabilidade, leva a hemólise intravascular, à lesão de isquemia-reperfusão, à inflamação crônica e a maior auto-oxidação da hemoglobina falciforme (Hermann *et al.*, 2016). Um fator

a ser avaliado é a relação do estresse oxidativo com a gravidade da anemia falciforme. A Figura 4 esquematiza o processo gerador de estresse oxidativo na anemia falciforme.

Figura 4 — Processo gerador de estresse oxidativo na anemia falciforme



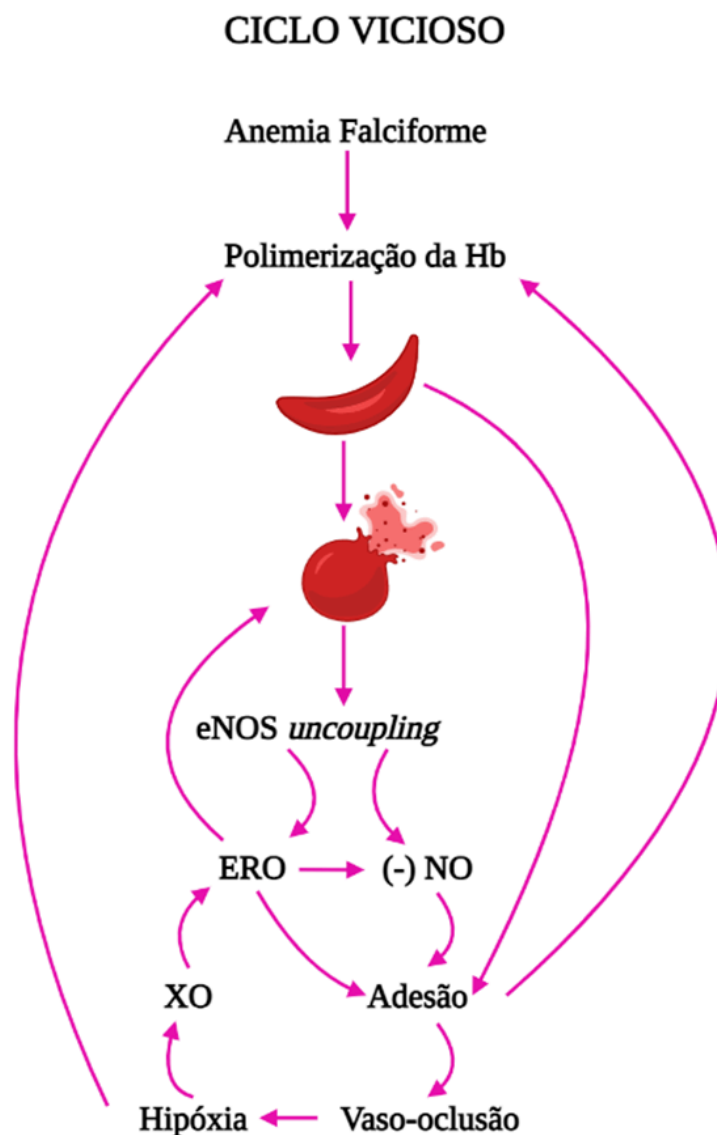
Fonte: elaborada pela autora, 2024. No organismo sem mutação causadora da anemia falciforme (AF), enquanto o metabolismo gera as espécies reativas de oxigênio (ERO), as enzimas antioxidantes trabalham quebrando essas moléculas prejudiciais ao nosso organismo, mantendo assim o equilíbrio redox. Enquanto em portadores de AF devido ao aumento significativo de hemoglobina (Hb) livres causadas pela hemólise e consequentemente o aumento das ERO, o organismo não consegue uma ação eficaz das enzimas antioxidantes, levando ao estresse oxidativo, prejudicial às células. $O_2^{\bullet-}$ = radical superóxido; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; $\bullet OH$ = radical hidroxila; SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GPX = glutatona peroxidase; NO = óxido nítrico; GSH = glutatona reduzida.

Os diferentes efeitos fisiopatológicos da falcização do eritrócito podem estar relacionados entre si por meio da alteração nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem gerar um ciclo vicioso na anemia falciforme (Chirico; Pialoux, 2012). A principal fonte de ERO na anemia falciforme é o momento de reoxigenação do eritrócito. Na Hb S, esse é o momento em que alguns grupos heme se auto-oxidam devido ao contato com o oxigênio, gerando meta-hemoglobina e radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A velocidade de auto-oxidação da Hb S é 1.7x maior que a da Hb A (Hebbel et al., 1988). Devido a esta condição, o eritrócito pode ficar repleto de íons superóxidos e de sua forma dismutada, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A reação de transformação de superóxido em peróxido de hidrogênio é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), uma das enzimas antioxidantes que participam do processo de proteção do eritrócito contra radicais livres (Fridovich, 1997).

Quando a metahemoglobina é exposta ao H_2O_2 , é decomposta e libera ferro, que irá em seguida reagir com o peróxido de hidrogênio para gerar o radical hidroxila ($\bullet OH$), a mais

reativa e prejudicial das ERO (Aslan *et al.*, 2000). Outro fator importante do estresse oxidativo é a participação do óxido nítrico (ON) e sua relação com a arginase e hemoglobinas livres no plasma devido à hemólise de eritrócitos. O óxido nítrico é um importante regulador de tônus vascular, fluxo sanguíneo e adesão. Em portadores de anemia falciforme a hemólise é aumentada devido à falta de flexibilidade do eritrócito, por isso encontram-se no plasma quantidades aumentadas de hemoglobina e arginase, uma enzima que metaboliza o excesso de nitrogênio. O óxido nítrico pode passar então por três processos: 1) ser metabolizado pela arginase; 2) reagir com a Hb S desoxigenada, resultando na formação do complexo estável $\text{Fe}^{2+}\text{Hb-NO}$, que pode prontamente participar das reações de Fenton (Belcher et al., 2010), reagir com a Hb S oxigenada, podendo formar metahemoglobina e nitrato. Isso demonstra que o portador de doença falciforme possui menor quantidade de NO disponível para executar suas funções fisiológicas, favorecendo a vasoconstrição. (Chirico; Pialoux, 2012). A figura 5 ilustra esse ciclo vicioso na AF.

Figura 5 — Representação esquemática do ciclo vicioso da anemia falciforme



Fonte: Adaptada de Chirico; Pialoux, 2012. A reação cíclica com a polimerização que leva a uma cascata de efeitos que recomeçam o ciclo, reiniciando as complicações da doença, onde a partir da polimerização ocorre a falcização e a hemólise. Abreviações: eNOS - óxido nítrico endotelial sintase; Hb - hemoglobina; NO - óxido nítrico; ERO - espécies reativas de oxigênio; XO - xantonina oxidase.

Uma das enzimas antioxidantes mais importantes é a catalase, responsável por catalisar a reação dismutase na qual o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é convertido à H_2O e O_2 . O peróxido de hidrogênio ainda pode ser removido por meio de outra enzima, a glutathione peroxidase (GPX), cuja atividade é dependente da presença de glutathione reduzida (GSH), que é oxidada para glutathione oxidada (GSSG). A concentração de GPX é diminuída em portadores de anemia falciforme (Natta *et al.*, 1990), e tem relação direta com a gravidade da doença (Dasgupta *et al.*, 2006).

Ainda não há informações consistentes sobre os níveis de catalase em portadores de anemia falciforme. Alguns estudos demonstram que há uma menor atividade da catalase em pacientes falciformes (Silva *et al.*, 2011), enquanto outros demonstram atividade da enzima aumentada (Das; Nair, 1980; Manfredini *et al.*, 2008). O aumento de catalase pode ser um mecanismo protetivo para reduzir o peróxido de hidrogênio, enquanto os níveis baixos podem ser devido ao estresse oxidativo crônico (Silva *et al.*, 2013).

1.6. HIDROXICARBAMIDA

O uso da hidroxycarbamida (HU) foi um dos grandes avanços no tratamento dos pacientes com doença falciforme (DF) (Tanimoto Duque *et al.*, 2022), sendo a primeira opção medicamentosa para pacientes que apresentam quadros clínicos de moderados a graves (Henrique, 2022). A HU é um fármaco que induz a produção de Hb F por meio da ativação da transcrição da cadeia gama da hemoglobina (Azar; Wong, 2017).

Tecnicamente a HU é um inibidor de replicação de DNA. Um dos mecanismos de ação da hidroxycarbamida é a inibição da ribonucleotídeo redutase (RR), uma enzima que converte ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos (dNTPs), requeridos para síntese e reparo de DNA. A inibição da RR leva a menores quantidades de desoxirribonucleotídeos intracelulares e impede a progressão da divisão celular na fase de síntese (fase S) e consequentemente, a construção de novas fitas de DNA, induzindo o estresse de replicação (Musialek; Rybaczek, 2021). Paralisar temporariamente a eritropoiese uma vez ao dia altera o ciclo e, tal “estresse eritropoiético”, causa o recrutamento de eritrócitos ainda jovens, que têm capacidade de produzir e consequentemente aumentar a Hb F (McGann; Ware, 2015; Musialek; Rybaczek, 2021), fazendo assim, com que altere a cinética da polimerização da Hb S, diminuindo a adesão das células sanguíneas às células endoteliais vasculares (Musialek; Rybaczek, 2021), crises vaso-oclusivas, redução de hospitalizações, redução de necessidade de transfusões e menor ocorrência de síndrome torácica aguda (STA) (Tanimoto Duque *et al.*, 2022).

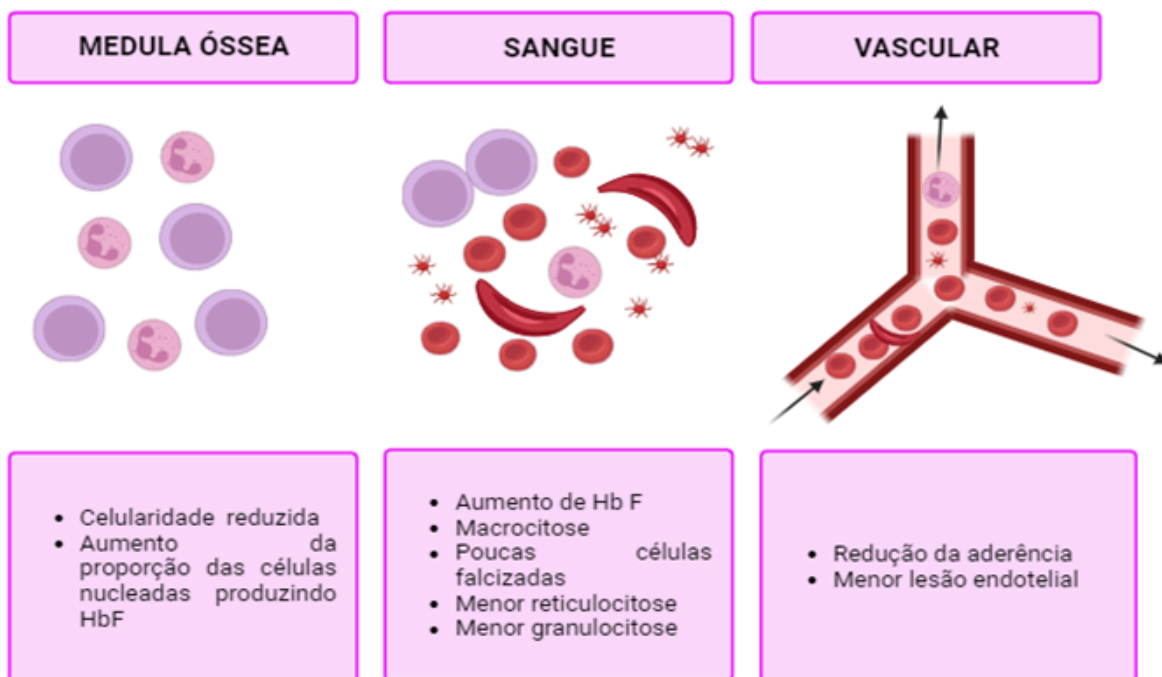
A Hb F prolonga o tempo necessário para que a Hb S se polimerize, permitindo que os eritrócitos falcêmicos escape da microcirculação para veias maiores, chegando aos pulmões, onde ocorrerá a reoxigenação, e dessa forma, a despolimerização da Hb S (Steinberg, 2020). Ao induzir o aumento dos níveis da HbF, a HU foi associada à redução da morbidade e da mortalidade em adultos. Os níveis de Hb F induzida variam muito, dependendo de interações farmacogenéticas (Pule *et al.*, 2015), não sendo distribuídos uniformemente nos eritrócitos, caso contrário, seria ainda mais eficaz (Tisdale; Thein; Eaton, 2020). A HU depois de

metabolizada, geralmente pelo fígado, é transformada em NO, que é o principal fator de efeito benéfico do tratamento como: redução da frequência de episódios vaso oclusivos, episódios de dores e transfusões (Barroso *et al.*, 2021). O medicamento também diminui a expressão de moléculas de adesão da superfície dos eritrócitos, plaquetas e leucócitos, e a diminuição de proteínas receptoras em células endoteliais, que resulta na redução de adesão das células sanguíneas ao endotélio, diminuição e regulação da produção de citocinas, mediadores inflamatórios e oxidantes, e no aumento da síntese e biodisponibilidade de NO pela ativação da guanilil ciclase (Guarda *et al.*, 2019; Cançado *et al.*, 2009). As principais vantagens da HU é seu custo baixo e sua fácil administração, porém apesar da sua baixa toxicidade, em alguns casos, o uso de HU pode acarretar mielodepressão e pancitopenia, aparecimento de úlceras de perna, enxaqueca, apresentação de excreção renal, e ter potencial teratogênicos (Henrique, 2022).

No Brasil, a HU passou a fazer parte do arsenal terapêutico para AF em 2002, regulamentada pela portaria de nº 872 do Ministério da Saúde (Sousa *et al.*, 2020). A HU é indicada a quase todos os pacientes com DF (Steinberg, 2020), desde o segundo ano de vida e, quando em casos especiais, a partir do nono mês de vida (Ministério da Saúde, 2018), mas mesmo com a eficácia comprovada na redução das crises falciformes e na melhora da sobrevivência, a HU é subutilizada (Tisdale; Thein; Eaton, 2020).

Dados mostram que em pessoas que fazem o uso de HU as crises diminuem pela metade em comparação com os sintomas antes do uso do medicamento, acarretando na diminuição de transfusões sanguíneas, diminuição das internações e resultando em melhora na qualidade de vida, com custo global do tratamento menor (Barroso *et al.*, 2021). A figura 6 mostra a ação da HU no organismo da pessoa com anemia falciforme.

Figura 6 — Efeito fisiológico da hidroxycarbamida em pacientes com anemia falciforme



Fonte: Adaptada de Steinberg, 1999. A hidroxycarbamida pode agir no organismo atuando na redução da celularidade da medula óssea, no aumento da proporção das células nucleadas produzindo Hb F e diminuindo a polimerização de Hb S, apresentando menor células falcizadas, diminuindo a quantidade de reticulócitos circulantes e menor concentração de granulócitos.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que a relação entre a gravidade da doença falciforme, a presença de talassemia alfa, estresse oxidativo e o uso ou não de hidroxycarbamida possui poucos estudos na população brasileira, a realização do estudo visou auxiliar a compreensão da interação entre estes fatores para o fenótipo dos pacientes, aprimorando e adequando o tratamento e a qualidade de vida. Dessa forma, sabendo-se que, tanto a Hb S quanto a talassemia alfa são hemoglobinopatias que ocasionam a lise dos eritrócitos quando expressas isoladamente, e que sua co-herança pode resultar na melhora do quadro clínico do paciente, supõe-se que a associação dessas doenças possa interferir na biodisponibilidade dos fatores de estresse oxidativo, influenciando a manifestação clínica do paciente.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto foi comparar o estresse oxidativo e a gravidade da anemia falciforme quando em associação com talassemia alfa (ou não), e em uso de hidroxycarbamida (ou não).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a influência da herança da talassemia alfa no perfil de gravidade, com e sem uso de hidroxycarbamida

Traçar o perfil de estresse oxidativo nas amostras de pacientes classificados por gravidade.

Traçar o perfil de estresse oxidativo e gravidade da doença falciforme em portadores de anemia falciforme (SS), que apresentam (ou não) associação com talassemia alfa e que foram (ou não) tratados com hidroxycarbamida.

4. MATERIAL E MÉTODO

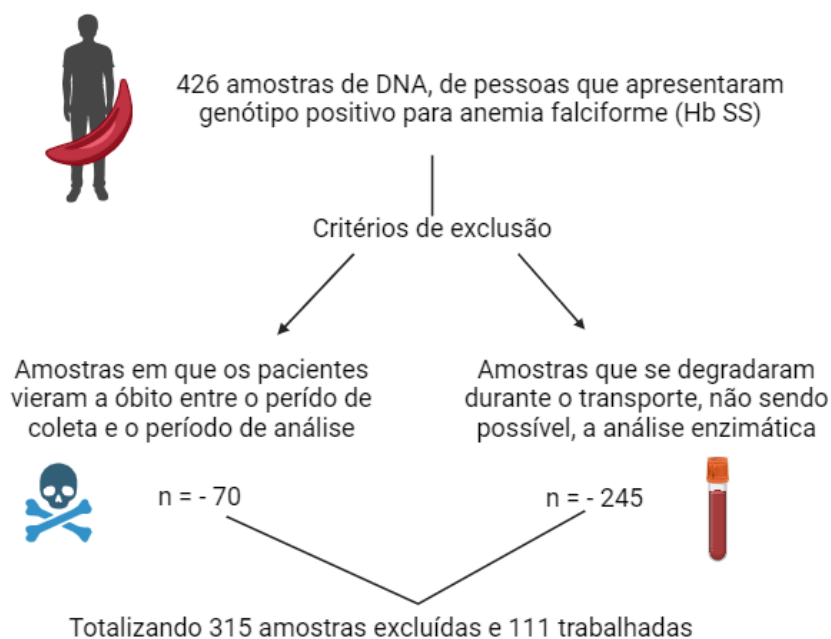
4.1. CASUÍSTICA

Para a realização das análises da pesquisa, foram utilizadas 426 amostras de DNA, de pacientes do Instituto Estadual de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcanti”, Rio de Janeiro (HEMORIO), com genótipo confirmado para anemia falciforme (Hb SS), disponíveis em banco de dados. As amostras que sofreram degradação durante o transporte, tornando-se impróprias para análise enzimática e, as amostras de pacientes que vieram à óbito entre o período de coleta e o período de realização das análises, foram excluídas da pesquisa. Dessa forma, foram elegíveis 111 amostras, (67 pacientes do sexo feminino e 44 pacientes do sexo masculino), sendo que, na data da coleta a idade dos pacientes variavam entre 6 anos e 54 anos.

A gravidade clínica desses pacientes foi estabelecida a partir de uma ferramenta denominada “Calculadora de Gravidade da Doença Falciforme”, categorizando por fenótipos (leve, moderado ou grave), desenvolvida por Sebastiani *et al.* (2007) e aplicada em estudo com pacientes do HEMORIO em 2015 por Belini-Junior *et al.*

A casuística simplificada para esta pesquisa está esquematizada na Figura 7.

Figura 7 — Esquematização simplificada da casuística da pesquisa



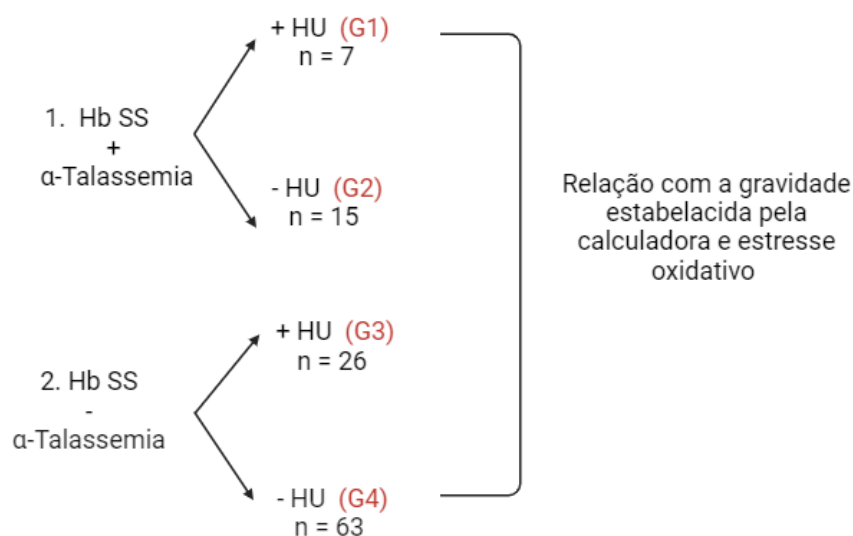
4.2. METODOLOGIA

A seguir serão descritas as metodologias utilizadas para o delineamento experimental da pesquisa, na triagem, para identificação de hemoglobinopatias, nas amostras, para obtenção dos resultados.

4.2.1. Delineamento experimental

Em nosso projeto, foram avaliados grupos de portadores de anemia falciforme (Hb SS), com e sem uso de Hidroxicarbamida, quanto ao genótipo de talassemia alfa, relacionados com a gravidade estabelecida pela calculadora, no desenho experimental apresentado na Figura 8.

Figura 8 — Esquematização do delineamento experimental da pesquisa



Fonte: elaborada pela autora, 2024. Hb SS = indivíduos com anemia falciforme; α -Talassemia = talassemia alfa; HU = hidroxicarbamida; G1 = grupo um; G2 = grupo dois; G3 = grupo 3; G4 = grupo quatro; n = número de amostras.

4.2.2. Hemolisado com saponina e solução de Hb com clorofórmio (Naoum,1998)

Para a realização dos procedimentos eletroforéticos e bioquímicos, as amostras foram lisadas para a obtenção da solução de Hb utilizando as metodologias de hemolisado rápido, com saponina, e solução de Hb, com clorofórmio.

Para realização do hemolisado com saponina foi colocado um volume de sangue para um volume de reativo hemolisante (1g de Saponina P.A. e 100ml de água destilada) em placa de Kline, fazendo a homogeneização até a hemólise completa da mistura. O hemolisado pôde ser utilizado após 5 minutos, e no máximo, 4 horas após seu preparo.

Para a realização da solução de Hb com clorofórmio, foi feita uma lavagem dos eritrócitos onde centrifugou-se 1 ml de sangue colhido com anticoagulante com solução salina a 0,85%, a 1.500 rpm, durante 5 minutos, desprezando o sobrenadante (o processo foi repetido 3x no mínimo). Ao volume dos eritrócitos lavados, adicionou-se outro de água destilada, homogeneizando a solução. Adicionou-se um volume do clorofórmio idêntico ao do hemolisado formado, após a mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 2.000 rpm por 20 minutos. A solução de Hb sobrenadante, foi retirada com o auxílio de pipeta Pasteur e transferida para um tubo limpo identificado. A concentração do hemolisado variou de 10 a 15 g/dL.

4.2.3. Resistência globular osmótica em Cloreto de Sódio a 0,36% (Silvestroni; Bianco, 1975)

Foi analisada a resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36%, para a detecção de talassemias beta, principalmente em heterozigose, pois estes casos apresentam eritrócitos microcíticos, mais resistentes à hemólise nesta solução. Os resultados positivos desta técnica podem ser encontrados também em anemias carenciais e em hemoglobinopatias como Hb C em heterozigose. Para a realização da técnica é necessário a diluição da solução estoque NaCl a 10% com pH 7,4 (9,0g de NaCl, 1,36 g de Na₂HPO₄, 0,28g de NaH₂PO₄.H₂O, completando com água destilada até chegar em 100ml) para solução trabalho NaCl a 36% (36 ml de NaCl 10%, completar com água destilada até 1000ml). O procedimento consiste em colocar 2ml de solução NaCl a 0,36% e 10µL de sangue em um tubo de hemólise, agitando por inversão, suavemente. A leitura foi feita após 10 minutos. Para interpretar o resultado colocou-se uma folha com linhas pretas a 2 cm do tubo, sendo positivo quando não é possível visualizar através do tubo as linhas, indicando resistência aumentada, tornando a amostra opaca. Em amostras com resistência osmótica normal é possível visualizar as linhas pretas através do tubo.

4.2.4. Análise à fresco da morfologia eritrocitária (Bonini-Domingos, 2006)

Os esfregaços sanguíneos foram analisados a fresco no microscópio óptico, quanto ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos, sendo descritos como alterações discretas (+), alterações moderadas (++), alterações acentuadas (+++), e células normais (N).

4.2.5. Eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose (Marengo; Rowe, 1965, com modificações)

A técnica foi utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das Hb anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais. Foi embebidas fitas de acetato de celulose em tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB) pH 8,6 (10,2 g de Tris hidroximetil aminometano, 0,6 g de ácido etilenodiaminotetracético, 3,2 g de ácido bórico, água destilada até completar 1000 ml e conservar em geladeira) por no mínimo 15 minutos e no máximo seis horas. Após serem secas em papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para embeber as fitas, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por tecido absorvente. A solução de Hb foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo. Passaram-se 300 Volts por 30 minutos. As frações foram analisadas sem coloração e posteriormente foram coradas com Ponceau (0,5 g Ponceau S, 5,0 g de ácido tricloroacético e água destilada até completar 100 ml), no qual ficaram imersas por cinco minutos e, posteriormente 30 minutos em solução descorante (100 ml de ácido acético glacial, 50 ml de metanol e água destilada até completar 1000 ml).

4.2.6. Eletroforese de diferenciação em ágar-fosfato, pH 6,2 (Vella, 1968)

A técnica foi utilizada para a identificação de algumas Hb que migram na mesma posição na eletroforese de pH alcalino e caracterização semiquantitativa de Hb Fetal. Os componentes de ágar-fosfato (500 mg de ágar-ágar e 25 ml de tampão fosfato pH 6,2) foram adicionados a um erlenmeyer de 250 ml e levados ao forno micro-ondas até a completa dissolução, tomando cuidado para não ferver a mistura. Foram pipetados 5 ml do gel em cada lâmina de microscópio, que gelificaram em temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo tampão-fosfato pH 6,2 (2,02 g de Na_2HPO_4 , 7,66 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e água destilada até completar 1000 ml, devendo ser

conservado em geladeira), utilizando como conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos tecido absorvente (pano multiuso). As amostras foram aplicadas na porção média do gel, com cuidado para o aplicador não partir totalmente o gel. Passaram-se 100 Volts por 30 minutos. As frações foram analisadas sem corar e coradas com Ponceau.

4.2.7. Cromatografia de Alta Performance (HPLC)

Para as análises realizadas pelo equipamento Trinity® Premier Resolution Analytical Columns, que utiliza coluna cromatográfica para separação das frações de hemoglobinas por troca iônica, em sistema fechado. Para a análise foi realizada a calibração da máquina utilizando os kits controle e FASC (HbF, HbA, HbS e HbC) exigidos para garantia da qualidade da análise. Após calibrada, a máquina automatizada, aspira a amostra para realização da quantificação. As análises foram realizadas em amostras de sangue periférico coletadas em tubo contendo EDTA.

Também foi utilizado o equipamento VARIANT (BIO-RAD) com kit de análise Talassemia Beta Heterozigota. Em um tubo de 1,5 ml fornecido pelo fabricante, foram misturados 5 µL de sangue total com 1,0 ml de solução hemolisante fornecida no kit de análise. Após hemólise total, as amostras foram acondicionadas em recipientes adequados e alojados no equipamento para realização dos procedimentos de leitura e análise das frações. A quantificação das diferentes frações de Hb de uma amostra foram realizadas a partir do tempo de retenção e dos valores percentuais, e emitidos em modelo próprio, que inclui, valores numéricos e cromatográficos.

4.2.8. Extração de DNA por método de precipitação salina ou *salting-out* (Salazar *et al.*, 1998, adaptado por Bonini-Domingos, C.R. 2020)

As amostras previamente identificadas para o perfil desejado de hemoglobinopatia, foram submetidas à extração de DNA por meio do método de precipitação salina, cuja técnica corresponde à lise dos leucócitos presentes na amostra de sangue periférico coletado com EDTA, sendo realizado em três etapas: lise das células sanguíneas e desproteíntização, precipitação de DNA e ressuspensão.

O procedimento consiste em transferir 1 mL de sangue periférico colhido em tubo com EDTA para tubo de centrifugação estéril de 2,0 mL, centrifugando por 5 minutos à 5000 rpm em temperatura ambiente, após deve ser desprezado o sobrenadante (plasma) e, ao sedimento,

acrescentar 900µL do Tampão-1x contendo Triton (5 mL do Tampão 1 10x (100 ml Tris-HCl 1M, 100 ml KCl 1M, 100 mL MgCl₂.6H₂O 1M, 40 mL EDTA 0,5 M, água ultra pura até completar 1000 ml) e 45 mL de Triton 2,75% (2,75 ml Triton e água ultra pura até completar 100 ml)), vortexar e centrifugar novamente por 5 minutos à 5000 rpm em temperatura ambiente. Após o procedimento, descartar o sobrenadante por inversão e lavar o sedimento com 1 ml de Tampão 1x (5 mL de Tampão 1 10x e 45 mL de água ultra pura), vortexar vigorosamente o tubo, centrifugar por 5 minutos à 500 rpm em temperatura ambiente (repetir o procedimento 3x ou até que o sedimento de leucócitos esteja isento de hemoglobina). Após a realização do procedimento, descartar o sobrenadante por inversão e lavar o sedimento com 1 mL de Tampão-1x, adicionando 1 µL de proteinase K, centrifugando à 5000 rpm por 5 minutos, em seguida, em temperatura ambiente. Descartar o sobrenadante, ressuspender o sedimento com 200 µL do Tampão 1x e homogeneizar bem. Acrescentar 20 µL de SDS à 10%, homogeneizar o tubo e levar ao banho-maria à 56°C por 15 minutos. Após o tempo estabelecido, adicionar 100 µL de NaCl (5M), homogeneizar e centrifugar por 5 minutos a 1200 rpm em temperatura ambiente. Transferir o sobrenadante para um tubo de 1,5 ml estéril de microcentrífuga e descartar o precipitado. Adicionar ao sobrenadante 1 mL de etanol absoluto gelado e inverter o tubo até a precipitação do DNA. Armazenar o material no congelador por no mínimo 30 minutos.

Em seguida, o material deverá ser centrifugado à 1200 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente, e o etanol absoluto removido. Depois o DNA será lavado com etanol 70% gelado, e centrifugado à 1200 rpm por 5 minutos, em temperatura ambiente, repetindo o procedimento mais uma vez. O etanol será removido e o tubo deixado aberto, sobre papel absorvente por 5 horas (ou overnight) para que haja a evaporação completa do etanol. Solubilizar o DNA com 30 µL de água destilada e incubar a 56°C por 15 minutos. Após a finalização de todo procedimento, o DNA deverá ser conservado em freezer a -20°C.

4.2.9. Extração de DNA com Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989)

O procedimento consiste em colocar 800 µL de sangue periférico, colhido com EDTA, em um micro tubo de 1,5 mL com solução de lise 1 (Sacarose 0,32M 10,95g, Tris HCl 10mM 1 mL, MgCl₂ 5 mM 0,5 mL, Triton 1% 100x 1 mL e água mili-Q autoclavada q. s. p. 100 mL) e homogeneizar. Centrifugar por 5 minutos em 6500 rpm, descartar o sobrenadante deixando aproximadamente 300 µL de pellet, completar para 1 mL com solução de lise 1, homogeneizar até desfazer o pellet e deixar descansar de 10 à 15 minutos. Após o descanso,

centrifugar por 5 minutos em 6500 rpm, descartar o sobrenadante. Completar novamente para 1 mL com a solução de lise 1, homogeneizar até desfazer o pellet deixando descansar de 10 à 15 minutos, centrifugar por 5 minutos em 6500 rpm e descartar o sobrenadante.

Finalizada as etapas anteriores, acrescentar ao pellet 450 µL de solução de lise 2 (0,075 M de NaCl 2,19 g, 0,02 M de EDTA (solução pH 8,0), 20 mL, água ultra pura q. s. p. 500 mL), ressuspender e adicionar 25 µL de SDS a 10% e 5 µL de proteinase K (20mg/ml) e homogeneizar. Incubar em banho-maria a 37°C overnight ou 42°C por 3 horas. Depois do período de incubação, acrescentar 500 µL de fenol e homogeneizar.

Centrifugar por 5 minutos em 700 rpm, transferir a face superior para outro tubo e colocar 500 µL de clorofórmio álcool isoamílico 24:1 (24 ml de clorofórmio e 1ml de álcool isoamílico), homogeneizar e centrifugar por 5 minutos em 700 rpm. Repetir essa etapa do procedimento.

Transferir o sobrenadante para um tubo contendo 50 µL de KCl (2M) gelado, acrescentar 500 µL de etanol 100% bem gelado e inverter o tubo várias vezes até precipitar o DNA. Centrifugar por 30 segundos em 15.000 rpm, desprezar o sobrenadante e lavar o DNA aderido ao tubo com 200 µL de etanol 70% gelado, centrifugar novamente por 30 segundos em 15.000 rpm e desprezar delicadamente o sobrenadante. Deixar secar entre 15 minutos a 1 hora. Reidratar o DNA com 100 µL de água mili-Q, deixando overnight em temperatura ambiente, ou em banho-maria a 3°C por 30 minutos para total solubilização da amostra. Finalizado todos os processos, armazenar as amostras a -20°C.

4.2.10. Quantificação de DNA e pureza da amostra

A quantificação das amostras de DNA foram realizadas em espectrofotômetro do tipo Nanodrop®, para o qual foi utilizado 1,0 µL de cada amostra. O equipamento além das medidas de absorbância nos comprimentos de onda 260 nm (DNA), 280 nm (proteína) e 230 nm (RNA), também fornece as razões de $A_{260} \cdot A_{280}^{-1}$ e $A_{260} \cdot A_{230}^{-1}$, apresentando o grau de pureza do DNA e certificando a qualidade de sua extração (DE OLIVEIRA CAMPOS, 2014). A amplificação de sequências do cluster do gene da alfa globina é tecnicamente mais difícil do que a amplificação de sequências do cluster do gene da beta globina, necessitando de condições mais rigorosas para o sucesso devido maior conteúdo de GC das sequências de ponto de interrupção e a considerável homologia de sequência dentro do cluster de genes da alfa globina (Galanello Renzo, 2003).

4.2.11. PCR-RFLP para Hb S (Bonini-Domingos, 2006; Belini-Júnior; Cançado; Bonini-Domingos, 2010)

As amostras foram testadas para a mutação resultante em Hb S por meio de PCR-RFLP, onde para o mix foram utilizados 13,0 µL de H₂O, 1,0 µL de cada primer (P 277 (sense): 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' e P 278 (antisense): 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3') a uma concentração de 10,0 µM, 1,0 µL de dNTP a 1,25 mM cada, 1,5 µL de Taq Polimerase de 1U, 2,5 µL de tampão sem MgCl₂, 3,0 µL de MgCl₂ a 50 mM e 2,0 µL de DNA a 100 ng/µL. A reação de amplificação para Hb S seguiu as condições de um ciclo com 35 repetições a de 30 segundos a 94°C para desnaturação inicial, anelamento durante 30 segundos a 55°C, extensão de 1 minutos a 72°C e um ciclo com uma repetição de 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 328 pb foi digerido a 37°C por 3 horas, contendo no mix 13,1 µL de H₂O, 1,0 µL de enzima Dde I (C ↓ TNAG), 2,1 µL de tampão e 10,0 µL do produto da PCR. A mutação do sexto códon (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição; assim após a digestão o alelo normal gerou três fragmentos de 201 pb, 88 pb e 87 pb; e o alelo mutante gera dois fragmentos, um de 288 pb, e outro de 88 pb. A análise foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio a 1%, em corrente constante de 80 volts durante 30 minutos e visualizados sob luz UV.

4.2.12. Gap-PCR Multiplex para α-Talassemia (Chong *et al.*, 2000)

A primeira parte das análises de talassemia alfa foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campus II de Três Lagoas.

Para a composição do mix para amplificação do DNA, foi utilizado o kit Quiagen (cod. nº. 206143), seguindo as medidas de 7,5 µL do Master Mix, 1,5 µL do Q-Solution, 3,0 µL do mix de primer.

Quadro 1 — Sequência de *primers* para análise de PCR multiplex em tubo único para deleções de talassemia alfa

PRIMERS para análise de PCR multiplex em tubo único para deleções de talassemia alfa			
NOME	SEQUÊNCIA 5'→ 3'	GENBANK ID: NUCLEOTÍDEO	AMPLIFICAÇÃO (TAMANHO)
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCCATTGAGC	HSLIS10:407 → 428	LIS1 3'UTR frag
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	HSLIS10:2909 → 2887	(2350 pb)
α 2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	HUMHBA4:5676 → 5694	- α 3.7jxn frag
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	HUMHBA4:11514 → 11494	(2022/2029 bp)
α 2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	HUMHBA4:7475 → 7457	(1800 bp)
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	HUMHBA4:3064 → 3084	- α 4.2jxn frag
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	HUMHBA4:8942 → 8920	(1628 bp)

Fonte: Adaptado de CHONG *et al*, 2000. Identificação dos primers, sequências e amplificação (em pares de base (pb)) para a composição do mix em tubo único e amplificação em multiplex gap-PCR.

4.2.13. Para detecção de Talassemia Alfa (Protocolo de deleções -3.7 e -4.2) em multiplex

A identificação do genótipo de alfa talassemia foi realizada por meio de PCR-Multiplex. A reação de amplificação para alfa talassemia (deleções -3.7 e -4.2) seguiu as condições de um ciclo à 96°C por quinze minutos, para desnaturação inicial; um ciclo de 35 repetições com 98°C por quarenta e cinco segundos, para desnaturação, 63°C por um minuto e trinta segundos, para anelamento, e 72°C por dois minutos e quinze segundos, para extensão da fita de DNA; um ciclo à 72°C por sete minutos, para extensão final da dupla hélice dos DNA sintetizados.

A análise do produto amplificado será feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio a 1%, em corrente de 100 volts por 1 hora e 30 minutos. Finalizado o procedimento, expor à luz ultravioleta para visualização.

4.2.14. Gap-PCR Multiplex para α -Talassemia (Old *et al.*, 2012, adaptado por Malerba; Bonini-Domingos)

A segunda parte das análises foi realizada no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas - LHGDH, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

Para o mix foram utilizados os mesmos *primers* ($\alpha 2/3.7$ -F, $\alpha 2$ -R, 3.7/20.5-R, 4.2-F, 4.2-R) descritos no Quadro 1, seguindo o protocolo apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 — Protocolo para análise gap- PCR multiplex para talassemia alfa 3.7 e 4.2

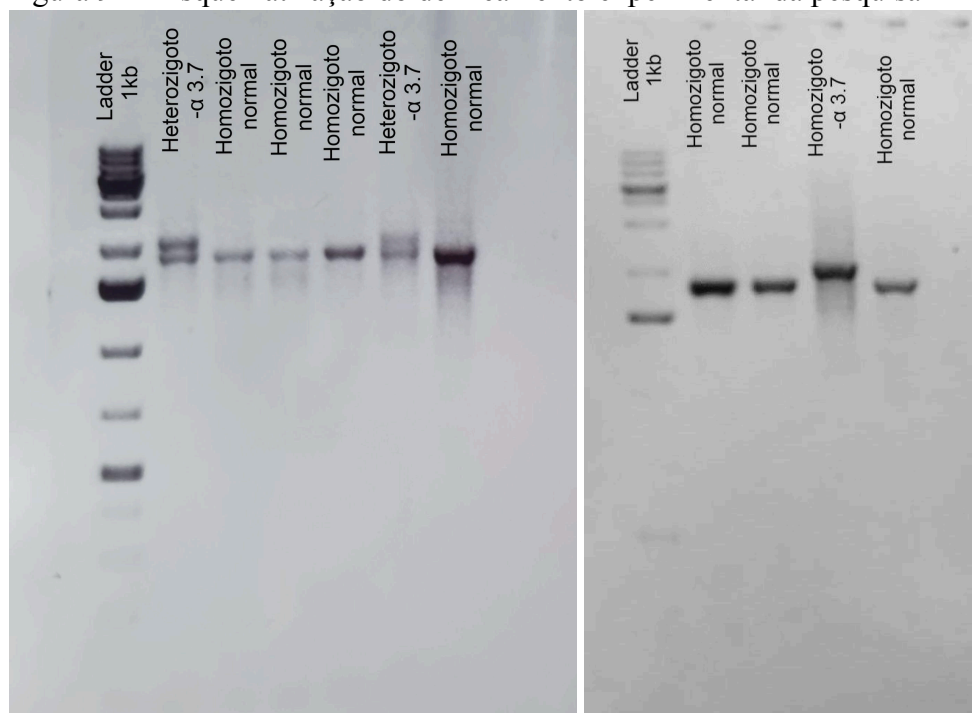
$\alpha 2/3.7$ -F (μ M)	1,0 μ L
$\alpha 2$ -R (μ M)	0,25 μ L
3.7/20.5-R (μ M)	1,0 μ L
4.2-F (μ M)	1,0 μ L
4.2-R (μ M)	1,5 μ L
Tampão 10x (750 mM Tris-HCl pH 8.8, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% Tween 20)	2,5 μ L
MgCl ₂ (25mM)	2,5 μ L
dNTPs (1mM)	5,0 μ L
Betaina (5M)	3,75 μ L
DMSO 10%	1, 25 μ L
H ₂ O	3,1 μ L
DNA (160ng/ μ L)	2,0 μ L
Taq polimerase Platinum (5 unidades/ μ L)	0,2 μ L

Fonte: Adaptado de Old *et al.*, 2012. Composição do mix para a composição do mix em tubo único e amplificação em multiplex gap-PCR.

A reação de amplificação para alfa talassemia (deleções -3.7 e -4.2) seguiu as condições de um ciclo à 95°C por cinco minutos, para desnaturação inicial; um ciclo de 35 repetições com 97°C por quarenta e cinco segundos, para desnaturação, 60°C por um minuto e quinze segundos, para anelamento, e 72°C por dois minutos e trinta segundos, para extensão da fita de DNA; um ciclo à 72°C por cinco minutos, para extensão final da dupla hélice do DNA sintetizado.

A análise do produto amplificado será feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio a 1%, em corrente de 80 volts por 45 minutos. Finalizado o procedimento, expor à luz ultravioleta para visualização. Os perfis encontrados deverão ser visualizados assim como apresentados na Figura 9.

Figura 9 — Esquematização do delineamento experimental da pesquisa



Fonte: elaborada pela autora, 2024. Fotos de géis de eletroforese do amplificado para deleção do gene alfa globina, deleção alfa 3.7 ($-\alpha^{3.7}$), apresentando como resultado gene homozigoto normal, heterozigoto mutante para $-\alpha^{3.7}$, homozigoto mutante $-\alpha^{3.7}$. A Ladder de 1kb utilizada como peso molecular conhecido para identificar as bandas do DNA amplificado.

4.2.15. Determinação da atividade enzimática da Catalase (Beutler, 1975)

As amostras de sangue foram diluídas 50 vezes em água destilada e sua atividade medida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, através do decréscimo de absorbância em 240 nm, a 30°C ($\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O procedimento do preparo das amostras consistiu em centrifugar o sangue total por 3 minutos a 1.500 rpm a 4°C, coletar 10 μL do precipitado e misturar a 490 μL de água ultra pura obtendo o hemolisado que foi utilizado nas análises. Para o preparo do Tampão Tris-HCl 1M, pH 8,0 contendo EDTA 0,5 mM foi utilizado 30,27 g de Tris(hidroximetil)-aminometano, 0,365 g de EDTA, 250 ml de água destilada, e ajuste do pH para 8,0 com HCl. Análise de leitura: Referência 1 mL de H_2O ultra pura, o meio de reação (10 mM H_2O_2): adicionou 250 μL de H_2O_2 3% em 25 mL de H_2O ultra pura, foi descartada uma alíquota de 2,5 mL, adicionou 1,25 mL do tampão Tris-HCl.EDTA e 1,25 mL de H_2O ultra pura. Para o ensaio enzimático foram utilizados 990 μL do meio de reação e 10 μL da amostra (hemolisado). A atividade da CAT foi calculada e expressa em U/mL de hemolisado.

4.2.16. Determinação da atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase (Keen *et al.*, 1976)

As amostras foram diluídas em 100 vezes em solução hemolisante e a atividade da GST foi feita pelo método de Keen *et al.*, (1976). Foi adicionada a amostra diluída em um meio de reação que continha, 100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 100 mM de GSH, e o aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm. Para o preparo da solução salina a 0,9% foram utilizados 9,0 g de NaCl e água destilada até completar 1000 mL; enquanto para o preparo da solução hemolisante foram utilizados 500 µL de 2-mercaptanol 7mM, 5 mL de NADP 2 mM, 10 mL de EDTA 0,27 M e água ultra pura até completar 1000 mL. A técnica consistiu em adicionar 1mL da solução de NaCl 0,9% a 100 µL do precipitado de glóbulos vermelhos de sangue total colhido em tubo contendo EDTA, homogeneizar e centrifugar por 3 minutos a 1.500 rpm a 4°C, descartar o sobrenadante. Repetir o processo três vezes. Coletar 50 µL do precipitado e acrescentar 950 µL de solução hemolisante, mantendo por 15 minutos a -18 °C, centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Separar o hemolisado para análise.

Para o preparo do tampão fosfato de potássio a 0,2 M, com pH 6,5 foram utilizados 13,605 g de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico), 17,42 g $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (fosfato de potássio dibásico), água destilada até completar 1000 mL e ajustar o pH para 6,5. Análise de leitura: Referência: 1 mL de solução tampão Fosfato de Potássio.

Para a hidrólise espontânea foram utilizados 980 µL de solução tampão Fosfato de Potássio, 10 µL de GSH 100 mM e 10 µL de CNDB 100 mM. Para o ensaio enzimático foram utilizados 930 µL de tampão fosfato de potássio, 10 µL de GSH 100 mM, 10 µL de CNDB 100 mM e 50 µL da amostra (hemolisado). A atividade da GST total foi calculada e expressa em U/mL de hemolisado.

4.2.17. Determinação da atividade enzimática da Glutathione Peroxidase (Sies *et al.*, 1979)

As amostras de sangue foram diluídas a 100 vezes em solução hemolisante e a atividade da GPx foi medida pelo método de Sies *et al.* (1979), por meio do decréscimo da absorbância de 340 nm, promovido durante a redução da glutathione oxidada (GSSG). A redução é catalisada pela glutathione redutase (GR) em presença de NADPH a 30 °C.

Para o preparo do meio de reação foram utilizados 25 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0; 10 mL de EDTA 0,0005 M, pH 7,0; 1,72 mg/10 mL meio NADPH; 11,0 µL de glutathione redutase; 16,0 mg de GSH e 15 mL de água.

Para preparo do tBOOH foram utilizados 128 μL de tBOOH e 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M com pH 7,0. E por fim, para o preparo do ensaio enzimático foram utilizados (990-X) μL do meio de reação; 10 μL de tBOOH e X μL de amostra.

A referência da análise de leitura foi 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. Para a hidrólise espontânea foram utilizados 990 μL do meio de reação e 10 μL de tBOOH. A leitura foi realizada em 1 minuto a 340 nm.

4.2.18. Dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Mihara; Uchiyama, 1978; Shimauti *et al.*, 2010)

A dosagem plasmática das espécies reativas ao TBARS foi utilizada para avaliar a peroxidação lipídica das amostras, sendo uma técnica baseada na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo com absorção máxima em 535 nm. Valores até 440 ng/mL são considerados normais.

As amostras foram coletadas em tubo contendo EDTA e permaneceram 20 minutos em descanso em Banho Maria em 38 °C, foram centrifugadas por 20 minutos a 1500 rpm e separadas. O TBA utilizado foi preparado no dia da leitura. Foram separados dois tubos de ensaio para cada amostra, pipetando 1 mL de reagente TBA para cada tubo. Os tubos de número um (controle branco) receberam 500 μL de água destilada e os tubos de número dois receberam 500 μL de solução padrão TBARS – controle padrão TBA. A partir dos tubos de número três foram adicionados 500 μL das amostras a serem analisadas. Durante uma hora, os tubos ficaram em Banho Maria a 94 °C, após o procedimento os tubos foram resfriados por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram pipetados 4 mL de álcool n butílico em cada tubo e foram fechados com rolha apropriada, foi feito a homogeneização das amostras no vórtex, e centrifugou-se os tubos por 10 minutos em 2500 rpm.

A leitura realizada em espectrofotômetro, ajustando-o em 535 nm, calibrando o aparelho com o controle branco (tubo 1) e após, foi realizada a dosagem das amostras contidas no tubo.

O cálculo do valor final do TBARS das amostras, em ng/mL (ou nmo/mL) é obtido seguindo a fórmula: $\text{TBARS} = \text{a média} \times F$, no qual $\text{a média} = (A1 + A2)/2$.

$F = ([\text{padrão TBARS}] \times 440,61 / A \text{ padrão TBARS})$, como a solução padrão MDA utilizada tem concentração de 10 nM temos:

$$F = 10 \times 440,61 / A \text{ padrão TBARS}$$

F = 4406,1/ A padrão TBARS

4.2.19. Análise estatística

As amostras foram testadas para normalidade por meio do teste Shapiro-Wilk. Posteriormente foram submetidas a análise de variância (ANOVA), pelo teste de Kruskal Wallis.

5. RESULTADOS

As análises moleculares para identificação das deleções do gene da alfa globina foram realizadas em 111 amostras por meio de gap-PCR Multiplex. Entre as amostras analisadas, 22 amostras obtiveram resultado positivo para deleção 3.7 kb do gene *HBA*, totalizando 19,81% das amostras, e 89 amostras com genótipo normal para as deleções testadas (3.7 kb e 4.2 kb). A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos mais detalhadamente: foram ao total 7 amostras com pacientes com quadro clínico leve, 9 amostras de pacientes com gravidade moderada e 5 amostra de paciente com quadro clínico grave positivas para talassemia alfa heterozigota para deleção 3.7 kb; para a amostra homozigota com a mesma mutação o quadro clínico apresentado pelo paciente foi leve; para as amostras com genótipo normal para talassemia alfa foram encontradas 25 amostras de pacientes com gravidade leve, 41 amostras de pacientes com gravidade moderada e 23 amostras de pacientes com quadro clínico grave, segundo a calculadora de gravidade de doença falciforme adaptada aos padrões brasileiros.

Tabela 1 — Dados obtidos das análises de PCR multiplex para talassemia alfa e o uso de hidroxycarbamida

TALASSEMIA ALFA	TRATAMENTO COM HU	GRAVIDADE			Total de amostras
		Leve	Moderado	Grave	
Heterozigota (W/- $\alpha^{3.7}$)	Sim	1	4	1	22
	Não	6	5	4	
Homozigota (- $\alpha^{3.7}$ /- $\alpha^{3.7}$)	Sim	1	0	0	
	Não	0	0	0	
Normal (W/W)	Sim	8	10	8	89
	Não	17	31	15	

Fonte: elaborada pela autora, 2024. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos com as análises para confirmação da associação de HbSS com talassemia alfa, totalizando 22 amostras positivas e 89 amostras negativas. - $\alpha^{3.7}$ = talassemia alfa deleção de 3.7 Kb.

A Tabela 2 apresenta a distribuição da gravidade entre os grupos segundo a classificação por gravidade dos pacientes com AF a partir da calculadora de risco para Doença Falciforme (Sebastiane *et al.*, 2007), adaptada para os padrões brasileiros

(Belini-Júnior *et al.*, 2015) referente ao tratamento com hidroxycarbamida (HU). Foram realizados os testes de normalidade por meio de Shapiro-Wilk (G1 $p=0,099$; G2 $p=0,004$; G3 $p=0,000$ e G4 $p=0,000$). Dessa forma foi realizado teste de Kruskal-Wallis para comparar os quatro grupos, onde o valor de $p=0,546$.

Tabela 2 — Distribuição da gravidade dos pacientes com anemia falciforme classificando-as pelo tratamento com hidroxycarbamida e com co-herança de talassemia alfa.

GRUPOS*	GRAVIDADE			
	Leve	Moderado	Grave	Total
G1	2 (28,57%)	4 (57,14%)	1 (14,28%)	7 (100%)
G2	6 (40,00%)	5 (33,33%)	4 (26,66%)	15 (100%)
G3	8 (30,76%)	10 (38,46%)	8 (38,76%)	26 (100%)
G4	17 (26,98%)	31 (49,20%)	15 (23,80%)	63 (100%)

Fonte: elaborada pela autora; 2024. G1 = pacientes com anemia falciforme que apresentam co-herança com talassemia alfa e que fazem uso hidroxycarbamida; G2 = pacientes com anemia falciforme que apresentam co-herança com talassemia alfa e que não fazem uso hidroxycarbamida; G3 = pacientes com anemia falciforme que não apresentam co-herança com talassemia alfa e que fazem uso hidroxycarbamida; G4 = pacientes com anemia falciforme que não apresentam co-herança com talassemia alfa e que não fazem uso hidroxycarbamida.

*Valores arredondados.

Por meio do exposto na Tabela 2, podemos verificar que o grupo G3 apresentou maior porcentagem de pacientes com quadro clínico leve e menor porcentagem de pacientes com quadro clínico moderado em comparação com o grupo G4, indicando melhora no quadro clínico geral dos pacientes quando em uso de hidroxycarbamida, corroborando a literatura. A Tabela 2 também expõem que o grupo G1 apresentou menor porcentagem de indivíduos com clínica grave em comparação com os G3 e G4 que não possuem co-herança com talassemia alfa, corroborando também a literatura. Ao compararmos os grupos G2 e G4 que não fazem o tratamento com a hidroxycarbamida, observamos que o grupo G2 possui maior porcentagem com indivíduos de clínica leve e menor porcentagem de indivíduos com clínica moderada, corroborando também que a talassemia alfa é um moderador da gravidade da anemia falciforme.

A avaliação dos antioxidantes não enzimáticos e enzimas de detoxificação e o perfil do estresse oxidativo entre os grupos de trabalho estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 — Parâmetros antioxidantes da anemia falciforme nos grupos estudados

GRUPO	ANTIOXIDANTES				
	GSH	GST	GPx	CAT	TBARS
G1	490,9±245,5	0,851±0,148	1,042±0,219	5215±847,3	1426±303,8
G2	272,5±126,2	1,127±0,191	1,080±0,133	4198±400,5	2151±339,6
G3	106,73±80,52	0,800±0,100	1,306±0,311	4605±337,7	2228±313,5
G4	317,35±69,09	2,212±1,183	1,253±0,229	3975±202,7	2855±324,7
Valor de p	0,151	0,303	0,965	0,318	0,218

Fonte: elaborada pela autora, 2024. média±erro padrão. G1 = pacientes com anemia falciforme que apresentam co-herança com talassemia alfa e que fazem uso hidroxycarbamida; G2 = pacientes com anemia falciforme que apresentam co-herança com talassemia alfa e que não fazem uso hidroxycarbamida; G3 = pacientes com anemia falciforme que não apresentam co-herança com talassemia alfa e que fazem uso hidroxycarbamida; G4 = pacientes com anemia falciforme que não apresentam co-herança com talassemia alfa e que não fazem uso hidroxycarbamida. GSH = Glutathione Reduzida. GST = Glutathione S-Transferase. GPx = Glutathione Peroxidase. CAT = Catalase. TBARS = Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.

O teste de normalidade dos dados de antioxidantes foi realizado a partir do teste Shapiro-Wilk, sendo não paramétricos (GSH $p=0,000$; GST = $0,000$; GPx $p=0,000$; CAT= $0,002$ e TBARS $p=0,000$). Dessa forma, para comparar os quatro grupos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis (valores de p indicados na Tabela 3) que não apresentou diferença estatística entre os grupos.

Ao analisarmos a Tabela 3 podemos observar que os valores de TBARS estão diminuídos nos grupos G3 (pacientes que fazem uso de HU) e G1 (pacientes que fazem uso de HU e possuem co-herança com talassemia alfa). Ainda sobre o TBARS, observamos também que mesmo sem o uso de HU, o grupo G2 (co-herança com talassemia alfa), ao compararmos com o grupo G3 e G4, apresentou maior atividade, o que evidencia a melhora do quadro clínico dos indivíduos com AF que apresentam co-herança de talassemia alfa. Os grupos G1 e G2 apresentaram menor atividade de GST quando comparados ao grupo G4, sendo que ao comparar o grupo G1 com o grupo G3 também houve uma menor atividade desta enzima, podendo indicar menor gravidade nos indivíduos desse grupo. Mesmo o grupo

G2 apresentando atividade maior de GST que o grupo G3, ele tem uma atividade 1,3 vezes menor que o apresentado pelo grupo G4. A enzima GPx apresentou maior atividade no grupo G3, enquanto a enzima GSH apresentou maior atividade no grupo G1. A maior atividade da catalase foi observado no grupo G1, podendo estar relacionado com diminuição na gravidade do quadro clínico dos pacientes com AF.

6. DISCUSSÃO

A anemia falciforme é uma doença hereditária caracterizada por mutação no gene da beta globina e afeta milhões de pessoas, possuindo efeito negativo significativo na qualidade de vida dos indivíduos, devido seu impacto na saúde física e mental, na vida social e escolar; além do seu elevado índice de mortalidade precoce (Osunkwo *et al.*, 2021).

Nosso estudo avaliou a gravidade dos pacientes com anemia falciforme e relacionamos a presença da co-herança com talassemia alfa e o uso de hidroxycarbamida (HU) com os índices enzimáticos detoxificantes e indicativos do estresse oxidativo.

As análises moleculares nos grupos de amostras com genótipo HbSS (anemia falciforme) para detecção de talassemia alfa, realizadas nas 111 amostras, apresentou 22 amostras com resultado positivo para deleção 3.7 Kb, totalizando 19,81%, apresentando uma porcentagem menor do que demais estudos, que observaram entre 20% e 35% (Lucena *et al.*, 2021) da co-herança de alfa talassemia em pacientes com anemia falciforme.

Ao analisarmos os grupos G1 (pacientes com anemia falciforme que apresentam co-herança de talassemia alfa e em tratamento com hidroxycarbamida); G2 (pacientes com anemia falciforme que apresentam co-herança de talassemia alfa que não fazem uso de hidroxycarbamida); G3 (pacientes com anemia falciforme que não apresentam co-herança de talassemia alfa em tratamento com hidroxycarbamida) e; G4 (pacientes com anemia falciforme sem co-herança com talassemia alfa e que não fazem uso de hidroxycarbamida), encontramos uma maior porcentagem na qual o quadro clínico expressa gravidade leve nos grupos em que os pacientes com anemia falciforme fazem o uso de HU e que possuem co-herança com talassemia alfa ($-\alpha^{3.7}$) indicando ser moduladores que melhoram o quadro clínico do paciente, corroborando a literatura. A HU age induzindo o aumento da Hb F e, juntamente com a diminuição da síntese da cadeia alfa globina, devido a co-herança da talassemia alfa, reduzem a presença da Hb S intraeritrocitária (Lucena *et al.*, 2021; Musialek, Rybaczek; 2021). Com a menor concentração de Hb S, consequentemente há menor falcização das células e diminuição de células densas, permitindo que os eritrócitos tenham maior facilidade para retornarem sua forma normal, contribuindo assim para a redução de hemólise e da anemia (Naoum, 2000). Vários estudos já apontaram a ação protetora da talassemia alfa em AF, em sub fenótipos relacionados à hemólise, como hipertensão pulmonar, úlcera de perna, acidente vascular cerebral e priapismo (Lucena *et al.*, 2021).

Para determinação do estresse oxidativo avaliamos o dano oxidativo (peroxidação lipídica) por meio do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e a quantificação do sistema de defesa antioxidante por meio GSH, GST, GPx e CAT.

Analisando o TBARS nos grupos de estudo é possível acompanhar na Tabela 3 que há uma diminuição em seus valores quando o paciente é tratado com HU e apresenta valores ainda menores quando há co-herança de talassemia alfa juntamente com o tratamento. As maiores diferenças ficam entre os grupos G1 ($1426 \pm 303,8$) em que o paciente apresenta co-herança com talassemia alfa e tratamento com HU, onde é duas vezes menor do que o G4 ($2855 \pm 324,7$) que não apresenta co-herança com talassemia alfa e nem fazem tratamento com HU. Isso pode ser devido aos processos fisiológicos da anemia falciforme, visto que há relatos de elevados níveis de peroxidação lipídica na doença falciforme, devido à maior geração de ERO e produtos de oxidação lipídica (Silva *et al.*, 2013), dessa forma quanto maior presença de Hb S e ERO, maior é a resposta ao teste e atividade de peroxidação lipídica. A análise da CAT nos mostrou que o G1 apresentou maior atividade enzimática. Também podemos ver que nos grupos G2 (que possui co-herança com talassemia alfa) e no grupo G3 (em que os pacientes fazem o uso de HU) a CAT apresenta valor superior ao grupo G4 (que não possui a co-herança com a talassemia alfa e nem faz o uso de HU), indicando que pode estar relacionada a gravidade do quadro clínico dos pacientes, pois é a responsável principal pela primeira linha de detoxificação celular (Vasconcelos *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que os níveis de atividades da CAT encontram-se reduzidos nos eritrócitos falcêmicos (Silva *et al.*, 2011) e nossos resultados concordam com o apresentado pela literatura.

Da mesma forma podemos verificar a diminuição da GST nesses grupos (G1 e G3), devido a atividade de peroxidase a GST pode estar ligada a proteção contra o dano oxidativo (Silva *et al.*, 2011), dessa forma, podemos inferir que o aumento da gravidade do indivíduo pode estar ligado ao aumento da GST.

Estudos mostram que os valores médios das atividades de GSH e GPx estão diminuídos em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, além de estar ligado à gravidade da doença (Dasgupta; Hebbel; Kaul, 2006; Vasconcelos *et al.*, 2007; Alsultan *et al.*, 2010). Os eritrócitos falcêmicos são caracterizados por concentrações diminuídas de GSH (Silva *et al.*, 2013), no entanto apesar do grupo G1 apresentar maior concentração dessa enzima, apresentando efeito positivo da co-herança e do uso de HU, o grupo G4 também apresenta índice alto de concentração da GSH, podendo corroborar estudos que sugerem que a

superabundância de pró-oxidantes pode levar ao consumo ou inativação destes elementos protetores (Silva *et al.*, 2013). Algo parecido foi observado com a atividade da GPx.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos apontar a melhora no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme em uso e não uso de hidroxycarbamida quando em associação com a talassemia alfa.

A partir dos resultados obtidos também podemos compreender que a biodisponibilidade e a atividade das enzimas e coenzimas de detoxificação estão ligadas a gravidade dos pacientes com anemia falciforme e ao estresse oxidativo.

Considerando os resultados obtidos podemos inferir que a co-herança da talassemia alfa pode influenciar na atividade dos fatores detoxificantes do estresse oxidativo, levando a melhora no quadro clínico geral dos pacientes com anemia falciforme.

REFERÊNCIAS

- ALCOFORADO, G. H. D. M. et al. Prevalence of α -thalassemia 3.7 kb deletion in the adult population of Rio Grande do Norte, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 3, p. 594–598, 2012.
- ALELUIA, M. M. et al. Association of classical markers and establishment of the dyslipidemic sub-phenotype of sickle cell anemia. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, 11 abr. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5387254/>. Acesso em: 04 fev. 2024.
- ALHUTHALI, H. M. et al. Molecular patterns of alpha-thalassemia in the kingdom of Saudi Arabia: identification of prevalent genotypes and regions with high incidence. **Thrombosis Journal**, v. 21, n. 1, 10 nov. 2023.
- ALSULTAN, A. I.; SEIF, M.A.; AMIN, T.T. et al. Relationship between oxidative stress, ferritin and insulin resistance in sickle cell disease. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 14, p. 27-538, Jun 2010.
- ASLAN, M. et al. Reactive species in sickle cell disease. **Ann N Y Acad Sci**, 2000.
- AZAR, S.; WONG, T. E. Sickle Cell Disease: A Brief Update. **The Medical clinics of North America**, v. 101, p. 375 – 393, 2 2017.
- BALLAS, S K. Sickle Cell Pain. 2nd. ed. Washiton, D. C. IASP Press, 2014.
- BAJWA, H.; BASIT, H. Thalassemia. 2023 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 31424735.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, 23(4):629-643, jul/ago., 2010.
- BARROSO, H. et al. Anemia Falciforme: Concepção do cuidador familiar sobre a doença e seu tratamento em um Município do Maranhão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e24010716450-e24010716450, 20 jun. 2021.
- BELCHER, J. D. et al. Heme degradation and vascular injury. **Antioxidants & redox signaling**, 2010.
- BELINI-JUNIOR, E.; CANÇADO, R. D.; BONINI-DOMINGOS, C. R. The Xml polymorphic site 5'to the gene G γ in Brazilian patient with sickle cell anemia - fetal hemoglobin concentration, hematology and clinical features. **Achives Medical Science**, v6, n.5, p. 822-825, 2010.
- BELINI JÚNIOR, E. et al. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 54, n. 4, p. 321–327, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.01.011>.

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**; 21(3): 319-330, 2011.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. **Ann Intern Med**, v. 83, p. 919-919, 1 Dec 1975.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias. São José do Rio Preto, SP: HN Editora, 2006.

BRANDOW, A. M.; LIEM, R. I. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, 3 mar. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças Falciformes (DF) e outras Hemoglobinopatias. [S.l.]: Ministério da Saúde, 16 nov. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/sangue/pntn/doencas-falciformes-df-e-outras-hemoglobinopatias>. Acesso em: 30 dez. 2023.

BREWIN, J. N. et al. The pleiotropic effects of α -thalassemia on HbSS and HbSC sickle cell disease: Reduced erythrocyte cation co-transport activity, serum erythropoietin, and transfusion burden, do not translate into increased survival. **American Journal of Hematology**, 18 jul. 2022.

BRUNETTA, D. M. et al. Manejo das complicações agudas da doença falciforme, p.231-237, 2010. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/180>. Acesso em: 17 de jul. 2022.

CALVO-GONZALEZ, E. Hemoglobinas Variáveis na Área Médica e no Tema Cotidiano: Um Olhar Sobre a Raça, Nação e Genética no Brasil contemporâneo. *Saúde social*, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 75-87, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sausoc/a/4KFTkGnJjSHYGVjskSqHt6f/?format=pdf>. Acesso em: 21 de maio de 2023.

CANÇADO, R. D. Talassemias alfa. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**; 28(2): 81-87, 2006.

CANÇADO, R. D. et al. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 5, p. 361–366, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/vhhZSsvrSh9NzwVK3BnHQCf/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 04 fev. 2024.

CAO, A.; KAN, Y. W. The Prevention of Thalassemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**; 3:a011775; 2013.

CASTRO, I. P. S.; VIANA, M. B. Cognitive profile of children with sickle cell anemia compared to healthy controls. **Jornal de Pediatria**, v. 95, n. 4, p. 451–457, jul. 2019.

CHACRA, A. P. M.; SALDANHA, A. L. R.; MARTINEZ, T. L. DA R. Sickle Cell Anemia as the First in the Hierarchy for Cardiac Alterations, Drives Attention to the Whole Spectrum

of Hemolytic Anemias. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 119, n. 6, p. 900–901, 1 dez. 2022.

CHAKRAVORTY, S.; WILLIAMS, T. N. Sick Cell disease: a neglected chronic disease of increasing global health importance. **Archives of Disease in Childhood**, 100:48–53, 2015. doi:10.1136/archdischild-2013-303773.

CHIRICO, Erica N. e PIALOUX, Vincent. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**, v. 64, n. 1, p. 72–80, 2012.

CHONG, S. S. et al. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia. **Blood**, v. 95, n. 1, p. 360–362, 1 jan. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.V95.1.360>.

COSTA, F. F. Anemia falciforme. In: Zago M. A., Pasquini R., Falcão R. P. Hematologia: fundamentos e prática. Rio de Janeiro: Atheneu, 290-307p, 2001.

COSTA, F. F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K. Y. Anemia Falciforme. In: Zago, M. A.; Falcão, R. P.; Pasquini, R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Editora Atheneu, v. 1, p. 205-223, 2013.

COSTA, F. F.; FERTRIN, K. Y.; CONRAN, N. Síndrome Hemolítica. Fisiopatologia e Clínica. Classificação. In: Zago, M. A.; Falcão, R. P.; Pasquini, R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Editora Atheneu, v. 1, p.161-167, 2013.

DAS, S. K. e NAIR, R. C. Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, Catalase and Lipid Peroxidation of Normal and Sickled Erythrocytes. **British Journal of Haematology**, v. 44, n. 1, p. 87–92, 1980.

DASGUPTA, T.; HEBBEL, R. P.; KAUL, D. K. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. **Free Radical Biology and Medicine**, 2006.

DE-CEULAER, K. et al. Alpha thalassemia reduces the hemolytic rate in homozygous sickle cell disease. **The New England journal of medicine**, v. 309, n. 3, p. 189–190, 1983.

DUTRA, V. DE F.; BIASI, T. P.; FIGUEIREDO, M. S. Sick cell anemia: hierarchical cluster analysis and clinical profile in a cohort in Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 45, n. 1, p. 45–51, jan. 2023.

FRASÃO, Gustavo. Governo Federal reforça necessidade do diagnóstico precoce da Doença Falciforme: essa é a doença genética hereditária de maior prevalência no mundo; sus oferece diagnóstico e tratamento integral e gratuito. Essa é a doença genética hereditária de maior prevalência no mundo; SUS oferece diagnóstico e tratamento integral e gratuito. [S.l]: Ministério da Saúde, 20 jun. 2022. Atualizado em 03 nov. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/junho/governo-federal-reforca-necessidade-do-diagnostico-precoce-da-doenca-falciforme>. Acesso em: 20 maio 2023.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18515–18517, 1997.

GALANELLO RENZO; THALASSAEMIA INTERNATIONAL FEDERATION. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders. Nicosia: **Thalassaemia International Federation**, 2003.

GALIZA NETO, G. C. DE.; PITOMBEIRA, M. D. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

GUARDA, C. C. et al. Hydroxyurea alters circulating monocyte subsets and dampens its inflammatory potential in sickle cell anemia patients. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 15 out. 2019.

HARTEVELD, C. L. et al. The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 44, n. S1, p. 28–36, set. 2022.

HEBBEL, R. P. et al. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1988.

HENRIQUE, P. et al. Toxidade da hidroxiueria no tratamento da anemia falciforme. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e51211426264-e51211426264, 25 mar. 2022.

HERMANN, P. B. et al. Erythrocyte oxidative stress markers in children with sickle cell disease. **Jornal de Pediatria**, v. 92, p. 394–399, 2016.

HIGGS, D. R. et al. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. **Blood** 73(5): p 1081-1104, 1989.

HIGGS, D. R. α -Thalassemia. **Baillière's Clinical Haematology**, 6(1), p. 117-150, 1993. doi: 10.1016/s0950-3536(05)80068-x.

HIGGS, D. R. The Molecular Basis of α -Thalassemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2013.

INSTITUTO ESTADUAL DE HEMATOLOGIA ARTHUR DE SIQUEIRA CAVALCANTI. Protocolos de Tratamento: Hematologia e Hemoterapia. 4. ed. Rio de Janeiro - Brasil: HEMORIO, 2014.

JESUS, J. A. D. Doença Falciforme no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia*; 80:3 (Ago-Out): 8-9, 2010.

OLD, J. et al. Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders. **Thalassaemia International Federation Publications (3)**. vol 2: Laboratory Methods. Nicosia, Cyprus. 2005.

KATO, Gregory J. et al. Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers*, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-23, 15 mar. 2018. **Springer Science and Business Media LLC**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>. Acesso em 09 abr. 2023.

KAZAZIAN, HH. The Thalassemia Syndromes: Molecular Basis and Prenatal Diagnosis in 1990. **Semin Hematol**, 1990.

KEEN, J. H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **J Biol Chem**, v. 251, p. 6183-6188, 25 Oct 1976.

KLINGS, E. S.; FARBER, H. W. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. **Respir. Res.**, v. 2, n. 5, p. 280–285, 2001.

LADEIA, A. M.; SALLES, C.; DIAS, C. Anemia Falciforme e Comorbidades Associadas Na Infância e Na Adolescência. Curitiba: Editora Appris, 2020.

LIEBHABER, S. A.; CASH, F. E.; BALLAS, S. K. Human alpha-globin gene expression. The dominant role of the alpha 2-locus in mRNA and protein synthesis. **Journal of Biological Chemistry**. 1986 Nov; 261(32):15327-33.

LIEBHABER, S.A. a THALASSEMIA. **Hemoglobin**, v. 13, p. 685–731, 1989.

LUCENA, B. et al. Alpha thalassemia, but not β S-globin haplotypes, influence sickle cell anemia clinical outcome in a large, single-center Brazilian cohort. *Annals of Hematology*, v. 100, n. 4, p. 921–931, 13 fev. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-021-04450-x>. Acesso em: 06 fev. 2024.

MANFREDINI, Vanusa et al. Blood Antioxidant Parameters in Sickle Cell Anemia Patients in Steady State. **Journal of the National Medical Association**, v. 100, n. 8, p. 897–902, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027968415314024>>.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **J Clin Pathol**, v. 18, p. 790-792, Nov 1965.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. Bioquímica básica. 4 ed. Rio De Janeiro (Rj): Guanabara Koogan, 2015.

MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 11, p. 1749–1758, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14740338.2015.1088827>>.

BRASIL. Portaria Conjunta Nº 05, de 19 de Fevereiro de 2018. Ministério da Saúde. Disponível em: [PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA DOENÇA FALCIFORME \(saude.sp.gov.br\)](https://www.saude.gov.br/images/stories/pdf/20180219-Portaria-Conjunta-05-2018-Protocolo-Clinico-e-Diretrizes-Terapeuticas-Para-Doenca-Falciforme.pdf).

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**, v. 86, p. 271-278, May 1978.

MUSIAŁEK, M. W.; RYBACZEK, D. Hydroxyurea—The Good, the Bad and the Ugly. **Genes**, v. 12, n. 7, p. 1096, 19 jul. 2021.

NAOUM, P. C.; et al. Hemoglobinopatias no Brasil. **Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 8, n. 141, p. 180–188, 1986.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 22, n. 1, abr. 2000.

NATTA, C. et al. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematologica*, 1990.

NOGUCHI C. T. et al.. Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. *The New England Journal Of Medicine*, v. 318, n. 2, p. 96–99, 1988.

ORLANDO, G. M. et al. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 22, n. 2, pp. 111-121, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842000000200007>.

OSUNKWO, I. et al. Impact of sickle cell disease on patients' daily lives, symptoms reported, and disease management strategies: Results from the international Sickle Cell World Assessment Survey (SWAY). *American Journal of Hematology*, v. 96, n. 4, p. 404–417, 25 fev. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajh.26063>. Acesso em: 05 fev. 2024.

PORTO, A. S. et al. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME:: REVISÃO DE LITERATURA. *Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro*, v. 1, n. 1, 2020. Disponível em: <https://revista.unipacto.com.br/index.php/multidisciplinar/article/view/753/724>. Acesso em: 04 fev. 2024.

PULE, G. D. et al. A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea-induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. *Expert Review of Hematology*, v. 8, n. 5, p. 669–679, 2015

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*. v. 156, p. 433-445, 2011.

REPARAZ, P. et al. Clinical management of the acute complications of sickle cell anemia: 11 years of experience in a tertiary hospital. *Anales de Pediatría* (English Edition), v. 97, n. 1, p. 4–11, jul. 2022.

RUMANEY, 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, n. 6, p. e100516, 30 jun. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4076272/>. Acesso em: 04 fev. 2024.

SALAZAR L. A. et al.. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem*, 44(8 Pt 1):1748-50, 1989.

SAMBROOK, J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SANKARAN, V.G.; ORKIN, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harb Perspect Med.** 2013;3a(1):1–14.

SANT'ANA, P. G. DOS S. et al. Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 40–45, jan. 2017.

SEBASTIANI, P. et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2727–2735, 2007.

SHAFIQUE, F. et al.. Thalassemia, a human blood disorder. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e246062, 2023.

SHAKLAI, N. et al.. Interaction of sickle cell hemoglobin with erythrocyte membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 1, p. 65–8, 1981.

SHANG, X.; XU, X. Update in the genetics of thalassemia: What clinicians need to know. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 39, p. 3–15, 1 fev. 2017.

SHIMAUTI, E. L.; SILVA, D.G.; DE ALMEIDA, E.A. et al. Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 45, p. 297–301, 15 Dec 2010.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Lett**, v. 103, p. 287–290, 15 Jul 1979.

SILVA, D. G. H. et al. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 47, n. 1, p. 23–28, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2011.03.004>.

SILVA, D. G. H. et. al. Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1101–1109, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.181>. Acesso em: 16 nov. 2023.

SILVESTRONI, E.; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of collected in the past 30 years. **Am J Hum Genet**, v. 27, p. 198–212, 1975.

SHIMAUTI, E. L.; SILVA, D.G.; DE ALMEIDA, E.A. et al. Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 45, p. 297–301, 15 Dec 2010.

SONATI, M. F. et al. High prevalence of α -thalassemia in a black population of Brazil. **Hemoglobin**. [S.l: s.n.], 1991.

SOUSA, É. Q. DE et al. Uso da hidroxiuréia na anemia falciforme: uma revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2, p. e102922058, 1 jan. 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/2058/1742>. Acesso em: 04 fev. 2024.

STEINBERG, M H e EMBURY, S H. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood**, v. 68, n. 5, p. 985–90, 1986.

STEINBERG, M. H. Management of Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 13, p. 1021–1030, abr. 1999.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anemia. **British Journal of Haematology**, 129, p. 465-481, 2005. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05411.x.

STEINBERG, M. H. Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia. **Blood**, v. 136, n. 21, 17 ago. 2020.

TANIMOTO DUQUE, F. A. et al. Avaliação de prescrições pediátricas de hidroxiureia para pacientes com doença falciforme. **O Mundo da Saúde**, v. 46, p. 369–379, 1 jan. 2022.

TAYLOR, S. M. et al.. Impacto of hemoglobinopathies on the clinical epidemyology of malaria: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**. 2012 June; 12(6): 457–468. doi:10.1016/S1473-3099(12)70055-5.

THEIN, S. L. Milestones in the history of hemoglobin research (in memory of professor Titus H.J. Huisman). **Hemoglobin**. 2011:450-62. doi: 10.3109/03630269.2011.613506.

TISDALE, J. F.; THEIN, S. L.; EATON, W. A. Treating sickle cell anemia. *Science*, v. 367, n. 6483, p. 1198–1199, 13 mar. 2020.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, out. 2007.

VELLA, F. Acid-agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **Am J Clin Pathol**, v. 49, p. 440-442, Mar 1968.

VRETTOU, C.; KAKOIROU, G.; MAMAS, T.; TRAEGER-SYNODINOS, J. Pre natal and preimplantation diagnosis of hemoglobinopathies. **Int J Lab Hematol**. 2018;40(Suppl 1):74-82. doi: 10.1111/ijlh.12823. Disponível em: [Diagnóstico pré-natal e pré-implantacional de hemoglobinopatias \(wiley.com\)](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.12823). Acesso em: 22 de maio de 2023.

ZAGO, M. A. et al. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 29(3): 207-214; 2007.

WEATHERALL, D. J. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. **Current Molecular Medicine**, 2008;8(7):592–9.

W.H.O. Report of the Vth Annual Meeting of the WHO Working Group on the Feasibility Study on Hereditary Disease Community Control Programmes. Herakleion- Grécia: [s.n.], 1987. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/61167/WHO_HDP_WG_HA_87.5.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

APÊNDICE

Artigo de revisão

TALASSEMIA ALFA: PRINCIPAIS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

RESUMO

A talassemia alfa é uma hemoglobinopatia hereditária recessiva, causada principalmente por grandes deleções do gene da alfa-globina. Sua gravidade é proporcional à quantidades de genes afetados, sendo clinicamente classificada como: Portador Silencioso quando há perda de um único gene; Traço de Talassemia Alfa quando há perda de dois genes; Doença da Hb H quando há perda de três genes e Síndrome da Hidropisia Fetal por Hb de Bart com o envolvimento dos quatro genes alfa. Devido à diversidade de fenótipos apresentados, considerando que os genes podem estar total ou parcialmente inativados, e à complexidade do seu diagnóstico laboratorial, sua confirmação deve ser realizada utilizando resultados de diferentes métodos de análise, sendo os principais: hematoscopia, pesquisa de reticulócitos, pesquisa de corpos de Hb H, quantificação das frações de hemoglobina por meio do HPLC, eletroforese de Hb e análise molecular. Nesta revisão buscamos apresentar atualização da literatura para os aspectos gerais da genética, fenótipos e diagnóstico dessa que é uma das talassemias mais frequentes em todo o mundo.

Palavras-chave: Hemoglobinopatia; Hemoglobina H; Deleções; Talassemia Alfa.

ABSTRACT

Alpha thalassemia is a recessive hereditary hemoglobinopathy, mainly caused by large deletions in the alpha-globin gene. The severity is proportional to the number of affected genes, clinically classified as: Silent Carrier with a single gene deletion; Alpha Thalassemia trait with two genes deletions; Hb H disease with three genes deletions; and Hydropsy Fetal Syndrome due to Bart's Hb involving all the four alpha genes deletions. Due to the diversity of phenotypes presented, considering that the genes may be totally or partially inactivated, and the complexity of the laboratory diagnosis, the confirmation must be carried out using results from different analysis methods, like: hematocopy, reticulocyte count research, of Hb H bodies, quantification of hemoglobin fractions through HPLC, Hb electrophoresis and

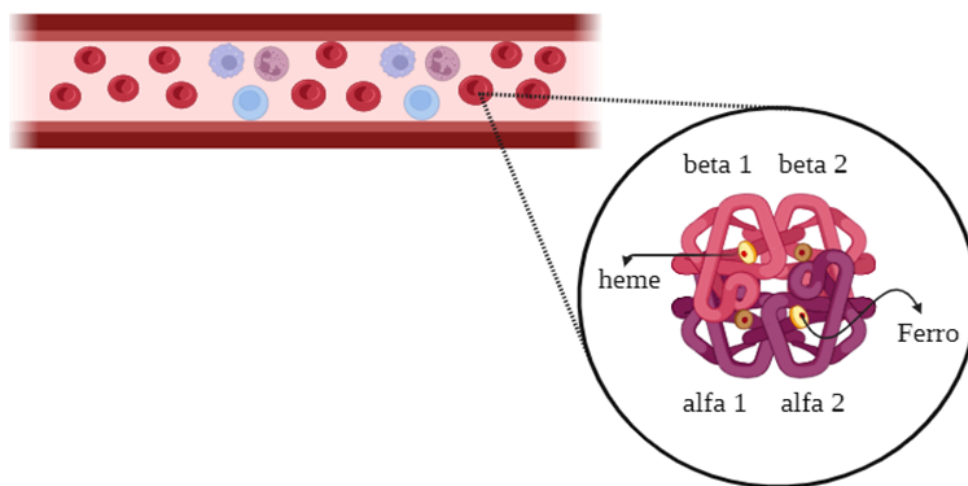
molecular analysis. In this review we aim to update the literature on the general aspects of genetics, phenotypes and diagnosis of this, which is one of the most common thalassemias worldwide.

Keywords: Hemoglobinopathy; Hemoglobin H; Deletions; Alpha Thalassemia

INTRODUÇÃO

A hemoglobina (Hb) presente nos eritrócitos é expressa em diferentes fases da vida (embrionária, fetal e adulta), sendo a proteína responsável pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos (Harteveld *et al.*, 2022). É composta por quatro cadeias globínicas, constituídas por duas cadeias do tipo alfa globina (formada por 141 aminoácidos cada) e duas cadeias do tipo beta globina (formada por 146 aminoácidos cada), associadas ao grupo heme ligado a um átomo de ferro (Harteveld *et al.*, 2022; Modell; Dalison, 2008). A principal hemoglobina humana no adulto é a Hb A, que representa entre 95% a 97% do valor total das hemoglobinas circulantes (Shafique *et al.*, 2023; Vrettou *et al.*, 2018). A Figura 1 ilustra, esquematicamente, a estrutura tridimensional da hemoglobina adulta (Hb A).

Figura 1 — Representação esquemática da hemoglobina adulta presente nos eritrócitos



Fonte: elaborada pela autora, 2024. A Figura 1 apresenta a hemoglobina adulta (Hb A), formada por duas cadeias beta globínicas (β_1 e β_2) e duas cadeias alfa globínicas (α_1 e α_2), sendo que cada cadeia globínica está associada a um grupo heme e uma molécula de ferro, responsável pelo transporte de oxigênio.

As talassemias são distúrbios hereditários da hemoglobina (Hb), sendo uma das hemoglobinopatias mais comuns no mundo (Goh; Chong; Lee, 2020; Williams; Weatherall, 2012). São caracterizadas pela diminuição ou ausência da síntese das cadeias globínicas, causando o desequilíbrio na proporção (1:1) entre as cadeias alfa e beta globina (Bajwa; Basit,

2023). Esse desequilíbrio é um dos aspectos mais importantes para a fisiopatologia da doença. Dessa forma, os diferentes níveis de gravidade estão diretamente relacionados ao desequilíbrio desta proporção, quanto maior o desequilíbrio entre a produção das cadeias globínicas, mais grave será o fenótipo apresentado pelo indivíduo (Jaing *et al.*, 2021; Shang; Xu, 2017). As talassemias são classificadas a partir da cadeia globínica afetada, sendo as principais formas, a alfa e a beta talassemia (Shafique *et al.*, 2023; Weatherall *et al.*; 2006). As taxas de prevalência das talassemias variam entre regiões geográficas, sendo mais comum em países tropicais e subtropicais, principalmente no Sudeste da Ásia e no Mediterrâneo (Musallam *et al.*, 2024), especialmente onde a malária é endêmica, devido a vantagem de sobrevivência contra as infecções causadas por *Plasmodium falciparum* (Musallam *et al.*, 2024; Frahi; Harteveld, 2018; Shang; Xu, 2017; Higgs, 2013).

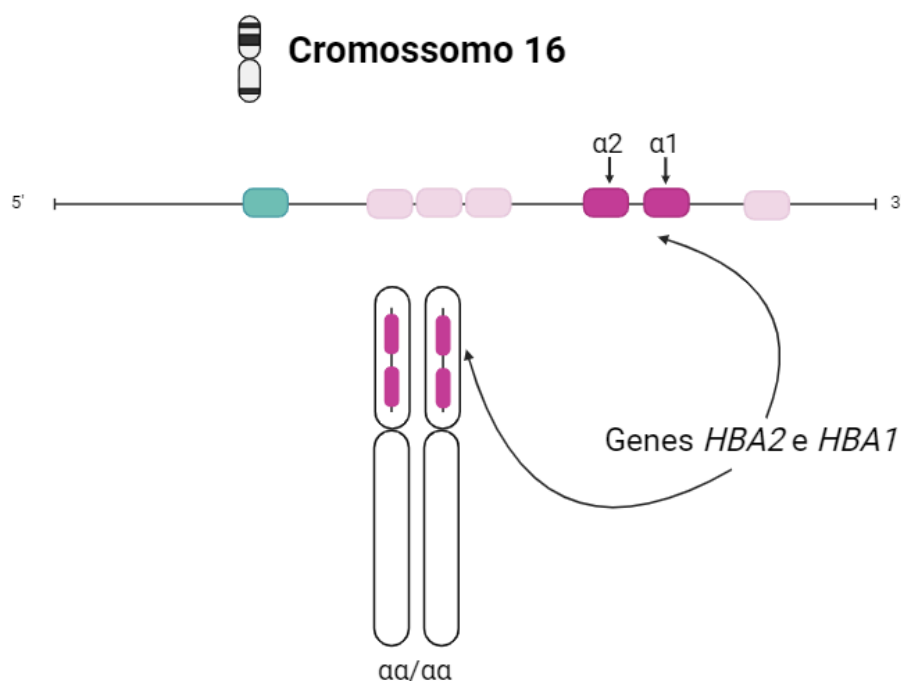
BASE MOLECULAR DA TALASSEMIA ALFA

A talassemia alfa é caracterizada pela diminuição ou ausência da síntese da cadeia de alfa-globina. Um indivíduo normal apresenta quatro genes alfa ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (Musallam *et al.*, 2024; Bajwa; Basit, 2023; Adekile *et al.*, 2020; Haley, 2017), sendo eles *HBA2* e *HBA1*, presentes no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) (Musallam *et al.*, 2024; Shafique *et al.*, 2023; Liang *et al.*, 2023). A Figura 2 ilustra a organização do agrupamento dos genes da alfa (α) globina no cromossomo 16.

Além dos genes duplicados α_2 e α_1 , o *cluster* do agrupamento de genes da α -globina também conta com os gene embrionário (ζ_2) e os pseudos genes ($\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$ e $\psi\alpha_1$), sendo que os genes α_2 e α_1 estão localizados em uma região altamente repetitivas (X, Y e Z) que, apesar de favorecer a recombinação recíproca no cromossomo, promove o alinhamento errôneo, ocasionando cruzamento desigual, levando à deleção de um ou ambos os genes da α -globina (Cardiero *et al.*, 2023; Mettananda; Higgs, 2018).

A taxa global de portadores de uma ou mais mutações da talassemia alfa é de aproximadamente 5% (Musallam *et al.*, 2024; Kwaifa; Lai; Noor, 2020; Santos *et al.* 2020), com o estado de portador chegando a atingir até 80 – 90% da população em algumas áreas (Adekile *et al.*, 2020, Farashi; Harteveld, 2018). A dinâmica molecular da talassemia alfa é ocasionada por mutações delecionais e não delecionais nos genes da alfa globina, sendo mais comuns as deleções (Musallam *et al.*, 2024, Bender *et al.*, 2020). Desde o início do desenvolvimento fetal, os genes α -globina são altamente expressos, dessa forma os efeitos das mutações que envolvem esses genes se manifestam ao longo da vida fetal e adulta (Kwaifa; Lai; Noor, 2020).

Figura 2 – Organização dos genes da alfa globina na região telomérica do cromossomo 16 humano

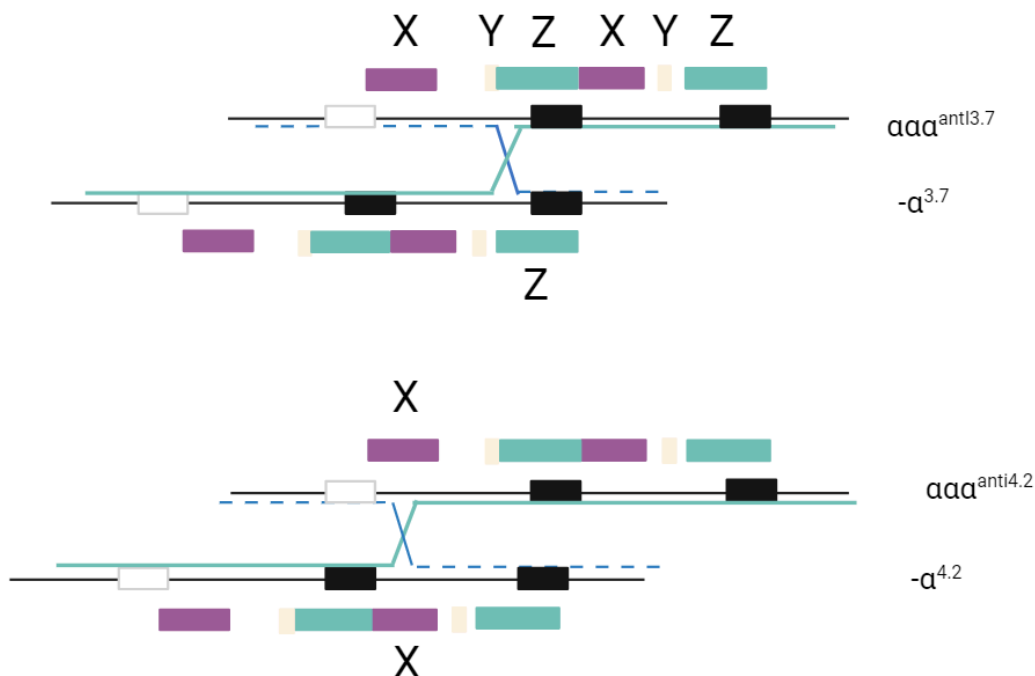


Fonte: elaborada pela autora, 2024. Ilustração esquemática da organização do agrupamento dos genes tipo alfa globina, localizados no cromossomo 16p13.3, sendo dois genes (*HBA2* e *HBA1*) por alelo, contabilizando assim quatro genes da alfa globina ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Observação: O padrão de bandas cromossômicas apresentado é meramente ilustrativo.

Durante a síntese da cadeia de alfa globina, o gene α_2 é responsável por 2/3 da produção total da proteína e o gene α_1 produz os outros 1/3 restantes. Por essa razão, as mutações localizadas no gene *HBA2* apresentam fenótipo mais grave do que as mutações presentes no gene *HBA1* (Shang; Xu, 2017). Quando há a deleção do gene *HBA2* e *HBA1*, não há síntese eficaz da cadeia alfa globina, sendo, dessa forma, definida como α^0 -talassemia; quando a parte deletada inclui apenas um dos dois genes, a síntese será parcial, sendo definida como α^+ -talassemia (Long *et al.*, 2022; Adekile *et. al.*, 2020; Munkondee *et al.*, 2020).

Os dois tipos mais comuns de α^+ -talassemia são as deleções de 3.7 Kb ($-\alpha^{3.7}$) e 4.2 Kb ($-\alpha^{4.2}$), que resultam de cruzamentos desiguais devido à recombinação entre as regiões altamente homólogas (Z e X respectivamente) (Mettananda; Higgs, 2018), representadas na Figura 3.

Figura 3 – Esquematização do pareamento desigual entre as regiões homólogas do gene da alfa globina

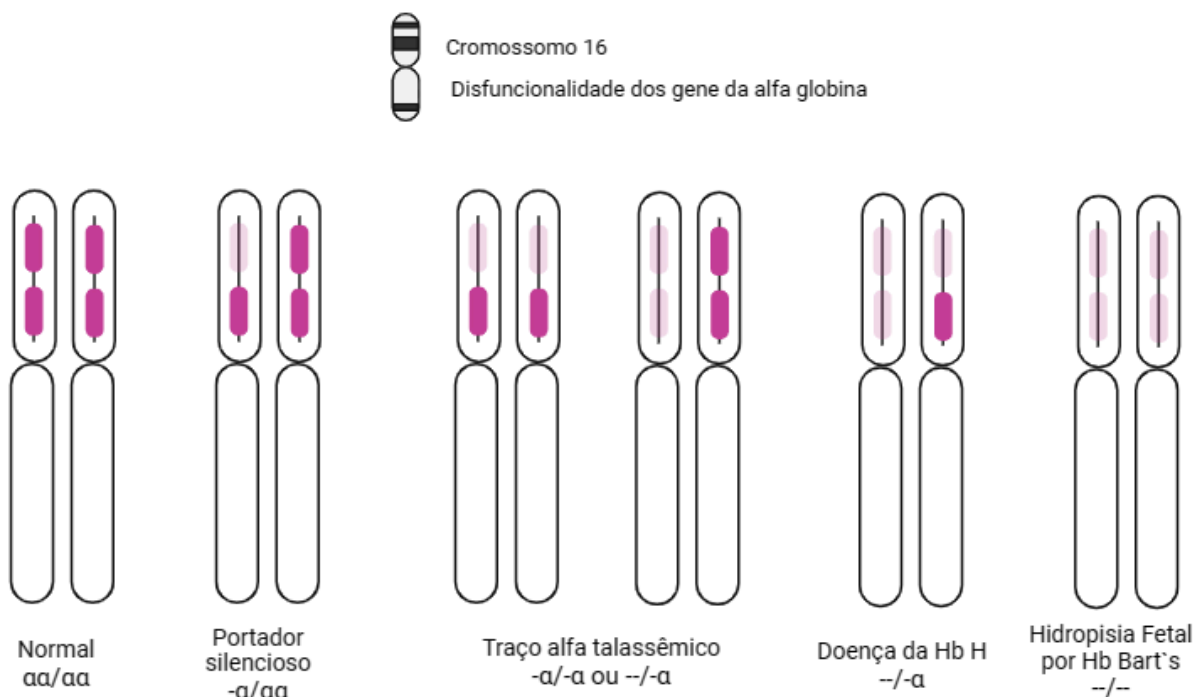


Fonte: Adaptada Hartevelde; Higgs, 2010. Ilustração da unidades homólogas X, Y e Z, dos genes da alfa globina, onde o mal pareamento durante a meiose da região Z, ocasiona um gene $\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}$ e um gene $-\alpha^{3.7}$, e o mal cruzamento da região X ocasiona um gene $\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ e um gene $-\alpha^{4.2}$.

O desequilíbrio na produção de cadeias alfa globina, resulta na formação de agregados de gama (γ) e beta (β) globina. Na fase fetal é formado o tetrâmero de gama globina (γ_4) que dá origem a Hb de Bart, e na fase pós-natal é formado o tetrâmero de beta globina (β_4) que origina a Hb H (Songdej; Babbs; Higgs, 2017). Essas Hb não são boas transportadoras de O_2 devido à alta afinidade pelo oxigênio, pois não liberam essas moléculas para os tecidos, causando hipoxemia (Taher; Weatherall; Capellini, 2018). Além disso, os agregados do tetrâmero de cadeia beta globina se precipitam nos eritrócitos maduros, formando corpos de inclusão (corpos de Hb H e HEINZ), podendo danificar a membrana, levando essas células a serem precocemente removidas pelo baço, causando hemólise e anemia (Shafique *et al.*, 2023; Shang; Xu, 2017; Songdej; Babbs; Higgs, 2017). Desta forma, a anemia mais grave é causada devido a menor sobrevivência dos eritrócitos na circulação e a reduzida quantidade de Hb formada (Shafique *et al.*, 2023).

A talassemia alfa pode ser dividida em quatro categorias: portador silencioso de talassemia alfa, traço talassêmico alfa, doença da Hb H e síndrome da hidropisia fetal por Hb de Bart (Shafique *et al.*, 2023; Songdej; Fucharoen, 2022), assim como apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Categorias fenotípicas da talassemia alfa.



Fonte: elaborada pela autora, 2024. A imagem ilustra a divisão categórica da talassemia alfa por quantidade de genes afetados (deletados ou inativados), onde o portador silencioso é caracterizado pela deleção de um gene da alfa-globina; o traço alfa talassêmico é caracterizado pela deleção de dois genes da alfa-globina; a Doença da hemoglobina H (Hb H) se caracteriza devido à três genes deletados e a hidropisia fetal por Hb de Bart se caracteriza devido a deleção dos quatro genes da alfa-globina.

Os indivíduos afetados pela talassemia alfa podem apresentar alterações nos índices hematológicos. Os níveis de Hb variam de normais até muito baixos, causados pela anemia hemolítica grave, valores reduzidos de VCM (volume corpuscular médio) e HCM (hemoglobina corpuscular média), contagem de eritrócitos normal ou aumentada e quantidade de HbA₂ normal ou diminuída, dependendo do desequilíbrio da síntese (Bajwa; Basit, 2023; Lavelle, 2019).

A talassemia alfa menor, também conhecida como portador silencioso de talassemia alfa é o fenótipo mais comum dentre as talassemias alfa, e decorre da perda de apenas um

gene ($-\alpha/\alpha$). São clínica e hematologicamente normais com valores dentro da normalidade para: Hb, VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), HbA₂ (hemoglobina adulta 2) e HbF (hemoglobina fetal), ou seja, não apresentam sintomas, podendo apresentar discreta alteração morfológica dos eritrócitos. Esses casos geralmente não são identificados por triagem de rotina laboratorial (hemograma e dosagem de Hb), sendo necessário análise molecular (Motiani; Sonagra, 2023; Piel; Weatherall, 2014; Naoum; Naoum, 2008). Apesar de não possuir impacto clínico para o portador, essa condição pode apresentar implicações aos descendentes dependendo da combinação genética dos pais (Shang; Xu, 2017).

No traço de talassemia alfa o indivíduo perde dois genes α ($--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha$), em *cis* ou em *trans*; são, geralmente, assintomáticos, mas apresentam microcitose (VCM diminuído) e hipocromia (HCM diminuído); podem apresentar anemia leve, que pode ser diagnosticada por exame de rotina, e clinicamente, podem apresentar frequentemente cansaço e dores nas pernas. O genótipo *cis* ($--/\alpha\alpha$) é prevalente na população do Sudeste Asiático, enquanto o genótipo *trans* ($-\alpha/-\alpha$) é mais comum na população africana (Shafique *et al.*, 2023; Piel; Weatherall, 2014; Naoum; Naoum, 2008).

Talassemia alfa intermediária, mais conhecida como doença da Hb H envolve a perda de três genes α ($--/-\alpha$) apresentando, anemia hemolítica microcítica, hipocrômica, de moderada a grave, com esplenomegalia evidente, podendo apresentar formas variadas de icterícia, cálculos biliares assintomáticos e, podendo haver necessidade de transfusões sanguíneas, nos casos mais graves. Devido a hemólise frequente neste tipo de anemia, a tendência à infecções respiratórias, cálculos biliares e úlceras de pernas, aumenta. A síntese desequilibrada entre as cadeias alfa e beta globina leva à agregação das cadeias beta formando o tetrâmero de beta globina (β_4), dando origem a Hb H. A Hb H pode ser detectada pela análise de Hb, por procedimentos eletroforéticos de rotina. (Motiani; Sonagra, 2023; Kwaifa; Lai; Noor, 2020; Piel; Weatherall, 2014; Haterveld; Higgs, 2010; Naoum; Naoum, 2008).

A hidropisia fetal por Hb de Bart, ou alfa talassemia maior, apresenta a perda dos quatro genes α ($--/--$), sendo a forma mais grave de todas as talassemias alfa, pois não há síntese de cadeia alfa globina (Motiani; Sonagra, 2023; Shafique *et al.*, 2023, Naoum; Naoum, 2008). O indivíduo afetado apresenta anemia e hipóxia intra uterina grave, insuficiência cardíaca, deformidades cardiovasculares, mau desenvolvimento do cérebro, hepatoesplenomegalia, derrames pleurais graves, e resulta na morte intrauterina (23-38 semanas) ou imediatamente após o nascimento, quando não há transfusão crônica precoce ou transplante de células-tronco (Motiani; Sonagra, 2023; Adekile *et al.*, 2020; Shang; Xu,

2017). O diagnóstico é feito por eletroforese de Hb do recém-nascido ou pelo sangue do cordão umbilical, que aponta de 90-100% de Hb de Bart (Naoum; Naoum, 2008).

Há poucos relatos de crianças com Síndrome da Hidropisia Fetal por Hb de Bart que receberam transfusões sanguíneas intrauterinas e/ou logo após o nascimento e que sobreviveram (Songdej; Babbs; Higgs, 2017; Chui; Waye, 1998). Essas crianças necessitam de transfusões sanguíneas regulares, e de terapia de quelação de ferro. Pacientes dependentes de transfusão de sangue desenvolvem várias complicações devido a sobrecarga de ferro, que se deposita na membrana eritrocitária, causando seu enfraquecimento e hemólise (Motiani; Sonagra, 2023). Essas crianças apresentam complicações clínicas graves, atrasos cognitivos e motores, e anomalias congênitas (Songdej; Babbs; Higgs, 2017; Chui; Waye, 1998). Na época do estudo realizado por Songdej *et al* (2017), o paciente mais velho estava com 31 anos de idade, 77 pacientes eram dependentes de transfusão e 20 haviam sido transplantados.

Em alguns casos raros, as deleções na região 16p13.3 são tão grandes, que além do gene alfa, podem afetar também os genes localizados ao redor, resultando na Síndrome ATR 16, apresentando sintomas parecidos com os da talassemia alfa, porém o indivíduo apresentará também deficiência intelectual, desenvolvimento anormal e características dismórficas. Outra síndrome rara que está associada à talassemia alfa é a Síndrome ATR-X (Xq13.3), que apresenta uma disfuncionalidade na proteína ATRX, que atua como reguladora transcricional, afetando a expressão das cadeias de alfa globina (Vijian *et al.*, 2021).

As variantes mais leves da talassemia alfa atuam como modificadores genéticos de outras condições hereditárias, como mostrado por interações epistáticas entre talassemia alfa e talassemia beta, ou entre HbS e talassemia alfa (Thein, 2005; Williams, 2005). A Tabela 1 resume os aspectos clínicos descritos nessas combinações de deleções que levam à talassemia alfa.

Tabela 1 – Aspectos clínico-laboratorial das alfa globinas

ASPECTOS DOS GENÓTIPOS DA TALASSEMIA ALFA		
Fenótipo	Genótipo	Aspecto Clínico e Laboratorial
Normal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Assintomático
Portador Silencioso	$-\alpha/\alpha\alpha$ $\alpha\alpha/-\alpha$	Hb normal VCM: 75-80 fL, sem manifestação clínica HCM: 24-27 pg < 2% de Hb H, com alterações hematológicas mínimas ou ausentes durante vida adulta
Traço Alfa Talassêmico	$--/\alpha\alpha$ $-\alpha/-\alpha$	Hb: 11 – 13 g/dL VCM: 55 – 65 fL HCM: 20 – 24 pg 2 – 8% de Hb H com discreta microcitose e hipocromia no adulto
Doença da Hb H	$--/-\alpha$	Hb: 8 – 11 g/dL VCM: 55 – 65 fL HCM: 20 – 24 pg 10 – 20% de Hb H com microcitose e hipocromia, anisopoiquilocitose e reticulocitose. Apresenta anemia moderada a grave
Síndrome da Hidropisia Fetal por Hb Bart	$--/--$	Hb: < 7 g/dL VCM: 100 – 110 fL HCM: diminuído Cerca de 80 - 100% de Hb de Bart, 10 – 20% de Hb H Anemia e hipóxia grave, icterícia, pode apresentar contagem de leucócitos elevada, aumento da bilirrubina e hepatoesplenomegalia. Na maioria dos casos é incompatível com a vida.

Fonte: Adaptada: Kwaifa; Lai; Noor, 2020; Naoum, [2012?]. Hb = hemoglobina; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TALASSEMIA ALFA

A talassemia alfa é uma hemoglobinopatia que apresenta dificuldades em seu diagnóstico laboratorial devido a equívocos interpretação de exames laboratoriais, mostrando a importância da realização de técnicas de seleção e confirmação, em conjunto com as análises clínicas e hematológicas (Belisário; Viana, 2012). Além disso, o diagnóstico molecular dos diferentes tipos de portadores de talassemia alfa é desafiador, devido à complexidade do *locus* gênico alfa (Liang *et al.*, 2021).

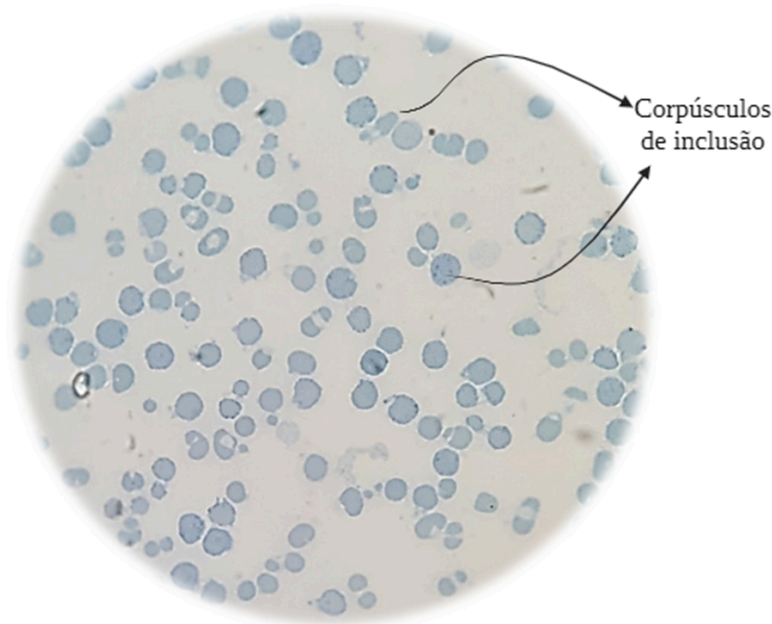
A utilização do hemograma completo para análise dos índices hematológicos é útil na identificação dos pacientes, no entanto, não são achados específicos da talassemia alfa. A contagem de reticulócitos auxilia o diagnóstico laboratorial, pois devido à menor síntese de cadeias alfa e a precipitação das cadeias beta em excesso, a membrana eritrocitária é danificada, levando à destruição prematura das hemácias, dando origem a anemia hemolítica característica das talassemias. A anemia hemolítica estimula a produção de eritropoetina, aumentando consequentemente a contagem de reticulócitos (>2,5 a 3,5%) (Naoum, 2011; Urbinat Et Al, 2006).

A HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) é um método sensível capaz de identificar e diferenciar várias Hb variantes e quantificar precisamente as frações. Essa técnica faz o rastreio das Hb, apresentando um resultado qualitativo e quantitativo (Souza Et Al., 2003; Ou; Rognerud, 2001; Tan, 1993), dessa forma é um excelente método para identificação dos baixos níveis de Hb A₂ característica das talassemias alfa (Vijian *et al.*, 2021; Vichinsky, 2013; Bonini-Domingos; Mendiburu, 2002).

A eletroforese de Hb, em fita de acetato de celulose, em pH alcalino (8,6 – 8,9) pode detectar Hb de Bart em neonatos, e sua confirmação pode ser feita em tampão fosfato, pH 6,5. Porém quando as concentrações são inferiores a 1%, sua detecção é dificultada, e devido a esse fato, cerca de 50% dos heterozigotos das talassemias α^+ não são identificados por esta técnica.

A pesquisa de Hb H deve ser investigada por meio do sangue periférico, realizando a pesquisa de corpúsculos de inclusão, utilizando coloração com azul cresil brilhante, que evidenciam os corpos intra-eritrocitários formados pela precipitação dos tetrâmeros de cadeias beta (Vujian *et al.*, 2021; Sonati; Costa, 2006; Weatherall, 2004). Entretanto, por se tratar de uma Hb instável, pode haver degradação durante o preparo ou armazenamento das amostras (Vichinsky, 2013). A Figura 5 ilustra uma lâmina corada com azul cresil brilhante, onde é possível visualizar os corpúsculos de inclusão.

Figura 5 – Lâmina hematológica apresentando corpúsculos de inclusão



Fonte: elaborada pela autora, 2024. Foto de esfregaço corado com azul de cresil brilhante para visualização dos corpúsculos de inclusão de Hb H, onde o eritrócito apresenta aspecto de “bolinha de golfe”.

No entanto, mesmo com esse conjunto de testes laboratoriais, ainda é essencial a análise molecular, para diagnóstico definitivo e para que haja um entendimento completo do fenótipo clínico apresentado pelo indivíduo (Vijian *et al.*, 2021; Vichinsky, 2013). Devido a deleções de grandes fragmentos e à complexidade do *locus* gênico, o diagnóstico molecular exige uma maior estabilidade e eficiência do *mix*, para que haja sucesso na amplificação, além da necessidade de um DNA mais puro e uma enzima (Taq) de alta eficiência.

CONCLUSÃO

Devido à complexidade do diagnóstico laboratorial, a confirmação da talassemia alfa deve ser realizada cuidadosamente e utilizando diferentes metodologias de análise. Além dos métodos clássicos aqui citados, a análise molecular é fundamental para a correta orientação, devido à sua natureza hereditária. O portador de talassemia alfa assintomático pode ter prole com a variação do gene deletado para suas gerações futuras, podendo resultar em combinações com manifestação mais grave da talassemia alfa.

REFERÊNCIAS

ADEKILE, A. et al. Alpha thalassemia genotypes in Kuwait. **BMC Medical Genetics**, v. 21, n. 1, 24 ago. 2020. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1186/s12881-020-01105-y>. Acesso em: 8 nov. 2023.

BELISARIO, A. R.; VIANA, M. B. **Efeitos da Talassemia Alfa nas manifestações clínicas e hematológicas da Anemia Falciforme: uma revisão sistemática**. Minas Gerais, 2012.

Disponível em: <https://rmmg.org/artigo/detalhes/175>. Acesso em: 8 nov. 2023.

BENDER, M. A. Newborn Screening Practices and Alpha-Thalassemia Detection — United States, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7499831/>. Acesso em: 11 dez. 2023

BONINI-DOMINGOS, C. R.; MENDIBURU, C. F. **Talassemia alfa no Brasil. Por que diagnosticar? Triagem**. 2002;2:22-34.

CARDIERO, G. et al. Alpha-Thalassemia in Southern Italy: Characterization of Five New Deletions Removing the Alpha-Globin Gene Cluster. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2577, 1 jan. 2023. Disponível em:

<https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/2577>. Acesso em: 11 dez. 2023

FARASHI, S.; HARTEVELD, C. L. Molecular basis of α -thalassemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 43–53, mai. 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079979617301493>. Acesso em: 8 nov. 2023.

GOH, L. P. W.; CHONG, E. T. J.; LEE, P-C. Prevalence of Alpha (α)-Thalassemia in Southeast Asia (2010:2020): A Meta-Analysis Involving 83,674 Subjects. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 20, 9 out. 2020.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/20/7354>. Acesso em: 11 dez. 2023

HALEY, K. Congenital Hemolytic Anemia. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 2, p. 361–374, mar. 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002571251637359X?via%3Dihub>. Acesso em: 11 dez. 2023

HAMZA BAJWA; HAJIRA BASIT. Talassemia. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545151/>. Acesso em: 11 dez. 2023

HARTEVELD, C. L.; HIGGS, D. R. α -thalassaemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, n. 1, 28 mai. 2010. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2887799/>. Acesso em: 8 nov. 2023.

JAING, T.-H. et al. Molecular genetics of β -thalassemia. **Medicine**, v. 100, n. 45, p. e27522, 12 nov. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8589257/>. Acesso em: 8 nov. 2023.

KALLE KWAIFA, I.; LAI, M. I.; MD NOOR, S. Non-deletional alpha thalassaemia: a review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 1, 29 jun. 2020. Disponível em: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-020-01429-1>. Acesso em: 11 jan. 2024

LIANG, Q. et al. A More Universal Approach to Comprehensive Analysis of Thalassemia Alleles (CATSA). **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 23, n. 9, p. 1195–1204, 1 set. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525157821002026>

LONG, J. et al. Third-generation sequencing: A novel tool detects complex variants in the α -thalassemia gene. **Gene**, v. 822, p. 146332, mai. 2022. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111922001512?casa_token=URCAWhDK8jUAAAAA:oQJLWpibrrr2_t-i-I2AstpODjorSbenshI9PXecbXonN0WzY6oVzXtm8e_F43ITZ7VIYuJbc51d. Acesso em: 11 jan. 2024

METTANANDA, S.; HIGGS, D. R. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 32, n. 2, p. 177–191, abr. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889858817301922?via%3Dihub>. Acesso em: 11 jan. 2024

MODELL, B. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 2008, n. 6, p. 480–487, 1 jun. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647473/>. Acesso em: 8 nov. 2023.

MUNKONGDEE, T. et al. Update in Laboratory Diagnosis of Thalassemia. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 74, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.00074/full>. Acesso em: 11 jan. 2024

MUSALLAM, K. M. et al. Alpha-thalassemia: A practical overview. **Blood Reviews**, p. 101165, 3 jan. 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38182489/>. Acesso em: 2 fev. 2024.

NAOUM, P. C. Anemias - Classificação e diagnóstico diferencial. [2012?]. Disponível em: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/anemias/Anemias_Classifica%C3%83%C2%A7%C3%83%C2%A3o_Diagn%C3%83%C2%B3stico_Diferencial.pdf. Acesso em: 11 jan. 2024

SANTOS, B. et al. Co-Inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell disease in a cohort of Angolan pediatric patients. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 7, p. 5397–5402, jul. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-020-05628-8>. Acesso em: 2 fev. 2024

SHAFIQUE, F. et al. Thalassemia, a human blood disorder. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/73sD7WKNCqMVfBg6zsTkSQ>. Acesso em: 11 jan. 2024

SHANG, X.; XU, X. Update in the genetics of thalassemia: What clinicians need to know. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 39, p. 3–15, 1 fev. 2017.

SONGDEJ, D.; BABBS, C.; HIGGS, D. R. An international registry of survivors with Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. **Blood**, v. 129, n. 10, p. 1251–1259, 9 mar. 2017.

SONGDEJ, D.; FUCHAROEN, S. Alpha-Thalassemia: Diversity of Clinical Phenotypes and Update on the Treatment. *Thalassemia Reports*, v. 12, n. 4, p. 157–172, 22 nov. 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2039-4365/12/4/20>. Acesso em: 28 nov. 2023.

STEVENSON, R. E. Alpha-Thalassemia X-Linked Intellectual Disability Syndrome. **Gene Reviews [Internet]**. 19 jun. 2000 [28 mai. 2020]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1449/>. Acesso em: 18 nov. 2023.

TAHER, A. T.; WEATHERALL, D. J.; CAPPELLINI, M. D. Thalassaemia. *The Lancet*, v. 391, n. 10116, p. 155–167, jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28774421/>. Acesso em: 7 dez. 2023

VICHINSKY, E. P. Clinical Manifestations of α -Thalassemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 5, p. a011742–a011742, 29 mar. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3633183/>. Acesso em 5 jan. 2024

VIJIAN, D. et al. Molecular Detection of alpha Thalassemia: A Review of Prevalent Techniques. **Medeniyet Medical Journal**, v. 36, n. 3, 2021. https://jag.journalagent.com/medeniyet/pdfs/MEDJ-14603-REVIEW-WAN_AB_RAHMAN.pdf. Acesso em: 7 dez. 2023

WEATHERALL, D. J.; AKINYANJU, O.; FUCHAROWN, S.; OLIVIERI, N.; MUSGROVE, P. **Inherited Disorders of Hemoglobin**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11727/>. Acesso em: 28 nov. 2023

WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J. World Distribution, Population Genetics, and Health Burden of the Hemoglobinopathies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**,

v. 2, n. 9, p. a011692-a011692, 1 set. 2012. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3426822/>. Acesso 28 nov. 2023.

ANEXO A: APROVAÇÃO CEP

UNESP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS LETRAS E
CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS
DE SÃO JOSÉ DO RIO
PRETO/IBILCE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estresse Oxidativo e Gravidade da Anemia Falciforme em Associação com Alfa Talassemia e Uso de Hidroxicarbamida

Pesquisador: DENNY PAMELA MALERBA

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 60269522.9.0000.5466

Instituição Proponente: UNESP - CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.725.692

Apresentação do Projeto:

O projeto consiste em estudar o estresse oxidativo e gravidade da doença com o uso ou não de Hidroxicarbamida

Objetivo da Pesquisa:

1. Determinar a gravidade da anemia falciforme por meio de calculadora derisco adaptada aos padrões brasileiros.
2. Traçar o perfil do estresse oxidativo nas amostras de pacientes classificados por gravidade.
3. Traçar o perfil do estresse oxidativo e gravidade da anemia falciforme em portadores de anemia falsiforme (SS), que apresentam ou não associação com alfa Talsessemia e que foram ou não tratados com Hidroxicarbamida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: possíveis Hematomas devido a coleta de sangue

Benefício: aprimorar e adequar o tratamento e o aconselhamento genético dos portadores

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto é claro e pertinente, os sujeitos da pesquisa possuem um risco mínimo ,mas os benefícios

Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Prédio principal, Ala 1, 1º andar, sala 9.

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2480

E-mail: cep.ibilce@unesp.br

UNESP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS LETRAS E
CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS
DE SÃO JOSÉ DO RIO
PRETO/IBILCE



Continuação do Parecer: 5.725.692

será que a pesquisa contribuirá no entendimento da doença, auxiliando os portadores

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicita a dispensa TCLE, uma vez que serão usados os prontuários e análises estatísticas. Um outro ponto importante para dispensa, muitos pacientes faleceram na Pandemia e outros mudaram de endereço, dificultando encontrar os mesmos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto esta bem escrito, com todas as informações necessárias para o Comitê de Ética em Pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa, em reunião extraordinária de 26 de outubro de 2022, deliberou, por unanimidade, pela aprovação do presente Projeto de Pesquisa. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados semestralmente, contando a partir desta data, bem como o relatório final, conforme modelo em nossa página: <http://www.ibilce.unesp.br/#!/comite/etica-em-pesquisa/relatorio-projeto>

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1940244.pdf	30/06/2022 18:21:31		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Estresse_Oxidativo_e_Gravidade_da_Anemia_Falciforme_em_Associacao_com_Alfa_Talassemia_e_Uso_de_Hidroxycarbamida.pdf	30/06/2022 18:06:39	DENNY PAMELA MALERBA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Plataforma_Brasil.pdf	30/06/2022 17:42:12	DENNY PAMELA MALERBA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Prédio principal, Ala 1, 1º andar, sala 9.
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2480 E-mail: cep.ibilce@unesp.br

UNESP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS LETRAS E
CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS
DE SÃO JOSÉ DO RIO
PRETO/IBILCE



Continuação do Parecer: 5.725.692

SAO JOSE DO RIO PRETO, 27 de Outubro de 2022

Assinado por:
Natalia Soares Janzantti
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Prédio principal, Ala 1, 1º andar, sala 9.
Bairro: JARDIM NAZARETH **CEP:** 15.054-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2480 **E-mail:** cep.ibilce@unesp.br