

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Thaís Fernandes Ribeiro

Frequência dos Polimorfismos no Gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*) em pacientes com COVID-19

São José do Rio Preto

2024

Thaís Fernandes Ribeiro

**Frequência dos Polimorfismos no Gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*) em
pacientes com COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, Área de Genética Molecular, junto ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, SP.

Financiadora: CAPES – 88887.670949/2022-00

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto

2024

R484f	Ribeiro, Thaís Fernandes Frequência dos Polimorfismos no Gene HFE (H63D, C282Y e S65C) em pacientes com COVID-19 / Thaís Fernandes Ribeiro. -- 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. Biologia molecular. 3. Hemocromatose. 4. COVID-19 (Doença). 5. Leucócitos. 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).

Thaís Fernandes Ribeiro

**Frequência dos Polimorfismos no Gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*) em
pacientes com COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, Área de Genética Molecular, junto ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, SP.

Financiadora: CAPES - 88887.670949/2022-00

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ana Regina Chinelato Fernandes

UNIP – Universidade Paulista/Instituto de Ciências da Saúde

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Girol

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

11 de março de 2024

Dedico este trabalho a minha admirada família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço os meus pais, Simone T. Fernandes Ribeiro e Ronei Ribeiro, por serem meus exemplos de vida e por todo o apoio e incentivo que sempre me proporcionaram continuar os estudos. Sempre serei grata por tudo que fizeram por mim.

Aos meus irmãos, Beatriz F. Ribeiro e Rafael F. Ribeiro, pelo constante carinho, amor, respeito e admiração que compartilhamos.

Agradeço aos meus amigos Amanda K. Rivero, Ana Clara Albertin, Beatriz Vilela, Lucas Toloi e Nikolas Alexander, pela compreensão, amizade e apoio incondicional. Mesmo diante da distância, vocês sempre estiveram ao meu lado. Muito obrigada Nikolas Alexander por sempre estar comigo e apoiar meus sonhos, você é exemplo de organização, disciplina e responsabilidade. Sou grata a toda ajuda.

À minha tia Fátima Fernandes, pelo carinho, amor e admiração.

Aos meus amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) Ana Beatriz, Ana Carolina, Bruna Lima, Débora Santos, Denny Malerba, Lucas Ramos, Rafaela Beatriz, por toda ajuda, paciência e ensinamentos, que contribuíram para a finalização deste trabalho. Em especial à Ana Beatriz, Débora Santos, Denny Malerba e Lucas Ramos, que sempre tiveram tempo para me ajudar contribuindo enormemente nas análises e na finalização desta dissertação. Muito obrigada por tudo.

À minha orientadora Claudia Regina Bonini Domingos, expresso minha gratidão pela oportunidade de realizar este trabalho e por seu significativo contributo para o meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço pelos ensinamentos, confiança e paciência. Levarei sempre comigo a admiração por sua dedicação como pessoa e pesquisadora.

Ao Laboratório de Estudos Genômicos (LEGO) pela disponibilização do equipamento, em especial a professora Paula Rahal, a Dayla Geraldini e ao Vivaldo Gomes, pelo suporte oferecido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento nº 88887.670949/2022-00.

RESUMO

A doença por coronavírus 2019 (COVID-19) conhecida como Síndrome Respiratória Aguda Grave é causada por um novo beta-coronavírus (SARS-CoV-2), e é caracterizada por um amplo espectro de gravidade clínica, devido às funções das proteínas codificadas pelo genoma viral envolvidas no processo de replicação e entrada na célula hospedeira. O processo de infecção pelo SARS-CoV-2 acarreta em grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para lesão nas células epiteliais pulmonares. A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença caracterizada pelo excesso de ferro no sangue e pacientes com os polimorfismos no gene *HFE* (*C282Y*, *H63D* e *S65C*) podem desenvolver uma série de doenças inflamatórias decorrente das reações oxidativas e de alterações no metabolismo do ferro. Como o aumento de ferro circulante e tecidual acentuam o processo inflamatório, verificar a resposta à infecção por COVID-19 nessas associações se faz necessário, identificando pacientes com maior risco de desenvolver quadros graves, pelo índice neutrófilo-linfócito (NLR), um potencial marcador prognóstico da gravidade da doença. O estudo envolveu 184 adultos, de ambos os sexos, que tiveram COVID-19, com idades entre 18 e 76 anos. Os resultados indicaram associação da gravidade da COVID-19 com: a) o sexo biológico ($p < 0,05$), predominando casos graves entre homens, e b) com a morfologia eritrocitária ($p < 0,05$), evidenciando alterações no tamanho e formato das células. Embora o NLR não tenha apresentado associação direta com a gravidade, casos mais graves exibiram um índice mais elevado. Além disso, o NLR mostrou associação com o sexo feminino, período curto de sintomatologia e casos leves de COVID-19, enquanto o sexo masculino associou-se a um NLR intermediário e gravidade moderada, sugerindo a influência dos diferentes perfis leucocitários entre homens e mulheres ($p < 0,05$). Alterações nos neutrófilos associaram-se à gravidade ($p < 0,05$), indicando que casos leves apresentam perfil normal de neutrófilos, enquanto que para os linfócitos não houve associação, possivelmente devido à linfopenia em casos leves. A mutação *H63D* apresentou diferença significativa em relação à gravidade da doença ($p < 0,05$), enquanto as mutações *C282Y* e *S65C* não apresentaram. Esse resultado possivelmente seja devido à baixa frequência desses polimorfismos em populações miscigenadas. A mutação *H63D* em heterozigose sugere um mecanismo de proteção contra agravamento da COVID-19. Este estudo destaca a importância de investigar o papel da HH nos sintomas da COVID-19 e ressalta a relevância de traçar o perfil de herança dos polimorfismos para estratégias de suporte em indivíduos predispostos a formas leves ou graves da doença.

Palavras-chave: Hemocromatose hereditária. Coronavírus. Gravidade clínica. Índice neutrófilos-linfócitos.

ABSTRACT

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), known as severe acute respiratory syndrome, is caused by a new beta-coronavirus (SARS-CoV-2), and is characterized by an ample spectrum of clinical severity, due to the functions of proteins encoded by the coronaviral genome involved in the replication process and entry into the host cell. The infection process by SARS-CoV-2 causes a large amount of pro-inflammatory cytokines, which contribute to injury to lung epithelial cells. Hereditary hemochromatosis (HH) is a disease characterized by excessive iron in the blood, and individuals with polymorphisms in the *HFE* gene (*C282Y*, *H63D* and *S65C*) can develop a series of inflammatory diseases resulting from oxidative reactions and changes in iron metabolism. As the increase in circulating and tissue iron accentuates the inflammatory process, assessing the COVID-19 infection outcome in these associations is necessary, identifying patients at higher risk of developing severe conditions, using the neutrophil-lymphocyte index (NLR), as a potential prognosis marker for disease severity. The study involved 184 adults, of both sexes, with COVID-19, aged between 18 and 76 years. The results indicated an association between severity of COVID-19 and: a) biological sex ($p<0.05$), with a higher prevalence of severe cases among men, and b) with erythrocyte morphology ($p<0.05$), showing alterations in size and shape of the cells. While the NLR did not directly correlate with severity, severe cases exhibited a higher index. The NLR was further linked to female sex, a short symptom duration, and mild cases of COVID-19, while male sex correlated with an intermediate NLR and moderate severity, indicating distinct leukocyte profiles between genders ($p<0.05$). Neutrophil alterations were associated with severity ($p<0.05$), indicating that mild cases tend to have a normal neutrophil profile, while lymphocytes displayed no association, possibly due to lymphopenia in mild cases. The *H63D* mutation exhibited significant differences concerning disease severity ($p<0.05$), while the *C282Y* and *S65C* mutations did not. This result may be suggested to their low frequency in mixed populations. The heterozygous *H63D* mutations suggests a protective mechanism against worsening of COVID-19. This study underscores the importance of investigating the role of HH in COVID-19 symptoms and emphasizes the relevance of delineating the inheritance profile of polymorphisms to guide strategies for individuals predisposed to mild or severe forms of the disease.

Keywords: Hereditary hemochromatosis. Coronavirus. Clinical severity. Neutrophil-lymphocyte index.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura e organização genômica do SARS-CoV-2.	15
Figura 2 – Ciclo de replicação do SARS-CoV-2.	17
Figura 3 – Modelo da proteína HFE.	22
Figura 4 – Metabolismo do ferro.	24
Figura 5 – Fluxograma representando a distribuição da amostra.	29
Figura 6 – Frequência da gravidade e do período de sintomatologia entre os sexos biológicos na COVID-19 em porcentagem.	31
Figura 7 – Frequência de gravidade em Caucasoídes, Afrodescendentes, Pardos e Asiáticos entre o sexo biológico feminino e masculino na COVID-19 em porcentagem.	33
Figura 8 – Frequência do número de neutrófilos em pessoas com a gravidade leve, moderada e grave na COVID-19 entre o sexo biológico feminino e masculino em porcentagem.	39
Figura 9 – Frequência do número de linfócitos em pessoas com a gravidade leve, moderada e grave na COVID-19 entre o sexo biológico feminino e masculino em porcentagem.	39
Figura 10 – Frequência de gravidade da COVID-19 entre as pessoas com os polimorfismos <i>H63D</i> , <i>C282Y</i> e <i>S65C</i> em porcentagem.	43
Figura 11 – Resistência globular osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36%.	61
Figura 12 – Representação esquemática dos possíveis produtos de digestão da PCR-RFLP para as mutações <i>H63D</i> , <i>S65C</i> e <i>C282Y</i> .	65
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão da PCR-RFLP para as mutações <i>H63D</i> , <i>S65C</i> e <i>C282Y</i> .	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de gravidade dos pacientes com COVID-19, com base na sintomatologia.	19
Tabela 2 – Caracterização dos casos com infecção por SARS-CoV-2 (n = 184).	32
Tabela 3 – Perfil hemoglobínico e cromatográfico dos indivíduos com COVID-19 (n = 184).	35
Tabela 4 – Alterações hematológicas em casos de infecção por SARS-CoV-2 (n = 93).	37
Tabela 5 – Perfil de neutrófilos e linfócitos entre os sexos biológicos na COVID-19 (n = 93).	38
Tabela 6 – Polimorfismos no gene <i>HFE</i> entre os sexos biológicos na COVID-19 (n = 184).	42
Tabela 7 – Perfil de ferro sérico (n = 12) e ferritina (n = 20) entre os sexos biológicos na COVID-19.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β2M	Beta 2 microglobulina
COVID-19	Doença por coronavírus 2019
COVs	Coronavírus (Família)
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DMT-1	Transportador de íons metálicos bivalente 1
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECA-2	Enzima Conversora de Angiotensina-2
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FS	Níveis séricos de ferritina
HAMP	Gene da hepcidina
Hb	Hemoglobina
HH	Hemocromatose Hereditária
HJV	Gene da hemojuvelina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFN	Interferon
Kb	Quilobases
MAF	Frequências alélicas menores
NLR	Razão Neutrófilo-Linfócito
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
SARS-CoV-1	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave-1
SARS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave-2
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
ST	Índice de saturação da transferrina
TFR2	Gene do receptor 2 da transferrina
TMPRSS2	Serina protease transmembrana 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 COVID-19	14
1.2 Gene <i>HFE</i>	19
2. JUSTIFICATIVA	26
3. HIPÓTESE	26
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo Geral	27
4.2 Objetivos Específicos	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 Casuística	28
5.2 Métodos	29
5.2.1 Razão Neutrófilo-Linfócito	29
5.2.2 Análise Estatística	30
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO	57
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	59
APÊNDICE C – PROTOCOLOS	61
Resistência Globular Osmótica 0,36%	61
Morfologia eritrocitária	61
Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino	62
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	62
Extração de DNA	63
Quantificação do DNA	64
Protocolo para detecção da mutação <i>H63D</i> , <i>S65C</i> e <i>C282Y</i> no gene <i>HFE</i>	64
PCR-RFLP	
ANEXO A – APROVAÇÃO CEP	67
ANEXO B – RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSO	68
ANEXO C – MANUSCRITOS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 COVID-19

A doença por coronavírus 2019 (COVID-19) conhecida como Síndrome Respiratória Aguda Grave é causada por um novo beta-coronavírus (SARS-CoV-2) (Hoffmann et al., 2020). Os Coronavírus (CoVs) são vírus envelopados com diâmetro de 60 a 130nm que contém um genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva e com um tamanho que varia entre 26 e 32 quilobases (Kb) de comprimento (Ludwig; Zarbock, 2020). Estes vírus são constituídos por um capsídeo com simetria pleomórfica e possuem projeções radiais de glicoproteínas superficiais (Xavier et al., 2020). A infecção pelo SARS-CoV-2 pode resultar em um amplo espectro de gravidade clínica, sendo que a maioria dos pacientes é capaz de desenvolver uma resposta imune adequada e eficaz, levando à eliminação viral (Seyedalinaghi et al., 2021). No entanto, um grupo significativo de pacientes apresenta manifestações clínicas graves (Bohn et al., 2020), em função de quatro proteínas principais codificadas pelo genoma do coronavírus (**Figura 1A**), o pico (S), o envelope (E), a membrana (M) e o nucleocapsídeo (N), que desempenham funções distintas na estrutura da partícula viral, e estão envolvidas em diferentes etapas do ciclo de replicação, ligação e inserção nas células hospedeiras (Costa; Moreli; Saivish, 2020).

O processo de patogênese se inicia com a invasão viral mediante a interação com os receptores das células hospedeiras alvo, sendo essa interação mediada pela proteína S (Nguyen et al., 2021). A proteína S, composta por uma cauda C-terminal intracelular e uma âncora transmembranar, pode ser subdividida em uma subunidade S1, responsável pela ligação ao receptor, e uma subunidade S2, responsável pela fusão de membrana (**Figura 1B**) (Chilamakuri; Agarwal, 2021).

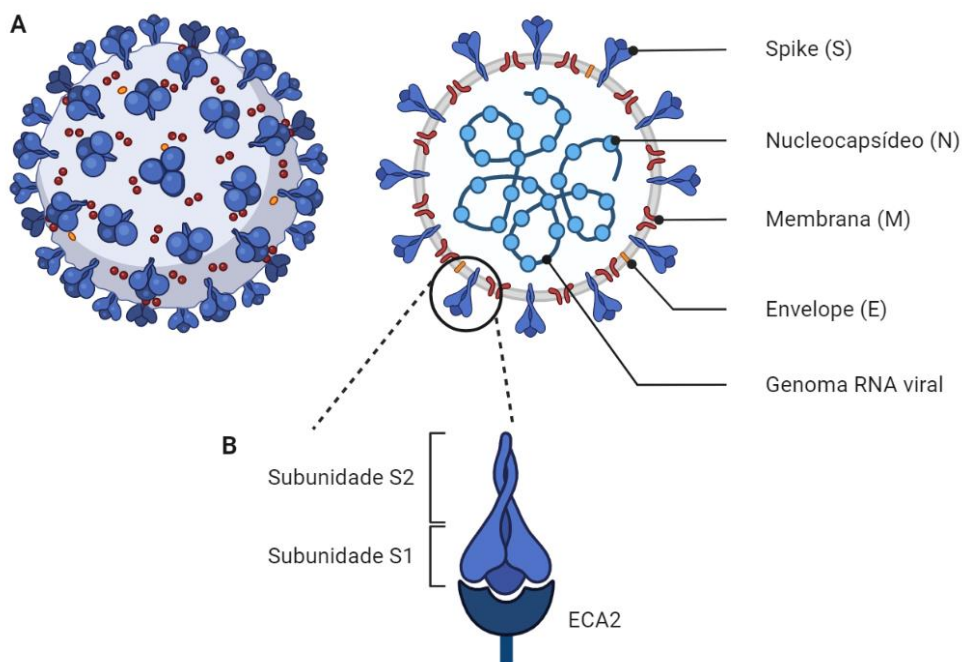


Figura 1. Estrutura e organização genômica do SARS-CoV-2. **(A)** Representação esquemática da estrutura do vírus SARS-CoV-2 e a localização das glicoproteínas *spike*, nucleocapsídeo, membrana, envelope e genoma viral de RNA. **(B)** Representação esquemática ampliada da glicoproteína *spike* mostrando as subunidades S1 e S2. Fonte: elaborada pela autora (2024).

O SARS-CoV-2 estabelece, predominantemente, ligação com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) por meio da interação com a subunidade S1 (Mahmoud et al., 2020), enquanto é clivada por proteases celulares, como a serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2), ativando sua capacidade de fusão de membrana por meio da clivagem da proteína S e ocasionando uma modificação estrutural em S2 (**Figura 2A**) (Harteniam et al., 2020). A fusão entre as membranas virais e celulares ocorre pela exposição da subunidade S2, facilitando a entrada do vírus na célula-alvo (**Figura 2B**) (Zhang; Shi; Wang, 2020). Esse mecanismo viabiliza a liberação do material genético viral no citoplasma das células, desencadeando a replicação viral e a disseminação da infecção.

Após a deposição do nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira, ocorre a tradução da polimerase viral (**Figura 2C**) e o genoma de RNA, de polaridade positiva, é replicado. Devido a essa polaridade positiva, o RNA viral pode ser traduzido diretamente nos ribossomos da célula hospedeira (Harteniam et al., 2020). Esse processo resulta na síntese de moléculas de RNA subgenômicas, que originam as proteínas virais, bem como moléculas de RNA utilizadas na composição do material genético das novas partículas virais (**Figura 2D**) (Malone et al., 2021). A proteína M, glicoproteína estruturalmente predominante, possui três domínios transmembrana e desempenha papel crucial no transporte de nutrientes através da

membrana celular e na montagem do CoV, interagindo com as outras proteínas virais para direcionar a formação do envelope viral e fornecer uma matriz à qual o nucleocapsídeo se liga; por sua vez, a proteína E, de natureza hidrofóbica e menos abundante, desempenha função significativa na liberação e montagem viral durante a patogênese; por fim, a proteína N, com três regiões intrinsecamente desordenadas (o braço N, a região central de ligação e a cauda C) e dois domínios estruturais (domínio N-terminal e o domínio C-terminal), associa-se ao RNA em uma estrutura helicoidal, mantendo a estabilidade do RNA (Bai; Zhong; Gao, 2022; Cruz et al., 2021; Schoeman; Fielding, 2019). A tradução das proteínas virais ocorre no compartimento intermediário do retículo endoplasmático-Golgi da célula hospedeira (**Figura 2E**), seguida pela associação com o novo nucleocapsídeo (**Figura 2F**) para formar novas partículas virais (**Figura 2G**) (Alanagreh; Alzoughool; Atoum, 2020). As partículas virais recém-formadas são liberadas para infectar outras células (**Figura 2H**), especialmente no trato respiratório superior e no tecido pulmonar, levando a progressão da infecção (Bohn et al., 2020).

A infecção pelo coronavírus induz a morte celular e lesão nas células epiteliais das vias aéreas, ocasionando a liberação de padrões moleculares associados a danos (*DAMPs*) e padrões moleculares associados a patógenos (*PAMPs*), identificados em macrófagos (Silva et al., 2021). O reconhecimento de antígenos virais geralmente desencadeia a produção de uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, mesmo em casos moderados. Em resposta, como observado na síndrome respiratória aguda causada pelo coronavírus 1 (SARS-CoV-1), demonstra uma capacidade limitada de induzir vias de sinalização antiviral mediadas pelo interferon (IFN) produzido pelos leucócitos (Spiegel et al., 2005), resultando em uma diminuição da resposta imune inata. Adicionalmente, a infecção direta de macrófagos também promove a liberação de mais citocinas e quimiocinas, impactando sua diferenciação e reduzindo sua capacidade de reconhecer e fagocitar outras células, contribuindo para o dano tecidual extenso (Salina et al., 2021). Em alguns pacientes com COVID-19, essa ativação pode intensificar-se, levando a uma ‘tempestade de citocinas’, com consequente liberação de espécies reativas de oxigênio (*ROS*), contribuindo para danos adicionais, hiper inflamação, e potencialmente, lesão pulmonar grave, falência de múltiplos órgãos e óbito (Napoleão et al., 2021; Bohn et al., 2020). Além dos danos pulmonares induzidos pelas citocinas e quimiocinas inflamatórias, a elevação dos níveis de monócitos e macrófagos inflamatórios pode estimular a fibrose pulmonar devido ao extravasamento do conteúdo vascular (Harteniam et al., 2020). Esse fenômeno ocorre devido a danos diretos e indiretos às células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, especialmente nos pulmões, desencadeando a ativação da cascata de coagulação, amplificando os efeitos da infecção por SARS-CoV-2 (Teuwen et al., 2020).

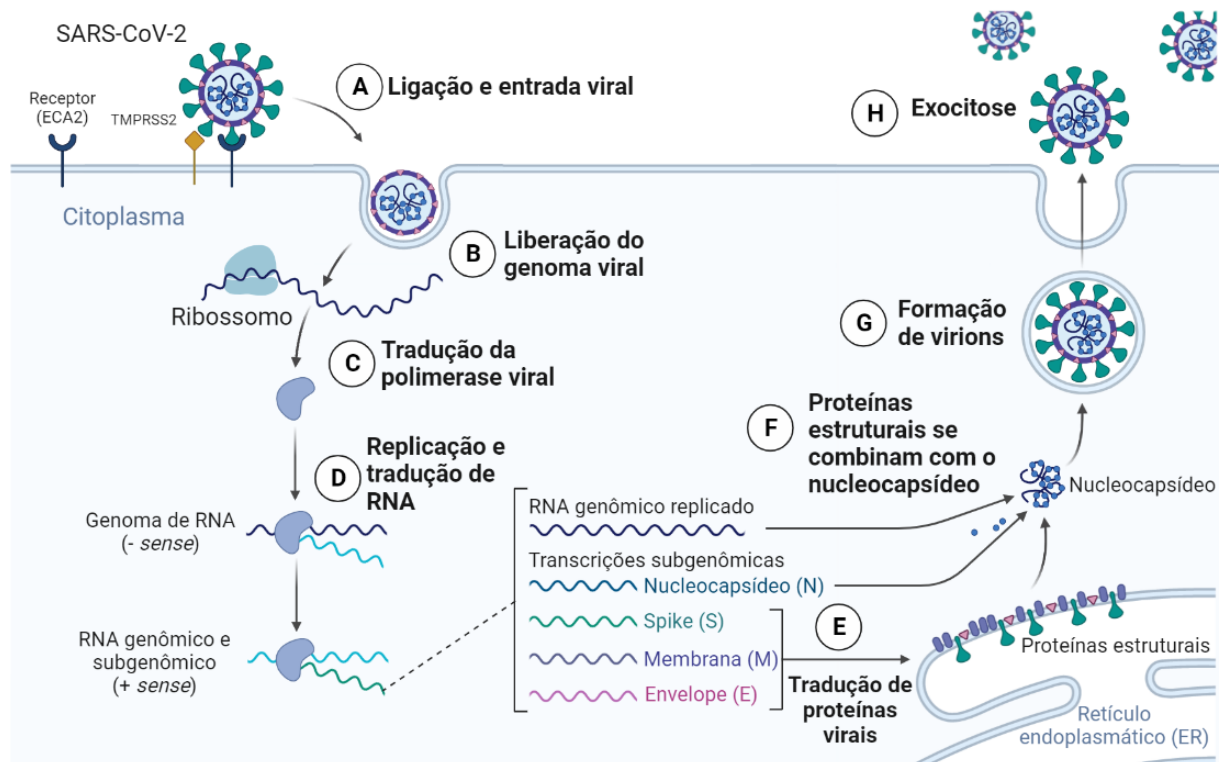


Figura 2. Ciclo de replicação do SARS-CoV-2. (A) A ligação e entrada viral em uma célula hospedeira ocorre com a interação do SARS-CoV-2 com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) da proteína de superfície celular, enquanto é clivada por proteases celulares, como a serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2), para a sua capacidade de fusão na membrana. (B) Após a entrada viral, ocorre liberação do genoma e (C) tradução da polimerase viral, após recrutamento dos ribossomos da célula hospedeira, por ser um vírus de RNA fita simples de sentido positivo. (D) Durante a replicação e tradução as cópias de RNA negativo produzidas são usadas como modelo para o RNA genômico positivo e um conjunto de RNAs subgenômicos. (E) No compartimento intermediário do retículo endoplasmático-Golgi da célula hospedeira ocorre a tradução das proteínas virais. (F) Assim, as proteínas estruturais podem ser combinadas com o nucleocapsídeo (G) para formar novas partículas virais. (H) Os vírus são transportados em vesículas e são liberadas por exocitose. Fonte: elaborada pela autora (2024).

Além da liberação de citocinas, na COVID-19, observa-se um aumento nos níveis de ferritina, aumento na contagem de neutrófilos e uma redução da contagem de linfócitos (Lippi; Plebani, 2020). Esse evento é resultado da apoptose induzida por uma grave desregulação imunológica que afeta diversas células, incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos T e células dendríticas, contribuindo para a progressão da doença (Brito et al., 2020). Pacientes graves, portanto, tendem a apresentar uma razão elevada entre neutrófilos e linfócitos (NLR), que pode ser utilizada como marcador de prognóstico e orientação para o tratamento da doença (Liu et al., 2020). Conforme revisado por Alves (2020), quanto maior o número de citocinas

inflamatórias (IL-2, IL-6, IL-10), maior o NLR e, consequentemente, maior a gravidade da doença com piora do prognóstico.

A COVID se manifesta como uma doença que afeta diversos órgãos, incluindo os sistemas respiratório, gastrointestinal, hematopoiético, renal e cardiovascular (Zaky et al., 2021). De acordo com a sintomatologia apresentada, os casos podem ser classificados em: assintomáticos, leves, moderados, graves e críticos, seguindo os critérios apresentados na **Tabela 1** (Baj et al., 2020). Sabe-se que infecção por coronavírus ou o uso de medicamentos antivirais secundários podem estar associados a doenças hepáticas devido à hepatotoxicidade desses medicamentos (Afonso et al., 2021; Lima et al., 2020). Além disso, a insuficiência hepática em pacientes com COVID-19 grave pode ser influenciada pela inflamação imunomediada, incluindo a tempestade de citocinas e a hipoxemia (Zhang; Shi; Wang, 2020). Entretanto, nenhum dado aponta para o aumento na gravidade em doenças hepáticas metabólicas, como a hemocromatose hereditária (HH), uma condição autossômica recessiva caracterizada pelo acúmulo excessivo de ferro no sangue (Li et al., 2014), cujo aumento favorece a infecção.

Com relação ao diagnóstico laboratorial da COVID-19, o teste padrão é a reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR), dada a sua alta sensibilidade na detecção do genoma de RNA, em amostras do trato respiratório, sendo este um teste fundamental para o diagnóstico precoce, visando identificar o limiar do ciclo de replicação viral (Sethuraman; Jeremiah; Ryo, 2020). Outro método utilizado é o ensaio imuno-enzimático de IgM e IgG (ELISA), que possibilita quantificar a presença de anticorpos produzidos pelo hospedeiro como parte da resposta imune, sendo um teste sorológico relevante em casos de doença leve ou moderada, especialmente quando os sintomas se manifestam em estágios mais tardios (Mathuria; Yadav; Rajkumar, 2020).

Tabela 1. Classificação de gravidade dos pacientes com COVID-19, com base na sintomatologia.

Classificação dos pacientes com COVID-19	
Assintomático	Teste molecular (PCR) para SARS-CoV-2 positivo, mas sem quaisquer sintomas ou sinais clínicos.
Sintomáticos	Leve Sintomas de infecção aguda do trato respiratório superior, como febre, fadiga, mialgia, tosse, dor de garganta, coriza e espirros, ou sintomas digestivos, como náuseas, vômito e diarreia.
	Moderado Presença de febre persistente e tosse seca. Na tomografia do tórax é visível uma opacidade fosca e consolidação pulmonar.
	Grave Dispneia, hipoxemia, comprometimento pulmonar >50%, diarreia, vômito e náuseas. A tomografia de tórax apresenta opacidade fosca, consolidação pulmonar e derrame pleural.
	Crítico Síndrome respiratória aguda grave com intubação orotraqueal. Na tomografia de tórax há a presença de opacidade fosca, geralmente bilateral, consolidação pulmonar. Pode ainda apresentar choque séptico, encefalopatia, lesão miocárdica, insuficiência cardíaca, coagulação intravascular disseminada e lesão renal aguda.

(Fonte: Adaptado de Baj et al., 2020).

1.2 Gene *HFE*

O gene *HFE* desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo do ferro, sendo responsável pela codificação da glicoproteína transmembrana denominada proteína HFE. Esta proteína atua como cofator essencial em diversos processos fisiológicos e biológicos, devido à sua capacidade de se ligar aos receptores de transferrina localizados nas membranas celulares (Nixon et al., 2018). Localizado no braço curto do cromossomo 6 (posição 6p21.3), o gene *HFE* consiste em sete regiões codificadoras intercaladas por íntrons (Feder et al., 1996), desempenhando um papel fundamental na prevenção da hemocromatose e contribuindo para o controle da absorção de ferro no organismo (Anjos et al., 2021). Mutações nesse gene frequentemente resultam no acúmulo de ferro em pacientes (Li et al., 2014). Embora o ferro

seja um elemento essencial para o metabolismo, seu excesso pode causar disfunções e danos nos órgãos e tecidos devido à sua toxicidade (Selvaraj et al., 2021).

A hemocromatose pode ser categorizada em duas formas, primária e secundária. A hemocromatose primária, resultante de mutações autossômicas recessivas, é uma condição bastante prevalente em todo o mundo, sendo subdividida em quatro tipos principais denominados tipo 1, 2, 3 e 4 (Turshudzhyan; Wu; Wu, 2023). O tipo 1, associado ao gene *HFE*, representa cerca de 80 a 85% dos diagnósticos e é causado por três polimorfismos, que são: *H63D* (rs1799945), *C282Y* (rs1800562) e *S65C* (rs1800730) (Gerhard; Paynton; Distefano, 2018). A prevalência desses polimorfismos varia entre diferentes grupos étnicos; o polimorfismo *C282Y*, que ocorre em aproximadamente 90 a 95% dos pacientes com HH, resulta da transição de uma tirosina por uma cisteína no códon 282 do éxon 4 (Nixon et al., 2018); o polimorfismo *H63D*, que afeta cerca de 15 a 20% da população global, envolve a transversão da histidina por um ácido aspártico na proteína devido a uma mutação no códon 63 do éxon 2; enquanto que o polimorfismo *S65C*, que ocorre em aproximadamente 2 a 3% dos casos de HH, está associado à substituição de uma serina por uma cisteína devido a uma mutação no éxon 2 (Souto; Pugliesi; Lopes, 2016).

A hemocromatose do tipo 2, ou juvenil, é mais frequente em adolescentes, sendo relativamente rara na população em geral, com menos de 100 casos relatados, e pode ser causada por mutações homozigóticas no gene da hemojuvelina (*HJV*) ou no gene da hepcidina (*HAMP*), afetando a transcrição da hemojuvelina ou interferindo diretamente na codificação da hepcidina, que é regulada em resposta ao aumento nos níveis de ferro nas células (Brissot et al., 2018). O tipo 3 resulta de mutações no gene do receptor 2 da transferrina (*TFR2*), que codifica uma proteína responsável por controlar a saturação da transferrina, sendo extremamente rara, com apenas 50 casos relatados em todo o mundo (Hernández et al., 2021). Enquanto o tipo 4 é causado por mutações autossômicas dominantes no gene *SLC40A1*, correspondendo a uma forma rara de sobrecarga de ferro, predominante em descendentes do sul da Europa, que leva à perda de função da ferroportina, resultando em uma deficiência para exportar o ferro, devido à sua incapacidade de se ligar à hepcidina (Tertre et al., 2021).

A hemocromatose secundária, por sua vez, surge de processos complementares, como a sobrecarga de ferro devido a múltiplas transfusões de sangue ou associada a doenças hepáticas crônicas ou distúrbios hematológicos (Hsu et al., 2022). Nesse caso, é desencadeada por condições, tanto congênitas quanto adquiridas, que levam ao acúmulo secundário de ferro, sendo as causas mais comuns: anemia hemolítica, anemia falciforme, talassemia beta maior, hepatopatias e eritropoiese ineficaz (Souto; Pugliesi; Lopes, 2016).

As manifestações clínicas iniciais da HH incluem fadiga, dor abdominal, hepatomegalia, esplenomegalia, artropatia e perda de peso (Anderson; Bardou-jacquet, 2021). Devido à deposição gradual e progressiva de ferro no organismo, esses sintomas geralmente aparecem após a terceira década de vida, tornando o diagnóstico precoce desafiador (Bonini-Domingos, 2006). Na ausência de tratamento precoce, podem ocorrer outras manifestações, como hiperpigmentação cutânea, diabetes *mellitus*, fibrose portal, adelgaçamento, cirrose hepática e o carcinoma hepatocelular (Santos et al., 2009). A mortalidade associada à HH inclui cirrose hepática, carcinoma hepatocelular, diabetes e miocardiopatia (Milman et al., 2001).

Apesar de mutações no gene *HFE* estarem associadas à hemocromatose, sua presença não é suficiente para o diagnóstico, devido à baixa penetrância do alelo mutante e expressões fenotípicas, dificultando a previsão do quadro clínico da doença (Santos et al., 2009). A HH está predominantemente associada à homozigose para o genótipo *C282Y*, evidenciando a doença clínica, enquanto as mutações *S65C* e *H63D* apresentam penetrância reduzida. A mutação *H63D* quando em heterozigose composta com o gene *C282Y* (*C282Y/H63D*), resulta em uma sobrecarga moderada de ferro (Gouveia; Ribeiro; Carrilho, 2016). As frequências alélicas máximas (MAFs) dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) *HFE* são 0,14 *H63D*, 0,05 *C282Y* e 0,004 *S65C* (NCBI, 2024). Proteínas *HFE* resultantes dessas mutações afetam o equilíbrio do ferro celular e estão associadas a doenças inflamatórias (Nixon et al., 2018), sendo expressas em níveis elevados nas células do intestino e do fígado (Enns, 2006). Esse fato nos faz refletir sobre os mecanismos subjacentes relacionados às variantes do gene *HFE* e a infecção por COVID-19.

Uma vez sintetizada, a proteína *HFE* interage com a beta2-microglobulina (β 2M), formando um complexo ilustrado na **Figura 3**, sendo essencial para o transporte e ancoragem da proteína na membrana celular, próximo ao receptor da transferrina; assim, mutações no gene *HFE* ou a ausência de β 2M resultam em acúmulo excessivo de ferro (Li; Dong; Wang, 2016). A mutação *C282Y* impede a ligação da proteína *HFE* à β 2M, levando à sua ausência na membrana celular, em vez disso, a proteína é retida no retículo endoplasmático e sofre degradação acelerada, o que leva a um aumento significativo na afinidade ao receptor da transferrina (Bacon; Britton, 2015). A mutação *H63D* e a *S65C* permitem a ligação da proteína *HFE* à β 2M, mas resultam em uma perda parcial de sua função, aumentando discretamente a expressão do receptor da transferrina (Bacon et al., 2011).

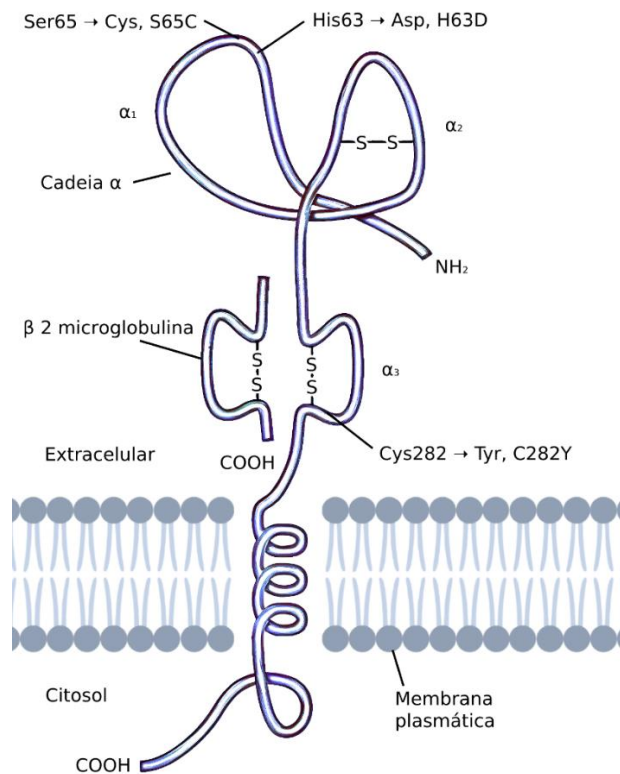


Figura 3. Modelo da proteína HFE. A proteína HFE recém sintetizada interage com a beta2-microglobulina para formação de um complexo capaz de se fixar na membrana plasmática da célula. O polimorfismo *C282Y* torna a proteína HFE incapaz de se associar com a beta2-microglobulina. Os polimorfismos *H63D* e *S65C* permitem a associação parcial da proteína HFE com a beta2-microglobulina. Fonte: elaborada pela autora (2024).

O corpo humano possui contém cerca de três a quatro gramas de ferro, sendo a maior parte intracelularmente e presente em diversas formas, como a hemoglobina (Hb) dos eritrócitos (cerca de 2,5g), ferritina, em estado de ferro férrico (Fe^{3+}) (cerca de 1g), ligado à transferrina para transporte no plasma, e em outras moléculas como mioglobina e outras enzimas (aproximadamente 0,5g) (Ganz, 2017). As principais fontes desse elemento incluem a reciclagem do ferro proveniente de eritrócitos senescentes, pelos macrófagos, a absorção intestinal via alimentação, e a liberação do ferro armazenado pelos hepatócitos (Wang; Babitt, 2019).

No processo de absorção intestinal, o ferro é captado no duodeno através de um transportador de íons metálicos bivalentes 1 (DMT-1) (**Figura 4-1**), localizado na superfície apical dos enterócitos; posteriormente, pode ser armazenado como ferritina ou reabsorvido na circulação pela ação da ferroportina (Anderson; Frazer, 2017). A ferritina, uma proteína esférica, é responsável pelo armazenamento do ferro, quando sua saturação está normal, mas pode aumentar em resposta a condições como infecções, inflamações e malignidades (Zarjou et al., 2019). A ferroportina, uma proteína transmembrana, desempenha papel crucial no

transporte do ferro para a corrente sanguínea, onde se liga à transferrina, uma glicoproteína presente em vários tipos celulares, sendo mais abundante no trato gastrointestinal, refletindo a relação direta da transferrina com a absorção de ferro, especialmente nessa área (Kawabata, 2019). Dessa forma, o ferro transportado pela transferrina pode ser direcionado para a medula óssea (**Figura 4-2**), onde estimula a produção de glóbulos vermelhos, promovendo a eritropoiese (Koury; Ponka, 2004).

A reciclagem dos eritrócitos senescentes ocorre nos macrófagos (**Figura 4-3**), que detectam alterações químicas na membrana dos eritrócitos, resultantes do tempo em circulação ou de defeitos, sinalizando sua degradação (Camaschella; Nai; Silvestri, 2020; Grotto, 2008). Durante esse processo, o ferro é liberado do grupo heme pela ação da enzima heme oxigenase, e a cadeia globínica é reaproveitada para sintetizar novas proteínas (Ganz, 2016). O ferro liberado pode ser armazenado no próprio macrófago, na forma de ferritina, sendo os macrófagos a principal fonte de ferritina sérica (Cohen et al., 2010). Alternativamente, o ferro pode ser exportado para o plasma pela ferroportina e, consequentemente, oxidado para Fe^{3+} pela ceruloplasmina, facilitando sua ligação à transferrina (Katsarou et al., 2019; Souto; Pugliesi; Lopes, 2016). Tanto a ferritina quanto a ferroportina desempenham papel importante na prevenção do estresse oxidativo, reduzindo a reatividade do ferro e facilitando sua liberação para locais de ação e estoque (Santos et al., 2009).

O ferro remanescente é direcionado para outros tecidos e órgãos (**Figura 4-2**), com destaque para o fígado, onde pode ser armazenado como ferritina (**Figura 4-4**). No fígado ocorre a regulação da homeostase do ferro, principalmente pela produção de hepcidina, a principal proteína reguladora desse processo, de forma a reduzir a exportação de ferro para o plasma devido sua interação com a ferroportina, na superfície de enterócitos e macrófagos (Gulec; Anderson; Collins, 2014; Saneela et al., 2019). A expressão da hepcidina é modulada pelo gene *HFE*, que interage com os receptores de transferrina. Em condições normais, o aumento dos níveis de ferro estimula a secreção de hepcidina, promovendo uma redução na sua absorção que, assim, fica retido no macrófago na forma de ferritina (Souto; Pugliesi; Lopes, 2016).

Mutações no gene *HFE* podem resultar em produção de uma proteína incapaz de se ligar adequadamente à transferrina, diminuindo a concentração plasmática de hepcidina e aumentando a quantidade de ferro não ligado à transferrina (Cançado; Alvarenga; Santos, 2022). Além disso, em condições de hipóxia, observa-se uma diminuição nas concentrações de hepcidina. O ferro livre atua como catalisador em reações oxidativas, resultando na síntese de

radicais superóxidos e radicais hidroxila, causando danos às membranas celulares, proteínas e ao DNA (Santos et al., 2009).

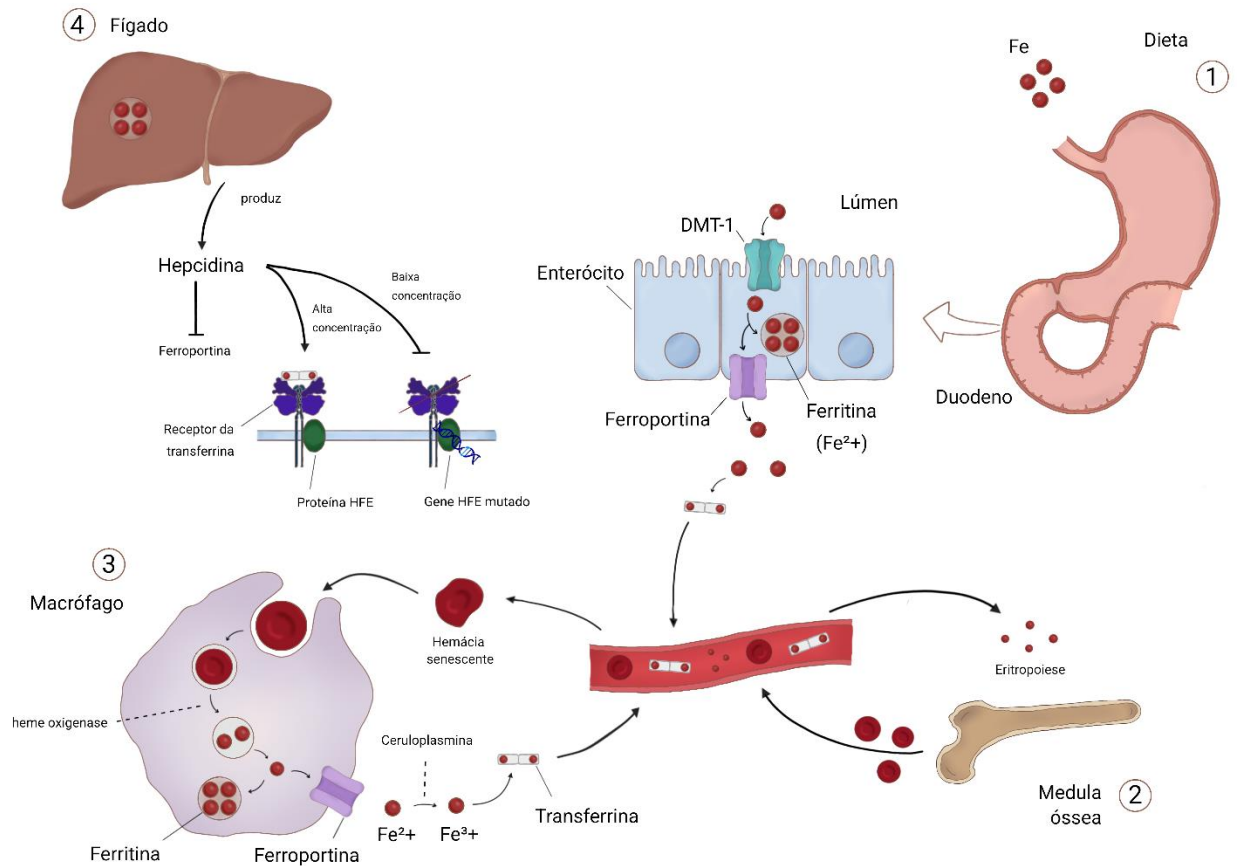


Figura 4. Metabolismo do ferro. O processo de absorção intestinal de ferro inicia-se com sua captação no duodeno (1) por meio do transportador de íons metálicos bivalentes 1 (DMT-1), localizado na membrana apical dos enterócitos. O ferro captado pode ser posteriormente armazenado como ferritina ou reintroduzido na circulação pela ação da ferroportina, uma proteína transmembrana. O ferro transportado pela transferrina é direcionado para a medula óssea (2), onde estimula a eritropoiese, promovendo a produção de glóbulos vermelhos. Nos macrófagos (3) ocorre a reciclagem dos eritrócitos senescentes, sinalizando sua degradação. Durante esse processo, o ferro é liberado do grupo heme pela ação da enzima heme oxigenase, podendo ser armazenado como ferritina ou exportado para o plasma pela ferroportina, facilitando sua liberação para locais de ação e estoque. O ferro remanescente é direcionado para o fígado (4), onde pode ser armazenado como ferritina. O fígado desempenha um papel crucial na regulação da homeostase do ferro, principalmente pela produção de hepcidina, que reduz a exportação de ferro para o plasma ao interagir com a ferroportina. A expressão da hepcidina é modulada pelo gene HFE, que interage com os receptores de transferrina. Em condições normais, o aumento de ferro estimula a secreção de hepcidina, promovendo uma redução na absorção de ferro, que fica retido no macrófago na forma de ferritina. Mutações no gene HFE resultam na produção de uma proteína incapaz de se ligar à transferrina, o que diminui a concentração de hepcidina e aumenta a quantidade de ferro circulante. Fonte: elaborada pela autora (2024).

O diagnóstico da HH pode ser estabelecido por meio da avaliação dos níveis de ferro no organismo, mediante a análise do índice de saturação da transferrina (ST) e dos níveis séricos de ferritina (FS), os quais refletem o aumento do conteúdo hepático de ferro. O ST é calculado a partir da relação entre os níveis de ferro sérico e a capacidade total de ligação do ferro. Valores de ferritina superiores a 200 µg/L em mulheres e superiores a 300 µg/L em homens são considerados anormais (Adams et al., 2005). É importante considerar que condições inflamatórias crônicas, como hepatite viral e doença hepática, alcoólica ou não alcoólica, podem ocasionar aumentos nos níveis de FS. A ferritina tende a apresentar uma menor variação biológica em comparação com a ST (Bacon et al., 2011). Quando o índice de saturação da transferrina está acima de 45% e os níveis de ferritina estão elevados, é aconselhável investigar a possível presença de mutações nos genótipos do gene *HFE* (Salgia; Brown, 2015). Contudo, em situações em que a ST se encontra abaixo de 45% e a ferritina está dentro dos limites normais, a avaliação deve ser orientada pelo histórico clínico do paciente (Bassett et al., 1984). Isso se deve ao fato de que alguns indivíduos com HH podem ser assintomáticos e ainda não terem manifestado qualquer expressão fenotípica.

A flebotomia terapêutica, conhecida como sangria terapêutica, representa o tratamento convencional para pacientes com hemocromatose, devido à sua eficácia, segurança e custo acessível, prevenindo danos aos tecidos e células, causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio, resultantes da sobrecarga (Jabbour et al., 2020). Durante a flebotomia, aproximadamente 400 a 500mL de sangue são removidos, considerando o peso corporal do paciente, levando à eliminação de cerca de 200 a 250mg de ferro a cada 1 a 4 meses, dependendo do nível de ferro do paciente. Esse é um procedimento necessário como tratamento de manutenção, especialmente porque a hepcidina persistentemente baixa promove uma absorção cronicamente elevada de ferro no intestino (Piperno et al., 2007).

A terapia de quelação do ferro não é a abordagem primária recomendada para a hemocromatose clássica. Entretanto, pode ser considerada como tratamento adjuvante em situações raras, especialmente quando a sobrecarga é grave e a flebotomia não demonstra eficácia (Barton, 2008). Os quelantes de ferro são medicamentos terapêuticos administrados por via oral, por meio de infusão subcutânea ou intravenosa, capazes de se ligar às moléculas de ferro no organismo. Uma vez quelado, o ferro é excretado por meio das fezes, sendo a eficácia dessa terapia diretamente proporcional à dose administrada (Ruivard; Lobbes, 2023).

2. JUSTIFICATIVA

O agente causador da COVID-19 se tornou uma ameaça global à saúde pública (Pal et al., 2021), devido ao modo de entrada, pelo sistema respiratório, e as características clínicas variáveis determinadas pela progressão da doença, e a fatores como a idade, sexo, presença de comorbidades e resposta imune do hospedeiro (Bakhshandeh et al., 2021). Os pacientes com COVID-19 apresentam sintomas semelhantes a outras doenças respiratórias comuns, como febre e tosse, posteriormente outros sintomas se apresentam, como náusea e vômito, e, finalmente, sintomas do trato gastrointestinal inferior, como diarreia (Larsen et al., 2020). Após a exposição ao novo coronavírus, as pessoas também podem apresentar dispneia, dor muscular, dor de cabeça, dor torácica e abdominal (Weng; Su; Wang, 2021).

A maioria dos pacientes apresentam sintomas moderados e com bom prognóstico. Entretanto, alguns pacientes podem progredir para casos graves, sendo relatados altas taxas de mortalidade (Ramphul; Mejias, 2020). Dessa forma, a inflamação desencadeada nos pacientes com COVID-19, que leva aos danos oxidativos (Pereira et al., 2021), em conjunto com as reações oxidativas causadas pelo ferro livre, decorrentes da hemocromatose (Santos et al., 2009), demonstram a necessidade de sua identificação para o prognóstico e tratamento da COVID-19.

3. HIPÓTESE

Hipotetizamos que a gravidade clínica na infecção por COVID-19 pode estar aumentada em pacientes com os polimorfismos no gene *HFE* (*C282Y*, *H63D* e *S65C*), e que, os efeitos pró-inflamatórios causados pela hemocromatose contribuem para o desenvolvimento e progressão de COVID-19.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Esta dissertação objetivou investigar a relação entre a herança dos polimorfismos no gene *HFE* (*C282Y*, *H63D* e *S65C*), em pacientes com COVID-19, com a gravidade clínica da doença.

4.2 Objetivos Específicos

Em pacientes com COVID-19:

1. Investigar gravidade clínica por meio de inquérito investigativo;
2. Avaliar o NLR dos pacientes com COVID leve, moderado e grave;
3. Identificar o perfil eletroforético e cromatográfico das hemoglobinas para afastar efeitos secundários a sobrecarga de ferro;
4. Comparar os valores de vitamina D, neutrófilos, linfócitos, ferro sérico e ferritina em indivíduos com COVID separados por gravidade clínica;
5. Verificar a frequência dos polimorfismos no gene *HFE* (*C282Y*, *H63D* e *S65C*);
6. Relacionar o genótipo das mutações no gene *HFE* com a gravidade da COVID.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Casuística

Foram utilizadas amostras de sangue periférico, colhido com EDTA a 5%, de pessoas que tiveram COVID-19, adultos jovens, de ambos os sexos, oriundos da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE), durante o período de 2022 a 2023. A coleta foi realizada pela técnica de punção venosa com escalpe. O grupo de estudo foi classificado em leve, moderado e grave, segundo respostas em questionário elaborado para essa finalidade (Apêndice A) e pelo índice NLR, conforme estabelecido por LIU et al. (2020). O número amostral total foi de 184 pessoas com COVID-19. Os critérios de inclusão foram: idade acima de 18 anos; período de infecção por COVID-19; presença ou ausência de sequelas, como olfato, paladar e memória; uso ou não de medicação diária; e se apresentam ou não comorbidades, como diabetes, obesidade, hipertensão, doença renal crônica e cirrose hepática. Para esta etapa tivemos a colaboração do Dr. Flavio Borin, com experiência em atendimento de pessoas com COVID-19 durante a pandemia.

Os testes de confirmação de COVID-19 foram realizados pelo RT-PCR. Além disso, é importante ressaltar que o hemograma foi realizado durante o período de sintomatologia da doença. A distribuição amostral avaliada é representada pelo fluxograma na **Figura 5**.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Câmpus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE) conforme estabelece a legislação e sob nº CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 60015522.1.0000.5466 (Anexo A).

As amostras foram submetidas a análises para obtenção do perfil hemoglobínico, cromatográfico e molecular dos indivíduos utilizando metodologias como: triagem básica, constando de resistência globular osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36% (Silvestroni & Bianco, 1975), análise a fresco da morfologia eritrocitária (Bonini-Domingos, 1993), eletroforese em pH alcalino (Marengo & Rowe, 1965) e análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com o equipamento *Trinity® Premier Resolution Analytical Columns* para quantificação das hemoglobinas A, A₂ e F. Os estudos moleculares foram realizados após extração do DNA genômico das amostras de sangue pelo método de *salting-out* (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989 – adaptado) e a frequência das variantes do gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*) analisadas pelo método PCR-RFLP.

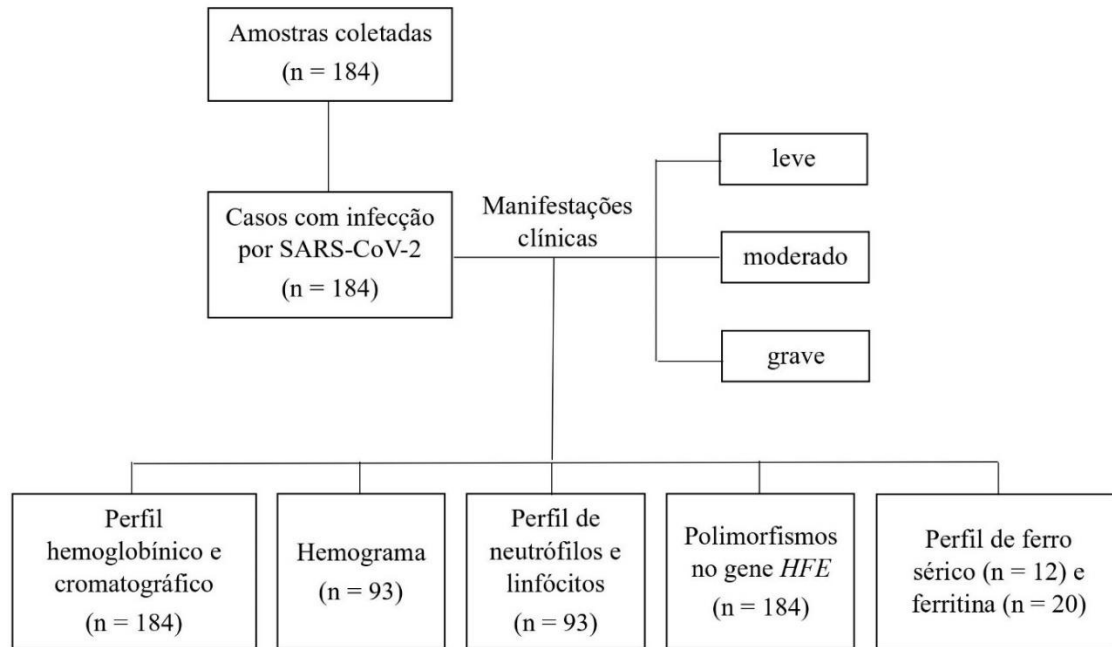


Figura 5. Fluxograma ilustra a distribuição da amostra. Foram examinadas 184 pessoas com COVID-19, com análise do perfil hemoglobínico, cromatográfico e dos polimorfismos no gene *HFE*. A análise do hemograma foi realizada em 93 pessoas devido à falta de entrega desse exame por parte dos participantes. Quanto aos dados do perfil do ferro, foram analisadas 12 pessoas para o ferro sérico e 20 para a ferritina. Fonte: elaborada pela autora (2024).

5.2 Métodos

Os protocolos completos de triagem básica, extração de DNA, quantificação do DNA e detecção das mutações *H63D*, *S65C* e *C282Y* encontram-se no Apêndice C. Os hemogramas foram realizados por equipamentos automatizados e fornecidos pelos participantes, assim como os testes para confirmação de COVID e dosagem de vitamina D.

5.2.1 Razão Neutrófilo-Linfócito (*NLR index*)

O perfil leucocitário foi obtido por meio da relação neutrófilo-linfócito (NLR), sendo um potencial marcador prognóstico (Liu et al., 2020). Pode ser calculado pela divisão entre os valores de neutrófilos e linfócitos, a partir de dados de hemograma completo realizados em equipamento automatizado. A razão indica uma condição de inflamação crônica e quando há um aumento da quantidade de neutrófilos, há uma diminuição da quantidade de linfócitos circulantes. Quanto mais próximo de 1 o valor resultante, maior o índice de inflamação.

$$NLR = \frac{\text{valores neutrófilos abs.}}{\text{valores linfócitos abs.}} \geq 1 \quad (1)$$

5.2.2 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com os *softwares* *Statistica 25.0* e *Graphpad Prism 8.0*. Os dados foram expressos em porcentagem de acordo com a frequência observada, e apresentados como média $\pm$ desvio padrão e testados quanto à distribuição normal usando o teste de *Shapiro-Wilk*. Avaliada a não normalidade, as diferenças entre os sexos biológicos e os parâmetros categóricos foram examinadas por meio do teste de *Qui-Quadrado* ou do teste Exato de *Fisher*. Para os parâmetros numéricos, empregou-se o teste de *Mann-Whitney*. O teste Exato de *Fisher* foi aplicado para verificar a associação entre a gravidade da COVID-19 e o sexo biológico, bem como entre a gravidade e o período de sintomatologia, a fim de avaliar a independência entre as variáveis categóricas. A análise da relação entre as etnias e a gravidade da doença foi realizada pelo teste de regressão logística ordinal, observando a força da relação entre uma variável resposta categórica ordinal e uma variável explanatória. O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para investigar a relação entre o perfil hemoglobínico e cromatográfico dos indivíduos com a gravidade da doença, comparando a mediana dos grupos numéricos independentes entre os pacientes com diferentes graus de gravidade da COVID-19, de modo a identificar fatores de risco ou biomarcadores para a doença.

No contexto da identificação de biomarcadores para a COVID-19, empregou-se o teste de regressão logística multinomial para verificar a associação entre as alterações nos neutrófilos e linfócitos na gravidade, considerando os sexos biológicos, a fim de estimar a probabilidade de ocorrência das gravidades sobre a força de associação com as alterações. A associação entre o índice de neutrófilo-linfócito e a gravidade entre os sexos foi comparada utilizando o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de *post-hoc*.

As associações entre os genótipos homozigotos selvagens, heterozigotos e homozigotos mutantes para as mutações no gene *HFE* foram testadas utilizando o teste de *Qui-Quadrado*. A frequência alélica foi calculada com base no equilíbrio de Hardy-Weinberg. A presença ou ausência dos polimorfismos no gene *HFE* e sua relação com a gravidade foram examinadas pelo teste de *Kruskal-Wallis*, a fim de sugerir os polimorfismos que podem estar associados a formas mais graves ou leves da doença, o que pode ser importante para estratégias de tratamento e prevenção. Por fim, a avaliação da ferritina em relação à gravidade da COVID-19 e aos polimorfismos no gene *HFE* foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Os resultados foram interpretados considerando um nível de significância estatística de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram agrupados na **Tabela 2** e envolveram a análise de 184 pessoas, com idades entre 18 e 76 anos, com média e desvio-padrão de $29,7 \pm 13,05$. Dentre esses, nos casos de COVID-19 leve, a maioria foi composta por indivíduos do sexo feminino (91 indivíduos – 49,4%) (**Figura 6a**). Por outro lado, nos casos moderados predominaram os indivíduos do sexo masculino, enquanto nos casos graves, apenas indivíduos do sexo masculino foram identificados, o que sugere um curso mais grave da infecção nesse grupo populacional, em comparação com o sexo feminino. Esses achados corroboram os resultados de Lipsky e Hung (2020), que apontaram para uma maior gravidade e mortalidade entre homens infectados com COVID-19. Assim, verificamos associação entre a gravidade e o sexo biológico na COVID-19 ($X^2=18,17$; $p<0,05$). Quanto ao período de sintomatologia, a maioria dos indivíduos com casos clínicos leves apresentou sintomas por um período curto de até sete dias (107 indivíduos – 58,1%), enquanto nos casos moderados, o período foi intermediário de sete a quatorze dias (27 indivíduos – 14,7%). Os casos graves foram encontrados somente em períodos intermediários e prolongados, com mais de quatorze dias (5 indivíduos – 2,7%). Khalili et al. (2020) destacaram um intervalo mais longo de sintomas para a COVID-19 em comparação a outras infecções virais respiratórias. A **Figura 6b** demonstra o período de sintomatologia entre os sexos biológicos. Mostramos que existe uma associação significativa entre a gravidade e o período de sintomatologia na COVID-19 ($X^2=50,73$; $p<0,05$) para o grupo avaliado.



Figura 6. Frequência da (a) gravidade e do (b) período de sintomatologia entre os sexos biológicos na COVID-19 em porcentagem. O total de indivíduos é representado pelo número nas barras. A gravidade foi categorizada como leve, moderada e grave. O período curto corresponde a sintomatologia de até sete dias, o intermediário de sete a quatorze dias e o prolongado a mais de quatorze dias.

Tabela 2. Caracterização dos casos com infecção por SARS-CoV-2 (n = 184).

Parâmetros avaliados	Total	Feminino	Masculino	P value ^a
Sexo biológico	184 (100%)	115 (62,5%)	69 (37,5%)	0,001 (X ² = 11,5)*
Idade (x ± SD), anos	29,7 ± 13,05 (18-76)	29,9 ± 13,01 (18-76)	29,2 ± 13,11 (18-65)	0,788 (U = 3873,5)
Etnia (segundo autodeclaração)				
Caucasóide	135 (73,4%)	94 (51,1%)	41 (22,3%)	0,003 (X ² = 12,47)*
Afrodescendente	7 (3,8%)	4 (2,2%)	3 (1,6%)	
Pardo	37 (20,1%)	14 (7,6%)	23 (12,5%)	
Asiático	5 (2,7%)	3 (1,6%)	2 (1,1%)	
Gravidade				
Leve	127 (69%)	91 (49,4%)	36 (19,6%)	< 0,001 (X ² = 18,17)*
Moderado	52 (28,3%)	24 (13%)	28 (15,2%)	
Grave	5 (2,7%)	0	5 (2,7%)	
Período de sintomatologia				
Curto	127 (69%)	82 (44,6%)	45 (24,4%)	0,592 (X ² = 1,12)
Intermediário	49 (26,6%)	29 (15,8%)	20 (10,9%)	
Prolongado	8 (4,3%)	4 (2,2%)	4 (2,2%)	
Apresentou sequelas				
Não	136 (73,9%)	84 (45,6%)	52 (28,3%)	0,729 (X ² = 0,12)
Sim	48 (26,1%)	31 (16,8%)	17 (9,2%)	
Se vacinou contra a COVID-19				
Não se vacinou	0	0	0	0,419 (X ² = 2,86)
2º dose	12 (6,5%)	5 (2,7%)	7 (3,8%)	
3º dose	91 (49,4%)	58 (31,5%)	33 (17,9%)	
4º dose	80 (43,5%)	51 (27,7%)	29 (15,8%)	
5º dose	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0	
Usa medicação diária				
Não	119 (64,7%)	60 (32,6%)	59 (32,1%)	< 0,001 (X ² = 20,97)*
Sim	65 (35,3%)	55 (29,9%)	10 (5,4%)	
Apresenta alguma comorbidade				
Não	160 (86,9%)	97 (52,7%)	63 (34,2%)	0,175 (X ² = 1,84)
Sim	24 (13%)	18 (9,8%)	6 (3,3%)	
Pratica atividades físicas regularmente				
Não	103 (56%)	70 (38%)	33 (17,9%)	0,084 (X ² = 2,98)
Sim	81 (44%)	45 (24,4%)	36 (19,6%)	
Atualmente fuma cigarros				
Não	173 (94%)	107 (58,1%)	66 (35,9%)	0,54 (X ² = 0,52)
Sim	11 (6%)	8 (4,3%)	3 (1,6%)	
Atualmente consome bebidas alcoólicas				
Não consome	37 (20,1%)	22 (11,9%)	15 (8,1%)	0,051 (X ² = 5,94)
Raramente	114 (61,9%)	78 (42,4%)	36 (19,6%)	
Regularmente	33 (17,9%)	15 (8,1%)	18 (9,8%)	
Realizou dosagem de vitamina D				
Não	140 (76,1%)	83 (45,1%)	57 (31%)	0,108 (X ² = 2,58)
Sim	44 (23,9%)	32 (17,4%)	12 (6,5%)	

(Fonte: Autoria própria). ^aOs valores de p comparando pessoas do sexo biológico feminino e masculino resultam do teste X², teste exato de Fisher ou teste de Mann-Whitney. *Estatisticamente significativo p≤0,05.

A pandemia de COVID-19 tem agravado disparidades de saúde, intensificando riscos sociais e econômicos (Schulz et al. 2020). No Brasil, observa-se uma taxa de mortalidade mais elevada entre negros (pretos e pardos) em relação a brancos, atribuída às desigualdades de acesso à saúde, que também se refletem na vacinação (Goes; Ramos; Ferreira, 2020). Segundo uma pesquisa realizada na cidade de São Paulo foi demonstrado que dentre os indivíduos que faleceram por COVID-19, 55% eram negros, em comparação a 34% dos brancos. No contexto de sexo biológico, homens negros apresentam maior mortalidade em relação a mulheres negras, fato atribuído a diferenças nas respostas imunológicas e maior incidência de comorbidades (Nisida; Cavalcante, 2020). Os nossos resultados indicaram uma maior ocorrência de manifestações clínicas moderada e grave da doença entre Caucasoídes (18,5%) e Pardos (9,8%) (**Figura 7**), em comparação a Afrodescendentes e Asiáticos, esses achados podem ser explicados pela maior chance de infecção e risco elevado de hospitalização nessa população, embora análises adicionais em uma amostra mais ampla sejam necessárias. O teste de regressão logística ordinal não evidenciou associação significativa entre Caucasoídes, Afrodescendentes, Pardos e Asiáticos com a gravidade da COVID-19 ($p>0,05$), para esse grupo de estudo. Contudo, observou-se que afrodescendentes e pardos apresentaram quadros mais graves da doença.

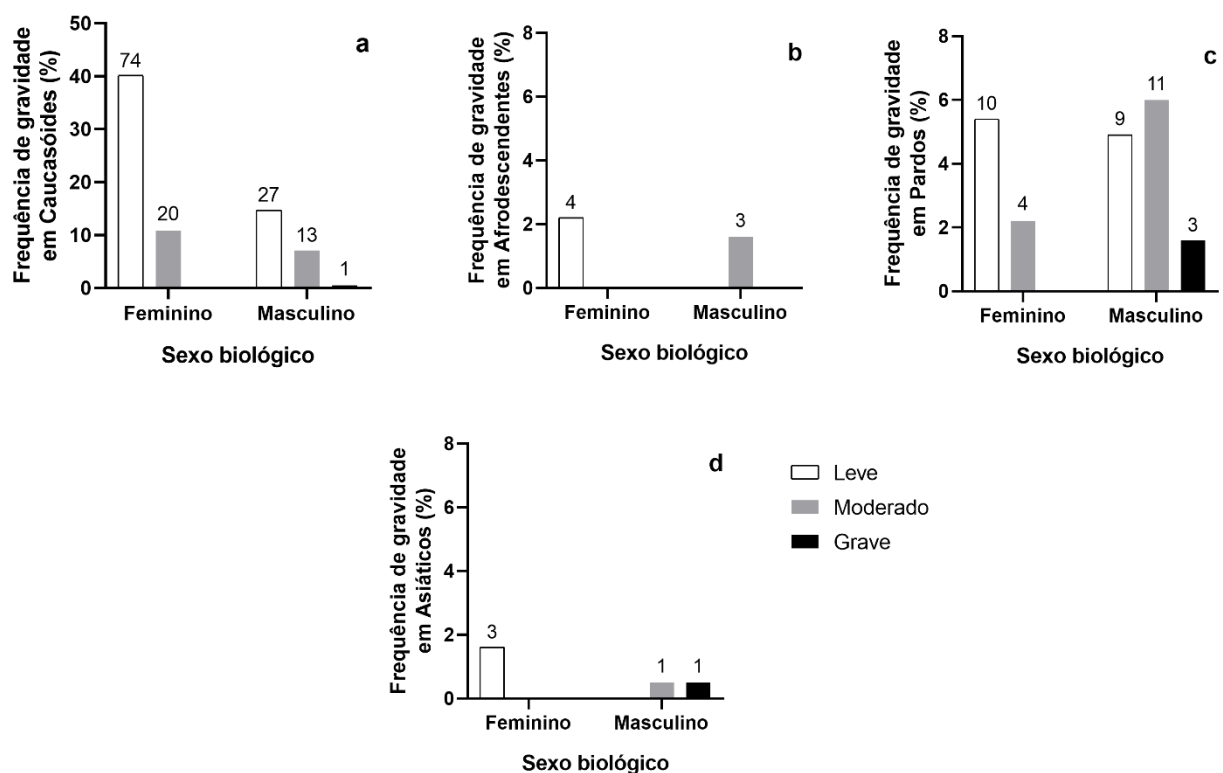


Figura 7. Frequência de gravidade em (a) Caucasoídes, (b) Afrodescendentes, (c) Pardos e (d) Asiáticos entre o sexo biológico feminino e masculino na COVID-19 em porcentagem. O total de indivíduos é representado pelo número nas barras. A gravidade foi categorizada como leve, moderada e grave.

A vitamina D, uma substância lipossolúvel, desempenha papel crucial na modulação da produção de citocinas, ativação de linfócitos T e de células fagocíticas, exercendo efeitos anti-inflamatório (Yisak et al., 2021). Em vista disso, a deficiência dessa vitamina tem sido associada a diversas doenças, incluindo as cardiovasculares, e maior suscetibilidade a infecções, principalmente do trato respiratório, como a gripe (Neale et al., 2010). Embora a deficiência de vitamina D tenha sido associada a um maior risco de gravidade e mortalidade da COVID-19 (Dror et al., 2022; Ghasemian et al., 2021), existem vários fatores fisiopatológicos subjacentes para a associação entre a dosagem da vitamina D e a COVID-19 (Shah; Saxena; Mavalankar, 2021), dentre eles, fatores de risco preexistentes. Nossos resultados mostraram que dentre as pessoas que realizaram dosagem de vitamina D durante ou após a infecção por COVID-19, a maioria foi de mulheres (**Tabela 2**), em comparação aos homens, com seis mulheres apresentando manifestações clínicas moderadas. Entre os homens, apenas quatro realizaram a dosagem de vitamina D, associada às manifestações clínicas moderada e grave.

O perfil hemoglobínico, eletroforético e cromatográfico está apresentado na **Tabela 3**. Os casos de COVID-19 têm apresentado prevalência significativa de anemia (Bergamaschi et al., 2021), provavelmente devido aos efeitos da hipóxia, com alterações na morfologia eritrocitária, como esferócitos, esquistócitos e estomatócitos (Berzuini et al., 2021). A análise do esfregaço de sangue periférico é importante para o diagnóstico, mas ainda faltam informações sobre a morfologia em pacientes com COVID-19. Neste estudo, encontramos, predominantemente, alterações no tamanho e formato das células, com maior evidência de microcitose, hipocromia e eliptocitose. Os valores da concentração da Hb A₂ podem ser influenciados por deficiência de ferro e processos infecciosos, diminuindo da faixa de normalidade. Os aumentos nessa hemoglobina identificam pessoas com beta talassemia heterozigota. A alteração da morfologia eritrocitária mostrou associação com a gravidade da COVID-19 ($p < 0,05$), enquanto resistência osmótica, eletroforese em pH alcalino e HPLC não.

Identificamos, adicionalmente, uma frequência alélica de 2,72% para beta talassemia heterozigota (5 indivíduos) e 1,63% para o traço falciforme (AS) (3 indivíduos), dados que estão compatíveis com as frequências esperadas para a região do grupo amostrado. No Brasil, a frequência média de indivíduos com beta talassemia é de 7,92%, enquanto na região sudeste observa-se uma prevalência de cerca de 8,6% (Domingos et al., 2010). Quanto ao traço falciforme, a prevalência no Brasil varia de 2 a 8% dos indivíduos (Murao; Ferraz, 2007).

Tabela 3. Perfil hemoglobínico e cromatográfico dos indivíduos com COVID-19 (n = 184).

	Total	Feminino	Masculino	<i>P</i> value ^a
Resistência				
osmótica				0,366 (X ² =
Negativa	115 (62,5%)	69 (37,5%)	46 (25%)	0,82)
Positiva	69 (37,5%)	46 (25%)	23 (12,5%)	
Morfologia				
eritrocitária				
Normocitose	40 (21,7%)	20 (10,9%)	20 (10,9%)	0,349 (X ² = 4,44)
N/+	51 (27,7%)	31 (16,8%)	20 (10,9%)	
+	43 (23,4%)	29 (15,8%)	14 (7,6%)	
++	41 (22,3%)	28 (15,2%)	13 (7,1%)	
+++	9 (4,9%)	7 (3,8%)	2 (1,1%)	
Eletroforese em				
pH alcalino				0,381 (X ² =
AA	179 (97,3%)	112 (60,9%)	67 (36,4%)	1,98)
AA ₂ aumentada	2 (1,1%)	2 (1,1%)	0	
AS	3 (1,6%)	1 (0,5%)	2 (1,1%)	
HPLC (x ± SD)				
Hb A ₂	2,8 ± 0,55 (2-5,7)	2,9 ± 0,61 (2-5,7)	2,8 ± 0,44 (2,2-4)	0,502 (U = 3733)
Hb F	0,2 ± 0,23 (0,1- 1,5)	0,1 ± 0,2 (0,1-1,2)	0,2 ± 0,28 (0,1-1,5)	0,782 (U = 3921)

(Fonte: Autoria própria). ^aOs valores de p comparando pessoas do sexo biológico feminino e masculino resultam do teste X² ou teste exato de *Fisher* ou teste de *Mann-Whitney*.

As manifestações hematológicas são diversas e ocorrem na maioria dos casos de COVID-19 (**Tabela 4**). O SARS-CoV-2 ataca a hemoglobina, dissociando o ferro do grupo heme e formando um complexo com a porfirina, uma vez que o ferro é necessário para a replicação do vírus (Courrol; Silva; Masilamani, 2021). Além disso, o ferro dissociado pode induzir reações inflamatórias, mediadas por macrófagos, e danos oxidativos, levando, portanto, a altas quantidades de ferritina (Pereira et al., 2021). Os casos de COVID-19 têm sido associados a uma diminuição acentuada da concentração de hemoglobina, podendo intensificar a gravidade, especialmente em pacientes com outras comorbidades (Taneri et al., 2020). Observamos que a concentração de hemoglobina total estava abaixo do valor de referência em 9 indivíduos (9,7%), sendo a maioria com casos leves de COVID-19 (8,6%). Estudos

demonstram leves alterações nas hemácias, porém sem relação com a gravidade dos casos analisados (Xavier et al., 2020), não sendo indicador para prognóstico desta doença. A contagem de hemácias manteve-se dentro dos valores de normalidade (80,6%). Quanto ao RDW, os pacientes apresentaram níveis elevados em casos de COVID-19 grave em comparação com os leves, indicando que o estado hiperinflamatório da doença, que pode afetar a resposta da medula óssea à eritropoietina, altera a estrutura das hemácias e aumenta sua fragilidade (Lee et al., 2021). O CHCM também se mostra com níveis elevados, possivelmente devido à hemoconcentração (Lee et al., 2021). No entanto, ainda não está totalmente estabelecido se o aumento ou diminuição do CHCM está relacionado à COVID-19, devido à baixa concentração de hemoglobina. Os casos com manifestações clínicas moderadas e graves de COVID-19 apresentaram aumento em CHCM e RDW (8,6 e 10,7%, respectivamente).

A maior parte dos achados hematológicos nas infecções por SARS-CoV-2 está relacionada aos leucócitos e a **Tabela 4** apresenta o perfil hematológico em indivíduos com COVID-19. A leucocitose pode ser devido a neutrofilia intensa nos casos graves (Rahman et al., 2021). Os leucócitos, neutrófilos e linfócitos especialmente, apresentaram aumento na maioria dos casos, com 26 indivíduos (27,9%), 15 indivíduos (16,1%) e 15 indivíduos (16,1%), respectivamente; enquanto os basófilos estavam diminuídos em relação aos valores de referência, principalmente nos casos leves, com 16 indivíduos (17,2%). A alteração da série plaquetária, frequentemente encontrada, é a trombocitopenia, variando conforme a gravidade da doença (Wool; Miller, 2021). As plaquetas não apresentaram mudanças significativas, com apenas 2,1% dos indivíduos com trombocitose e 7,5% com trombocitopenia. Essas alterações sugerem uma ligação com os processos inflamatórios generalizados causados pelo COVID-19, embora tenhamos poucos dados hematológicos em indivíduos graves.

Estudos têm sido conduzidos para identificar biomarcadores que possam influenciar a gravidade das infecções por SARS-CoV-2. Dentre esses biomarcadores, destaca-se a contagem de neutrófilos e linfócitos, cujo perfil categorizado em indivíduos com COVID-19 foi apresentado na **Tabela 5**. Com relação aos neutrófilos, observa-se um aumento proporcional, em sua contagem, à medida que a COVID-19 progride para sintomatologia mais grave, possivelmente devido à atração dessas células para o local da infecção mediada por citocinas (Wang et al., 2020). No entanto, detectamos alterações nos neutrófilos apenas em pessoas com casos leves e moderados, com predominância de neutropenia (**Figura 8**). A fim de verificar a associação das alterações nos neutrófilos, com a gravidade, entre os sexos biológicos, aplicamos o teste de regressão logística multinomial e verificamos que a neutropenia apresenta diferença significativa nos casos leves da COVID-19 ($p < 0,05$).

Tabela 4. Alterações hematológicas em casos de infecção por SARS-CoV-2 (n = 93).

	Total	Feminino	Masculino	P value ^a
GV (M/μL) (x $\pm$ SD)	4,8 $\pm$ 0,55 (3,58-6,46)	4,5 $\pm$ 0,4 (3,58-5,58)	5,3 $\pm$ 0,5 (4,44-6,46)	0,421 (U = 924)
Hb (g/dL) (x $\pm$ SD)	13,8 $\pm$ 1,57 (10-18,1)	13,1 $\pm$ 1,1 (10-15,2)	15,3 $\pm$ 1,21 (12,1-18,1)	0,562 (U = 952)
Ht (x $\pm$ SD)	41,3 $\pm$ 4,37 (31,8-54,3)	39,2 $\pm$ 2,99 (31,8-45,6)	45,5 $\pm$ 3,57 (36,7-54,3)	0,268 (U = 885,5)
VCM (x $\pm$ SD)	86,8 $\pm$ 6,47 (60-106,4)	86,6 $\pm$ 7,28 (60-106,4)	87,3 $\pm$ 4,38 (77,42-95)	0,525 (U = 945,5)
HCM (x $\pm$ SD)	29,1 $\pm$ 2,62 (18-35,5)	28,9 $\pm$ 2,95 (18-35,5)	29,4 $\pm$ 1,69 (25,42-32,1)	0,723 (U = 981)
CHCM (x $\pm$ SD)	33,4 $\pm$ 1,21 (29,83-35,5)	33,1 $\pm$ 1,23 (29,83-35)	33,7 $\pm$ 1,08 (31,42-35,5)	0,023 (U = 738)*
RDW (x $\pm$ SD)	13,1 $\pm$ 0,94 (11,6-16,5)	13,3 $\pm$ 0,98 (12,1-16,5)	12,8 $\pm$ 0,8 (11,6-15)	0,078 (U = 788)
Leucócito (μL) (x $\pm$ SD)	7755,9 $\pm$ 7515,27 (2050-72000)	7246,4 $\pm$ 2866,54 (2050-18930)	8656 $\pm$ 11852,16 (3800-72000)	0,419 (U = 923,5)
Neutrófilo (μL) (x $\pm$ SD)	3874,3 $\pm$ 1962,25 (193-15333)	4012,7 $\pm$ 2224,88 (193-15333)	3597,3 $\pm$ 1239,4 (1770-6741)	0,423 (U = 924,5)
Linfócito (μL) (x $\pm$ SD)	2369,4 $\pm$ 921,89 (264-5594)	2490,6 $\pm$ 997,05 (264-5594)	2127 $\pm$ 687,98 (708-3502)	0,881 (U = 1007)
Monócito (μL) (x $\pm$ SD)	483,5 $\pm$ 179,65 (80-1136)	485,4 $\pm$ 202,4 (80-1136)	479,6 $\pm$ 121,99 (207-671)	0,52 (U = 944,5)
Eosinófilo (μL) (x $\pm$ SD)	151,2 $\pm$ 123,37 (0-672)	151,3 $\pm$ 132 (0-672)	151,1 $\pm$ 103,63 (0-443)	0,111 (U = 793,5)
Basófilo (μL) (x $\pm$ SD)	35,9 $\pm$ 28,52 (0-147)	41 $\pm$ 29,64 (0-147)	25,6 $\pm$ 22,83 (0-70)	0,499 (U = 907,5)
Plaqueta (mil/μL) (x $\pm$ SD)	255,2 $\pm$ 67,7 (132-509)	261,3 $\pm$ 66,46 (147-453)	243,1 $\pm$ 68,62 (132-509)	0,498 (U = 940)

(Fonte: Autoria própria). ^aOs valores de p comparando pessoas do sexo biológico feminino e masculino resultam do teste de *Mann-Whitney*. GV: glóbulos vermelhos. Hb: hemoglobina. Ht: hematócrito. VCM: volume corpuscular médio. HCM: hemoglobina corpuscular média. CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. RDW: amplitude de distribuição dos eritrócitos. *Estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

A neutropenia apresentou um *ODDS ratio* de 49%, indicando que pessoas com manifestações clínicas leves têm 1,49 vezes mais chances de apresentar contagem normal de neutrófilos em comparação com os casos moderados e graves.

A linfopenia, identificada em aproximadamente 70,9% dos indivíduos infectados pela doença (Guan et al., 2020; Ding et al., 2020; Zhang et al., 2020), pode ser atribuída à invasão direta dos linfócitos pelo SARS-CoV-2, facilitada pela presença da enzima conversora de angiotensina-2 (ECA2) nessas células, com consequente lise celular (Shahri; Niazkar; Rad, 2021), e sua redistribuição para os locais de infecção (Pereira et al., 2021). A quantidade de linfócitos se apresenta elevada em casos leves da doença, enquanto em casos graves ou críticos, observa-se uma redução, estabelecendo uma relação inversamente proporcional à gravidade do quadro clínico (Chen et al., 2020). Entretanto, observamos linfopenia em pessoas com manifestações clínicas leves (**Figura 9**). A baixa contagem de linfócitos pode ser associada à presença da ECA-2 nas membranas dos linfócitos, resultando em lise celular após a infecção viral (Terpos et al., 2020). Os nossos achados corroboram a ligação com os processos inflamatórios, uma vez que a COVID-19 desencadeia um processo inflamatório generalizado. O teste de regressão logística multinomial não demonstrou associação entre as alterações nos linfócitos e a gravidade da doença ($p>0,05$). No entanto, a análise para o sexo biológico mostrou diferença significativa na contagem geral de neutrófilos e linfócitos.

Tabela 5. Perfil de neutrófilos e linfócitos entre os sexos biológicos na COVID-19 (n = 93).

	Total	Feminino	Masculino	<i>P</i> value ^a
Alteração nos neutrófilos				
Neutropenia	3 (3,2%)	3 (3,2%)	0	0,808 (X ² = 0,683)
Normal	75 (80,6%)	49 (52,7%)	26 (27,9%)	
Neutrofilia	15 (16,1%)	10 (10,7%)	5 (5,4%)	
Alteração nos linfócitos				
Linfopenia	4 (4,3%)	3 (3,2%)	1 (1,1%)	0,841 (X ² = 0,558)
Normal	74 (79,6%)	48 (51,6%)	29 (31,2%)	
Linfocitose	15 (16,1%)	11 (11,8%)	4 (4,3%)	

(Fonte: Autoria própria). ^aOs valores de *p* comparando pessoas do sexo biológico feminino e masculino resultam do teste X^2 ou teste exato de Fisher.

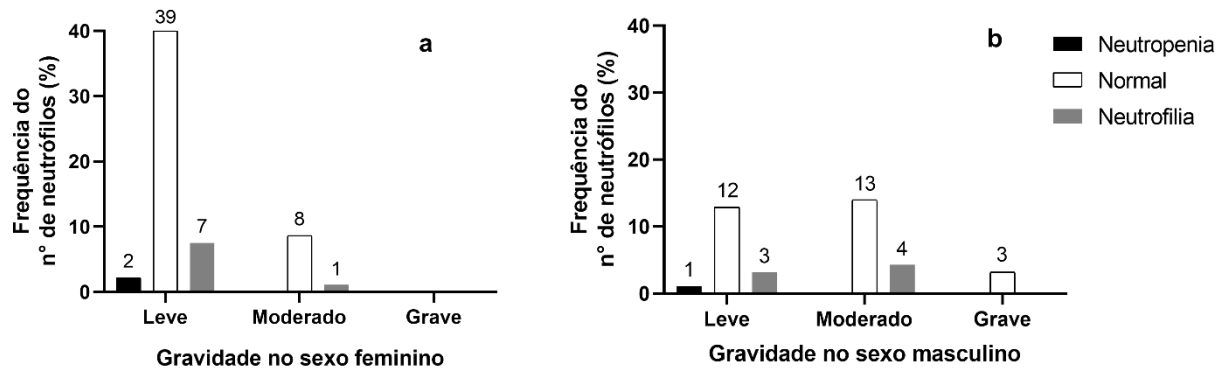


Figura 8. Frequência do número de neutrófilos em pessoas com a gravidade leve, moderada e grave na COVID-19 entre o sexo biológico feminino (a) e masculino (b) em porcentagem. O total de indivíduos é representado pelo número nas barras.

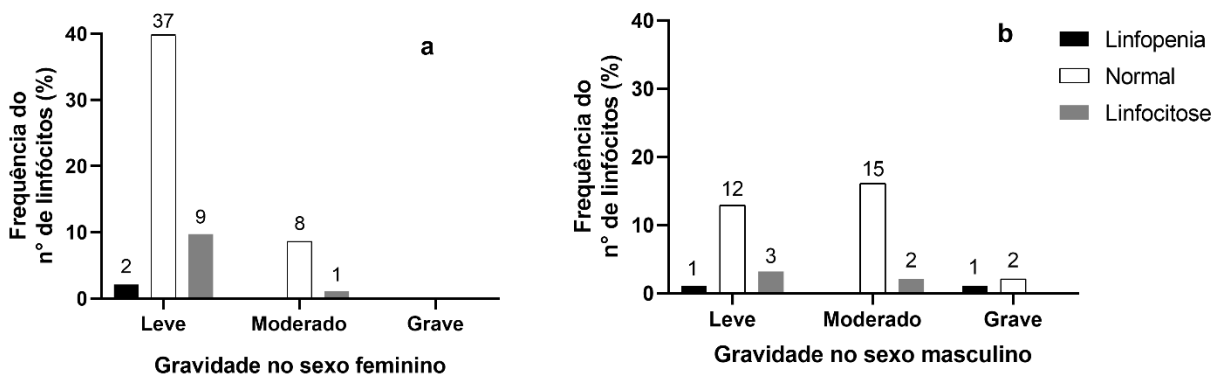


Figura 9. Frequência do número de linfócitos em pessoas com a gravidade leve, moderada e grave na COVID-19 entre o sexo biológico feminino (a) e masculino (b) em porcentagem. O total de indivíduos é representado pelo número nas barras.

A relação neutrófilo-linfócito (NLR) tem sido destacada como um potencial marcador prognóstico na avaliação da gravidade da COVID-19 (Zhang et al., 2020). Este indicador sugere que o risco de mortalidade aumenta à medida que o NLR aumenta em pacientes afetados pela COVID-19 (Liu et al., 2020). Estudos anteriores, conduzidos na China, observaram diferenças nas contagens basais de leucócitos entre os estágios clínicos de COVID-19, indicando maior contagem de neutrófilos e menor contagem de linfócitos em casos graves em comparação com casos não graves (Chen et al., 2020; Qin et al., 2020; Mo et al., 2021), resultando em uma NLR mais elevada em pacientes com infecção grave. Nossos dados mostraram que a NLR foi superior a 3,5 em casos leves e moderados, enquanto os casos graves apresentaram um índice entre 2 e 3, embora a maioria não possuísse dados hematológicos para comparação. A média e o desvio padrão para o índice leucocitário total foram de $2 \pm 1,91$; para o sexo feminino foram de $2 \pm 2,13$; e para o masculino foram de $2 \pm 1,34$. Desse modo, encontramos diferença entre o

sexo biológico e a gravidade da doença ($p < 0,001$), porém não encontramos diferenças nas médias da razão neutrófilo-linfócito e a gravidade ($p = 0,66$), sendo a distribuição do NLR a mesma entre as gravidades. No entanto, o teste de regressão logística multinominal evidenciou que a NLR está associada às variáveis de sexo feminino, período curto de sintomatologia e com casos leves de COVID-19, em relação ao masculino ($p < 0,05$). Além disso, houve associação entre o sexo masculino, NLR intermediário e gravidade moderada da doença ($p < 0,05$).

A hemocromatose hereditária, associada ao gene *HFE*, impacta consideravelmente os níveis de ferro no organismo e o fenótipo dos macrófagos (Nixon et al., 2018), sendo sua frequência variável entre as diferentes populações. Essa condição pode, possivelmente, afetar o curso da infecção por SARS-CoV-2 devido à influência na resposta inflamatória. As amostras foram submetidas a análises moleculares para caracterizar as mutações no gene *HFE*. Observamos que 114 genótipos heterozigotos foram encontrados para a mutação *H63D* (**Tabela 6**), representando 61,9% dos indivíduos, uma frequência notavelmente superior ao esperado para a população. Além disso, foram encontrados 14 genótipos heterozigotos para a mutação *S65C*, enquanto apenas dois genótipos homozigotos mutantes foram identificados para a mutação *C282Y*. O teste de *Qui-Quadrado* revelou diferença significativa entre os genótipos homozigotos selvagens, heterozigotos e homozigotos mutantes para os polimorfismos *H63D* ($X^2 = 103,14$; $p < 0,01$), *C282Y* ($X^2 = 302,27$; $p < 0,01$) e *S65C* ($X^2 = 269,19$; $p < 0,01$). A análise da frequência alélica do gene *HFE* evidenciou que a mutação *H63D* apresentou diferença em relação à frequência esperada no equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, enquanto os polimorfismos *C282Y* e *S65C* encontram-se em equilíbrio. Esse padrão indica que a mutação *H63D* está evoluindo geneticamente, refletindo em um aumento de sua frequência na população estudada.

A prevalência da mutação *H63D*, observada também em populações africanas (Sassi et al., 2004), é mais alta na população brasileira, especialmente na região sudeste, sendo considerada um importante marcador genético na população brasileira (Calvo-González, 2014). Mundialmente, estima-se que a heterozigosidade e a homozigosidade para a mutação *H63D* sejam de 19,4 e 1,9%, respectivamente (Selvaraj et al., 2021), enquanto no Brasil esse valor é de 30,6% para heterozigotos e 4,3% para homozigotos mutantes (Calvo-González, 2014). Por sua vez, a mutação *C282Y* possui maior penetrância em homozigose mutante, sendo prevalente nas populações caucasóides na Europa e na América do Norte, porém é rara na população mundial, principalmente em populações africanas e indígenas (Krindges; Flores; Lul, 2021). Estima-se que a frequência de homozigotos mutantes na população mundial para o polimorfismo *C282Y* seja em torno de 9% para a variante heterozigota e 1% para homozigota mutante; e em Asiáticos, subcontinente indiano, África e Oriente Médio uma frequência entre

0 e 0,5% de heterozigotos e nenhum homozigoto mutante foi relatado. No Brasil, foi relatado uma frequência de 1,4 e 16,3% entre os caucasóides para as mutações *C282Y* e *H63D*, respectivamente (Calvo-González, 2014). Por fim, a mutação *S65C* foi relatada com uma frequência baixa ou ausente em todos os continentes, exceto nos países europeus, com prevalência de 0,69 a 14,4% (Selvaraj et al., 2021). Portanto, os nossos dados corroboram os descritos na literatura acima citada, podendo, as diferenças, serem relacionadas com a diversidade étnica da população brasileira.

Em seguida, classificamos os genótipos de *HFE* relacionados à gravidade da COVID-19 (**Figura 10**) e observamos que a maioria dos indivíduos heterozigotos para a mutação *H63D* desenvolveram formas leves da doença (40,2%), enquanto apenas os homozigotos mutantes para essa mutação apresentaram casos moderados e graves (1,1%). A mutação *C282Y* em heterozigose foi identificada predominantemente em seis indivíduos (3,3%) com COVID leve, enquanto em homozigose foi observada em apenas dois indivíduos com COVID leve. Quanto à mutação *S65C* em heterozigose, nove indivíduos (4,9%) apresentaram COVID leve, três (1,6%) moderada e dois (1,1%) grave. Assim, a presença da mutação *H63D* heterozigoto sugere um possível mecanismo de proteção contra agravamento da COVID-19, considerando a reduzida contribuição dessa mutação no acúmulo de ferro e a alta frequência do alelo mutante de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Isso sugere que a COVID-19 atua como um fator externo que resultou no desenvolvimento de quadros leves da doença. No entanto, são necessários estudos adicionais para compreender os mecanismos inflamatórios subjacentes a esse processo. Por outro lado, a mutação *C282Y*, embora esteja associada a uma maior sobrecarga de ferro e gravidade clínica, especialmente em homozigose, foi predominantemente identificada em indivíduos com casos leves de COVID-19. Isso pode ser explicado pelo fato de que essa mutação foi identificada principalmente em mulheres, o que pode equilibrar as taxas de ferro devido à menstruação (Coad; Conlon, 2011). Sendo que apenas homens desenvolveram quadros graves de COVID-19 para todas as mutações do gene *HFE*.

Pela análise estatística observamos associação entre os alelos da mutação *H63D* e a gravidade da COVID-19 ($p < 0,05$), assim como com o sexo biológico ($p < 0,001$), sendo mais evidentes entre os casos leves da COVID (de 184 indivíduos – 127 de casos leves e destes 76 com a mutação *H63D* – 74 em heterozigose). Enquanto que o valor de NLR não demonstrou esta relação estatisticamente ($p > 0,05$). Esses resultados evidenciam que a presença do alelo *H63D* exerce influência na manifestação clínica da COVID-19, devido a associação, com 6,36 vezes mais chances de desenvolver manifestações clínicas leves (*ODDS ratio*).

Tabela 6. Polimorfismos no gene *HFE* entre os sexos biológicos na COVID-19 (n = 184).

Polimorfismo	Total	Frequência alélica		Homozigoto selvagem	Heterozigoto	Homozigoto mutante	Feminino	Masculino	P value ^a
		W	M	Esperado	Esperado	Esperado			
<i>H63D</i>		p	q						
W/W	58 (31,5%)						35 (19%)	23 (12,5%)	0,952 (X ² = 0,34)
W/M	114 (61,9%)	0,65	0,35	75,1	79,7	21,1	71 (38,6%)	43 (23,4%)	
M/M	4 (2,2%)						3 (1,6%)	1 (0,5%)	
<i>C282Y</i>									
W/W	168 (91,3%)						105 (57,1%)	63 (34,2%)	1 (X ² = 0,64)
W/M	7 (3,8%)	0,97	0,03	166,2	10,6	0,2	5 (2,7%)	2 (1,1%)	
M/M	2 (1,1%)						1 (0,5%)	1 (0,5%)	
<i>S65C</i>									
W/W	161 (87,5%)						102 (55,4%)	59 (32,1%)	0,450 (X ² = 1,86)
W/M	14 (7,6%)	0,95	0,04	160,4	15,3	0,4	8 (4,3%)	6 (3,3%)	
M/M	1 (0,5%)						0	1 (0,5%)	

(Fonte: Autoria própria). W/W: homozigoto selvagem. W/M: heterozigoto. M/M: homozigoto mutante. ^aOs valores de p comparando pessoas do sexo biológico feminino e masculino resultam do teste X² ou teste exato de Fisher.

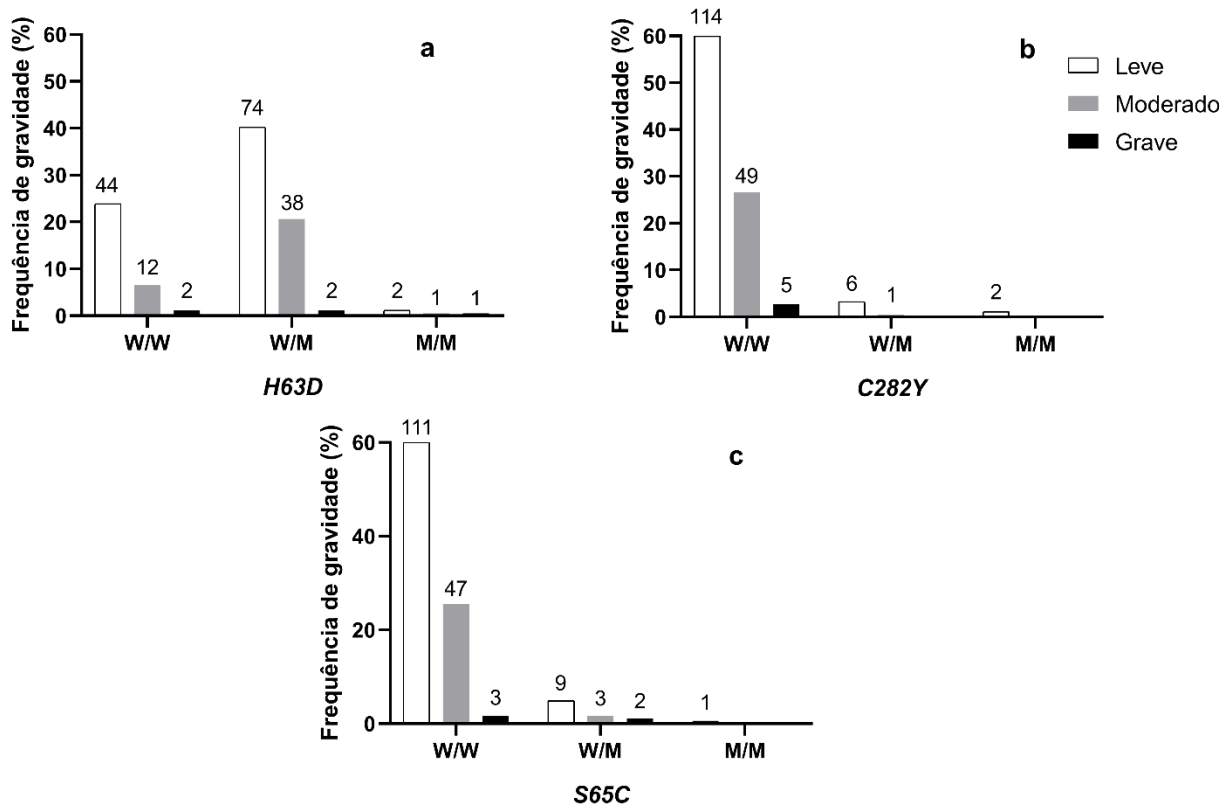


Figura 10. Frequência de gravidade da COVID-19 entre as pessoas com os polimorfismos (a) *H63D*, (b) *C282Y* e (c) *S65C* em porcentagem. O total de indivíduos é representado pelo número nas barras. W/W: homozigoto selvagem. W/M: heterozigoto. M/M: homozigoto mutante.

Embora o índice NLR não demonstre relação com os polimorfismos no gene *HFE*, observamos que o sexo biológico está associado, indicando que há diferenças nos perfis leucocitários e nas respostas à inflamação, influenciadas por variações hormonais, e ligadas aos diferentes quadros de gravidade da COVID-19 entre homens e mulheres. A infecção por SARS-CoV-2 sugere um desequilíbrio sexual, com os homens apresentando maior suscetibilidade a casos graves e maior taxa de letalidade (Alwani et al., 2021). Nas infecções, as mulheres exibem uma resposta imunológica celular e humoral mais robusta. Takahashi et al. (2020) destacaram que, embora a linfopenia de células T ocorra em ambos os sexos, as mulheres demonstram uma ativação mais eficiente dessas células, desempenhando um papel fundamental na resposta imunológica e na redução da carga viral. Os hormônios também desempenham papel importante na determinação da gravidade da COVID-19 entre homens e mulheres. O estrogênio, por exemplo, possui propriedades imunoestimulantes, induz a diferenciação de células dendríticas inflamatórias, promove maior produção de interleucina-4 e estimula respostas mediadas por células (Klein; Flanagan, 2016). Essas características sugerem um efeito protetor contra a infecção por SARS-CoV-2. Além disso, os homens apresentam valores

laboratoriais mais elevados, como enzimas hepáticas, indicativos de um estado pró-inflamatório aumentado, juntamente com um número elevado de leucócitos e marcadores inflamatórios (Alwani et al., 2021). Esses fatores, associados aos polimorfismos no gene *HFE*, podem contribuir para o desenvolvimento de formas mais graves de COVID-19.

Por fim, outro parâmetro aqui avaliado foi a ferritina, cujos estudos indicam um aumento significativo em pacientes com quadros graves de COVID-19, possibilitando prever o agravamento da doença (Cheng, et al., 2020). No entanto, os mecanismos subjacentes à fisiopatologia das alterações hematológicas ainda não foram completamente esclarecidos. Elevados níveis de ferritina, associados à baixa saturação de transferrina, conforme observado por Bergamaschi et al. (2021), sugerem anemia por inflamação, contribuindo para agravar a doença. Os perfis do ferro sérico e da ferritina entre os sexos biológicos foram apresentados na **Tabela 7**, mostrando que as mulheres exibem valores inferiores de ferro sérico e ferritina em comparação aos homens, como esperado. Apenas um indivíduo com quadro grave apresentou baixos níveis de ferritina, enquanto altos níveis foram observados em casos leves e moderados de COVID-19. Não foi identificada baixa contagem de ferro e ferritina em genótipos heterozigotos ou homozigotos mutantes para os polimorfismos no gene *HFE*. A contagem elevada de ferritina foi exclusiva nos casos de heterozigotos para as mutações *H63D* e *S65C*.

Para avaliar a associação da ferritina com a gravidade da COVID-19 e a presença ou ausência das mutações no gene *HFE* realizamos o teste de *Kruskal-Wallis* e não encontramos diferenças significativas ($p > 0,05$). Contudo, os dados limitados de ferro sérico e ferritina impedem o estabelecimento de uma relação de significância.

Tabela 7. Perfil de ferro sérico (n = 12) e ferritina (n = 20) entre os sexos biológicos na COVID-19.

	Total	Feminino	Masculino	P value ^a
Alteração no ferro				
sérico				
Baixo	2 (16,7%)	0	2 (16,7%)	0,717 (X ² = 1,64)
Normal	8 (66,7%)	6 (50%)	2 (16,7%)	
Alto	2 (16,7%)	2 (16,7%)	0	
Ferro sérico	96,2 ± 39,52	80,1 ± 35,86	118,8 ± 32,76	
(µg/dL) (x ± SD)	(38-182)	(38-149)	(89-182)	0,088 (U = 7)
Alteração na				
ferritina				
Baixa	3 (15%)	2 (10%)	1 (5%)	0,287 (X ² = 2,59)
Normal	12 (60%)	10 (50%)	2 (10%)	
Alta	5 (25%)	2 (10%)	3 (15%)	
Ferritina (ng/mL)	124,7 ± 118,6	80,9 ± 93,07	205,9 ± 118,12	
(x ± SD)	(5-376)	(5-320,9)	(68,7-376)	0,01 (U = 13)*

(Fonte: Autoria própria). ^aOs valores de p comparando pessoas do sexo biológico feminino e masculino resultam do teste X², teste exato de *Fisher* ou teste de *Mann-Whitney*. *Estatisticamente significativo p≤0,05.

7. CONCLUSÕES

As interações entre a COVID-19 e a hemocromatose hereditária, juntamente com marcadores hematológicos, demonstram uma complexa rede de fatores que potencialmente impactam na gravidade da doença. Casos graves predominam entre os homens, enquanto casos leves são mais frequentes em mulheres.

A morfologia eritrocitária está relacionada com a gravidade da doença, manifestando alterações no tamanho e formato das células.

O NLR mostrou que casos graves são caracterizados por um NLR superior a 3, e que está associado às variáveis de sexo feminino, período curto de sintomatologia e com casos leves de COVID-19, enquanto o sexo masculino está associado a um NLR intermediário e casos moderados da doença. As alterações nos neutrófilos indicam que em casos leves há maior probabilidade de contagem normal de neutrófilos. No entanto, os linfócitos não demonstraram associação, devido à presença de linfopenia em casos leves e linfocitose em moderados. O perfil de ferritina não apresentou associação com a gravidade nessa coorte.

A frequência dos polimorfismos *H63D*, *C282Y* e *S65C* no gene *HFE* mostram uma maior ocorrência de heterozigotos para *H63D* nos quadros leves, com diferenças significativas em relação à gravidade da COVID-19.

O polimorfismo *H63D* destaca-se como o mais frequente nesse grupo populacional, associando-se à manifestação leve da COVID-19. Estudos para caracterizar a HH são necessários para desenvolver estratégias eficazes de suporte aos pacientes propensos a formas leves ou graves da doença, visando melhorar sua qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. C. et al. Hemochromatosis and Iron-Overload Screening in a Racially Diverse Population. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1769–1778, abr. 2005. DOI: 10.1056/NEJMoa041534.
- AFONSO, T. D. O. et al. Clinical profile, prevalence and mortality of hospitalized patients with chronic liver diseases infected with SARS-COV-2: An integrative review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. 1–12, abr. 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i4.13143.
- ALANAGREH, L.; ALZOUGHLOOL, F.; ATOUM, M. The Human Coronavirus Disease COVID-19: It's Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. **Pathogens**, v. 9, n. 5, p. 331, abr. 2020. DOI: 10.3390/pathogens9050331.
- ALVES, J. M. R. Relação neutrófilo-linfócito e resposta imune como fatores de prognóstico para COVID-19. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 52, n. 2, p. 201–202, set. 2020. DOI: 10.21877/2448-3877.
- ALWANI, M. et al. Sex-based differences in severity and mortality in COVID-19. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 6, p. e2223, nov. 2021. DOI: 10.1002/rmv.2223.
- ANDERSON, G. J.; BARDOU-JACQUET, E. Revisiting hemochromatosis: genetic vs. phenotypic manifestations. **Annals of Translation Medicine**, v. 9, n. 8, p. 731, abr. 2021. DOI: 10.21037/atm-20-5512.
- ANDERSON, G. J.; FRAZER, D. M. Current understanding of iron homeostasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. 6, p. 1559S-1566S, out. 2017. DOI: 10.3945/ajcn.117.155804.
- ANJOS, E. E. P. D. et al. Avaliação dos aspectos gerais da Hemocromatose Doença genética causada por alterações no metabolismo do ferro. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 1, p. 20, set. 2021. DOI: 10.51161/remis/1858.
- BACON, B. R. et al. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 54, n. 1, p. 328-343, jun. 2011. DOI: 10.1002/hep.24330.
- BACON, B. R.; BRITTON, R. S. Hemochromatosis. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 74, mai. 2015.
- BAI, C.; ZHONG, Q.; GAO, G. F. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. **Science China Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 280-294, ago. 2022. DOI: 10.1007/s11427-021-1964-4.
- BAJ, J. et al. COVID-19: Specific and Non-Specific Clinical Manifestations and Symptoms: The Current State of Knowledge. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1753, jun. 2020. DOI: 10.3390/jcm9061753.

BAKHSHANDEH, B. et al. Variants in ACE2; potential influences on virus infection and COVID-19 severity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 90, p. 104773, jun. 2021. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104773.

BARTON, J. C. Chelation therapy for iron overload. **Current Gastroenterology Reports**, v. 9, p. 74-82, mar. 2008. DOI: 10.1007/s11894-008-0024-9.

BASSETT, M. L. et al. Diagnosis of hemochromatosis in young subjects: predictive accuracy of biochemical screening tests. **Gastroenterology**, v. 87, n. 3, p. 628-633, set. 1984. PMID: 6745616.

BERGAMASCHI, G. et al. Anemia in patients with COVID-19: pathogenesis and clinical significance. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 21, n. 2, p. 239-246, jan. 2021. DOI: 10.1007/s10238-020-00679-4.

BERZUINI, A. et al. Red blood cell morphology in patients with COVID-19-related anaemia. **Blood Transfusion**, v. 19, n. 1, p. 34-36, jan. 2021. DOI: 10.2450/2020.0242-20.

BOHN, M. K. et al. Pathophysiology of COVID-19: Mechanisms Underlying Disease Severity and Progression. **Physiology**, v. 35, n. 5, p. 288–301, set. 2020. DOI: 10.1152/physiol.00019.2020.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 1993.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemocromatose hereditária e as mutações no gene HFE. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 4, p. 1–3, dez. 2006. DOI: 10.1590/S1516-84842006000400002.

BRISSOT, P. et al. Haemochromatosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 4, p. 18016, abr. 2018. DOI: 10.1038/nrdp.2018.16.

BRITO, S. B. P. et al. Immunopathological mechanisms involved in SARS-CoV-2 infection. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, p. 1–10, out. 2020. DOI: 10.5935/1676-2444.20200056.

CALVO-GONZÁLEZ, E. Sobre escravos e genes: “origens” e “processos” nos estudos da genética sobre a população brasileira. **Historia Ciencias Saude-manguinhos**, v. 21, n. 4, p. 1113–1129, dez. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-59702014000400003>.

CAMASCHELLA, C.; NAI, A.; SILVESTRI, L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. **Haematologica**, v. 105, n. 2, p. 260-272, jan. 2020. DOI: 10.3324/haematol.2019.232124.

CANÇADO, R. D.; ALVARENGA, A. M.; SANTOS, P. C. J. HFE hemochromatosis: an Overview about Therapeutic Recommendations. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 44, n. 1, p. 95-99, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.htct.2021.06.020.

- CHEN, Y. et al. Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Predicting Infective Endocarditis: A Case-Control Retrospective Study. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, p. 8586418, nov. 2020. DOI: 10.1155/2020/8586418.
- CHENG, L. et al. Ferritin in the coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 34, n. 10, p. e23618, out. 2020. DOI: 10.1002/jcla.23618.
- CHILAMAKURI, R.; AGARWAL, S. COVID-19: Characteristics and Therapeutics. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 206, jan. 2021. DOI: 10.3390/cells10020206.
- COAD, J.; CONLON, C. Iron deficiency in women: assessment, causes and consequences. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 14, n. 6, p. 625-634, nov. 2011. DOI: 10.1097/MCO.0b013e32834be6fd.
- COHEN, L. A. et al. Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. **Blood**, v. 116, n. 9, p. 1574-1584, set. 2010. DOI: 10.1182/blood-2009-11-253815.
- COSTA, V. G. D.; MORELI, M. L.; SAIVISH, M. V. The emergence of SARS, MERS and novel SARS-2 coronaviruses in the 21st century. **Archives of Virology**, v. 165, p. 1517–1526, abr. 2020. DOI: 10.1007/s00705-020-04628-0.
- COURROL, L. C.; SILVA, F. R. D. O.; MASILAMANI, V. SARS-CoV-2, hemoglobin and protoporphyrin IX: Interactions and perspectives. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, p. 102324, jun. 2021. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2021.102324.
- CRUZ, M. P. et al. COVID-19, una emergencia de salud pública mundial. **Revista Clínica Española**, v. 221, n. 1, p. 55–61, jan. 2021. DOI: 10.1016/j.rce.2020.03.001.
- DING, Y. et al. Risk perception of coronavirus disease 2019 (COVID-19) and its related factors among college students in China during quarantine. **Plos One**, v. 15, n. 8, p. e0237626, ago. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0237626.
- DOMINGOS, A. L. B. et al. Perfil de beta thalassemia heterozigota obtido a partir de análise data mining em banco de dados. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 1, p. 78-79, fev. 2010. DOI: 10.1590/S1516-84842010000100018.
- DROR, A. A. et al. Pre-infection 25-hydroxyvitamin D3 levels and association with severity of COVID-19 illness. **Plos One**, v. 17, n. 2, p. e0263069, fev. 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0263069.
- ENNS, C. A. Possible roles of the hereditary hemochromatosis protein, HFE, in regulating cellular iron homeostasis. **Biological Research**, v. 39, n. 1, p. 105–111, jun. 2006. DOI: 10.4067/s0716-97602006000100013.
- FEDER, J. N. et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nature Genetics**, v. 13, n. 4, p. 399–408, ago. 1996. DOI: 10.1038/ng0896-399.

GANZ, T. Iron and Infection. **International Journal of Hematology**, v. 107, p. 7-15, nov. 2017. DOI: 10.1007/s12185-017-2366-2.

GANZ, T. Macrophages and Iron Metabolism. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, out. 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0037-2016.

GERHARD, G. S.; PAYNTON, B. V.; DISTEFANO, J. K. Identification of Genes for Hereditary Hemochromatosis. **Disease Gene Identification**, n. 1706, p. 353–365, fev. 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-7471-9_19.

GHASEMIAN, R. et al. The role vitamin D in the age of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Clinical Practice**, n. 75, n. 11, p. e14675, jul. 2021. DOI: 10.1111/ijcp.14675.

GOES, E. F.; RAMOS, D. D. O.; FERREIRA, A. J. F. Desigualdades raciais em saúde e a pandemia da COVID-19. **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 18, n. 3, p. 1981-7746, mai. 2020. DOI: 10.1590/1981-7746-sol00278.

GOUVEIA, S.; RIBEIRO, C.; CARRILHO, F. Avaliação do impacto da sobrecarga de ferro na diabetes mellitus tipo 1. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 11, n. 1, p. 30–33, jan. 2016. DOI: 10.1016/j.rpedm.2015.05.005.

GROTTO, H. Z. W. Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390–397, out. 2008. DOI: 10.1590/S1516-84842008000500012.

GUAN, W. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, fev. 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.

GULEC, S.; ANDERSON, G. J.; COLLINS, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 307, n. 4, p. G397–G409, ago. 2014. DOI: 10.1152/ajpgi.00348.2013.

HARTENIAN, E. et al. The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910–12934, jul. 2020. DOI: 10.1074/jbc.REV120.013930.

HERNÁNDEZ, G. et al. New Mutations in HFE2 and TFR2 Genes Causing Non HFE-Related Hereditary Hemochromatosis. **Genes (Basel)**, v. 12, n. 12, p. 1980, dez. 2021. DOI: 10.3390/genes12121980.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280, mar. 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

HSU, C. C. et al. Iron overload disorders. **Hepatology Communications**, v. 6, n. 8, p. 1842–1854, jun. 2022. DOI: 10.1002/hep4.2012.

JABBOUR, T. E. et al. Histologic Lesions of Porto-Sinusoidal Vascular Disease Following Phlebotomy in Hemochromatosis. **Gastroenterology Research**, v. 13, n. 1, p. 32–39, jan. 2020. DOI: 10.14740/gr1236.

KATSAROU, M. et al. Chapter Ten – Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene. **Vitamins and Hormones**, v. 110, p. 201–222, jan. 2019. DOI: 10.1016/bs.vh.2019.01.010.

KAWABATA, H. Transferrin and transferrin receptors update. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 133, p. 46–54, mar. 2019. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037.

KHALILI, M. et al. Epidemiological Characteristics of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Epidemiology and Infection**, v. 29, n. 148, p. e130, jun. 2020. DOI: 10.1017/S0950268820001430.

KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 626–638, out. 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.90.

KOURY, M. J.; PONKA, P. New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 105–131, jul. 2004. DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306.

KRINDGES, S. F.; FLORES, J. L.; LUL, R. M. Lesões hepáticas associadas à hemocromatose hereditária. **Revista Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 65, n. 2, p. 01022105, jun. 2021. DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306.

LARSEN, J. R. et al. Modeling the Onset of Symptoms of COVID-19. **Frontiers in public health**, v. 8, p. 473, ago. 2020. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00473.

LEE, J. J. et al. Association between red blood cell distribution width and mortality and severity among patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 4, p. 2513–2522, jan. 2021. DOI: 10.1002/jmv.26797.

LI, L.; DONG, M.; WANG, X. The Implication and Significance of Beta 2 Microglobulin: A Conservative Multifunctional Regulator. **Chinese Medical Journal**, v. 129, n. 4, p. 448–455, fev. 2016. DOI: 10.4103/0366-6999.176084.

LI, M. et al. Mutations in the HFE gene and sporadic amyotrophic lateral sclerosis risk: a meta-analysis of observational studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 3, p. 215–222, fev. 2014. DOI: 10.1590/1414-431X20133296.

LIMA, J. V. D. O. et al. Potential risk of investigated drugs for the treatment of COVID-19: drugs interactions. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 6, n. 10829, p. 1–13, jul. 2020. DOI: 10.26694/repis.v6i0.10829.

LIPPI, G.; PLEBANI, M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-19 infection. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 58, n. 7, p. 1131–1134, mar. 2020. DOI: 10.1515/cclm-2020-0198.

LIPSKY, M. S.; HUNG, M. Men and COVID-19: A Pathophysiologic Review. **American Journal of Men's Health**, v. 14, n. 5, p. 1557988320954021, set. 2020. DOI: 10.1177/1557988320954021.

LIU, Y. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. 6–12, jul. 2020. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.04.002.

LUDWIG, S.; ZARBOCK, A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. **Anesthesia & Analgesia**, v. 131, n. 1, p. 93–96, mar. 2020. DOI: 10.1213/ANE.0000000000004845.

MAHMOUD, I. S. et al. SARS-CoV-2 entry in host cells-multiple targets for treatment and prevention. **Biochimie**, v. 175, p. 93-98, mai. 2020. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.05.012.

MALONE, B. et al. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, p. 21-39, nov. 2021. DOI: 10.1038/s41580-021-00432-z.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **Journal of Clinical Pathology**, v. 18, n. 6, p. 790-792, nov. 1965. DOI: 10.1136/jcp.18.6.790.

MATHURIA, J. P.; YADAV, R.; RAJKUMAR. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 – A review of current methods. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 7, p. 901-905, jul. 2020. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.06.005.

MILMAN, N. et al. Clinically overt hereditary hemochromatosis in Denmark 1948-1985: epidemiology, factors of significance for long-term survival, and causes of death in 179 patients. **Annals of Hematology**, v. 80, n. 12, p. 737-744, out. 2001. DOI: 10.1007/s002770100371.

MO, P. et al. Clinical characteristics of refractory COVID-19 pneumonia in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 11, p. e4208-e4213, dez. 2021. DOI: 10.1093/cid/ciaa270.

MURAO, M.; FERRAZ, M. H. C. Traço falciforme: heterozigose para hemoglobina S. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, set. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300006>.

NAPOLÊÃO, R. N. M. et al. Understanding the cytokine storm. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, mai. 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i5.15150.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Bethesda (MD): National Library of Medicine (US)**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>>. Acesso em: 30 jan. 2024.

NEALE, B. M. et al. Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 49, n. 9, p. 884-897, set. 2010. DOI: 10.1016/j.jaac.2010.06.008.

NGUYEN, H. T. et al. Spike Glycoprotein and Host Cell Determinants of SARS-CoV-2 Entry and Cytopathic Effects. **Journal of Virology**, v. 95, n. 5, p. e02304-20, fev. 2021. DOI: 10.1128/JVI.02304-20.

NISIDA, V. C.; CAVALCANTE, L. A. Racismo e impactos da COVID-19 na população da cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Direito Urbanístico**, v. 6, n. 10, p. 151-174, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.55663/rbdu.v6i10.80>.

NIXON, A. M. et al. The role of HFE genotype in macrophage phenotype. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 30, p. 1–11, fev. 2018. DOI: 10.1186/s12974-018-1057-0.

PAL, M. et al. SARS-CoV-2 (COVID-19) Pandemic Remains a Global Public Health Threat. **Iberoamerican Journal of Medicine**, v. 3, n. 3, p. 264–270, mai. 2021. DOI: 10.5281/zenodo.4892651.

PEREIRA, A. F. et al. Hematological alterations and hemostasis in COVID-19: a literature review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e171101119409, ago. 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i11.19409.

PIPERNO, A. et al. Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 4096-4100, dez. 2007. DOI: 10.1182/blood-2007-06-096503.

QIN, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. **Clinical Infectious Disease**, v. 71, n. 15, p. 762-768, jul. 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa248.

RAHMAN, A. et al. Hematological Abnormalities in COVID-19: A Narrative Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 4, p. 1188-1201, abr. 2021. DOI: 10.4269/ajtmh.20-1536.

RAMPHUL, K.; MEJIAS, S. G. Coronavirus Disease: A Review of a New Threat to Public Health. **Cureus**, v. 12, n. 3, p. e7276, mar. 2020. DOI: 10.7759/cureus.7276.

RUIVARD, M.; LOBBES, H. Diagnosis and treatment of iron overload. **Revue de Médecine Interne**, v. S0248-8663, n. 23, p. 00680-X, jul. 2023. DOI: 10.1016/j.revmed.2023.07.002.

SALGIA, R. J.; BROWN, K. Diagnosis and management of hereditary hemochromatosis. **Clinics in liver disease**, v. 19, n. 1, p. 187-198, fev. 2015. DOI: 10.1016/j.cld.2014.09.011.

SALINA, A. C. G. et al. Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage anti-inflammatory functions and clearance of apoptotic cells. **eLife**, v. 11, n. e74443, fev. 2021. DOI: 10.7554/eLife.74443.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANEELA, S. et al. Hcpidin: A key regulator of iron. **Journal of the Pakistan Medical**, v. 69, n. 8, p. 1170-1175, ago. 2019. PMID: 31431773.
- SANTOS, P. C. J. L. et al. Alterações moleculares associados à hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 192–202, jan. 2009. DOI: 10.1590/S1516-84842009005000051.
- SASSI, R. et al. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the haemochromatosis (HFE) gene in Tunisian population. **Annales De Genetique**, v. 47, n. 4, p. 325–330, out. 2004. DOI: 10.1016/j.anngen.2004.05.001.
- SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology Journal**, v. 16, n. 69, mai. 2019. DOI: 10.1186/s12985-019-1182-0.
- SCHULZ, F. et al. Giant virus diversity and host interactions through global metagenomics. **Nature**, v. 578, n. 7795, p. 432–436, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1957-x>.
- SELVARAJ, B. et al. Frequency of hereditary hemochromatosis gene mutations and their effects on iron overload among beta thalassemia patients of Chennai residents. **AIMS Molecular Science**, v. 8, n. 4, p. 233–247, nov. 2021. DOI: 10.3934/molsci.2021018.
- SETHURAMAN, N.; JEREMIAH, S. S.; RYO, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. **JAMA**, v. 323, n. 22, p. 2249–2251, mai. 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.8259.
- SEYEDALINAGHI, S. et al. Characterization of SARS-CoV-2 different variants and related morbidity and mortality: a systematic review. **European Journal of Medical Research**, v. 26, n. 1, p. 51, jun. 2021. DOI: 10.1186/s40001-021-00524-8.
- SHAH, K.; SAXENA, D.; MAVALANKAR, D. Vitamin D supplementation, COVID-19 and disease severity: a meta-analysis. **An International Journal of Medicine**, v. 114, n. 3, p. 175-181, mai. 2021. DOI: 10.1093/qjmed/hcab009.
- SHAHRI, M. K.; NIAZKAR, H. R.; RAD, F. COVID-19 and hematology findings based on the current evidences: A puzzle with many missing pieces. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 43, n. 2, p. 160-168, abr. 2021. DOI: 10.1111/ijlh.13412.
- SILVA, C. A. et al. Imunopatogênese no desenvolvimento da COVID-19. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 10, n. 1, p. 85–102, set. 2021. ISSN: 2317-8469.
- SILVESTRONI, E. & BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **American Journal of Human Genetics**, v. 27, n. 2, p. 198–212, mar. 1975. PMCID: 1762748.

SOUTO, N. L. R.; PUGLIESI, P. R.; LOPES, I. C. R. Hereditary hemochromatosis: literature review. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 26, n. 1791, p. 1–8, jan. 2016. DOI: 10.5935/2238-3182.20160091.

SPIEGEL, M. et al. Inhibition of Beta Interferon Induction by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Suggests a Two-Step Model for Activation of Interferon Regulatory Factor 3. **Journal of Virology**, v. 79, n. 4, p. 2079-2086, fev. 2005. DOI: 10.1128/jvi.79.4.2079-2086.2005.

TAKAHASHI, T. et al. Sex differences in immune responses that underline COVID-19 disease outcomes. **Nature**, v. 588, n. 7837, p. 315-320, dez. 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2700-3.

TANERI, P. E. et al. Anemia and iron metabolism in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Epidemiology**, v. 35, n. 8, p. 763-773, ago. 2020. DOI: 10.1007/s10654-020-00678-5.

TERPOS, E. et al. Hematological findings and complications of COVID-19. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 7, p. 834-847, jul. 2020. DOI: 10.1002/ajh.25829.

TERTRE, M. L. et al. Splicing analysis of SLC40A1 missense variations and contribution to hemochromatosis type 4 phenotypes. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 87, p. 102527, mar. 2021. DOI: 10.1016/j.bcmd.2020.102527.

TEUWEN, L. et al. COVID-19: the vasculature unleashed. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, p. 389-391, mai. 2020. DOI: 10.1038/s41577-020-0343-0.

TURSHUDZHYAN, A.; WU, D. C.; WU, G. Y. Primary Non-HFE Hemochromatosis: A Review. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 11, n. 4, p. 925-931, fev. 2023. DOI: 10.14218/JCTH.2022.00373.

WANG, C.; BABITT, J. L. Liver iron sensing and body iron homeostasis. **Blood**, v. 133, n. 1, p. 18–29, jan. 2019. DOI: 10.1182/blood-2018-06-815894.

WANG, Z. et al. Analysis of memory B cells identifies conserved neutralizing epitopes on the N-terminal domain of variant SARS-CoV-2 spike proteins. **Immunity**, v. 55, n. 6, p. 998–1012.e8, jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.04.003>.

WENG, L.; SU, X.; WANG, X. Pain Symptoms in Patients with Coronavirus Disease (COVID-19): A Literature Review. **Journal of Pain Research**, v. 14, p. 147–159, jan. 2021. DOI: 10.2147/JPR.S269206.

WOOL, G. D.; MILLER, J. L. The impact of COVID-19 disease on platelets and coagulation. **Pathobiology**, v. 88, n. 1, p. 15–27, out. 2021. DOI: 10.1159/000512007.

XAVIER, A. R. et al. COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, p. 1–9, jul. 2020. DOI: 10.5935/1676-2444.20200049.

YISAK, H. et al. Effects of Vitamin D on COVID-19 Infection and Prognosis: A Systematic Review. **Risk Management and Healthcare Policy**, v. 7, n. 14, p. 31–38, jan. 2021. DOI: 10.2147/RMHP.S291584.

ZAKY, S. et al. Management of liver disease patients in different clinical situations during COVID-19 pandemic. **Egyptian Liver Journal**, v. 11, n. 21, p. 1–12, mar. 2021. DOI: 10.1186/s43066-021-00091-x.

ZARJOU, A. et al. Ferritin Light Chain Confers Protection Against Sepsis-Induced Inflammation and Organ Injury. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 131, fev. 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00131.

ZHANG, C.; SHI, L.; WANG, F. Liver injury in COVID-19: management and challenges. **The Lancet**, v. 5, n. 5, p. 428–430, mar. 2020. DOI: 10.1016/s2468-1253(20)30057-1.

ZHANG, L. et al. Clinical characteristics of COVID-19-infected cancer patients: A retrospective case study in three hospitals within Wuhan, China. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 7, p. 894–901, jul. 2020. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.03.296.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO

Avaliação da gravidade da COVID-19 e herança da Hemocromatose Hereditária

Esse formulário tem como objetivo investigar a relação entre os polimorfismos no gene HFE (H63D, C282Y e S65C) em pessoas com COVID-19, com a gravidade clínica.

A sua participação é voluntária e você pode responder com sinceridade e liberdade, pois são garantidos o anonimato e a confidencialidade de todas as suas respostas.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE-UNESP conforme estabelece a legislação e sob nº CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 60015522.1.0000.5466.

1) E-mail:

2) Nome completo (ou nome social):

3) Data de nascimento: ____ / ____ / ____

4) Idade:

5) Sexo biológico: ☐ Feminino, ☐ Masculino

6) Qual é a sua origem étnica? ☐ Caucasoide (branco), ☐ Afro-descendente,
☐ Pardo, ☐ Asiático, ☐ Oriental, ☐ Indígena, ☐ Outro:

7) Teve COVID-19? ☐ Sim, ☐ Não

8) Se sim, qual a data ou ano:

9) E qual o período de tempo? ☐ Antes da vacinação, ☐ Durante o período de vacinação,

☐ Se recebeu a 1º dose; ☐ 2º dose; ☐ 1º reforço; ☐ 2º reforço,

☐ Pós vacinado.

10) Qual a gravidade, quanto aos sintomas:

☐ Leve (sintomas leves) – coriza, dor de garganta, dor de cabeça, dor no corpo, febre ou sensação de febre.

☐ Moderado – sintomas acima + secreção com uso de antibiótico.

☐ Grave – sintomas acima + uso de antibiótico + internação e necessidade de oxigênio.

☐ Gravíssimo – sintomas acima + EOT (intubação orotraqueal).

11) Qual a gravidade quanto ao período de sintomatologia:

- ☐ Período curto – até 7 dias.
- ☐ Período intermediário – de 7 à 14 dias.
- ☐ Período prolongado – mais de 14 dias.

12) Ficou com sequelas? ☐ Não, ☐ Olfato, ☐ Paladar, ☐ Memória, ☐ Dor muscular,
☐ Outro:

13) Se vacinou contra a COVID-19? ☐ 1º dose, ☐ 2º dose, ☐ 3º dose, ☐ 4º dose,
☐ Não se vacinou

14) Usa medicação diária? ☐ Sim, ☐ Não

15) Se sim, quais medicamentos?

16) Tem exame de hemograma? ☐ Sim, ☐ Não

17) Apresenta alguma comorbidade? ☐ Não, ☐ Diabetes, ☐ Obesidade, ☐ Hipertensão,
☐ Doença renal crônica, ☐ Cirrose hepática,
☐ Outro:

18) Pratica atividades físicas regularmente? ☐ Sim, ☐ Não

19) Atualmente fuma cigarros? ☐ Sim, ☐ Não

20) Atualmente consome bebidas alcoólicas? ☐ Regularmente, ☐ Raramente,
☐ Não bebe bebidas alcoólicas

21) Realizou dosagem de Vitamina D? ☐ Sim, ☐ Não, ☐ Outro:

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa *Relação da Infecção e Gravidade Clínica de Pacientes com COVID-19 e com os Polimorfismos no gene HFE (H63D, C282Y e S65C)* sob responsabilidade da pesquisadora Thaís Fernandes Ribeiro. Para o estudo, serão coletadas amostras de sangue, separadas de acordo com a gravidade por meio de questionário, com o objetivo de investigar a relação entre os polimorfismos no gene *HFE (H63D, C282Y e S65C)* em pessoas com COVID-19, com a gravidade clínica da doença. Os participantes serão convidados a participar da pesquisa por meio de divulgação nas redes sociais do IBILCE/UNESP e cartazes na Unidade. Os participantes serão adultos, sem distinção de sexo e etnia e pertencentes à comunidade do IBILCE (Discentes, Docentes e Técnico-administrativos). O questionário poderá ser respondido online, enviado por meio de e-mail fornecido a pesquisadora responsável, ou presencial durante a coleta. Haverá um risco mínimo para saúde física, com possível hematoma, decorrente da coleta de sangue. Para minimizar o risco dos hematomas alguns cuidados devem ser feitos após a coleta, como pressão no local, não dobrar o braço, usar blusas com mangas mais frouxas e evitar carregar peso. O local voltará ao normal em algumas horas, compressas de água morna podem acelerar o desaparecimento, e caso o hematoma permaneça é importante comunicar a responsável pela pesquisa. Além disso, a coleta será realizada pela pesquisadora e pelos enfermeiros da Seção Técnica de Saúde do IBILCE/UNESP, adequadamente treinados e com experiência, no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) do IBILCE/UNESP. A coleta será realizada pela técnica de punção venosa com escalpe, em que um garrote será aplicado acima do local escolhido para punção; o escalpe será aberto na frente do participante e conectado a seringa; quando o sangue começar a fluir para a seringa, o participante será desgarroteado; quando a coleta do tubo de 4 ml estiver terminada, o escalpe será retirado e o local pressionado utilizando um algodão por 1 ou 2 minutos; o escalpe será descartado imediatamente em recipiente para materiais perfurocortantes; e adicionado um curativo adesivo no local da punção.

Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para traçar o perfil dos genótipos que estão predispostos a desenvolverem quadros clínicos mais graves com infecção por COVID-19. Você poderá consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo, e estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas de forma anônima.



Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato de estes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa.

Diante das explicações, se você concorda em participar deste projeto, forneça os dados solicitados e coloque sua assinatura a seguir.

Nome: _____ R.G. _____

Endereço: _____

Fone: _____

_____, _____ de _____ de 20____

Assinatura do Participante

Assinatura da Pesquisadora responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao participante e a outra ao pesquisador.

Nome Pesquisadora: Thaís Fernandes Ribeiro	Cargo/Função: Mestranda
Instituição: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP – IBILCE)	
Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265	
Telefone: (11) 981558645	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP	
Rua Cristóvão Colombo, 2265. Bairro: Jardim Nazareth.	
São José do Rio Preto/SP – Fone 17-3221.2480 e 3221.2545	

APÊNDICE C – PROTOCOLOS

Resistência Globular Osmótica 0,36% (Silvestroni & Bianco, 1975)

Princípio: Técnica utilizada para detectar talassemia beta, pois os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nesta solução, porém resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e outras hemoglobinopatias.

Procedimento: Em tubo de hemólise foi colocado 1,5 ml de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total. O tubo foi agitado por inversão suavemente e, depois de 10 minutos, a leitura foi feita colocando o tubo de hemólise com a amostra na solução a 2,0 cm de distância de uma folha branca com linhas negras (**Figura 11**).

A resistência aumentada à hemólise do eritrócito torna a amostra opaca e não se visualiza as linhas negras, sendo interpretado como resultado positivo ao teste. Em amostras com resistência normal à hemólise, é possível visualizar facilmente as linhas através da solução.

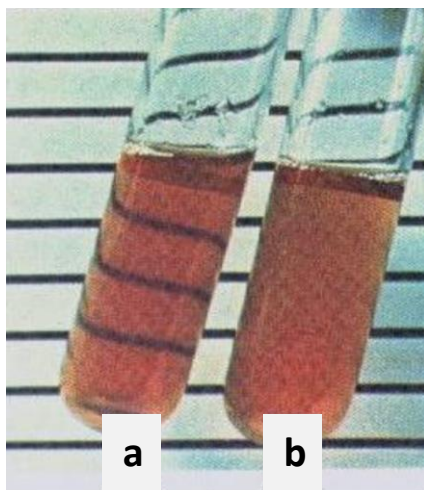


Figura 11. Resistência globular osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36%. (a) Resultado negativo. (b) Resultado positivo. (Fonte: LHGDH).

Morfologia eritrocitária (Bonini-Domingos, 1993)

Princípio: Em esfregaço sanguíneo à fresco, analisou-se o tamanho, a forma e a coloração dos eritrócitos. As lâminas foram visualizadas ao microscópio em objetiva de 40 vezes. Os possíveis resultados foram: alterações discretas (+), alterações moderadas (++), alterações acentuadas (+++) ou células normais (N).

Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino (Marengo & Rowe, 1965)

Princípio: É uma técnica utilizada para qualificação e quantificação de hemoglobinas (Hb) normais e anormais. As diferentes mobilidades eletroforéticas das hemoglobinas anormais são originadas por alteração de carga elétrica, causada por substituição de aminoácidos nas cadeias formadoras das moléculas. As hemoglobinas que se originam de mutações onde não ocorre mudança de carga elétrica migram na posição de hemoglobina A. Nestes casos, para a caracterização dessas hemoglobinas, utilizam-se outros processos eletroforéticos.

Procedimento: Fitas de acetato de celulose foram embebidas por 15 minutos em tampão TEB pH 8,5. As fitas foram secas entre duas folhas de papel absorvente para retirar o excesso de solução tampão e foram colocadas na cuba de eletroforese, conectadas com os compartimentos eletrolíticos através de tiras de papel de filtro. O hemolisado rápido da amostra de sangue com saponina foi aplicado a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o polo negativo e passado em 300 volts por 40 minutos.

As frações sem coloração foram analisadas e posteriormente coradas com Negro de amido ou Ponceau, embebendo as fitas em um dos corantes por 15 minutos. A interpretação foi realizada por meio da consulta de um mapa de disposição de hemoglobina em eletroforese alcalina.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Princípio: A quantificação das frações de hemoglobina foi obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando o equipamento *Trinity® Premier Resolution Analytical Columns*. A HPLC funciona por meio de uma cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, onde duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição com controles de gradientes pré-programados, passam através de uma coluna analítica em alta pressão. Um fotômetro de filtro de comprimento de onda duplo (415 e 690 nm), monitora a eluição da Hb na coluna, detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura dos tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância x tempo. Cada fração de Hb tem um tempo de retenção característico, que é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da Hb.

A HPLC fornece quantificação precisa das Hb A, A₂, S e F e foi utilizada para identificação das hemoglobinas variantes. Os valores de referência para a Hb A estão entre 2,5

e 3,5% e para a Hb F entre 0 e 1,0%. A confirmação foi feita usando reação em cadeia da polimerase (PCR).

Extração de DNA (Método por precipitação salina ou *salting-out*) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989 – adaptado por BONINI-DOMINGOS)

Princípio: Técnica utilizada para extrair DNA genômico a partir de leucócitos de sangue periférico. O método é realizado em três etapas: lise das células sanguíneas, desproteinização, precipitação de DNA e ressuspensão. Os tampões de lise rompem os eritrócitos e glóbulos brancos. Após a ressuspensão, o DNA está pronto para o uso.

Procedimento: Amostras de sangue periférico foram colhidas com EDTA. Foi transferido 1 mL de sangue para um tubo de microcentrífuga de 1,6 mL estéril, e centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm à temperatura ambiente. O plasma foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 900 µL do Tampão-1x contendo Triton (5 mL do Tampão TEB 10x + 45 mL de Triton). Após vortexar vigorosamente, foi novamente centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por inversão e o sedimento lavado com 1 mL de Tampão-2 (5 mL do Tampão 10x + 45 mL de água milliQ) e, em seguida, centrifugado a 5000 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos. O procedimento foi repetido por 3 vezes ou até que o sedimento contendo os leucócitos esteja limpo, isento de hemoglobina. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao fundo 1 mL do Tampão-2 e 1 µL da Proteinase K. Após homogeneização, foi centrifugado a 5000 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão com 200 µL do Tampão-2 e homogeneizado. Acrescentou-se 20 µL de SDS à 10%. Após homogeneização, o microtubo foi colocado em banho-maria por 15 minutos a 56°C. Foi adicionado 100 µL de NaCl (5M), homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga estéril e o precipitado descartado. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e o tubo invertido até a precipitação do DNA. O material foi armazenado no congelador por no mínimo 30 minutos.

Posteriormente, o material foi centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e o etanol absoluto removido. O DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e, em seguida, centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Esse último passo foi repetido por mais uma vez. O etanol foi removido e o tubo deixado sobre um papel absorvente por aproximadamente 5 horas para que o etanol evapore por completo.

Após a evaporação do etanol, o DNA foi solubilizado com 30 µL de água destilada e depois incubado a 56°C por 15 minutos. E, por fim, a solução de DNA foi conservada em freezer a -20°C.

Quantificação do DNA

A solução de DNA foi homogeneizada e 1 µL transferido para o espectrofotômetro tipo *NanoDrop*. Esse equipamento mensura rapidamente amostras de DNA, de modo preciso, por meio de tensões superficiais, onde a amostra fica retida entre duas fibras óticas que quantificam sua absorbância em solução nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm. A concentração de DNA determinada deverá ser maior ou igual a 100 ng/µL. Quanto maior for a absorção de luz, maior a concentração de DNA na solução. O equipamento ainda fornece as razões 260 nm:280 nm e 260 nm:230 nm, indicando o grau de pureza do DNA e, assim, caracterizando a qualidade de extração do mesmo.

Protocolo para detecção das mutações *H63D*, *S65C* e *C282Y* no gene *HFE* por PCR-RFLP

A investigação das frequências das três variantes do gene *HFE* (*H63D*, *S65C* e *C282Y*) foi realizada por reação em cadeia da polimerase, seguida de análise de restrição de polimorfismo de fragmento único (PCR-RFLP). A sequência de primers utilizados para a amplificação das mutações *H63D* e *S65C* serão: o L63 (*sense*): 5' ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC 3' e o R63 (*antisense*): 5' ATC CCC AGC CTT GTT AAC TG 3'. Para detectar a mutação *C282Y*, a sequência de primers utilizados para a amplificação foram: o L282 (*sense*): 5' GGG TAT TTC CTT CCT CCA ACC 3' e o R282 (*antisense*): 5' CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC 3'.

A reação de amplificação para as mutações *H63D* e *S65C* obedeceram às seguintes condições: 95°C a três minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 30 repetições de 45 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 60°C para anelamento dos primers e 60 segundos a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 32 ciclos de repetições.

Para a mutação *C282Y* a reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: 95°C a três minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 30 repetições de 45 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 64°C para anelamento dos primers e 60

segundos a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 32 ciclos de repetições.

Após a amplificação, os fragmentos das mutações *H63D* e *S65C* de 496 pb e o fragmento da mutação *C282Y* de 441 pb foram analisados em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 Volts por 20 minutos. Em seguida, os fragmentos foram digeridos em banho-maria a 37°C (*Fermentas*) por cinco minutos. A enzima utilizada para a mutação *H63D* foi a *Bcl I* (T↓GATCA), para a *S65C* foi a *Hinf I* (G↓ANTC) e para a *C282Y* foi a *Rsa I* (GT↓AC).

A mutação no códon 63 (CAT → GAT), éxon 2, elimina um sítio de restrição da enzima *Bcl I*; assim após a digestão o alelo normal gerou 2 fragmentos de 352 pb e 144 pb, e o alelo mutante gerou 1 fragmento de 496 pb (**Figura 12a**). A mutação no códon 65 (AGT > TGT), éxon 2, elimina um sítio de restrição da Enzima *Hinf I*; assim, após a digestão o alelo normal gerou 4 fragmentos de 274 pb, 147 pb, 69 pb e 6 pb, e o alelo mutante gerou 3 fragmentos de 274, 216 e 6 pb (**Figura 12b**). A mutação no códon 282 (TGC > TAC), éxon 4, origina um sítio de restrição da Enzima *Rsa I*; assim, após a digestão o alelo normal gerou 2 fragmentos de 296 e 145 pb, e o alelo mutante gerou 2 fragmentos de 296, 116 e 29 pb (**Figura 12c**). A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sob luz UV (**Figura 13**), após coloração com brometo de etídio.

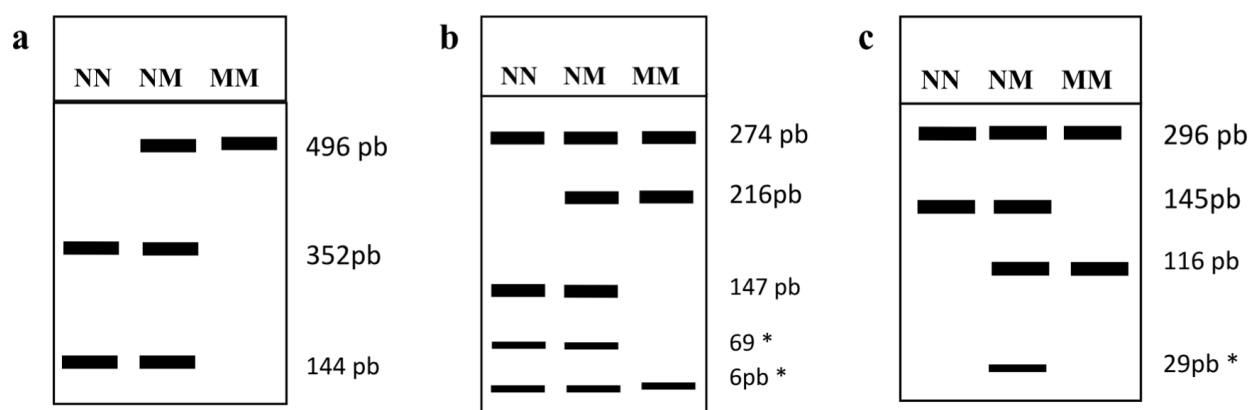


Figura 12. Representação esquemática dos possíveis produtos de digestão da PCR-RFLP para as (a) mutações *H63D*, (b) *S65C* e (c) *C282Y*. NN: homozigoto selvagem. NM: heterozigoto. MM: homozigoto mutante. pb: pares de bases. * bandas não visíveis.

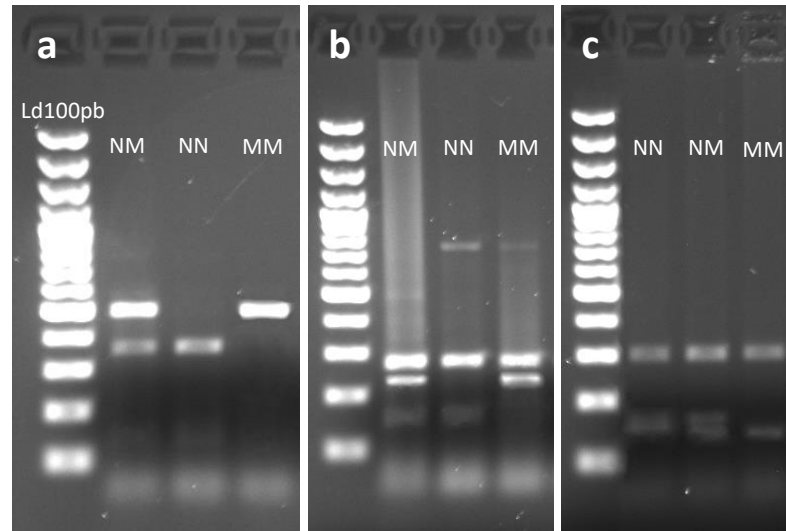


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão da PCR-RFLP para as (a) mutações *H63D*, (b) *S65C* e (c) *C282Y*. Ld100pb: marcador de peso molecular 100pb. NN: homozigoto selvagem. NM: heterozigoto. MM: homozigoto mutante.

ANEXO A – APROVAÇÃO CEP

07/11/2023, 23:17

Plataforma Brasil

Portal do Governo Brasileiro



principal



sair

THAIS FERNANDES RIBEIRO Pesquisador | V3.8.2

Cadastros
51

Sua sessão expira em: 36min



DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relação da Infecção e Gravidade Clínica de Pacientes com COVID-19 e com os Polimorfismos no Gene HFE (H63D, C282Y e S65C)
Pesquisador Responsável: THAIS FERNANDES RIBEIRO
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 60015522.1.0000.5466
Submetido em: 31/08/2022
Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do Rio Preto
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção: PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1947426

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO

Apreciação	Pesquisador Responsável	Versão	Submissão	Modificação	Situação	Exclusiva do Centro Coord.	Ações
N1	THAIS FERNANDES RIBEIRO	2	27/09/2023	02/10/2023	Em Apreciação Ética	Sim	
PO	THAIS FERNANDES RIBEIRO	2	31/08/2022	04/10/2022	Aprovado	Não	

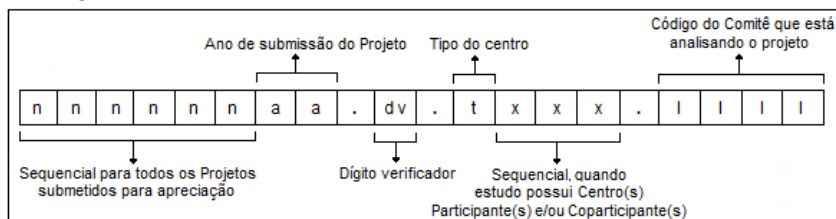
HISTÓRICO DE TRÂMITES

LEGENDA:

(*) Apreciação

PO = Projeto Original de Centro Coordenador	POp = Projeto Original de Centro Participante	POc = Projeto Original de Centro Coparticipante
E = Emenda de Centro Coordenador	Ep = Emenda de Centro Participante	Ec = Emenda de Centro Coparticipante
N = Notificação de Centro Coordenador	Np = Notificação de Centro Participante	Nc = Notificação de Centro Coparticipante

(*) Formação do CAAE



Suporte a sistemas: 136 - opção 8
 e-mail: suporte.sistemas@datasus.gov.br
 Fale conosco: <http://datasus.saude.gov.br/fale-conosco>

ANEXO B – RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

“Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in COVID-19 patients”

S82

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2023;45(S4):S1–S1006

prediz maior predisposição a sequelas ($p < 0,05$) como a elevação de: IL-6 basal em até 12 meses; MMP-9 e Krebs von den Lungen-6 (KL-6) em até 3 meses. **Discussão:** Foi demonstrado correlação PCR, D-dímero, e KL-6 e sequelas. Ademais, os marcadores inflamatórios IL-6 e D-dímero são preditores desfavoráveis para a recuperação pulmonar. **Conclusão:** Em síntese, a presente revisão, corrobora alteração em alguns marcadores mesmo meses após a doença, os quais poderão ser utilizados para futuras pesquisas e elucidações sobre a fisiopatologia, também como alvos diagnósticos e terapêuticos na PASC.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.223>

NEUTROPHIL-TO-LYMPHOCYTE RATIO (NLR) IN COVID-19 PATIENTS

TF Ribeiro, CRB Domingos, TDS Rodrigues, FH Borin

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, Brazil

Objectives: COVID-19, caused by the new coronavirus SARS-CoV-2, exhibits a broad spectrum of clinical manifestations. Various markers have been investigated to identify factors contributing to disease severity and prognosis. Among these, alterations in the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) have been considered crucial in the disease pathophysiology and studied as potential biomarkers for disease severity and prognosis. This study aimed to assess the NLR in patients with COVID-19 and its association with disease severity. **Methodology:** Blood samples were collected from 55 adults diagnosed with COVID-19. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 20 software with a significance level set at 0.05. We utilized the Chi-Square test to examine associations between female and male biological sex and changes in neutrophil and lymphocyte values. The multinomial logistic regression test was applied to investigate associations between COVID-19 severity and neutrophil and lymphocyte values. Additionally, one-way ANOVA was conducted to assess the association between NLR means and COVID-19 severity. **Results:** The study group consisted of 41 women (74,5%) and 14 men (25,4%), aged between 18 and 61 years, with a mean age of 31,4. When comparing sex with NLR alterations, we found differences ($p < 0.01$). Neutropenia was observed in mild and moderate cases, with a higher prevalence in the latter (25,4%), and significant differences in cases of mild COVID-19 severity ($p < 0.05$) compared to the normal neutrophil count. Lymphocytopenia was identified in mild cases (7,3%), while lymphocytosis occurred in moderate cases (5,4%), with differences in lymphocytosis between mild cases of the disease ($p < 0.05$). The NLR was higher than 3.5 in mild cases and intermediate (between 2 and 3) in severe cases. The overall NLR mean was 1.5, with 3.3 for females and 2 for males. We found no differences in NLR means concerning disease severity ($p = 0.77$). However, NLR exhibited an association with males in moderate and severe cases, and with females in mild cases ($p < 0.05$). **Discussion:** The proportional increase in neutrophils according to COVID-19 severity suggests immune

system activation, possibly in response to cytokines that promote neutrophil migration to the infection site. The lymphocyte count shows an inverse relationship with disease severity, with higher counts in mild cases and lower counts in severe cases. The presence of neutropenia in mild and moderate cases may be attributed to the lack of hematological data in individuals with more severe disease. Reduced lymphocyte count may indicate immune system suppression, consistent with lymphopenia in mild cases. Studies have reported elevated NLR in severe cases, although most of our severe cases lacked hematological data for comparison. **Conclusion:** The study's findings strengthen the link between increased inflammation and the severity of COVID-19. The NLR proves to be a relevant indicator, as its elevation is associated with a higher risk of mortality in COVID-19 patients, making it essential for clinical management and prognosis assessment of disease severity.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.224>

RESISTÊNCIA /INTOLERÂNCIA A HIDROXIUREIA DOS PACIENTES COM POLICITEMIA VERA NO HEMORIO, UM ESTUDO RETROSPECTIVO

AMM Queiroz, LA Filho

Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Introdução: Ainda não se sabe as causas para o surgimento da policitemia vera, mas cientistas já descobriram que 96% dos pacientes apresentam uma anormalidade no gene JAK2, dado muito importante no momento do diagnóstico. Intolerância ao uso de hidroxiureia ocorre em 15% a 24% nos pacientes com policitemia vera numa análise de 106 pacientes no Hospital Universitário de Leven, 16% foram intolerantes a hidroxiureia, e 4,7% são resistentes utilizando os critérios ELNo, resistência a hidroxiureia é associado a diminuição da expectativa de vida e a intolerância não tem valor prognóstico. Neste estudo faremos uma análise retrospectiva dos prontuários dos pacientes quanto à resistência e intolerância, a hidroxiureia na Policitemia Vera. **Objetivo:** Levantamento da resistência/intolerância ao uso da hidroxiureia na Policitemia Vera no Hemorio. **Metodologia:** Levantamento na documentação médica do Hemorio de todos os pacientes matriculados com Policitemia Vera, através da Tecnologia de Informação do Hospital, que forneceu o número dos prontuários, que foram analisados individualmente, seguindo os critérios abaixo de resistência e intolerância a hidroxiureia. 1 - A necessidade de flebotomia com hematócrito acima de 45%, utilizando 2 g de hidroxiureia no mínimo por dois meses; 2 - Mieloproliferação descontrolada com contagem de plaquetas acima de 400.000 e contagem de leucócitos acima de 10.000 em uso de 2 g de hidroxiureia por no mínimo 3 meses; 3 - Neutrofilo absoluto menor que 1000 contagem de plaquetas menor que 100.000 e hemoglobina menor que 10 com baixa dose de hidroxiureia; 4 - Presença de ulcera de perna, manifestações mucu cutâneos sintomas

NEUTROPHIL-TO-LYMPHOCYTE RATIO (NLR) IN COVID-19 PATIENTS

Ribeiro, T. F.¹; Bonini-Domingos, C. R.¹; Rodrigues, T. S.¹; Borin, F. H.¹

¹ São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), São José do Rio Preto Campus, SP, Brazil. Email: thais.f.ribeiro@unesp.br

Introduction

COVID-19, caused by SARS-CoV-2, exhibits a broad spectrum of clinical manifestations. Markers have been associated with identifying factors that contribute to the severity and prognosis of the disease. Alterations in the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) have been considered a crucial role in the pathophysiology of the disease.

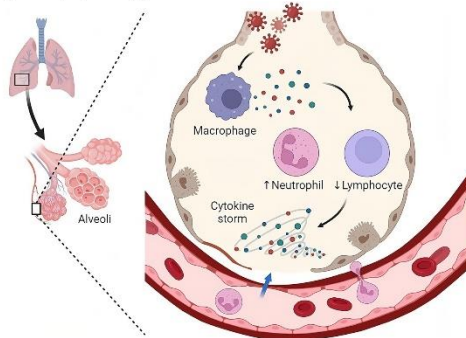
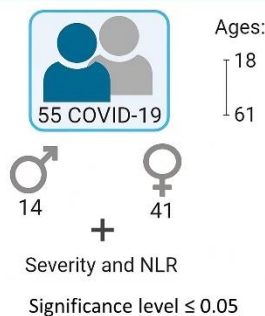


Figure 1. Coronavirus infection process. Source: prepared by the authors.

Objectives

This study aimed to assess the NLR in patients with COVID-19 and its association with disease severity in a sample from the city of São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Methodology



References

- Alves, J. M. R. Relação neutrófilo-linfócito e resposta imune como fatores de prognóstico para COVID-19. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 52, n. 2, 2020.
- Bohn, M. K. et al. Pathophysiology of COVID-19: Mechanisms Underlying Disease Severity and Progression. *Physiology*, v. 35, n. 5, 2020.
- Uppel, G.; Plebani, M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-19 infection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 58, n. 7, 2020.
- Liu, Y. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *Journal of Infection*, v. 81, n. 1, 2020.
- Nixon, A. M. et al. The role of HFE genotype in macrophage phenotype. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 30, 2018.

Results and Discussion

Neutropenia was observed in mild and moderate cases, with a higher prevalence in the latter (25.4%) when compared to the normal neutrophil count. The proportional increase in neutrophils according to COVID-19 severity suggests immune system activation, possibly in response to cytokines that promote increased migration.

Table 1. Neutrophil profile between biological sex and severity of COVID-19.

Changes in neutrophils	Neutropenia	Normal	Neutrophilia	P value ^a
Total	25,4%	69,1%	5,4%	0,002*
Females	21,8%	47,3%	5,4%	
Males	3,6%	21,8%	0%	
Severity				
Mild	16,4% ^{a,b}	52,7%	1,8%	<0,05*
Moderate	5,4%	16,4%	1,8%	
Severe	0%	1,8%	0%	

^aThe p values comparing people of female and male biological sex result from the χ^2 test.

^bAssociations using the multinomial logistic regression test. * $p \leq 0.05$.

Lymphopenia was identified in mild cases (7.3%), while lymphocytosis occurred in moderate cases (5.4%). Low lymphocyte count may indicate suppression of the immune system, consistent with lymphopenia in mild cases.

Table 2. Lymphocyte profile between biological sex and severity of COVID-19.

Changes in lymphocytes	Lymphopenia	Normal	Lymphocytosis	P value ^a
Total	7,3%	87,3%	5,4%	0,003*
Females	5,4%	63,6%	5,4%	
Males	1,8%	23,6%	0%	
Severity				
Mild	7,3%	61,8%	1,8% ^{a,b}	<0,05*
Moderate	0%	21,8%	1,8%	
Severe	0%	1,8%	0%	

^aThe p values comparing female and male biological sex results from the χ^2 test.

^bAssociations using the multinomial logistic regression test. * $p \leq 0.05$.

The NLR was higher than 3.5 in mild cases and intermediate (between 2 and 3) in severe cases. The overall NLR mean was 1.5, with 3.3 for females and 2 for males. We found no differences in NLR means concerning disease severity using the one-way ANOVA test ($p=0.77$). However, the NLR exhibited an association with males in moderate and severe cases, and with females in mild cases ($p<0.05$).

Conclusion

The NLR proves to be a relevant indicator, as its elevation is associated with a higher risk of mortality in COVID-19 patients, reinforcing the relationship between increased inflammation and disease severity.

“Frequency of polymorphisms in the *HFE* gene (*H63D*, *C282Y* e *S65C*) in patients with COVID-19”

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2023;45(S4):S1–S1006

S81

afirmam também que a correta aplicação da profilaxia com uso do anti-D é resolutiva e com potencial para reduzir os casos de aloimunização. **Conclusão:** O correto seguimento dos protocolos de exames de pré-natal, aliados ao atendimento e reconhecimento da DHPN nas maternidades ou serviços de parto auxiliam a prevenção e manejo da afecção. A redução dos números de internamento, ano após ano, apontam para melhorias na condução do pré-natal, mas ainda há muito a ser feito para que fetos deixem de padecer desse problema, que, nos casos mais graves, podem evoluir para óbito.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.221>

COVID-19 - HEMATOLOGIA GERAL

FREQUENCY OF POLYMORPHISMS IN THE *HFE* GENE (*H63D*, *C282Y* E *S65C*) IN PATIENTS WITH COVID-19

TF Ribeiro, CRB Domingos, TDS Rodrigues, FH Borin

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, Brazil

Objectives: Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by a novel beta-coronavirus (SARS-CoV-2) and is characterized by a diverse clinical severity. The infection process of SARS-CoV-2 leads to a substantial increase in pro-inflammatory cytokines, contributing to damage of lung epithelial cells. Hereditary hemochromatosis (HH) is a disease characterized by excessive iron in the blood, and individuals with polymorphisms in the *HFE* gene (*H63D*, *C282Y* e *S65C*) have alterations in iron metabolism, which further exacerbate the inflammatory process. This study aims to investigate the association between *HFE* gene inheritance and the severity of the disease in patients with COVID-19. **Methodology:** Blood samples were collected from 87 adults diagnosed with COVID-19 and categorized based on disease severity, mild, moderate and severe. Molecular analysis was conducted to confirm the presence of mutations in the *HFE* gene (*H63D*, *C282Y* e *S65C*) using the PCR-RFLP method. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 20 software, with a significance level set at 0.05. Associations between COVID-19 severity and biological sex were assessed using Fisher's exact test. The associations between homozygous wild-type, heterozygous, and homozygous mutant genotypes for each polymorphism were tested using the Chi-square test. To investigate the relationship between sex and *HFE* gene mutations with the severity of COVID-19, ANOVA was performed. **Results:** The group comprised 53 women (60.9%) and 34 men (39.1%) with ages ranging from 18 to 61 years, and a mean and standard deviation of 30.4 ± 12.96 . Among these, the majority of mild COVID-19 cases were observed in females (49.4%), while most moderate cases were found in males. Severe cases were exclusively identified in males, indicating a significant association between COVID-19 severity and gender ($p < 0.05$). A total of 522 alleles were evaluated for the *HFE* gene mutations. For the *H63D* mutation, were found 22 wild-type homozygous

genotypes, 64 heterozygous and 1 mutant homozygous. For the *C282Y*, 78 wild-type homozygous, 7 heterozygous and 2 mutant homozygotes were found. For the *S65C*, 73 wild-type homozygous, 13 heterozygous and 1 mutant homozygous were found. Statistically significant differences were observed between genotypes for polymorphisms ($p < 0.05$). The covariate gender and the variables severity of the disease and presence or absence of *HFE* gene polymorphisms did not show significant differences. However, when comparing the severity of COVID with the *H63D* polymorphism, a statistically significant association was observed ($p < 0.01$). **Discussion:** The higher occurrence of moderate and severe COVID cases in males suggests a more severe disease course in this population group. The prevalence of the *H63D* mutation was more frequent in this group and associated with COVID-19 severity. The relatively low incidence of homozygous mutant alleles can be explained by the admixture of the Brazilian population. The *C282Y* and *S65C* genotypes exhibit low expressiveness, which is insufficient to establish a significant relationship. **Conclusion:** The *H63D* genotype exhibits a higher frequency of heterozygotes and is associated with increased clinical severity of COVID-19, especially in males. Further investigations are warranted to characterize the *HFE* gene and develop strategies for managing exacerbated COVID-19 symptoms.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.222>

MARCADORES INFLAMATÓRIOS ASSOCIADOS A SEQUELAS NA SÍNDROME PÓS-COVID-19 AGUDA: UMA REVISÃO DE SISTEMÁTICA

LSL Vieira, LFM Fontes, GLT Caneschi, AP Ferreira

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora (SUPREMA), Juiz de Fora, MG, Brasil

Introdução: A Síndrome Pós-COVID-19 Aguda (PASC) está relacionada a sintomas que persistem por mais de 12 semanas. A fisiopatologia da PASC ainda é pouco elucidada em relação a marcadores hematológicos e inflamatórios. **Objetivos:** Avaliar pacientes que tiveram sequelas e correlacionar com marcadores inflamatórios, alterações hematológicas meses após a resolução da doença aguda do COVID-19 por meio de uma revisão sistemática. **Material e métodos:** Foram selecionados ensaios clínicos e estudos observacionais publicados em inglês, entre 2021 e 2023, tendo como referência as bases de dados MedLine, Web of Science, Embase e Scopus, com as seguintes palavras chaves e suas respectivas variações no DeCS/MeSH: *long-COVID*; *Post-Acute Sequelae of COVID*; *biomarkers*; *inflammatory*, *complications*. Foram incluídos estudos que continham exames laboratoriais e avaliaram pacientes que se recuperaram da COVID-19 com no mínimo três meses após a fase aguda. Foram encontrados 316 estudos e após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão somente quatro foram selecionados. **Resultados:** Foram avaliados 252 pacientes. O D-dímero pode prever sequelas pulmonares ou associado a gravidade da doença ($p < 0,05$). Foram observados que a elevação de alguns biomarcadores durante a fase crítica

FREQUENCY OF POLYMORPHISMS IN THE *HFE* GENE (*H63D*, *C282Y* AND *S65C*) IN PATIENTS WITH COVID-19

Ribeiro, T. F.¹; Bonini-Domingos, C. R.¹; Rodrigues, T. S.¹; Borin, F. H.¹

¹ São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), São José do Rio Preto Campus, SP, Brazil. Email: thais.f.ribeiro@unesp.br

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is characterized by a broad spectrum of clinical severity. SARS-CoV-2 infection leads to a large amount of pro-inflammatory cytokines, which contribute to damage to lung epithelial cells. Hereditary hemochromatosis (HH) is a disease characterized by excess iron. People with polymorphisms in the *HFE* gene (*H63D*, *C282Y* and *S65C*) have changes in iron metabolism, which accentuate the inflammatory process.

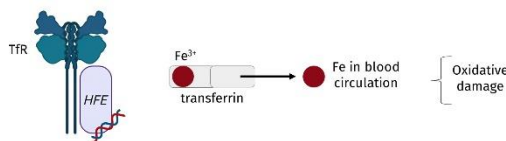
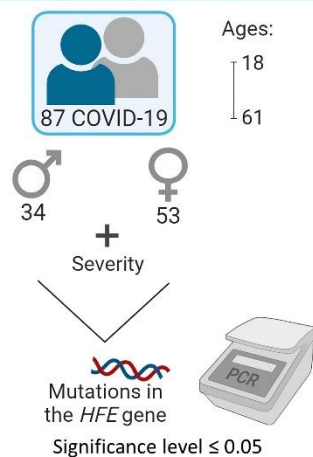


Figure 1. Iron metabolism. *HFE*: *HFE* protein. TFR: transferrin receptor. Source: prepared by the authors.

Objectives

This study aims to investigate the association between *HFE* gene inheritance and the severity of the disease in patients with COVID-19 in a sample from the city of São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Methodology



References

- Bohn, M. K. et al. Pathophysiology of COVID-19: Mechanisms Underlying Disease Severity and Progression. *Physiology*, v. 35, n. 5, 2020.
Liu, Y. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *Journal of Infection*, v. 81, n. 1, 2020.
Nixon, A. M. et al. The role of *HFE* genotype in macrophage phenotype. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 30, 2018.
Selvaraj, B. et al. Frequency of hereditary hemochromatosis gene mutations and their effects on iron overload among beta thalassemia patients of Chennai residents. *AIMS Molecular Science*, v. 8, n. 4, 2021.

Results and Discussion

For the *H63D* mutation, 22 individuals were identified with the homozygous wild-type genotype (8.4%), 64 heterozygous (24.5%) and 1 homozygous mutant (0.4%). We found 2 homozygous mutant genotypes (0.8%) and 1 homozygous mutant genotype (0.4%) for the *C282Y* and *S65C* mutations, respectively.

Table 1. Allele frequency of the *HFE* gene in patients with COVID-19.

Allele	<i>H63D</i>		<i>C282Y</i>		<i>S65C</i>	
	n°	F	n°	F	n°	F
W*	108	0,621	163	0,937	159	0,914
M*	66	0,379	11	0,063	15	0,086
Total Alleles	174	1	174	1	174	1

W: wild-type allele. M: mutant allele. F: allele frequency. * p<0.05

An association between COVID-19 severity and biological sex was observed using Fisher's exact test.

The ANOVA test indicated that the variables gender and severity of the disease with the presence or absence of polymorphisms in the *HFE* gene had no significant differences. However, when we compared the severity of COVID with the *H63D* polymorphism, we obtained significance for the presence of heterozygosity and lower severity.

Table 2. Profile of *HFE* gene mutations by gender and severity in patients with COVID-19.

Gender	<i>H63D</i>		<i>C282Y</i>		<i>S65C</i>	
	W/M	M/M	W/M	M/M	W/M	M/M
Males	10,7%	0%	0,8%	0%	2,3%	0,4%
Females	13,8%	0,4%	1,9%	0,8%	2,7%	0%
Severity*						
Mild	16,5%	0%	2,3%	0,8%	3,4%	0%
Moderate	7,3%	0,4%	0,4%	0%	0,8%	0,4%
Severe	0,8%	0%	0%	0%	0,8%	0%

W/M: heterozygous. M/M: homozygous mutant. * p=0.008

The presence of moderate and severe COVID in males suggests a more severe course of infection. The *H63D* mutation is an important marker for the population, indicating that it can influence iron overload and lead to milder cases of COVID-19.

The low incidence of the homozygous mutant genotype can be explained by the miscegenation of the Brazilian population.

Conclusion

The heterozygous *H63D* genotype has a higher occurrence with increased clinical severity of COVID-19, especially in males.

“Differences in the frequency of polymorphisms in the *HFE* gene (*H63D*, and *C282Y*) in a population group from northwest São Paulo, Brazil”

S2

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;44(S2):S1–S689

um mês de evolução marcado por plenitude pós-prandial, perda ponderal significativa (11 kg), além de parestesia de membros simétrica associada à instabilidade na marcha e bradipsiquismo. Ao exame físico observou-se também atrofia de papilas gustativas e a avaliação neurológica foi compatível com neuropatia periférica e redução da sensibilidade dolorosa e tátil do nível T8 até região suprapatelar bilateral. Laboratorialmente: anemia macrocítica (Hb 8,3 g/dL; Hto 24,7%; VCM 118 fL), índice de reticulócitos corrigido de 1,1, leucopenia com neutropenia (Leucócitos 2.240/mm³ com 270 neutrófilos), trombocitopenia (28.000/mm³), LDH muito elevada (4.597 UI/L) e bilirrubina indireta de 1,9 mg/dL. À hematoscopia: raros neutrófilos plurissegmentados, macroalócitos e numerosos dacriócitos e esquizócitos. Embora a história clínica sugerisse o diagnóstico de deficiência de vitamina B12, os achados laboratoriais e da hematoscopia tornavam microangiopatia trombótica (MAT), especificamente púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), um preocupante diagnóstico alternativo (PLASMIC score: 6 pontos; French score: 2 pontos). Diante de um elevado VCM e da ausência de reticulocitose real, foi optado pelo início da reposição de vitamina B12 e pelo adiamento do início de plasmáfereze. Após 48 horas da admissão, a dosagem de vitamina B12 foi liberada < 50 pg/mL. A paciente evoluiu com rápida melhora clínica e laboratorial. **Discussão:** A pseudo-MAT caracteriza-se por: anemia hemolítica, presença de esquizócitos e dacriócitos no sangue periférico, trombocitopenia grave, LDH muito elevada e haptoglobina consumida. Pacientes com deficiência grave de vitamina B12 podem apresentar um amplo espectro de manifestações hematológicas, dentre elas a pseudo-MAT é relatada em apenas 2,5% dos pacientes. Por ser achado incomum, de difícil reconhecimento e poder vir acompanhado de sintomas neurológicos, muitos pacientes recebem o diagnóstico de PTT e são tratados desnecessariamente com plasmáfereze. Diferentemente do que ocorre em outras formas de MATs, na pseudo-MAT o VCM costuma ser muito elevado, apesar da ausência de reticulocitose real, quando corrigimos pela anemia. O conhecimento dessa forma de apresentação e de suas peculiaridades pode evitar o diagnóstico incorreto com consequente instituição de tratamentos que agregam morbidade. O caso chama atenção para a necessidade de afastarmos deficiência de B12 quando diante de quadros clínicos semelhantes ao descrito.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.003>

DIFFERENCES IN THE FREQUENCY OF POLYMORPHISMS IN THE *HFE* GENE (*H63D* AND *C282Y*) IN A POPULATION GROUP FROM NORTHWEST SÃO PAULO, BRAZIL

TF Ribeiro, JO Rios, CRB Domingos

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil

Goals: Hereditary hemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disease characterized by excess iron. People with polymorphisms in the *HFE* gene (*H63D* and *C282Y*) may develop inflammatory processes resulting from changes in iron metabolism. The ability of the *HFE* protein to make connections with transferrin receptors, located on cell membranes, allows it to

help control the absorption of iron in the body. This work sought to investigate the frequency of *HFE* gene variants in a sample from the city of São José do Rio Preto, SP, Brazil. **Methodology:** DNA samples from 105 people were subjected to molecular analysis to confirm mutations in the *HFE* gene (*H63D* and *C282Y*), using PCR-RFLP. The group was separated by male and female gender, age group of 10 in 10 years, and ethnic groups. Statistical analyzes were performed using the IBM SPSS Statistics 20 software and data were presented as percentages, with a significance level of 0.05. The associations between the wild-type homozygote, heterozygote, and mutant homozygote genotypes for each mutation were tested by the Chi-Square test. Then, the allele frequencies in the genotypes were calculated. Fisher's exact test was performed to verify the association between gender, age group, and ethnicity with mutations in the *HFE* gene. **Results:** The sample included: 55 men (52.38%) and 50 women (47.62%), with ages ranging from 18 to 62 years, with an average of 30 years. A total of 210 alleles were evaluated and for the *H63D* mutation, 78 wild-type homozygotes, 26 heterozygotes, and 1 mutant homozygote were found. For the *C282Y* mutation, 99 wild-type homozygotes, 6 heterozygotes and no mutant homozygote were found. Allelic frequency analysis indicated the occurrence of significant differences between wild-type homozygous, heterozygous, and mutant homozygous genotypes for the mutations ($p < 0.05$). Fisher's exact test indicated no association between gender, age, and ethnicity for the *H63D* and *C282Y* polymorphisms ($p > 0.05$). The heterozygous genotype for *H63D* was more frequent in men (15-14%) than women 11 (10%). For *C282Y* equal frequencies (3-3%) were found for heterozygosity between men and women. *H63D* heterozygosity was more frequent in Caucasians (22-21%). In African-derived, only one individual was heterozygous for *H63D*. **Discussion:** The frequency of HH genotypes varies among different populations. The low incidence or absence of homozygous alleles is due to the different degrees of miscegenation in the formation of the Brazilian population. The *H63D* mutation is an important marker for the Brazilian population, being frequent in Africa, although it has low phenotypic expression. The *C282Y* is predominantly associated with homozygosity for clinical cases, however, it is rare in African populations and frequent in Caucasians. Our results corroborate the data in the literature, with a predominance of the *H63D* mutation in Caucasians, African-derived, and Afro-descendants, and *C282Y* in Caucasians. **Conclusion:** The frequency of *H63D* and *C282Y* polymorphisms in the *HFE* gene showed a higher occurrence of heterozygotes for *H63D* in this population group. Studies to characterize HH are needed to devise strategies for effective support to patients and, therefore, improve quality of life.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.004>

ASSOCIAÇÃO ENTRE GRAUS DE OBESIDADE E DEFICIÊNCIA DE VITAMINA B12 E ÁCIDO FÓLICO: REVISÃO SISTEMÁTICA COM METANÁLISE

PIM Souza^a, LG Costa^a, M Pereira^b, MMS Neto^a

^a Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Salvador, BA, Brasil

DIFERENÇAS NA FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NO GENE *HFE* (*H63D* E *C282Y*) EM UM GRUPO DA POPULAÇÃO DO NOROESTE PAULISTA

Ribeiro, T. F.¹; Rios, J. O.¹; Bonini-Domingos, C. R.¹

¹ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Câmpus de São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail: thais.f.ribeiro@unesp.br

Introdução

Hemocromatose hereditária (HH) é uma doença autossômica recessiva caracterizada pelo excesso de ferro. Pessoas com os polimorfismos no gene *HFE* (*H63D* e *C282Y*) podem desenvolver processos inflamatórios decorrentes das alterações no metabolismo do ferro.

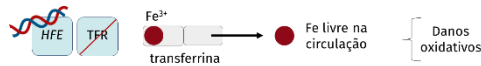
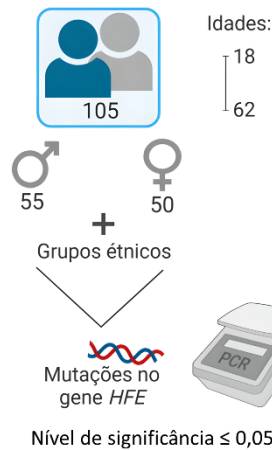


Figura 1. Metabolismo do ferro. HFE: proteína HFE. TFR: receptores de transferrina. Fonte: autoria própria.

Objetivos

Esse trabalho buscou investigar a frequência de variantes do gene *HFE* em uma amostra da cidade de São José do Rio Preto, SP.

Metodologia



Resultados e Discussão

Para a mutação *H63D*, foram encontrados 78 (37,14%) genótipos homozigotos selvagens, 26 (12,38%) heterozigotos e 1 (0,48%) homozigoto mutante. Para a mutação *C282Y*, 99 (47,14%) genótipos homozigotos selvagens, 6 (2,86%) heterozigotos e nenhum homozigoto mutante.

↓ incidência dos M/M é devido aos diferentes graus de miscigenação na formação da população brasileira.

Tabela 1. Frequência alélica do gene *HFE*.

Alelo	<i>H63D</i>		<i>C282Y</i>	
	nº	F	nº	F
W*	182	0.867	204	0.971
M*	28	0.133	6	0.029
Total Alelos	210	1	210	1

W: alelo selvagem. M: alelo mutante. F: frequência alélica. * p<0,05

O teste exato de Fisher indicou que não existe associação entre sexo biológico, idade e etnia para os polimorfismos *H63D* e *C282Y*.

Tabela 2. Perfil das mutações no gene *HFE* no gênero e na etnia.

Gênero	<i>H63D</i>		<i>C282Y</i>	
	W/M	M/M	W/M	M/M
Masculino	14%	1%	3%	0%
Feminino	10%	0%	3%	0%
Etnia				
Caucasianos	21%	1%	6%	0%
Pardos	1%	0%	0%	0%
Afro-descendentes	3%	0%	0%	0%

W/M: heterozigoto. M/M: homozigoto mutante.

A mutação *H63D* é um importante marcador para a população brasileira, sendo frequente na África. A *C282Y* está predominantemente associada à homozigose para os casos clínicos, entretanto, é rara nas populações africanas e frequente em caucásios.

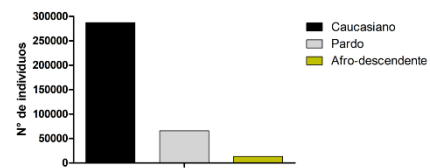


Figura 2. Número de pessoas que corresponde às classificações de étnico/raciais da cidade de São José do Rio Preto, SP, definidas pelo IBGE. Fonte: Censo – IBGE (2010).

Conclusão

A frequência dos polimorfismos *H63D* e *C282Y* no gene *HFE* evidenciaram maior ocorrência de heterozigotos para *H63D*, nesse grupo populacional.

Referências

- Selvaraj, B. et al. Frequency of hereditary hemochromatosis gene mutations and their effects on iron overload among beta thalassemia patients of Chennai residents. *AIMS Molecular Science*, v. 8, n. 4, 2021.
- Souto, N. L. R.; Pugliesi, P. R.; Lopes, I. C. R.; Hoffmann, J. C. J. Hereditary hemochromatosis: literature review. *Revista Médica de Minas Gerais*, v. 26, n. 1791, 2016.
- Nixon, A. M. et al. The role of HFE genotype in macrophage phenotype. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 30, 2018.
- Kane, S. F.; Roberts, C.; Paulus, R. Hereditary Hemochromatosis: Rapid Evidence Review. *American Family Physician*, v. 104, n. 3, 2021.

“Frequência dos polimorfismos no gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*) em pacientes com Hb S/Beta-talassemia e sua associação com a gravidade clínica”

S4

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;44(S2):S1–S689

que poderia ser explicado pelas diferenças hormonais existentes entre homens e mulheres mediadas pela associação de *Alu/ID*. **Conclusão:** Foi possível observar que há relação entre sexo e os polimorfismos da Enzima Conversora de Angiotensina e inserções do elemento *Alu*. Com relação a idade e os polimorfismos da *ECA1*, não foi possível observar a relação entre essas duas variáveis.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.006>

FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NO GENE *HFE* (*H63D*, *C282Y* E *S65C*) EM PACIENTES COM Hb S/BETA-TALASSEMIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE CLÍNICA

TF Ribeiro, ACA Zucão, DP Malerba, CRB Domingos

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Objetivos: A beta-talassemia é causada por mutações no gene da β -globina, que resulta na ausência ou redução na taxa de síntese das cadeias de β -globina normal. A ausência de cadeias de β -globina e o excesso de cadeias de α -globina incompatíveis causam eritropoiese ineficaz, resultando em anemia. A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença caracterizada pelo excesso de ferro, devido aos polimorfismos no gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*), que levam a alterações no metabolismo do ferro. Esse trabalho teve por objetivo avaliar a frequência de polimorfismos no gene *HFE* em pacientes com Hb S/ β -talassemia, e classificados em risco de gravidade pela *Calculator of severity of sickle cell disease*. **Metodologia:** Amostras de DNA de 20 pacientes com Hb S/ β -talassemia foram submetidas à análise molecular para confirmar as mutações, por PCR-RFLP e PCR-AE. Caracterizamos os pacientes de acordo com o sexo, idade e gravidade. As análises estatísticas foram realizadas no software IBM SPSS Statistics 20 e os resultados foram reportados em porcentagem, com nível de significância de 0,05. Testamos a associação entre os genótipos homozigotos e heterozigotos da mutação *H63D* pelo teste de *Qui-Quadrado*. Em seguida, verificamos a associação entre o sexo, idade e gravidade com o polimorfismo *H63D* pelo teste exato de Fisher. **Resultados:** Verificaram-se 8 indivíduos do sexo masculino e 12 do sexo feminino, com idades entre 10 e 54 anos, com média de 27 anos. Para a mutação *H63D* foram identificados 7 indivíduos com o genótipo homozigoto selvagem, 13 heterozigotos e nenhum homozigoto mutante. Para as mutações *C282Y* e *S65C* não foram encontrados mutantes. Para a mutação *H63D*, não ocorreram diferenças significativas entre os genótipos homozigotos selvagens, heterozigotos e homozigotos mutantes ($p=0,18$). Observamos que não ocorreram diferenças significativas entre o sexo e idade para o polimorfismo *H63D* ($p > 0,05$). O genótipo heterozigoto para *H63D* foi mais frequente em homens com Hb S/ β -talassemia (9-45%) do que em mulheres (4-20%). A relação da gravidade entre os pacientes com Hb S/ β -talassemia e a mutação *H63D* apresentou diferenças significativas ($p=0,04$), sendo a gravidade intermediária com maior frequência nos heterozigotos (6-30%). **Discussão:** A presença do polimorfismo *H63D* pode ser

um fator de risco para a sobrecarga de ferro nos pacientes com Hb S/ β -talassemia. Apesar da baixa penetrância do alelo mutante, se encontra em maior frequência na população brasileira, indicando que a mutação pode influenciar na sobrecarga de ferro e levar a casos mais graves de Hb S/ β -talassemia. **Conclusão:** Os resultados evidenciaram alta frequência do polimorfismo *H63D*, principalmente em homens com Hb S/ β -talassemia. Existe uma relação entre a gravidade da doença e a presença da mutação *H63D*.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.007>

DESIGUALDADES DEMOGRÁFICAS E TERRITORIAIS NA INTERNAÇÃO POR ANEMIA FERROPRIVA ENTRE ADOLESCENTES BRASILEIROS

VKAS Marinho^a, D Vale^b

^a Hemocentro Dalton Cunha (HEMONORTE), Natal, RN, Brasil

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN), Ceará-Mirim, RN, Brasil

Objetivo: Analisar as frequências de internação por anemia ferropriva entre adolescentes brasileiros e sua distribuição segundo variáveis demográficas e territoriais entre 2008 e 2021. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo ecológico e descritivo. Foram utilizados dados do Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Informações de adolescentes (10-19 anos) internados devido anemia por deficiência de ferro entre 2008 e 2021. Essa variável principal foi categorizada segundo sexo, faixa de idade, cor/raça, unidade da federação e região geográfica de moradia. Todos os dados foram coletados utilizando o TABNET. **Resultados:** No período analisado, ocorreram 8375 internações de adolescentes decorrente de anemia por deficiência de ferro. Dentre esses, a maior parte tinha entre 15 e 19 anos (64,9%), eram do sexo feminino (70,3%), se autodeclararam pardos (38,9%), e eram moradores da região Nordeste (39,1%), dos estados de São Paulo (12,9%) e da Bahia (9,5%). **Discussão:** A anemia ferropriva é uma condição de impacto negativo sobre o desenvolvimento psicossocial das crianças e dos adolescentes. No Brasil, não existe um inquérito contínuo de avaliação da prevalência de anemia entre adolescentes. Diante disso, a internação por esse tipo de anemia pode ser utilizada como um marcador epidemiológico para identificação de áreas prioritárias e situações de maior risco para saúde do adolescente. O presente estudo identificou maior prevalência em adolescentes mais velhos e do sexo feminino, os quais costumam apresentar maior demanda pelas modificações corporais, maior consumo de ultraprocessados (pior fonte de ferro com melhor biodisponibilidade) e práticas alimentares restritivas. Além disso, sendo mais frequentes em regiões e estados da região Nordeste e Sudeste que possuem bolsões de pobreza e insegurança alimentar. **Conclusão:** As internações por anemia ferropriva demonstram situações de maior gravidade, podendo indicar também maior acesso aos serviços de saúde. Verifica-se que no Brasil, esse agravado é desigualmente

FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NO GENE *HFE* (*H63D*, *C282Y* E *S65C*) EM PACIENTES COM HB S/ β -TALASSEMIA E SUA ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE CLÍNICA

Ribeiro, T. F.¹; Zucão, A. C. A.¹; Malerba, D. P.¹; Bonini-Domingos, C. R.¹

¹ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Câmpus de São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail: thais.f.ribeiro@unesp.br

Introdução

A β -talassemia é causada por mutações no gene da β -globina, que resulta na ausência ou redução na taxa de síntese das cadeias de β -globina normal.

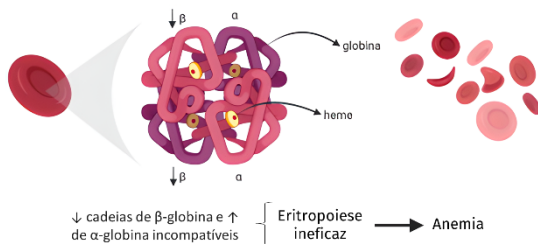


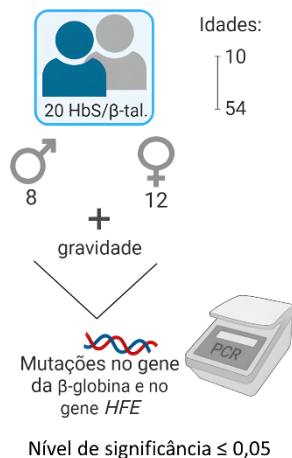
Figura 1. Hemoglobina com os grupos heme e globina e as cadeias alfa e beta. Fonte: autoria própria.

A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença caracterizada pelo excesso de ferro, devido aos polimorfismos no gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*), que podem levar a alterações no metabolismo do ferro.

Objetivos

Esse trabalho teve por objetivo avaliar a frequência de polimorfismos no gene *HFE* em pacientes com Hb S/ β -talassemia, e classificados em risco de gravidade pela *Calculator of severity of sickle cell disease*.

Metodologia



Resultados e Discussão

Para a mutação *H63D* foram identificados 7 indivíduos com o genótipo homozigoto selvagem (35%), 13 heterozigotos (65%) e nenhum homozigoto mutante. Para as mutações *C282Y* e *S65C* não foram encontrados mutantes.

Tabela 1. Frequência alélica do gene *HFE* em pacientes com Hb S/ β -talassemia.

Alelo	<i>H63D</i>		<i>C282Y</i> e <i>S65C</i>	
	nº	F	nº	F
W*	27	0.675	40	1.000
M*	13	0.325	0	0.000
Total Alelos	40	1	40	1

W: alelo selvagem. M: alelo mutante. F: frequência alélica. * $p > 0,05$

O teste exato de Fisher indicou que não ocorreram diferenças significativas entre o sexo biológico e idade para o polimorfismo *H63D*. Entretanto, a gravidade apresentou diferenças significativas.

Tabela 2. Perfil das mutações do gene *HFE* no gênero e na gravidade em pacientes com Hb S/ β -talassemia.

Gênero	<i>H63D</i>			<i>C282Y</i> e <i>S65C</i>	
	W/W	W/M	M/M	W/W	W/W
Masculino	15%	45%	0%	60%	60%
Feminino	20%	20%	0%	40%	40%
Gravidade*					
Leve	15%	15%	0%	30%	30%
Intermediária	5%	30%	0%	35%	35%
Grave	15%	20%	0%	35%	35%

W/W: homozigoto selvagem. W/M: heterozigoto. M/M: homozigoto mutante.

* $p = 0,04$

- Apesar da ↓ penetrância do M/M, ele se encontra em maior frequência na população brasileira, indicando que a mutação pode influenciar na sobrecarga de ferro e levar a casos mais graves de Hb S/ β -talassemia.

Conclusão

Os resultados evidenciaram alta frequência do polimorfismo *H63D*, principalmente em homens com Hb S/ β -talassemia. Existe uma relação entre a gravidade da doença e a presença da mutação *H63D*.

Referências

- Ali, S. et al. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, v. 9, n. 12, 2021.
- Selvaraj, B. et al. Frequency of hereditary hemochromatosis gene mutations and their effects on iron overload among beta thalassemia patients of Chennai residents. *AIMS Molecular Science*, v. 8, n. 4, 2021.
- Souto, N. L. R.; Pugliesi, P. R.; Lopes, I. C. R.; Huffmann, J. C. J. Hereditary hemochromatosis: literature review. *Revista Médica de Minas Gerais*, v. 26, n. 1791, 2016.
- Nixon, A. M. et al. The role of *HFE* genotype in macrophage phenotype. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 30, 2018.

“Análise da frequência do polimorfismo no gene da protrombina (*G20210A*) em um grupo da população do noroeste paulista”

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;44(S2):S1–S689

S289

100 control individuals were included. The group of t-PAPS was 63.73% female, and the median age was 40 years (IQR 31-53). Asymptomatic aPL carriers were predominantly female (82.36%) and the median age was 36 years (IQR 24-59). Controls were mostly female (67%) and their median was 39 years (IQR 29-49). No significant demographic differences between the groups were observed. Cardiovascular risk factors were more prevalent among t-PAPS than among asymptomatic aPL carriers and controls (37.25%, 5.88%, and 9% respectively). ANXA3 ($p=0.0292$) and TNFAIP6 ($p=0.0006$) mRNA were up-regulated while TXK ($p<0.0001$), BACH2 ($p=0.0085$) and SERPINB2 ($p=0.0491$) were down-regulated in t-PAPS when compared to controls. In aPL carriers, the relative expression levels of TNFAIP6 were similar to t-PAPS while that of BACH2 was similar to controls; as shown in Figure 1. In a subgroup analysis, ANXA3 and TNFAIP6 mRNA expression were more pronounced in t-PAPS with multiple thrombosis ($P=0.0027$ and $P<0.0001$ respectively), while TXK mRNA expression was lower in all t-PAPS subgroups in comparison with controls, being particularly lower in patients who had first thrombotic event and non-triple positivity ($p<0.0001$ and $p<0.0001$ respectively), BACH2 mRNA expression was lower in t-PAPS subgroup with first thrombotic event ($P=0.0019$) compared to the control group and SERPINB2 mRNA expression was only significantly lower in t-PAPS with first thrombotic event ($p=0.0071$). Table 1 demonstrates fold changes by different manifestations of t-PAPS. **Discussion:** We observed dysregulation of genes related to hemostasis (ANXA3 and SERPINB2) and inflammation (TNFAIP6, TXK, and BACH2) in t-PAPS when compared to controls. ANXA3 plays a role in cell growth regulation and signal transduction pathways, and has previously been linked to stroke in animal studies. TNFAIP6 is involved in cell-cell and cell-matrix interactions during inflammation and tumorigenesis. Among TXK-related pathways is the transmigration of immune cells which plays a role in regulating the adaptive immune response. BACH2 is responsible for immune regulation, mainly related to the adaptive immune response, and has been implicated in B cell. SERPINB2 regulates the production of the plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2), directly related to the hemostasis pathways. Such mechanisms were not evident among asymptomatic aPL carriers. In subgroup analysis, the relative expression of genes related to innate immunity has also been associated with signs of disease severity, such as multiple thrombosis and triple positivity. **Conclusions:** Our results showed that innate immunity and hemostasis pathways are associated with t-PAPS at a transcriptome level and innate immunity may play a role in disease severity.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.489>

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO NO GENE DA PROTROMBINA (*G20210A*) EM UM GRUPO DA POPULAÇÃO DO NOROESTE PAULISTA

TF Ribeiro, ABV Sarausa, ABBD Santos, CRB Domingos

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Objetivos: O gene da protrombina está associado ao risco de trombose venosa, uma desordem multifatorial resultante de anormalidade no sistema de coagulação, ativação de plaquetas e parede vascular sanguínea, devido a fatores genéticos e adquiridos, como idade avançada, uso de anticoncepcionais, colesterol elevado, obesidade ou ainda tabagismo e alcoolismo. Esse estudo teve como objetivo analisar a frequência do polimorfismo no gene *G20210A* em pessoas com hemoglobina normal (Hb AA), com relação ao sexo e idade em uma amostra do estado de São Paulo, SP. **Metodologia:** Foram analisadas amostras de DNA de 260 indivíduos de ambos os sexos, por meio de PCR para verificar o polimorfismo no gene da Protrombina (*G20210A*). Para as análises estatísticas foi utilizado o software IBM SPSS Statistics 20, com nível de significância de 0,05. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para verificar a associação entre os genótipos homozigotos e heterozigotos do polimorfismo *G20210A*. Em seguida, verificamos a associação entre o sexo e idade com o polimorfismo no gene, utilizando o teste exato de Fisher. **Resultados:** O grupo amostral foi constituído de 163 homens (62,69%) e 97 mulheres (37,31%) com idades variando entre 16 a 67 anos. O polimorfismo exibiu os seguintes genótipos: 256 homozigotos selvagens (98,46%), 4 heterozigotos (1,54%) e nenhum homozigoto mutante. Encontramos diferenças significativas entre os genótipos homozigotos e heterozigotos para o polimorfismo ($p<0,05$). Entre os heterozigotos, observamos frequências iguais entre homens e mulheres (2-0,77%), com predominância de idades acima de 40 anos. **Discussão:** Existe uma maior frequência entre o polimorfismo da Protrombina e indivíduos de idades superiores a 40 anos por fatores associados à idade e hábitos de vida. Em mulheres com mais de 40 anos a frequência se dá, principalmente, pelo uso de anticoncepcionais, os quais podem aumentar em até 5 vezes o risco de trombose, tornando esse grupo mais suscetível. **Conclusão:** Não foi possível correlacionar, de forma conclusiva, o polimorfismo com as variáveis sexo, etnia e gênero. Entretanto, 75% dos indivíduos heterozigotos possuíam idade superior a 40 anos.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.490>

PURPURA TROMBOCITOPÊNICA TROMBÓTICA HEREDITÁRIA: RELATO DE CASO

MS Longhin, MM Raddi, TRAC Donato, MVF Bizzarro, EC Ferreira

Grupo Gestor de Serviços de Hemoterapia (Grupo GSH), São Paulo, SP, Brasil

Introdução: A Purpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) é uma doença rara, caracterizada pela formação de pequenos coágulos sanguíneos, que se formam subitamente e acabam bloqueando arteríolas e capilares da microcirculação do organismo, especialmente aqueles que levam a circulação sanguínea para órgãos vitais como cérebro, coração e rins. Podendo também causar o rompimento de hemácias que atravessam esses vasos parcialmente bloqueados. Tais coágulos sanguíneos que se formam geram um consumo acentuado de plaquetas, levando a diminuição de sua contagem na corrente sanguínea (trombocitopenia). A PTT é

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO NO GENE DA PROTROMBINA (G2021A) EM UM GRUPO DA POPULAÇÃO DO NOROESTE PAULISTA

Ribeiro, T. F.¹; Sarausa, A. B. V.¹; Santos, A. B. B. D.¹; Bonini-Domingos, C. R.¹

¹ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Câmpus de São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail: thais.f.ribeiro@unesp.br

Introdução

O gene da protrombina está associado ao risco de trombose venosa, uma desordem multifatorial resultante de fatores genéticos e adquiridos, como idade avançada, uso de anticoncepcionais, colesterol elevado, obesidade ou ainda tabagismo e alcoolismo.

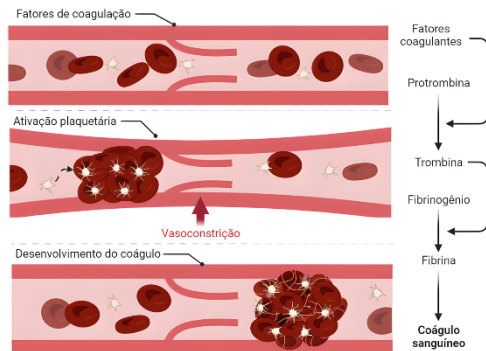
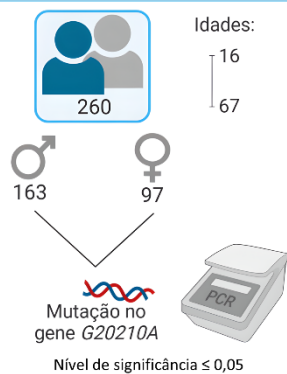


Figura 1. Formação de um coágulo dentro de um vaso sanguíneo. Fonte: autoria própria.

Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo analisar a frequência do polimorfismo no gene *G20210A*, com relação ao sexo, idade e etnia em uma amostra do estado de São Paulo, SP.

Metodologia



Resultados e Discussão

O polimorfismo exibiu os seguintes genótipos: 256 homozigotos selvagens (98,46%), 4 heterozigotos (1,54%) e nenhum homozigoto mutante.

Tabela 1. Frequência alélica do gene *G20210A*.

Alelo	<i>G20210A</i>	
	nº	F
W*	516	0.992
M*	4	0.008
Total Alelos	520	1

W: alelo selvagem. M: alelo mutante. F: frequência alélica. * p<0,05

O teste exato de Fisher indicou que não ocorreram diferenças significativas entre o sexo biológico, idade e etnia para o polimorfismo *G20210A* na população estudada.

Tabela 2. Perfil das mutações no gene *G20210A* no gênero e na etnia.

Gênero	<i>G20210A</i>	
	W/W	W/M
Masculino	62%	1%
Feminino	37%	1%
Etnia		
Caucasiano	73%	1%
Pardo	3%	0%
Afrodescendente	21%	0%
Asiático	1%	0%
Oriental	0%	0%

W/W: homozigoto selvagem. W/M: heterozigoto.

- Existe ↑ frequência entre o polimorfismo e indivíduos de idades superiores a 40 anos por fatores associados à idade e hábitos de vida.

Em mulheres com mais de 40 anos a frequência se dá, principalmente, pelo uso de anticoncepcionais, os quais podem aumentar em até 5 vezes o risco de trombose, tornando esse grupo mais suscetível.

Conclusão

Não foi possível relacionar, de forma conclusiva, o polimorfismo com as variáveis sexo biológico, etnia e gênero. Entretanto, 75% dos indivíduos heterozigotos possuíam idade superior a 40 anos.

Referências

- López, T. et al. Frecuencia de la mutación del factor V Leiden y protrombina G2021A en pacientes con tromboembolismo venoso. *Salus*, v. 11, n. 3, p. 37-40, 2007.
- Macari, B. F. et al. Incidence of venous thromboembolic events in patients diagnosed with COVID-19: A literature review. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 5, 2022.
- Montealegre, L. et al. Primer estudio sobre la detección del factor V Leiden en pacientes nicaragüenses con tromboembolia venosa no provocada: informe preliminar. *Hematología*, v. 22, n. 2, 2019.
- Oliveira, G. M. Hereditary and Acquired Thrombophilia and possible obstetric complications. 2018.

ANEXO C – MANUSCRITOS

“The Severity of Sickle Cell Anemia in Men – The Action of Molecular and Biochemical Markers”

ISSN: 2469-5696



International Journal of
Blood Research and Disorders

Rios et al. Int J Blood Res Disord 2022, 9:077

DOI: 10.23937/2469-5696/1410077

Volume 9 | Issue 1

Open Access

ORIGINAL ARTICLE

The Severity of Sickle Cell Anemia in Men - The Action of Molecular and Biochemical Markers

Jonathan de Oliveira Rios^{1*}, Thais Fernandes Ribeiro¹, Gabriel Felipe Arantes Bertochi², Clarisse Lopes de Castro Lobo³ and Claudia Regina Bonini Domingos¹

¹Laboratory of Hemoglobins and Genetics of Hematological Diseases, Biosciences, Letters and Exact Sciences Institute, São Paulo State University (UNESP), Brazil

²Research Lab Human Performance and Sport, Triangulo Mineiro Federal University (UFTM), Brazil

³State Health Department, Arthur de Siqueira Cavalcanti State Institute of Hematology, Brazil

*Corresponding author: Jonathan de Oliveira Rios, Genetics and Evolutionary Biology, Laboratory of Hemoglobins and Genetics of Hematological Diseases, Biosciences, Letters and Exact Sciences Institute, São Paulo State University (UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto/SP - CEP 15054-000



Abstract

Background: Sickle cell disease is characterized by a very heterogeneous clinical course among patients with the same mutations for sickle cell hemoglobin (HbS). Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary hemoglobinopathy caused by the homozygosity of a point mutation in the beta-globin gene, which leads to the substitution of glutamic acid for valine in the sixth position. Thus, this mutation results in an individual with the abnormal Hb phenotype and different physicochemical properties being known as HbS. The molecular basis for the formation of HbS is known, however, the mutation alone (*HBB*, *glu6val*, *rs334*) is not enough to explain the heterogeneous phenotype found in patients with SCD, other factors such as HbF levels, genetic polymorphisms, drug use how hydroxyurea and environmental factors can help to better understand this hemoglobinopathy.

Objective: To study how these factors modulate sickle cell anemia expression, the present work aimed to investigate the association of molecular, hematological, and biochemical markers with the severity of sickle cell anemia.

Materials and methods: 182 male patients homozygous for the Hb S genotype were selected. Disease severity was calculated from the “Sickle Cell Disease Severity Calculator”. In this study, hematological (Ferritin), biochemical (TBARS-Thiobarbituric acid-reactive species) and molecular markers - SNP were used in the genes: [*TNFA* (-308 G > A), *TGFβ* (-509 C > T), *eNOS* (-786 T > C) and *HFE* - *H63D* (63 G > A), *C282Y* (282 G > A) and *S65C* (65 A > T)].

Results: Some associations were stronger, for example with polymorphisms of *TNF-α* (-308 G > A) genes with the most predominant genotype being the homozygous mutant polymorphism [GG]. Patients with Moderate and severe severity had pain attacks with a frequency of two attacks per year on average. In contrast, the frequency observed in Mild patients was 3-5/year. The *eNOS* gene polymorphism (-786 T > C) showed a higher frequency of the [TT] polymorphism being associated with stroke. The use of hydroxyurea, as well as the levels of Ferritin, showed to be great agents associated with the degree of severity. Of the polymorphisms of the *HFE* gene studied, only the *H63D* (63 G > A) presented a mean associated with the degrees of severity, with the frequency of the *W/H63D* genotype being predominant in patients with a moderate degree.

Conclusion: This work showed that the degree of severity in SCA is associated with *TNFA*, Stroke, Pain Crises, *TGFβ*, TBARS, Number of infections/year, *eNOS*, Ferritin, and mutations in the *HFE* gene (*H63D*, *C282Y*, and *S65C*).

Keywords

Genetic markers, Sickle cell anemia, Severity, TBARS

Abbreviations

Hb: Hemoglobin; SCA: Sickle cell anemia; SCD: Sickle cell disease; IL: Interleukin; *TNF-α*: Tumor necrosis factor α; HU: Hydroxyurea; *TGF-β*: Transforming growth factor-beta; *eNOS*: Endothelial nitric oxide synthase; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; *HFE*: Homeostatic iron regulator



Citation: Rios JO, Ribeiro TF, Bertochi GFA, Lobo CLC, Domingos CRB (2022) The Severity of Sickle Cell Anemia in Men - The Action of Molecular and Biochemical Markers. Int J Blood Res Disord 9:077. doi: 10.23937/2469-5696/1410077

Accepted: June 21, 2022; **Published:** June 23, 2022

Copyright: © 2022 Rios JO, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.