

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA**  
**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO**  
**AMAZONAS – HEMOAM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À**  
**HEMATOLOGIA – PPGH**

**FREQUÊNCIA DA TALASSEMIA ALFA – DELEÇÕES 3.7KB E 4.2KB EM**  
**INDIVÍDUOS DA REGIÃO METROPOLITANA DE**  
**MANAUS - AMAZONAS**

Fernanda Cozendey Anselmo

**MANAUS - AMAZONAS**

**2019**

Fernanda Cozendey Anselmo

**Frequência da Talassemia Alfa – Deleções <sup>3.7kb</sup> e <sup>4.2kb</sup> em indivíduos da Região  
Metropolitana de Manaus - Amazonas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convênio com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

**MANAUS - AMAZONAS**

**2019**

### **Ficha Catalográfica**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

A618f Anselmo, Fernanda Cozendey  
Frequência da Talassemia Alfa - Deleções 3.7KB e  
4.2KB em Indivíduos da Região Metropolitana de Manaus  
Amazonas / Fernanda Cozendey Anselmo. Manaus :  
[s.n], 2019.  
87 f.: color.; 31 cm.

Dissertação - PGSS - Ciências Aplicadas à Hematologia  
(Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas,  
Manaus, 2019.  
Inclui bibliografia  
Orientador: José Pereira de Moura Neto

1. Hemoglobinopatias. 2. Talassemia Alfa. 3. GAP  
PCR. 4. Biologia Molecular. I. José Pereira de Moura  
Neto (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas.  
III. Frequência da Talassemia Alfa - Deleções 3.7KB e  
4.2KB em Indivíduos da Região Metropolitana de Manaus  
Amazonas


**Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463**


ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 03/2019


Aos vinte oito dias do mês de março do ano de 2019, às 14h00, realizou-se na Sala de Aula 10, Bloco B, 1º andar, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Fernanda Cozenley Anselmo**, sob o título “**Diagnóstico Molecular de Talassemia Alfa – Defeitos 3,7 A4.2 em Indivíduos da Região Metropolitana de Manaus – Amazonas**”, em complemento aos critérios exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Hematologia, tendo como orientador (a) o Prof(a) Dr(a) **José Pereira de Moura Neto**, segundo encaminhamento do (a) Prof(a) Doutor(a) **Cristina Morta Ferreira**, Coordenador (a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas. A Banca examinadora foi composta pelos seguintes membros: Prof(a) Dr(a) **Leny Nascimento da Mota Passos** (HEMOAM), **Andréa Monteiro Tarragó** (HEMOAM), **Rajendranath Ramasawmy** (FMI-HVD). Encerrando os trabalhos, os examinadores deram o parecer final sobre a defesa, tendo sido atribuído à (a) aluna (o) o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

A Dissertação foi considerada:

Aprovada       Não Aprovada

  
Prof.ª. Dra. **Leny Nascimento da Mota Passos** (Presidente)

  
Prof.ª. Dra. **Andréa Monteiro Tarragó** (Membro Externo)

  
Prof. Dr. **Rajendranath Ramasawmy** (Membro Externo)

Dedico este trabalho ao meu pai Almir Manhães Anselmo (*in memoriam*), pela dádiva de momentos e ensinamentos únicos; por jamais ser ausência, e sim, saudade. Gratidão pelas lembranças deixadas, pela compreensão da distância e por confiar que, em algum dia, eu chegaria aqui. Ofereço a você minha superação.

## AGRADECIMENTOS

Em todo instante a vida me foi generosa ao presentear momentos, pessoas e experiências. A realização deste projeto é reflexo de parte de uma ciência lida, ouvida, escrita; mas é também fruto da essência dos erros e acertos. Em meio a tudo isso, a delicadeza dos que participaram comigo desta jornada tornaram todo este processo muito mais leve.

Agradeço a Deus pela oportunidade de passar pela vida de maneira privilegiada, por, especialmente nos últimos 2 anos, ter me auxiliado em momentos de apreensão, me confortado em momentos difíceis, me enlevado em momentos oportunos e ter sido canal fiel de minha fé.

Agradeço à minha família por toda compreensão e jus aos meus planos e objetivos. Em especial à minha mãe, Margareth, por diuturnamente se preocupar e apoiar minhas atividades. Ao meu saudoso pai Almir, fonte inesgotável de amor, entusiasta de minhas conquistas e eterno exemplo de humildade e caráter. Ao meu irmão Felipe, por se tornar insigne ouvinte de minhas divagações e compartilhar comigo a essência da união.

Agradeço a amigos que fizeram e fazem parte da construção de quem tenho me tornado, pessoas que cederam ouvidos e estenderam as mãos enquanto essa etapa se desenhava. Aos queridos Glauber Dias, Guilherme Rosa, João P. Melo, Taysa Vieira, Bruna Venâncio, Bruna Geovanini, por prezarem pela alegria de momentos juntos, por compartilharem seus sonhos e acreditarem nos meus, por ressignificarem a essência da gentileza e cuidado, por se doarem e me permitirem vivenciar um sentido mais humano e genuíno da amizade.

Agradeço ao grupo de pesquisa e colegas do Laboratório de Biologia Molecular da UFAM, por tornarem-se companhias de valor e uma família com total disponibilidade de ajudar, colaborar e crescer. À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da mesma universidade pela disponibilidade dos equipamentos e espaço, onde as análises foram realizadas.

Agradeço à Universidade do Estado do Amazonas, à Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas junto à Coordenação do PPGH, por disponibilizar o Mestrado como ferramenta potencial de ascensão, promoção, fomento e valorização das atividades relacionadas à Hematologia e Hemoterapia no Norte do país. Ao seu respectivo corpo administrativo, especialmente a Wilmara R. B. da Silva, pela solicitude e presteza durante meu ingresso e permanência no programa.

Agradeço às Instituições de Saúde, Hospitais e Laboratórios, assim como aos participantes desta pesquisa, que, ao aceitarem contribuir com este projeto também puderam receber um diagnóstico adequado, sendo essenciais para a condução de seu caso clínico e para o desenvolvimento e conclusão do trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa durante o período do Mestrado – sem a qual seria inviável prosseguir na atuação das atividades do projeto.

Agradeço aos colegas e amigos da pós-graduação que, durante esse ínterim, se tornaram companhias importantes e especiais, atenuando a saudade e ausência e criando vínculos que irão perdurar de forma valorosa; entre esses destaco Jean M. Silva, Natália S. Ferreira, Rosa Belota, Noeme H. Freitas, Lucyane M. Silva, Cíntia X. Albuquerque, Evilázio C. Cardoso, Abdou Gafar, Karinna R. B. Assis, Ana Carla, Aline S. Jamel, Ana Castro e Maria Ivaldete S. de Souza.

Agradeço ao corpo docente do Programa, professores dispostos e solícitos em agregar conhecimentos, experiências e inúmeras lições de vida. Gratidão pela dedicação em formarem Mestres conscientes do seu saber científico e da importância da sensibilidade aos cuidados relacionados aos pacientes e participantes da pesquisa.

Finalizo agradecendo ao meu orientador, professor Dr. José Pereira de Moura Neto, primeiramente pela confiança depositada ao perceber o quão este passo era importante pra mim. Como orientador, tenho absoluta gratidão por ministrar seus ensinamentos de maneira firme e ao mesmo tempo leve, pela paciência ao dedicar-se às minhas dúvidas, pela segurança depositada em mim na realização das atividades, pela presença como exímio mentor, pelo entusiasmo de tornar o trabalho da pesquisa científica uma experiência proveitosa. De maneira pessoal, agradeço por se tornar meu segundo pai, por me conceder a liberdade de um vínculo que se estende às portas da Universidade. Agradeço por me conduzir durante esse período sendo alguém de plena empatia, de bom coração e de alma gigante. Muito obrigada por fazer parte da construção do meu propósito durante minha passagem por esta vida. Eu me sinto lisonjeada por compartilhar desse crescimento onde, em meio às dificuldades e sucessos, tive a dádiva de me espelhar em alguém com tamanha generosidade.

Gratidão por tudo, sempre.

## **DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) apoiou este projeto de pesquisa, por meio da concessão de bolsa de estudo, durante os 24 meses de sua execução.

O projeto de pesquisa faz parte de um estudo intitulado “Estudo das hemoglobinopatias estruturais e de síntese na Região Metropolitana de Manaus-Amazonas” que foi financiado pela Fundação supracitada após submissão e aprovação por meio da chamada FAPEAM/SUSAM-SES-AM/MS/CNPq 001/2013 – PPSUS.



## EPÍGRAFE

É preciso um grande, enorme, descomunal  
problema, para que o que antes julgamos  
ser problema volte à sua dimensão real.

Não há problema, se há saúde.

Isso, porém, só se descobre  
quando a saúde ameaça ir embora, ou vai.  
Tomar consciência de que perdi o direito de  
ter problemas foi uma das boas coisas que  
aconteceram na minha vida.

Roberto Nogueira Ferreira  
Co-Fundador da ABRACE

## RESUMO

A Talassemia Alfa, considerada uma das doenças monogênicas mais comuns no mundo, constitui um grupo heterogêneo de alterações hereditárias causadas por deleções que afetam os genes reguladores alfa ( $\alpha$ ) e promovem o desequilíbrio no conteúdo quantitativo de globinas, culminando na diminuição de componentes normais dos níveis de hemoglobina devido à perda de um ou mais genes  $\alpha$ . A deleção de 3,7Kb é a mais frequente em todo o mundo e, no Brasil, a prevalência varia entre 20 e 35%, dependendo principalmente da raça, sendo mais predominante nos afrodescendentes. Um estudo transversal de prevalência foi realizado com o objetivo de caracterizar a Talassemia Alfa, compreendendo as deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ , estimando sua frequência em indivíduos da Região Metropolitana de Manaus-Amazonas. A deleção foi investigada por GAP-PCR para  $-\alpha^{3.7}$  e Multiplex-PCR para  $-\alpha^{4.2}$ . O tamanho amostral incluiu 2798 indivíduos de seis municípios da região, compreendendo as cidades de Iranduba (N = 232), Itacoatiara (N = 301), Manacapuru (N = 287), Presidente Figueiredo (N = 370), Coari (N = 263) e a capital, Manaus (N = 1345). Todas as amostras foram coletadas de hospitais e/ou centros de saúde de cada cidade. Especificamente em Manaus, as amostras foram estratificadas entre indivíduos atendidos em centros de saúde (N = 356) e um grupo específico de doadores de sangue atendidos no HEMOAM (N = 989). Todas as amostras foram submetidas ao hemograma (por meio do contador automático ABX Pentra XL 80 HORIBA) e dosagem de Ferritina e Ferro Sérico (Bioclin® KIT). A extração de DNA foi realizada utilizando kit Biopur Mini Spin Plus, armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e processado gradativamente. A Talassemia Alfa foi encontrada em 7,9% da população geral (6% heterozigotos e 1,9% homozigotos), as associações analisadas entre os portadores foram estatisticamente significantes ( $<.001$ ) entre os parâmetros hematológicos, exceto entre as dosagem de Ferro Sérico e Ferritina. Nesse grupo, foi encontrado 158 indivíduos microcíticos e hipocrômicos, a frequência da deleção nesse grupo alcançou 40,68%. A prevalência da  $-\alpha^{3.7}$  foi de 5,35% nos doadores de sangue. O número de leucócitos e contagem de plaquetas não diferiu significativamente. Como de se esperar, os dados hematológicos dessa população foram mais reduzidos, considerando a comparação entre os indivíduos normais ( $p<.001$ ). Este estudo mostrou que os valores dos parâmetros hematológicos, especialmente MCV e MCH são menores em doadores com deficiência de ferro, especialmente quando associado com  $\alpha$ -talassemia e pode ser útil em discriminar os diferentes tipos de anemia microcítica. Em conclusão, acreditamos que a triagem para traço de talassemia deve constituir o rol de análises solicitadas em aconselhamento genético e até mesmo pré-natal, assim como a existência de um teste de sangue padrão antes da doação de sangue. Deve ser notado que este foi o primeiro estudo a realizar a triagem de deleções alfa na população geral e em doadores de sangue da região de Manaus.

**Palavras-chave:** Hemoglobinopatias, Talassemia Alfa, GAP-PCR, Biologia Molecular

## ABSTRACT

Alpha thalassemia, one of the most common monogenic diseases in the world, is a heterogeneous group of hereditary changes caused by those who affect the alpha ( $\alpha$ ) regulatory genes and promote imbalance in the market in hemoglobin levels due to the loss of one or more  $\alpha$  genes. The 3.7Kb deletion is the most frequent worldwide and, in Brazil, varied 20 and 35%, while it is mainly concentrated, being more predominant in Afro-descendants. A major cross-sectional study was carried out with the aim of characterizing an alpha thalassemia, comprising  $-\alpha^{3.7}$  and  $-\alpha^{4.2}$  deletions, estimating its frequency in a case of the Metropolitan Region of Manaus-Amazonas. The deletion was investigated by GAP-PCR for  $-\alpha^{3.7}$  and Multiplex-PCR for  $-\alpha^{4.2}$ . The sample size included 2798 municipalities of the region, comprising the cities of Iranduba (N = 232), Itacoatiara (N = 301), Manacapuru (N = 287), Presidente Figueiredo (N = 370), Coari (N = 263) and the capital, Manaus (N = 1345). The samples were collected from hospitals and/or health centers in each city. Specifically, in Manaus, the samples were stratified between care at health centers (N = 356) and a specific group of blood donors seen at FHEMOAM (N = 989). All samples were submitted to the hemogram and by the dosage of Ferritin and Serum Iron (Bioclin® KIT). DNA extraction was performed using Biopur Mini Spin Plus kit, stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and further processed. Alpha thalassemia was found in 7.9% of the general population (6.0% heterozygous and 1.9% homozygous), as the variables analyzed among the patients were statistically significant ( $<0.001$ ) among hematological parameters, except between Serum iron and Ferritin dosages. In this group, 158 microcytic and hypochromic subjects were found, with a frequency of 40.68%. The prevalence of  $-\alpha^{3.7}$  was 5.35% in blood donors. The number of leukocytes and platelet counts did not differ significantly. As might be expected, hematological data were more reduced, considering an average among normal individuals ( $p < .001$ ). This is a study that presents values of hematological parameters, especially MCV and HCM are lower in donors with iron deficiency, while when associated with  $\alpha$ -thalassemia and may be useful in discriminating different types of microcytic anemia. In conclusion, we believe that screening for the thalassemia trait should be built on genetic and at the same time prenatal databases, as well as the existence of a standard blood test prior to donating blood. It should be noted the first study to perform a screening of alpha deletions in the general population and blood donors of the Manaus region.

**Keywords:** Hemoglobinopathies, Alpha Thalassemia, GAP-PCR, Molecular Biology

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática da molécula de hemoglobina.....	18
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática dos genes das cadeias globínicas .....	19
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática da síntese de cadeias globínicas .....	20
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática dos possíveis genótipos apresentados na TA .	23
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática do <i>cluster</i> do gene Alfa, demonstrando cada deleção .....	23
<b>Figura 6</b> – Distribuição geográfica da TA.....	29
<b>Figura 7</b> – Fluxograma das atividades realizadas durante todo o desenvolvimento do projeto.....	37
<b>Figura 8</b> – Mapa da Região Metropolitana de Manaus .....	39

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b> – Manifestações clínicas e laboratoriais dos distintos genótipos talassêmico .....	26
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CNS	Conselho Nacional de Segurança
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina Fetal
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Ht	Hematócrito
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kb	Kilobase – Mil pares de base
mg	Miligrama
ml	Mililitro
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHHF	Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal
RMM	Região Metropolitana de Manaus
TA	Talassemia Alfa
TCLE	Termo de Compromisso Livre e Esclarecido
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VCM	Volume Corpuscular Médio
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\delta$	Delta
$\epsilon$	Épsilon
$\zeta$	Zeta
$\theta$	Teta
$\rho$	Rho
$\Psi$	Psi
$\mu$	Mu

## SUMÁRIO

RESUMO CIENTÍFICO .....	IX
ABSTRACT .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE QUADROS E TABELAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 Estrutura e Síntese da Hemoglobina.....	16
1.2 Hemoglobinopatias .....	19
1.3 Talassemias .....	20
1.3.1 Talassemia Alfa .....	21
1.3.2 Fisiopatologia da Talassemia Alfa.....	23
1.3.3 Achados Clínicos e Laboratoriais da Talassemia Alfa.....	23
1.3.4 Diagnóstico e Importância Clínica .....	25
1.3.5 Talassemia Alfa e Associações.....	26
1.3.6 Epidemiologia da Talassemia Alfa.....	27
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
2.1 Objetivos Específicos .....	32
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	
3.1 Casuística.....	33
3.2 Obtenção das amostras .....	38
3.3 Análises Hematológicas e Bioquímicas.....	38
3.4 Extração de DNA.....	39
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Identificação da TA $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ .....	40
3.6 Eletroforese dos Produtos da PCR .....	40
3.7 Análises Estatísticas.....	41
3.8	
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
4.1 Artigo 1.....	42

4.2	Artigo 2.....	60
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A talassemia alfa (TA) é uma doença de ordem genética, cursando com diferentes graus de anemia. Foi assim intitulada em razão de sua etiologia de origem grega: *Thalassa* que significa mar, e *Haemas* que significa sangue; denominada também como Anemia do Mediterrâneo<sup>(1)</sup>.

Em um contexto histórico, os primeiros achados compreendem principalmente populações ao redor do Mar Mediterrâneo, sendo locais com prevalência elevada desta doença. Países do Sudeste Asiático, Africanos, Oriente Médio e Europeus compreendem as regiões de maior prevalência da TA. No Brasil, por sua vez, a imigração oriunda das localidades supracitadas foi fator substancial para que encontrassem portadores em todas as regiões do país<sup>(2)</sup>.

Considerada uma alteração hereditária autossômica recessiva, seu acometimento dá-se pela deleção de um ou mais genes alfa, cursando com a redução de cadeias globínicas alfa e consequente modificação da função da molécula de hemoglobina. Sua gravidade varia exatamente pela quantidade de genes acometidos<sup>(3)</sup>.

As hemoglobinopatias, de forma geral, são consideradas doenças de saúde pública. A investigação de indivíduos portadores da TA é essencial para que se dê a importância nas condutas terapêuticas, diagnóstico e tratamento de forma correta, recebendo apoio e suporte do corpo clínico bem como de seus familiares<sup>(4)</sup>.

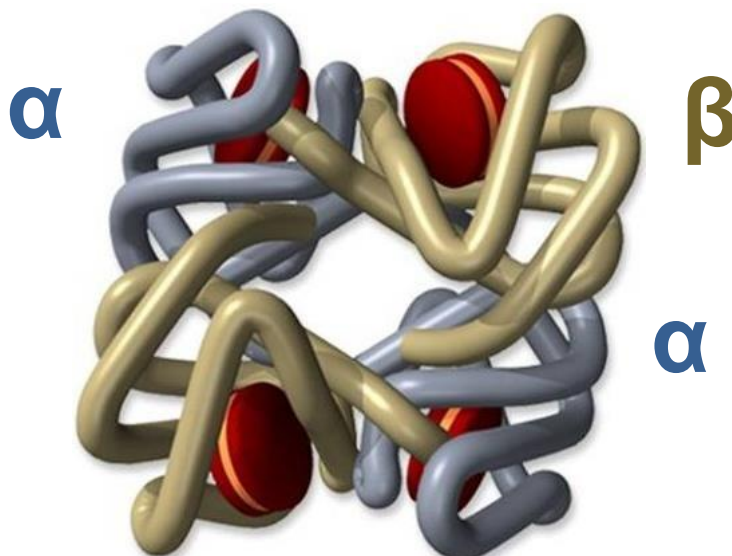
Nesse contexto, além da determinação do diagnóstico molecular, a avaliação do perfil hematológico nas populações estudadas no presente trabalho é bastante relevante, já que ainda não há um padrão claramente definido na população brasileira, tornando essa discussão essencial. No que tange à Região Norte, a estimativa da frequência da Talassemia Alfa, além de oferecer dados para a determinação de características relacionadas, também fornecem informações substancialmente válidas na conduta do tratamento dos portadores.

### 1.1 Estrutura e Síntese da Hemoglobina

A molécula de hemoglobina do adulto é composta por proteínas simetricamente organizadas em 2 cadeias de globina do tipo ‘alfa’ ( $\alpha$ ) e 2 cadeias de globina do tipo ‘não alfa’, podendo ser do tipo beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ) ou gama ( $\gamma$ ) – dependendo do tipo de hemoglobina a ser sintetizada. Localizada no interior do eritrócito, sua estrutura

quaternária permite que cada cadeia se una a um anel tetrapirrólico de Protoporfirina IX ligado a um átomo de ferro (constituindo o grupamento Heme), protegendo o elemento ferroso da solução plasmática, propiciando a reversível associação da molécula de oxigênio e o seu consequente transporte dos pulmões aos tecidos<sup>(5)</sup>.

**Figura 1** – Representação esquemática da molécula de hemoglobina. Adaptado de Koury et al., 2013<sup>(6)</sup>.



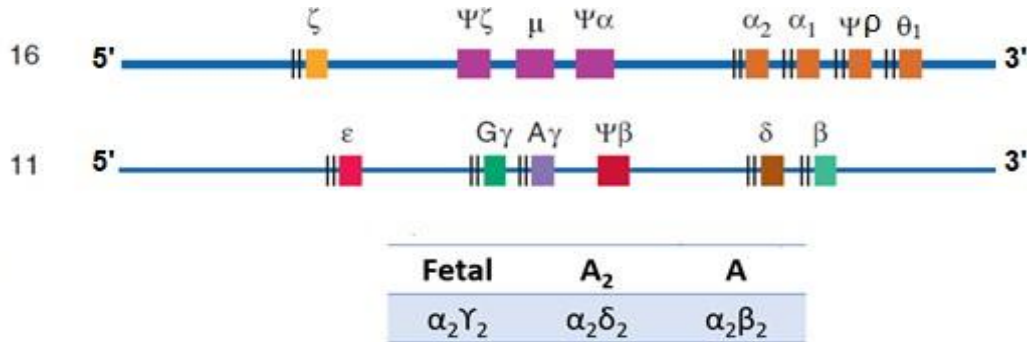
A produção de hemoglobina ocorre durante todo processo de maturação celular, persistindo até os estágios de reticulócitos. A completa organização da hemoglobina dá-se ao passo em que se processa a correta expressão dos genes de síntese da globina, a formação do grupamento Heme (junto à síntese de Protoporfirina IX) e o aporte de ferro plasmático à mitocôndria<sup>(6)</sup>.

A síntese de cadeias de globina precisa ser equilibrada para que a formação da hemoglobina seja eficiente, do contrário, fenótipos patológicos de anemias hereditárias acabam surgindo. A regulação gênica tanto da síntese como da organização estrutural das principais hemoglobinas humanas  $\alpha$  e  $\beta$  é promovida por 2 *clusters*. Esses grupamentos gênicos (representados esquematicamente na Figura 2) encontram-se em cromossomos distintos; no cromossomo 16 estão localizados os *clusters*  $\alpha$  e no cromossomo 11, os  $\beta$ . O grupamento  $\alpha$  localiza-se próximo à extremidade do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) e compreende 3 genes funcionais ( $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  e um gene zeta ( $\zeta$ ) embrionário), 3 pseudogenes ( $\Psi\zeta$ – $\Psi\rho$ – $\Psi\alpha_1$ ), além de  $\mu$  e  $\theta_1$ <sup>(7)</sup>.

Situados na porção terminal do cromossomo 11 (11p15.5), o grupamento das cadeias de globina  $\beta$  compreendem os genes funcionais  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , dois genes gama ( $^G\gamma$  e  $^A\gamma$ )

e um pseudogene beta ( $\Psi\beta$ ). De maneira ordenada é possível observar: 5'- $\epsilon$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\Psi\beta$ - $\delta$ - $\beta$ -3'<sup>(8)</sup>.

**Figura 2** – Representação esquemática dos genes das cadeias globínicas. Adaptado de Kasper et al., 2015<sup>(9)</sup>.

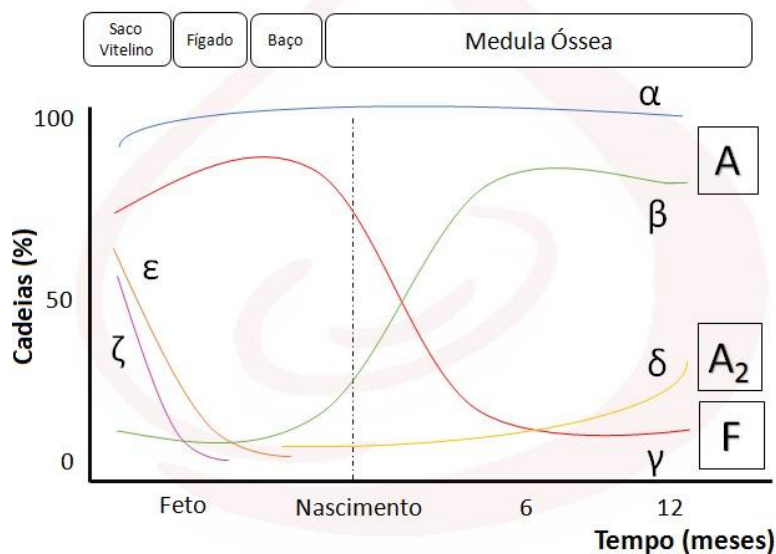


Durante a gradativa maturação das células através das atividades hematopoiéticas, as cadeias de globina variam em porções quantitativas no organismo de acordo com as etapas de desenvolvimento humano. Desse modo, se agrupam e se organizam no intuito de formarem todos os tipos de hemoglobinas presentes. Para que isso corretamente em todos os estágios da vida, um rígido controle da expressão gênica deve existir para promover o adequado equilíbrio na produção dessas cadeias<sup>(10)</sup>.

O contexto estrutural da hemoglobina sofre modificações durante os períodos embrionário, fetal e na fase adulta. Durante o primeiro mês de gestação as cadeias  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  e  $\epsilon$  são produzidas essencialmente no saco vitelino e logo se organizam em pares para compor as hemoglobinas embrionárias. Assim, a Hemoglobina *Gower 1* ( $\zeta_2\epsilon_2$ ) é substancialmente presente, em seguida, destaca-se a produção das Hemoglobinas *Portland* ( $\zeta_2\gamma_2$ ) e *Gower 2* ( $\alpha_2\epsilon_2$ ), cuja síntese perdura até o terceiro mês<sup>(11)</sup>.

Com o estabelecimento da maturação dos órgãos hematopoiéticos, segue-se a ativação da eritropoiese hepática, contribuindo para a formação da Hemoglobina Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ) (Figura 3), que, apesar de também ser produzida nas primeiras semanas, tem seu aumento gradativo a partir do primeiro mês de gestação, decaindo apenas no fim da gravidez. Ao estímulo da eritropoiese esplênica, ocorre o aumento da produção de cadeias  $\beta$ , que de maneira progressiva, passa a substituir as cadeias  $\gamma$ , perfazendo assim a hemoglobina predominante na vida adulta; Hemoglobina  $A_1$  ( $\alpha_2\beta_2$ ), juntamente com a Hemoglobina  $A_2$  ( $\alpha_2\delta_2$ )<sup>(12)</sup>.

**Figura 3** – Representação esquemática da síntese das cadeias globínicas. Adaptado de Hillman et al., 2005<sup>(13)</sup>.



A síntese da HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), promovida no eritrócito em desenvolvimento, é determinada como a segunda hemoglobina mais predominante e importante em um indivíduo adulto normal, alcançando até 2,5% da hemoglobina total circulante<sup>(14)</sup>.

Ao passo em que ocorre o nascimento, o neonato pode apresentar cerca de 80% de Hemoglobina Fetal e 20% da Hemoglobina A<sub>1</sub>. Após seis meses à natividade, quando dentro da normalidade, a medula óssea produz todas as hemoglobinas presentes em todo período adulto, cuja concentração permeia 95 a 98% para Hemoglobina A<sub>1</sub>, cerca de 2,5% da Hemoglobina A<sub>2</sub> e até 2% da Hemoglobina Fetal<sup>(15)</sup>.

## 1.2 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias consistem em um conjunto heterogêneo de doenças genéticas decorrentes de alterações na síntese de globinas. São desse modo, caracterizadas por mutações que prejudicam a estabilidade das cadeias polipeptídicas. Essas desordens podem ser classificadas em grupos específicos<sup>(16)</sup>.

- I. Redução ou ausência da síntese de uma ou mais cadeias de globina, culminando com o desbalanço quantitativo das cadeias polipeptídicas – denominadas como Talassemias;
- II. Hemoglobinas variantes, apresentando forma estrutural diferente à hemoglobina normal correspondente; desencadeada pela troca de uma ou mais

bases nitrogenadas que cursam com a substituição de um ou mais aminoácidos nas globinas (sem alterar sua síntese);

- III. Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF), caracterizada pela persistência da concentração de hemoglobina fetal após o nascimento, culminando com a constante produção de cadeias gama.

Alterações hemoglobínicas configuram nas patologias monogênicas hereditárias mais comuns, acometendo aproximadamente 7% da população mundial. Sugere-se que cerca de 400.000 recém-nascidos ao ano possuam algum tipo de alteração heterozigótica ou homozigótica dessa origem, dos quais, 90% se encontram em regiões de países emergentes. Acredita-se que a elevada prevalência dessa alteração se dê, entre alguns fatores, pela Seleção Natural, Migração Populacional e casamentos consanguíneos<sup>(17)</sup>.

Nos últimos 10 anos, aproximadamente 1000 hemoglobinas variantes foram descritas. As mais significantes no aspecto clínico provêm da substituição de aminoácidos que desestabilizam a molécula de hemoglobina, que, além de comprometer sua função, alteram a afinidade entre a estrutura quaternária e o oxigênio. Compreendendo as mutações mais frequentemente encontradas, citamos a HbS devido à substituição do Ácido Glutâmico pela Valina e a HbC cuja modificação ocorre da troca do Ácido Glutâmico pela Lisina, ambas possuindo alteração pontual no códon 6 do gene  $\beta$ , e a HbE no códon 26 pela substituição do Ácido Glutâmico pela Lisina do mesmo *locus*<sup>(18,19)</sup>.

### 1.3 Talassemias

As talassemias são alterações hereditárias decorrentes da redução ou ausência da síntese de uma ou mais cadeias globínicas. Como consequência dessa modificação, o nível de produção de hemoglobina tende a cair, inferindo hipocromia e microcitose aos eritrócitos. Por conseguinte, dependendo da quantidade das deleções, pode ocorrer a diminuição da capacidade de transporte do oxigênio pela hemácia, prejudicando tanto a célula vermelha quanto os seus precursores, culminando com eritropoiese ineficaz e/ou até mesmo anemia hemolítica. Embora todas as cadeias de globina possam ser afetadas e desencadear alterações, as principais globinas envolvidas que levam à clínica de doença, são as  $\alpha$  e  $\beta$ <sup>(20)</sup>.

A classificação das Talassemias dependerá da cadeia de globina alterada, sendo possível encontrar as Talassemias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\delta\beta$  e  $\epsilon\gamma\delta\beta$ <sup>(21)</sup>. O elevado grau de miscigenação compreendendo índios nativos, descendentes de africanos e europeus na população

brasileira é um fator que tem produzido consideráveis frequências de alterações da hemoglobina que refletem diretamente na diversidade de origens raciais em cada região do país<sup>(22)</sup>.

Com relação à Talassemia  $\beta$ , cerca de 200 mutações foram associadas a essa condição em todo o mundo, mas apenas 30 alcançam a frequência de até 1%. Seus portadores são tipicamente categorizados de acordo com nível de acometimento das cadeias  $\beta$ . O portador de Talassemia denominada “Minor” (ou menor; portador silencioso) é expresso em razão de mutação silenciosa. Mutações sutis que causam relativa redução na produção das cadeias de globinas  $\beta$  cursam com o portador da Talassemia “Intermédia” (ou intermediária; apresentando anemia sutil e variável dependência de transfusão). Já portadores da Talassemia “Major” (ou maior; com anemia severa dependente de transfusão) apresentam mutações mais graves que resultam em completa ausência da síntese da cadeia de globina  $\beta$ <sup>(23)</sup>.

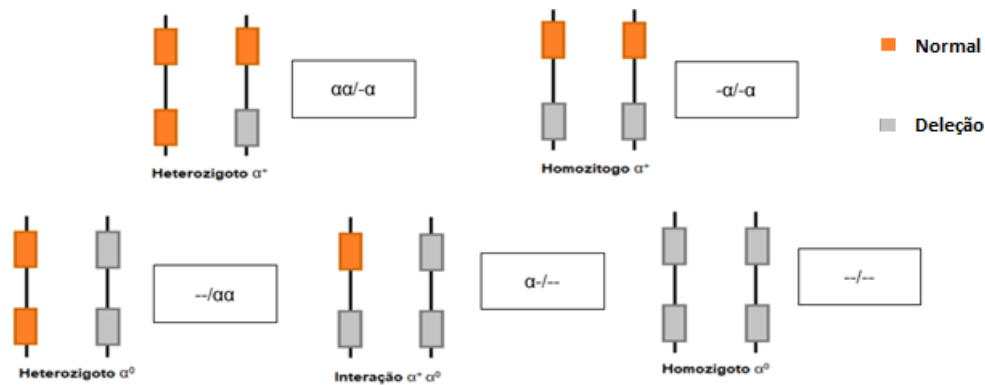
### 1.3.1 Talassemia Alfa

A TA é caracterizada pela redução ou ausência da produção de cadeias  $\alpha$ . Descrita pela primeira vez na década de 1950, sua estrutura genética foi elucidada apenas 20 anos depois, com a avaliação dos quatro genes codificantes para as cadeias Alfa ( $\alpha_2\alpha_1/\alpha_2\alpha_1$ ), encontrados no cromossomo 16. A partir desse momento, pôde-se classificar as distintas formas de apresentação da TA em razão da deleção de um ou mais genes<sup>(2)</sup>.

Compreende-se que, cadeias de globina Alfa e Beta são compartilhadas em todo o processo de desenvolvimento; seja na fase fetal (HbF –  $\alpha_2\gamma_2$ ) ou adulta (HbA –  $\alpha_2\beta_2$  e HbA<sub>2</sub> –  $\alpha_2\delta_2$ ). Assim, ao passo em que as deleções dos genes  $\alpha$  promovem a diminuição ou anulam a produção de cadeias de globina  $\alpha$ , toda a estabilidade e equilíbrio das cadeias são comprometidos. Desse modo, de forma descompensada, o excesso de cadeias  $\beta$  modifica a estrutura da hemoglobina. Ocorre a formação de tetrâmetros de cadeia Gama ( $\gamma_4$ ), também chamados de hemoglobina de Bart – na fase fetal, e a formação de tetrâmetros de cadeia Beta ( $\beta_4$ ), chamados de Hemoglobina H – ocorrendo na fase adulta<sup>(11)</sup>.

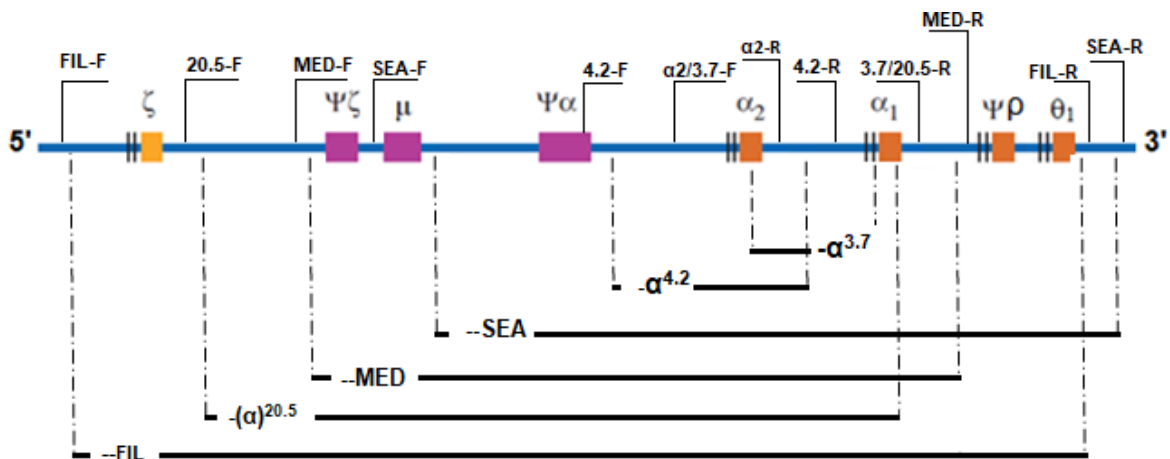
As alterações variam desde a apresentação de um indivíduo  $\alpha^+$  talassêmico heterozigoto – com a deleção de um único gene, ao portador de Hidropsia Fetal, sem que haja qualquer síntese de hemoglobina em razão da total deleção dos genes  $\alpha$  – ilustrados na Figura 4<sup>(24,25)</sup>.

**Figura 4** - Representação esquemática dos possíveis genótipos apresentados na talassemia alfa. Adaptado de Higgs et al., 2009<sup>(26)</sup>.



Assim, cada alteração será responsável pela deleção em local específico, eliminando do gene fragmentos de diferentes tamanhos. O gene pode ser parcialmente ou completamente deletado, essa característica será determinante para identificar qual tipo de Talassemia está se avaliando, além da gravidade clínica que será expressa. A Figura 5 ilustra as possibilidades de deleção<sup>(27)</sup>.

**Figura 5** – Representação esquemática do *cluster* do gene Alfa, ilustrando cada deleção<sup>(24)</sup>.



### 1.3.2 Fisiopatologia da Talassemia Alfa

As características da TA, bem com a expressão dos seus sintomas, dependerão da intensidade do desequilíbrio das cadeias globínicas sintetizadas, isto é, os mecanismos fisiopatológicos da doença indicarão a gravidade clínica em razão do número das

deleções. Excesso de cadeias beta ou gama provoca a formação de tetrâmeros ( $\beta_4$  ou  $\gamma_4$ ) que precipitam na hemácia formando inclusões insolúveis, também conhecidas por Corpúsculos de Heinz<sup>(28)</sup>.

Nos casos cujas deleções ocorram em três ou mais genes, o desbalanço das cadeias afeta os precursores em desenvolvimento, culminando com moderada a intensa hemólise intramedular e eritropoese ineficaz. Além disso, tanto a Hemoglobina de Bart como a Hemoglobina H causam destruição prematura dos eritrócitos, levando à hemólise intravascular e formação de corpos de inclusão eritrocitária por conta da instabilidade dos homotetrâmeros<sup>(29)</sup>.

Em razão de eventos de *cross-over* desigual entre dois segmentos homólogos contendo genes de globinas alfa, haverá a redução da síntese da cadeia específica em resposta à alteração cromossômica particular. Essa alteração gera as duas deleções supracitadas mais comuns para a Talassemia Alfa<sup>+</sup>, determinadas:  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ . A ocorrência do cruzamento cromossômico anormal contribui com a diminuição ( $-\alpha$ ) ou aumento ( $\alpha\alpha\alpha$ ) das cópias dos genes de globina, acompanhado de consequências fenotípicas sutis ou graves, dependendo de seu acometimento<sup>(30)</sup>.

Os genes de globina alfa estão incorporados em duas unidades de duplicação idênticas de 4kb, cuja região é dividida em subsegmentos homólogos (X, Y, Z). A recombinação equivocada entre os segmentos Z pode produzir um cromossomo com apenas um gene  $\alpha$  funcionante. Como os segmentos duplicados Z ficam entre uma sequência de 3.7kb de DNA, sua remoção promove a alteração mais frequente no mundo, ou seja, a  $-\alpha^{3.7}$  ou deleção à direita (*rightward deletion*)<sup>(31)</sup>.

### 1.3.3 Achados Clínicos e Laboratoriais da Talassemia Alfa

É possível determinar a gravidade clínica dos indivíduos com TA a partir do número de genes afetados e sua conseqüente perda de função. Desse modo, em nível molecular, a deleção parcial ( $\alpha^+$ ) ou total ( $\alpha^0$ ) de um gene alfa, se expressa de forma distinta. Portadores heterozigotos geralmente apresentam sintomas mais brandos, mas que precisam ser diferenciados entre anemia sutil, anemia microcítica-hipocrômica, anemia refratária ou deficiente de ferro. Já a forma homozigota acompanha sinais entre moderados a graves como a anemia hemolítica<sup>(32)</sup>.

A partir de uma única deleção dos genes alfa ( $-\alpha/\alpha\alpha$  – observado no Quadro 1) determinamos o portador silencioso, característica mais frequente da alteração. O



indivíduo com o Traço Talassêmico Heterozigoto apresenta-se de forma assintomática – clínica e hematologicamente normal ou associado à microcitose e hipocromia sutis com HbA<sub>2</sub> e HbF normais<sup>(11)</sup>.

O traço Alfa Talassêmico Homozigoto ( $-\alpha/-\alpha$ ) e o traço Alfa Talassêmico Heterozigoto ( $--/\alpha\alpha$ ) correspondem à inativação de dois genes alfa que podem não expressar sintomas em alguns casos, em outros, os níveis de hemoglobina podem ser limítrofes com hipocromia e microcitose discretas, sendo importante que haja acompanhamento correto aos indivíduos para evitar suplantação de ferro inadequado<sup>(33)</sup>. A doença da Hemoglobina H ( $--/-\alpha$  ou interação  $\alpha^0/\alpha^+$ ) ocorre em razão da inativação de três genes alfa, seja por mutação deletional ou não deletional. A diminuição considerável das cadeias alfa leva a uma intensa microcitose e hipocromia. Os pacientes podem apresentar anemia hemolítica severa com necessidade de transfusão além de febre e infecções. Essa condição pode levar a um crescimento retardado durante a infância e, em adultos, são grandes as chances de sobrecarga de ferro devido a transfusões recorrentes – culminando, ao longo dos anos, com danos hepáticos, endócrinos e cardíacos<sup>(34)</sup>.

A deleção das quatro cadeias de globina alfa ( $--/--$ ) resulta na Hidropsia Fetal por Hemoglobina de Bart. Essa condição advém da ausência de síntese da Hemoglobina Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ), em razão da falta total de cadeias de globina alfa. Desse modo, tetrâmeros de globina  $\gamma$  se formam sendo incapazes de liberar oxigênio aos tecidos (devido sua alta afinidade pelo oxigênio). Infelizmente as consequências da Hemoglobina de Bart são bastante graves, caracterizadas por eritropoiese ineficaz juntamente com hematopoese extramedular. Esses fatores resultam em organomegalia massiva, albuminemia severa, falência cardíaca, edema, desenvolvimento incorreto e morte intrauterina (ou poucas horas após o nascimento)<sup>(35,36)</sup>.

**Quadro 1** – Características Clínicas e Laboratoriais dos distintos genótipos Talassêmicos.

<b>Diagnóstico</b>	<b>Arranjo Gênico</b>	<b>Achados hematológicos</b>	<b>(Hemoglobina) Sintomas Principais</b>
Normal	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Hb Normal MCH Normal	(Normal) Assintomático
$\alpha^+$ Talassemia Heterozigoto	$-\alpha/\alpha\alpha$	Hb Normal MCH < 27 pg	(Normal) Assintomático/ Mudanças sutis no eritrograma
$\alpha^+$ Talassemia Homozigoto	$-\alpha/-\alpha$	Hb Normal ou Baixa MCH < 26 pg	(Normal) Anemia branda/ Mudanças significantes no eritrograma
$\alpha^0$ Talassemia Heterozigoto	$--/\alpha\alpha$	Hb normal ou baixa MCH < 24 pg	(Normal) Anemia branda/ Mudanças significantes no eritrograma
Interação $\alpha^+/\alpha^0$ Hemoglobina Bart's e $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$ e $\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$	$--/-\alpha$	Hb 8 a 10 g/dL MCH < 22 pg	HbH $\approx$ 10 a 20% Anemia Hemolítica Crônica
$\alpha^0$ Talassemia Homozigoto Hidropsia Fetal	$--/--$	Hb < 6 g/dL MCH < 20 pg	Hb Bart's $\approx$ 85% Hb Portland $\approx$ 15% HbH < 1% Hidropsia generalizada

### 1.3.4 Diagnóstico e Importância Clínica

A expressão fenotípica de grande parte dos indivíduos com TA é muitas vezes sutil, passando despercebida durante toda a vida do portador da doença. Em outros momentos, esse resultado é encontrado após uma rotina de exames que detalhe o perfil hematológico e molecular completo. As formas que mais se destacam de maneira sintomática compreendem a Doença da Hemoglobina H ou a Hidropsia Fetal (Hb Bart's), ambas com apresentações graves e até letais<sup>(11)</sup>.

Geralmente, as primeiras abordagens com relação à triagem clínica do paciente com suspeita de Talassemia Alfa, é a realização da contagem automatizada das células sanguíneas, seguida pelas dosagens de HbA<sub>2</sub> e HbF, e Eletroforese de Hemoglobina para identificar quaisquer hemoglobinas variantes. Nesse estágio é possível realizar um diagnóstico presumível para diferentes formas de Talassemia, porém, em muitos outros casos, há a necessidade de um diagnóstico definitivo, implicando na avaliação da alteração através da análise do DNA<sup>(20)</sup>.

A talassemia alfa pode ser confundida com outras causas de anemia em razão de características hematológicas similares. Microcitose e hipocromia, oriundas da redução do VCM e do HCM respectivamente, são alterações observadas também nas anemias por deficiência de ferro. Desse modo, é possível que o manejo de ferro seja, por vezes, equivocadamente ministrado aos pacientes acarretando consequências sistêmicas tardias<sup>(22)</sup>.

Ao passo que ocorre a ministração de ferro ao paciente talassêmico de modo indiscriminado, os indivíduos são passíveis de receber dosagens desse composto por longos períodos, podendo apresentar quadros de cirrose e insuficiência hepática, além de consequências endócrinas como a *diabetes mellitus*, hipotireoidismo (pelo acúmulo de ferro nas células beta-pancreáticas), hipogonadismo hipogonadotrófico e hipotireoidismo. Ainda assim, a cardiomiopatia ainda é a consequência mais letal no quadro de acúmulo de ferro e os parâmetros relacionados à insuficiência cardíaca fulminante são apresentações geralmente rápidas e irreversíveis<sup>(30)</sup>.

Distinguir regiões de controle, compreender a estrutura e a função dos genes promotores da hemoglobina, compreender as consequências fenotípicas de ativação de novos *íntrons* e *éxons* e identificar mutações de terminação de cadeias são exemplos de pontos importantes que refletem o avanço que a pesquisa traz no contexto do estudo das hemoglobinopatias. É notório que novas tecnologias surjam e sejam utilizadas para aprimorar e determinar de forma ainda mais rápida o diagnóstico das Talassemias<sup>(37)</sup>.

### **1.3.5 Talassemia Alfa e Associações**

No Brasil, estima-se que 5 a 6% da população seja portadora do gene de  $\beta^s$ , correlacionado à Anemia Falciforme. Em alguns casos é possível observar simultânea associação da Anemia Falciforme com a TA, configurando em um quadro clínico mais brando, reduzindo a concentração de HbS nos eritrócitos e amenizando sua polimerização; o que diminui a fragilidade mecânica da hemácia, consequentemente reduzindo a intensidade de hemólise<sup>(33, 38)</sup>.

Além disso, atesta-se um caráter de proteção para essa relação, aumentando os níveis de hemoglobina e diminuindo episódios de dor. Apesar de não haver estudo que comprove a maior sobrevida em pacientes portadores dessa associação em comparação com os portadores apenas do traço falciforme, observou-se melhora no desempenho cardiovascular em atletas portadores dessas alterações, quando juntas<sup>(39)</sup>.

Como citado anteriormente, existem diversas razões para que as distribuições de diferentes alterações das cadeias de globina ocorram com alta frequência. A Seleção Natural, casamentos consanguíneos (praticado em muitos locais onde as hemoglobinopatias são comuns) e a deriva gênica, servem como exemplo para tentar explicar a prevalência. Uma evidência bastante pertinente é a proteção contra a malária (*Plasmodium falciparum*), em indivíduos portadores de TA<sup>(18)</sup>.

Discute-se uma associação entre a TA e a Malária, sugerindo certa vantagem aos indivíduos homocigotos ou heterocigotos para a deleção. Essa característica tem ampliado um campo de investigação no acometimento da infecção, justificando os indivíduos talassêmicos estarem presumivelmente em vantagem seletiva em áreas onde a malária (especialmente provocada por *P. Falciparum*) é ou foi endêmica<sup>(40)</sup>.

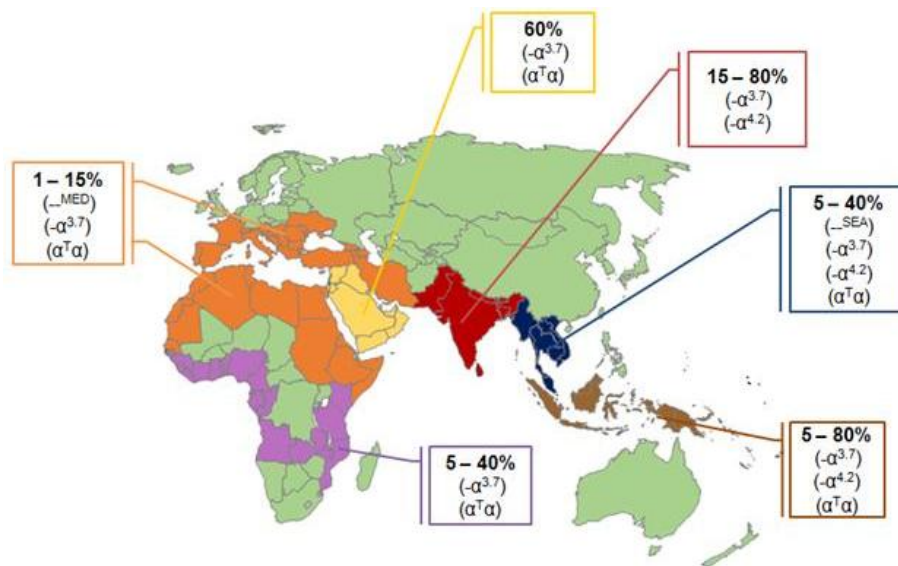
Apesar de estudos levantados acerca dessa interação, pouco se sabe sobre como a TA pode resultar nessa proteção, e, além disso, se é possível que isso ocorra em todas as formas de apresentação da doença. Acredita-se que a TA proteja contra o desenvolvimento da malária grave, entretanto, sem interferir na parasitemia. Mecanismos como a parada na maturação do esquizonte, respostas do sistema complemento e o aumento na fagocitose de eritrócitos infectados são algumas estratégias associadas<sup>(41,42)</sup>.

O indivíduo portador de TA ( $\alpha^+$  ou  $\alpha^0$ ), em alguns casos, ao ser acometido pela malária, apresenta características eritrocitárias que culminam com a inibição à formação de 'rosetas' (aderência de células infectadas e não infectadas com formação de agregados celulares que interferem na microcirculação), o que implica na expressão patogênica da doença. As hemácias talassêmicas infectadas estimulam uma maior ligação de anticorpos que, por sua vez, intensificam a resposta neoantigênica, reforçando o reconhecimento imunológico e a eliminação do parasita<sup>(43,44)</sup>.

### 1.3.6 Epidemiologia da Talassemia Alfa

Amplamente distribuída, a TA é encontrada frequentemente em regiões tropicais, sendo especialmente comum em regiões do Sudeste da Ásia, no Subcontinente Indiano, na África e no Oriente Médio. A deleção  $-\alpha^{3.7}$  é a mais prevalente, com frequências elevadas de 70% a 90% em regiões como Ilhas da Melanésia e o Nepal, respectivamente. As Talassemias  $\alpha^0$  são mais frequentes e restritas ao Sudeste Asiático e poucas regiões mediterrâneas, como observado na Figura 6<sup>(26,45)</sup>.

**Figura 6** – Distribuição geográfica da TA com elevada prevalência. Adaptado de Nunes et al., 2017<sup>(45)</sup>.



A frequência de pessoas que se deslocaram entre continentes nos últimos séculos aumentou bastante, principiando desde africanos levados à América do Norte e Sul, à colonização de países europeus; entre refugiados vietnamitas, à mais recente crise na Síria – que encaminhou cerca de um milhão de pessoas do Oriente Médio através da Turquia para a Europa e as Américas. Todos esses indivíduos provêm de áreas com elevada incidência de talassemia, podendo mudar a uma nova diversidade de mutações que não são comumente vistas em sua população local<sup>(46)</sup>.

No Brasil, em razão da migração de pessoas oriundas de países com relevante prevalência dessa alteração, observa-se significativa frequência nos casos de hemoglobinopatias. Os primeiros relatos da TA no país surgiram no ano de 1970, uníssono ao desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de Biologia Molecular, onde informações relativas à localização e organização dos genes alfa obtiveram sucesso ao serem elucidadas. Diversos estudos comprovam que as hemoglobinopatias são problemas de saúde pública, sendo extremamente relevante a realização de aconselhamento genético, triagem, acompanhamento neonatal e a investigação da TA no país<sup>(2)</sup>.

Na região Nordeste, especificamente em Salvador, um estudo realizado através da análise de sangue de cordão umbilical avaliou a prevalência da TA em recém-nascidos. Ao total, as amostras de 514 recém-natos foram submetidas às análises. A deleção  $-\alpha^{3.7}$  foi confirmada em 114 (22,2%) indivíduos<sup>(47)</sup>.

No mesmo estado, 53 gestantes foram submetidas a um estudo de frequência da TA  $-\alpha^{3.7}$ . Desse total, 41 (77%) apresentavam traço de hemoglobina C (AC), e, dentre

esse grupo, 12 (23%) gestantes eram portadoras da Talassemia, sendo 11 (21%) heterozigotas e 1 (2%) homozigota. As demais gestantes caracterizadas como normais (AA), 12 (23%) foram heterozigotas para a alteração  $-\alpha^{3.7(48)}$ .

Ainda em Salvador, outro estudo compreendendo 400 pacientes portadores de Anemia Falciforme atendidos no Centro de Referência da Doença Falciforme de Itabuna-Bahia e no HEMOBA (Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia) encontrou 9% (36/400) de frequência para a TA  $-\alpha^{3.7}$ ; sendo, desse total, 12,5% (4/32) pacientes homozigotos ( $-\alpha/-\alpha$ ) e 87,5% (28/32) heterozigotos ( $-\alpha/\alpha\alpha$ )<sup>(49)</sup>.

No Rio Grande do Norte, um estudo realizado com 319 indivíduos com microcitose e hipocromia demonstrou que 32%, cerca de 105 pessoas, eram portadoras de TA  $-\alpha^{3.7}$ . Dentre esses últimos, 93 (29,1%) eram heterozigotos e 12 (3,8%) eram homozigotos<sup>(50)</sup>. Um outro estudo compreendendo uma população de 620 indivíduos residentes do mesmo estado, a prevalência da TA  $-\alpha^{3.7}$  encontrada foi 11,2%, sendo 11,1% na forma heterozigótica e 0,1% na homozigótica<sup>(51)</sup>.

Em Belém do Pará, 220 pacientes atendidos no Hospital Municipal de Santarém participaram de um estudo cujo objetivo era estimar a frequência da TA nessa população. Do total, 12,7% (28) eram heterozigotos para a deleção  $-\alpha^{3.7}$  e apenas 1 (0,5%) foi caracterizado como homozigoto para a mesma alteração<sup>(52)</sup>.

Na região Sudeste, em São Paulo, a prevalência aumenta em indivíduos com microcitose e hipocromia, mesmo sem anemia. Dos 169 pacientes ambulatoriais do Hospital Universitário da UNICAMP apresentando as características supracitadas, aproximadamente 49,9% deles apresentavam a Talassemia. Cerca de 145 (42,8%) eram heterozigotos para a alteração  $-\alpha^{3.7}$ , 18 (5,3%) homozigotos  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ , 5 (1,5%) eram heterozigotos para a alteração não-deleccional ( $-\alpha^{\text{Hphl}}/\alpha\alpha$ ) e 1 (0,3%) era portador da alteração  $-\text{MED}^{(22)}$ . Outro estudo realizado em São Paulo, na UNESP, aplicou testes para diagnóstico da TA em 1.002 amostras de indivíduos que apresentavam traço falciforme (AS). Desse total, em 16 (1,59%) foram determinadas a interação AS/Alfa Talassemia<sup>(53)</sup>.

Em Belo Horizonte, Minas Gerais, um estudo da prevalência da TA  $-\alpha^{3.7}$  para uma população de crianças portadoras de Anemia Falciforme atendidas no Hemocentro de Minas Gerais (HEMOMINAS) foi de 29,9%<sup>(54)</sup>.

No Rio de Janeiro, a frequência da TA em profissionais e trabalhadores da FIOCRUZ no município foi estimada em 0,7% para a deleção  $-\alpha^{3.7}$ . Ou seja, de 2.190 amostras analisadas, 16 destes tinham a alteração<sup>(55)</sup>.

Na região Centro-Oeste, um estudo envolvendo 404 alunos da Universidade Católica de Goiás observou que 5,2% destes eram heterozigotos para TA  $-\alpha^{3.7}$ , cerca de 2,2% apresentavam heterozigose para Hemoglobina S e outros 1% em heterozigose para Hemoglobina C<sup>(56)</sup>.

Na região Sul, um estudo realizado no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário da UFPR compreendendo 156 crianças, demonstrou frequência de 9,5% para a TA  $-\alpha^{3.7}$ , sendo 5 heterozigotos e 1 homozigoto<sup>(57)</sup>.

Outro estudo visando estimar a frequência da TA em indivíduos portadores de anemia microcítica não ferropênica, foi realizado com a população atendida no Hospital das Clínicas de Porto Alegre. A TA foi confirmada em 15 (25,9%) amostras<sup>(58)</sup>.

Ainda no Sul do país, pacientes portadores de anemia falciforme atendidos pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Estado do Rio Grande do Sul, 110 indivíduos foram submetidos à confirmação diagnóstica para TA  $-\alpha^{3.7}$ , encontrando-se uma frequência de 14% nas amostras analisadas<sup>(59)</sup>.

Desta forma, a talassemia alfa é considerada um caso de saúde pública, e nosso estudo ajudará no conhecimento por parte dos profissionais de saúde e principalmente dos portadores, para uma condução de acompanhamento e tratamento correto, além de favorecer melhor seu quadro clínico.

Uma das graves consequências aos indivíduos com talassemia alfa é a sobrecarga de ferro por suplementação errônea e desnecessária desse composto, principalmente naqueles homozigóticos. Um tratamento prolongado de aporte de ferro sem a necessidade correta, pode levar ao acúmulo de ferro (hemocromatose secundária) cursando com dano sistêmico, exigindo condutas das quais o paciente não necessitaria caso houvesse o diagnóstico correto.

Apesar da importância clínica e demográfica da talassemia alfa no Brasil, infelizmente o Estado do Amazonas não dispõe de estudos genético-epidemiológicos em seus laboratórios e hospitais públicos, bem como de pesquisas científicas com bibliografia indexada publicada que caracterize epidemiologicamente e fenotipicamente esses paciente

Além disso, apesar de não ser nosso foco do trabalho, a cidade de Manaus, possui endemia para a doença “malária”, com trabalhos na literatura mundial demonstrando a talassemia alfa como um fator que pode modificar a gravidade da doença, tanto para menor como para maior. Tal observação motiva ainda mais esta investigação, uma vez que o conhecimento desses processos permite a criação de estratégias efetivas de

prevenção, controle e tratamento dessa doença específica, podendo contribuir para o avanço na qualidade de vida dos grupos populacionais envolvidos, além do conhecimento dos polimorfismos genéticos na população brasileira. Desta forma, acreditamos que o conhecimento da patologia especialmente por parte dos portadores, implica em maior atenção relacionada ao aconselhamento genético, bem como todos os cuidados necessários para conduzir o acompanhamento do tratamento.



## **2. OBJETIVOS**

Identificar a prevalência da talassemia alfa deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  na cidade de Manaus e nas demais que compõem parte de sua Região Metropolitana.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Determinar a frequência das talassemias  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  da capital, Manaus, e das cidades de Coari, Manacapuru, Iranduba, Presidente Figueiredo e Itacoatiara;
- II. Caracterizar os parâmetros hematológicos (WBC, RBC, Ht, VCM, HCM, CHCM, e RDW), Ferritina e Ferro séricos de cada população;
- III. Avaliar a associação dos genótipos da talassemia alfa com os parâmetros hematológicos, Ferritina e Ferro séricos de cada população.
- IV. Estimar a frequência das talassemias  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  em doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas/Manaus;

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 Casuística**

No período de janeiro de 2014 a dezembro de 2017 foram coletadas amostras de sangue de indivíduos, de ambos os sexos, que se dirigiram aos Hospitais, Laboratórios ou Unidades Básicas de Saúde dos municípios compreendidos neste estudo para realização de consultas e exames, bem como doadores de sangue que compareceram à Fundação HEMOAM.

De acordo com as cidades compreendidas na Região Metropolitana de Manaus selecionadas para o projeto, um total de 1809 indivíduos participaram do estudo, sendo coletados 232 (12,8%) amostras em Iranduba no Hospital Hilda Freire, 301 (16,6%) em Itacoatiara no Laboratório Central de Itacoatiara, 287 (15,9%) em Manacapuru no Hospital Lázaro Reis, 370 (20,5%) em Presidente Figueiredo no Hospital Geral Eraldo Neves Falcão e 356 (19,7%) na capital, Manaus, compreendendo os ambulatórios dos Hospital Universitário Getúlio Vargas e Hospital Francisca Mendes. Apesar de não pertencer à RMM, a cidade de Coari foi incluída no estudo em razão da possibilidade de abrangência da coleta na localidade, com 263 (14,5%) amostras oriundas do Hospital Dr. Odair Carlos Geraldo.

No mesmo período supracitado, este grupo de estudo realizou a coleta de 989 amostras de doadores de sangue na Fundação HEMOAM. Todos os indivíduos aptos à doação foram inclusos no trabalho.

Foram incluídas no estudo as amostras de indivíduos não aparentados, naturais somente da Região do Estado do Amazonas. Os critérios de exclusão deram-se aos indivíduos cujas amostras coletadas não foram suficientes para a realização dos testes. Além desses; menores de 18 anos, gestantes, transfundidos nos últimos três meses e portadores de patologias onco-hematológicas e/ou hospitalizados também foram excluídos ou não coletados.

O tamanho amostral foi estabelecido por demanda espontânea (ou por conveniência), permitindo uma abordagem sem agendamento prévio, além de aleatória. Foi adotado o mínimo de 1500 indivíduos para o estudo. O processo amostral foi realizado em duas etapas: inicialmente as amostras de sangue foram coletadas na cidade de Manaus e finalizadas nas cidades circunvizinhas, já citadas neste trabalho.

O projeto foi apresentado individualmente aos participantes e os mesmos previamente esclarecidos sobre os procedimentos adotados e a finalidade do trabalho. As

coletas foram realizadas apenas após a concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este projeto enquadra-se subprojeto de três trabalhos maiores aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas, baseando-se na Plataforma Brasil pelos pareceres a seguir supracitados:

**3.1.1** N° 834.086, CAEE 30668114.0.0000.5020 “Estudo das Hemoglobinopatias Estruturais e de Síntese na Região Metropolitana de Manaus-Amazonas.” (ANEXO A).

**3.1.2** N° 213.167, CAAE: 01193312.4.0000.0009 “Estudo do Impacto nas Rejeições Imune em Terapia Celular dos Sistemas Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton e Gerbich” (ANEXO B)

**3.1.3** N° 1.178.117, CAAE: 46020315.4.0000.5020 Mapeamento Genético Em Pacientes Portadores De Doenças Cardiovasculares (ANEXO C)

Ao que tange às responsabilidades éticas uníssonas à Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, como supracitado, este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética da Instituição sob caráter de adendo no projeto intitulado como Estudo do impacto nas rejeições imunes da terapia celular do sistemas Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton e Gerbich no Hemocentro do Amazonas e aprovado sob parecer n° 213.167, CAAE: 01193312.4.0000.0009 (ANEXO B).

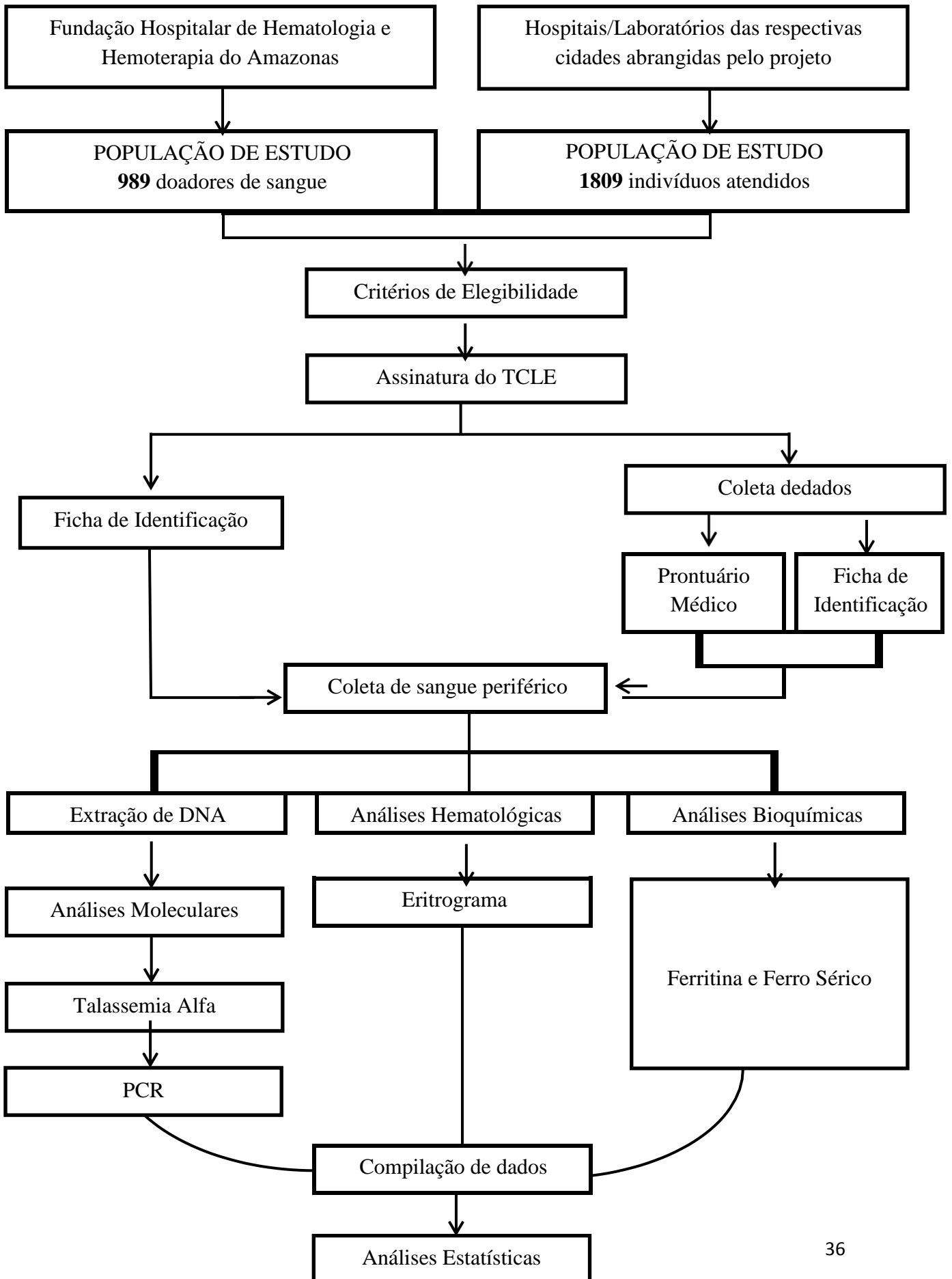
Todo o trabalho foi desenvolvido de acordo com os critérios da Regulamentação de Bioética no Brasil, Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e Resolução Complementar<sup>(60)</sup>. Os experimentos seguiram as normas de Biossegurança de acordo com a Lei n°. 11.105 de março de 2005, seguindo as normas técnicas existentes no manual de biossegurança da FIOCRUZ (Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ)<sup>(61)</sup>.

Durante o período de estudo e coletas, as amostras ficaram sob responsabilidade do Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, mantidas de acordo com os critérios da resolução CNS 347/2005, devidamente etiquetadas com código numérico garantindo o sigilo e a confidencialidade do doador, bem como a possibilidade de contato com o mesmo.

Todas as informações obtidas através das análises das amostras coletadas permanecem sob sigilo e só possuem acesso às mesmas a equipe clínica e pesquisadores. Quaisquer indivíduos ou responsáveis que não autorizassem sua participação ou de seu

relativo no presente estudo, não tiveram sua amostra e dados incorporados ao banco, sendo devidamente excluídos.

Figura 7 – Fluxograma das atividades realizadas durante todo o desenvolvimento do projeto.



- **Financiamento**

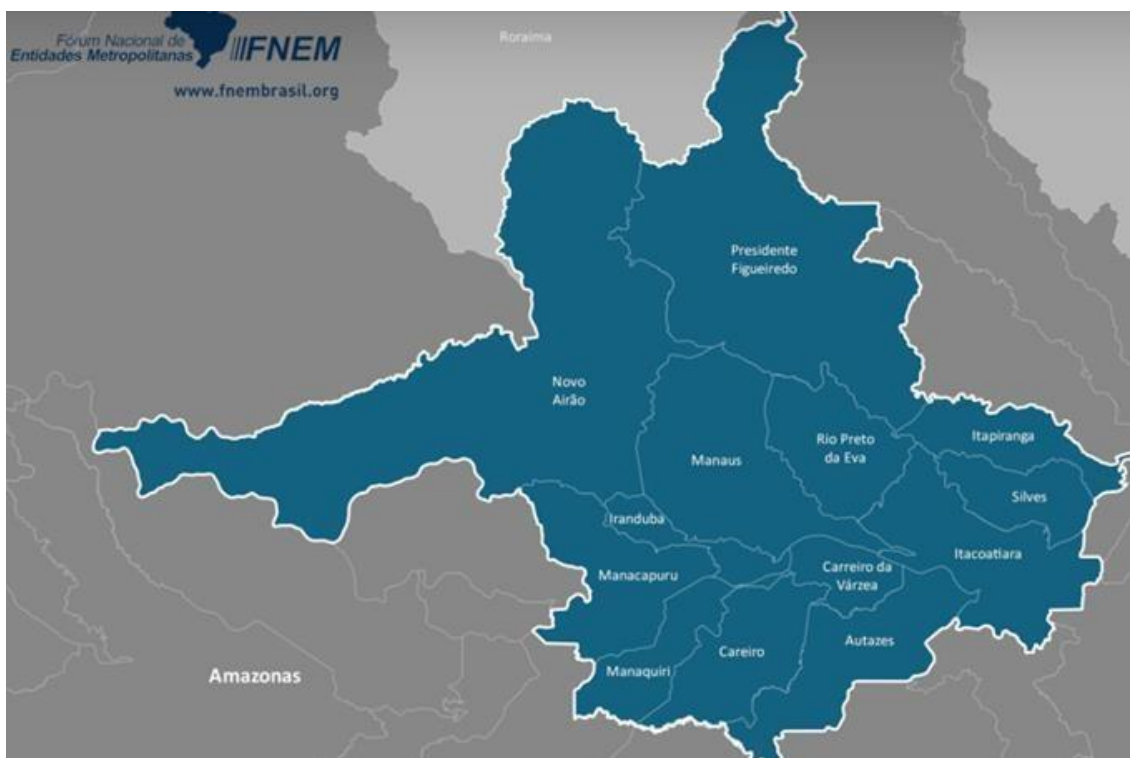
O Projeto foi submetido e aprovado no Programa de Pesquisa para o PPSUS no edital PPSUS de nº 001/2013. Decisão 287 de 2/12/2013. Trata-se, porém, de um subprojeto do Projeto “Estudo das Hemoglobinopatias Estruturais e de Síntese na Região Metropolitana de Manaus-Amazonas”.

- **A Região Metropolitana de Manaus**

A Região Metropolitana de Manaus foi instituída pela Lei Complementar nº 59, de 27 de dezembro de 2007. Atualmente, segundo a Secretaria de Estado e Desenvolvimento da RMM, essa região compreende 13 (treze) municípios em uma área de cerca de 127.287 km<sup>2</sup> (Figura 8). Segundo o IBGE, a estimativa para a quantidade de habitantes em cada uma das cidades que compõem a região é de 2.145.444 em sua capital, Manaus; 47.571 em Iranduba; 18.974 em Novo Airão; 18.974 em Careiro da Várzea; 32.001 em Rio Preto da Eva; 99.854 em Itacoatiara; 35.352 em Presidente Figueiredo, 96.236 em Manacapuru, 38.830 em Autazes, 37.384 em Careiro, 9.064 em Itapiranga, 31.147 em Manaquiri, e 9.110 em Silves, perfazendo um total de 2.631.239 pessoas que habitam essa região<sup>(62,63)</sup>.

De acordo com a Lei supracitada, o intuito em estabelecer o processo de integração da região adveio do interesse na co-gestão entre poderes públicos através da execução de obras e serviços, formulação de programas e planos cujo compartilhamento intergovernamental existisse e assim fossem firmados.

**Figura 8** - Mapa da Região Metropolitana do Amazonas (63).



### **3.2 Obtenção das Amostras**

As amostras de sangue periférico foram coletadas através de punção venosa.

Aproximadamente 8ml colhidos e distribuídos em tubos estéreis de modo que:

- 4ml em tubo contendo como anticoagulante o EDTA (ácido etileno de aminotetracético di-sódico - concentração de 1,5mg/ml) para realização do hemograma e posterior extração de DNA genômico;
- 4ml em tubo sem aditivo anticoagulante para análises bioquímicas.

### **3.3 Análises Hematológicas e Bioquímicas**

Imediatamente após a coleta de sangue, as determinações hematológicas foram realizadas em analisador automatizado - Pentra XL/ABX 80 Horiba® (Horiba Diagnostic Montpellier - France) e as dosagens bioquímicas em equipamento também automatizado Bioclin 3000.

No contexto da avaliação hematológica, todos os hemogramas foram realizados através do princípio de impedância e, posteriormente, seguiu-se a extração de DNA nuclear. Apesar dos parâmetros disponibilizados pelo equipamento, este trabalho

compilou apenas informações do Eritrograma e dos Leucócitos. As análises, quando possível, foram realizadas nas respectivas unidades de saúde e hospitais na qual as coletas foram efetuadas. Não havendo essa possibilidade, os hemogramas foram imediatamente encaminhados ao laboratório de Hematologia da Fundação HEMOAM para execução do procedimento.

As análises bioquímicas incluíram dosagens do Ferro Sérico e Ferritina. Todas as dosagens foram processadas em aparelho automatizado Bioclin® 3000 (Bioclin/Quibasa) de acordo com a especificação do fabricante. De modo semelhante aos hemogramas, as análises bioquímicas, quando possível, foram realizadas nas respectivas unidades de saúde na qual as coletas foram realizadas. Não havendo a possibilidade, o material foi imediatamente centrifugado e congelado, em seguida, encaminhado ao laboratório de Bioquímica da Fundação HEMOAM sendo descongelado uma única vez para realização dos testes. Ressalta-se que todos os aparelhos supracitados apresentavam calibração adequada e padronização sob controles de qualidade interno e externo vigentes.

### **3.4 Extração de DNA**

A extração do DNA foi realizada pelo *kit BIOPUR Extração Mini Spin Plus®* (Curitiba, PR), seguindo as recomendações do fabricante. Duzentos microlitros ( $\mu\text{l}$ ) de sangue total, colhidos previamente em EDTA, foram adicionados com 25  $\mu\text{l}$  de Proteínase K em microtubo de centrifugação (1,5 mL) estéril. Após, foi adicionado o Tampão de Lise e homogeneizado vigorosamente em vórtex, seguindo de incubação a 56°C por 15 minutos. No próximo passo, o processo de lavagem ocorreu adicionando tampão específico contendo etanol. A transferência para os Tubos de Coleta com Filtrado ocorre duas vezes, na primeira com adição da Solução de Lavagem SI e, após centrifugação, adicionada Solução de Lavagem SII. O tampão de Eluição é previamente aquecido a 56°C e a centrifugação final ocorre durante 1 minuto a 11.000 x g (mini centrífuga KASVI, TecLab). A solução de DNA obtida foi armazenada em -20°C até a realização das análises. Todas as extrações e passos seguintes dos processos de Biologia Molecular foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas sob os cuidados do Professor José Pereira de Moura Neto.



### 3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Identificação da TA - $\alpha^{3.7}$ e - $\alpha^{4.2}$

A caracterização molecular da - $\alpha^{3.7}$  foi investigada por meio da técnica da PCR de acordo com BAYSAL (1994)<sup>(64)</sup>, utilizando os primers A (5'-CTTTCCTACC CAGAGCCAGGTT-3') - *forward*, B (5'-CCCATGCTGGCACGTTTCTGAGG-3') - *reverse* e C (5'-CCATTGTTGGCACATTCCGGGACA-3') - *reverse*; que flanqueia e amplifica o fragmento mutante (A + B) e promove o mesmo com a sequência normal (A + C). A identificação da deleção e a determinação do genótipo ocorreu a partir da amplificação de fragmentos de 1,8 kb para a identificação de deleções e genes normais, respectivamente. Já a - $\alpha^{4.2}$  foi investigada pela técnica de Multiplex-PCR, utilizando os três primers E (5'-CCGGTTACCCATGTGGTGCCTC-3') - *forward*, F (5'-CCCTGGG TGTCCAGGAGCAAGCC-3') - *reverse* e G (5'-GGCACATTCCGGGACAGAG AGAA-3') - *reverse*, em um único tubo. O diagnóstico da deleção foi confirmado pela presença de um fragmento de 1,762 kb para a identificação dos portadores, enquanto para indivíduos normais o fragmento não amplifica, amplificando como controle interno da reação um fragmento de 228 pb<sup>(65)</sup>.

A reação foi realizada em tampão contendo 15mM de solução de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>); 25mM de MgCl<sub>2</sub>; 200mM de dCTP + dGTP e 100mM de dATP + dTTP de mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs); 5x Q-solution; 10x CoralLoad concentrado; 0,25 $\mu$ l de cada primer; 5U da enzima Taq DNA polimerase (Platinum Taq, Life Technologies, Gaithersburg, MD) e 2,5  $\mu$ l de DNA, em volume final de 25 $\mu$ L.

### 3.6 Eletroforese dos Produtos da PCR

Para visualização dos fragmentos amplificados, alíquotas de 15  $\mu$ l do produto da PCR foram misturados a 1,0  $\mu$ l de tampão da amostra (Azul de Bromofenol) e aplicados ao gel de Agarose a 1% (já contendo a solução de brometo de etídeo). Tampão TAE 1x é acrescido e submetido à corrida eletroforética (100V/200A) por 60 minutos. Em cada gel de eletroforese foi aplicado 5 $\mu$ L do padrão de tamanho molecular (Ladder Ludwig Biotec), para determinação do tamanho do fragmento amplificado. Em seguida, a exposição à luz UV e foto documentação foram realizados através do ENDURO<sup>TM</sup> GDS Gel Documentation System.

### **3.7 Análises Estatísticas**

Os dados dos questionários e dos resultados obtidos dos experimentos realizados serão analisados estatisticamente em banco de dados gerado no SPSS versão 19 e Graph pad Prism 5.0 (Graphpad Software, San Diego, CA-USA) de acordo com o tipo de variável. A partir desta informação poderá ser usado o teste paramétrico ANOVA ou não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo os resultados confirmados pelo pós-teste de Bonfferoni. A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos será realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Os valores de  $P < 0,05$  serão considerados significativos para as análises realizadas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Artigo 1

#### PREVALENCE OF ALPHA THALASSEMIA $-\alpha^{3.7\text{kb}}$ and $-\alpha^{4.2\text{kb}}$ DELETION IN INDIVIDUALS FROM CITIES IN THE METROPOLITAN REGION OF MANAUS – AMAZONAS

Fernanda Cozendey Anselmo<sup>1,2</sup>, Cleidiane de Aguiar Ferreira<sup>2</sup>, Flora Maia Viga Sobrinha<sup>2</sup>, Ana Caroline Santos Castro<sup>2</sup>, Marilda de Souza Gonçalves<sup>3</sup>, Rafael Oliveira Brito<sup>2</sup>, José Pereira de Moura Neto<sup>1,2</sup>

1 Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

2 Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus, Amazonas, Brasil.

3 Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brasil.

**\*Address correspondence to:**

José Pereira de Moura Neto, Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Avenida General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 - Coroadó I, Manaus - AM, 69067-005, phone + 55-92-3305-1181- R:2007 or [jp-mn@hotmail.com](mailto:jp-mn@hotmail.com)

**Sponsorships:**

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – Processo: 1094/2013-FAPEAM.

## ABSTRACT

Alpha Thalassemia is a heterogeneous group of hereditary alterations caused by deletions that affect alpha ( $\alpha$ ) regulatory genes and promote imbalance in the quantitative content of globins. The 3.7 Kb deletion is the most frequent worldwide. In Brazil, the prevalence varies between 20 and 35%, depending mainly on race, being more predominant in Afro-descendants. Molecular characterization of  $\alpha$ -thal, comprising deletions  $-\alpha^{3.7}$  and  $-\alpha^{4.2}$ , estimating their frequency in individuals from the metropolitan region of Manaus-Amazonas. In the period between 2014 a 2017 blood samples were collected of the adult's individuals (> 18 years old) of both genders, from hospital and/or health centers each city. Genotyping of the  $\alpha$ -thalassemia 3.7kb deletion was performed by ASO-PCR, while 4.2kb deletion by Multiplex-PCR. The studied population sample was composed beginning in the capital, 356 (19.7%) samples, 232 (12.8%) Iranduba, 287 (15.9%) in Manacapuru, 370 (20.5%) in Presidente Figueiredo, 301 (16.6%) in Itacoatiara and 263 (14.5%) in Coari. A total of 1809 samples were collected, of which 760 (42%) were male subjects and 1049 female (58%). The mean age among males was  $35.3\pm 14.78$  years and  $36.7\pm 14.95$  for females. The Alpha Thalassemia found was only  $-\alpha^{3.7}$  deletion, identified in 143 individuals (7.9%) of the total (6% heterozygotes and 1.9% homozygous). The associations analyze among the  $\alpha$ -thal genotypes were statistically significant among all parameters hematological (<.001), except serum Iron and serum Ferritin analyses between carrier's  $\alpha$ -thal. Individuals with microcytosis (MCV <80 fL), a total of 158 was found. The prevalence of the 7.9% corroborate with others Brazilians studies. The present study demonstrates the importance and relevance to performed of genetic anemia diagnostic in region Amazonia, principally as an important test for differential diagnosis, especially among iron deficiency anemia.

## INTRODUCTION

Alpha thalassemia ( $\alpha$ -thal) is characterized by the reduction or absence of  $\alpha$ -chain production. First described in the 1950s, its genetic structure was elucidated only 20 years later, with the evaluation of the four genes encoding alpha chains ( $\alpha 2\alpha 1/\alpha 2\alpha 1$ ), located on chromosome 16. From that moment on, it was possible to classify the different forms of presentation and severity of  $\alpha$ -thal due to the deletion of one or more gene <sup>(1)</sup>.

Widely distributed, this deletion is often found in tropical regions, and is especially common in regions of Southeast Asia, the Indian Subcontinent, Africa, and the Middle East. Deletion  $-\alpha^{3.7\text{ Kb}}$  is the most prevalent, with frequencies rising from 70% to 90% in regions such as the Melanesian Islands and Nepal, respectively <sup>(2)</sup>. Considered as a hereditary alteration of an autosomal recessive pattern, its involvement is due to the deletion of one or more alpha genes, with the reduction of alpha globin chains and consequent modification of the function of the hemoglobin molecule. The degree of severity varies exactly by the number of genes involved and may range from an asymptomatic individual to a life-incompatible condition <sup>(3)</sup>.

The nomenclature also determines the classification of  $\alpha$ -thal-1 ( $\alpha^0$ ) when it is possible to observe a deletion that removes both  $\alpha$  genes from a single chromosome - being the most common forms presented,  $--^{SEA}$ ,  $--^{FIL}$ ,  $--^{MED}$  and  $--^{THAI}$ . The  $\alpha$ -thal-2 ( $\alpha^+$ ) comprises the deletion of only one of the four  $\alpha$ -globin genes, being the most frequent form of presentation of the deletion, whose alterations  $-\alpha^{3.7}$  and  $-\alpha^{4.2}$  are the most prevalent and common throughout the world <sup>(4)</sup>.

The last ones, the recombination between misaligned homologous chromosomes alters the organization of the HbA2 and HbA1 genes, leading to the production of a hybrid HbA2/HbA1 gene, in addition to culminating with a deletion of 3.7kb DNA in Thalassemia  $-\alpha^{3.7}$  and a deletion of 4.2kb of DNA in Thalassemia- $\alpha^{4.2}$  <sup>(5)</sup>.

It is possible to determine the clinical severity of individuals with  $\alpha$ -thal from the number of genes affected and their consequent loss of function. Thus, at the molecular level, the partial ( $\alpha^+$ ) or total ( $\alpha^0$ ) deletion of an alpha gene is expressed differently. Heterozygous carriers usually present milder symptoms but need to be differentiated between subtle anemia, microcytic-hypochromic anemia, refractory or iron deficient anemia. On the other hand, the homozygous form accompanies signs between moderate and severe such as hemolytic anemia <sup>(6)</sup>.

From a single deletion of the alpha genes ( $-\alpha/\alpha$ ) we determined the silent carrier, the most frequent characteristic of the alteration. The individual with the Heterozygous Thalassemic Trait is asymptomatic - clinically and hematologically normal or associated with subtle microcytic and hypochromic with normal hemoglobin A2 and Fetal hemoglobin <sup>(7)</sup>.

The alpha thalassemic Homozygous ( $-\alpha/-\alpha$ ) trait and the alpha thalassemic Heterozygous ( $-\alpha/\alpha$ ) trait correspond to the inactivation of two alpha genes that may not express symptoms in some cases, in others, hemoglobin levels may be borderline with discrete hypochromia and microcytosis, and it is important that to avoid inappropriate iron supplement <sup>(8)</sup>.

Hemoglobin H disease ( $-\alpha$  or  $\alpha^0/\alpha^+$  interaction) occurs due to the inactivation of three alpha genes, either by deletion or non-deletion. The considerable decrease of alpha chains leads to intense microcytosis and hypochromia. Patients may have severe hemolytic anemia requiring transfusion in addition to fever and infections. This condition can lead to retarded growth during childhood and, in adults, the chances of iron overload due to recurrent transfusions - culminating with liver, endocrine and cardiac damage are high <sup>(9)</sup>.

Deletion of the four alpha ( $--/--$ ) globin chains results in Fetal Hydrops by Bart's Hemoglobin. This condition arises from the absence of synthesis of Fetal Hemoglobin ( $\alpha_2\gamma_2$ ), due to the total lack of alpha globin chains. Thus, globin  $\gamma$  tetramers are formed being unable to release oxygen to tissues (due to their high oxygen attraction). Unfortunately, the consequences of Bart's hemoglobin are quite severe, characterized by ineffective erythropoiesis together with extramedullary hematopoiesis <sup>(10)</sup>.

Widely distributed, the frequency of  $\alpha$ -thal is directly linked to the constant displacement of people between continents in recent centuries, which in turn has increased greatly. From Africans taken to North and South America, to the colonization of European countries, among Vietnamese refugees, to the latest crisis in Syria - which has sent about a million people from the Middle East through Turkey to Europe and the Americas. All these individuals come from areas with a high incidence of thalassemia and it is envisaged that recipient countries may have. A new generation of thalassemia at all levels of disease and may face a new diversity of mutations that are not commonly seen in their local population <sup>(11)</sup>.

In Brazil, due to the migration of people from countries with relevant prevalence of this alteration, a significant frequency is observed in cases of hemoglobinopathies. The

first reports of  $\alpha$ -thal in the country began in the year 1970, in unison to the emergence and improvement of Molecular Biology techniques, where information regarding the location and organization of alpha genes was elucidated. Several studies have shown that hemoglobinopathies are a public health problem, and genetic counseling, screening, neonatal follow-up and  $\alpha$ -thal research in the country are extremely relevant <sup>(12)</sup>.

The aim of this study was to determine the frequency of thalassemia alpha - $\alpha^{3.7}$  and - $\alpha^{4.2}$  in individuals living in the Manaus, Capital of Amazon State, and from cities inside within metropolitan region of Manaus – Amazonas, besides characterizing the hematological parameters, serum ferritin and serum iron of each population and to evaluate its association.

## **MATERIALS AND METHODS**

In the period between 2014 a 2017 a total of 1809 blood samples were collected of the adult's individuals (> 18 years old) of both genders, from hospital and/or health centers each city. Reference health centers to Manaus.

The studied population sample was composed with individuals from the cities Manaus, Coari, Manacapuru, Iranduba, Presidente Figueiredo and Itacoatiara. In Iranduba City, samples of individuals attended were collected at Hospital Hilda Freire ambulatory, in Manacapuru no Hospital Lázaro Reis ambulatory, in Presidente Figueiredo no Hospital Geral Eraldo Neves Falcão ambulatory, in Itacoatiara no Central of Laboratory and Coari city at the Hospital Odair Carlos Geraldo ambulatory.

This work was approved by the Ethics in Research Committee (CEP) of the Federal University of Amazonas, based on the Brazil Platform in three projects

- N° 834.086, CAEE 30668114.0.0000.5020

- N° 213.167, CAAE: 01193312.4.0000.0009

- N° 1.178.117, CAAE: 46020315.4.0000.5020

All the samples of unrelated individuals, natural or not from the State of Amazonas, were included in the study. Samples withdrawn or excluded were from the study subjects under 18 years of age, transfused in the last three months and patients with onco-hematological and/or hospitalized conditions.

Peripheral blood samples were collected in vacutainer blood collection tubes, being 3 ml in tube containing as anticoagulant EDTA to perform the Hemogram and

genomic DNA extraction and 3 ml in tube without anticoagulant additive for serum ferritin and serum iron dosages.

As soon blood collection, all hematological analyzes were performed at the respective Health Centers, Hospitals or associated laboratories of the respective study cities. On cases of impossibility of immediate analyses, the blood tubes hemograms were duly stored and sent to Molecular Biology Laboratory of the Federal University of Amazonas (UFAM) for complete analysis.

All hematological analyses were performed using the automated hematology analyzers of the new generation impedance technique and always calibrated before every test. BC-5800 (Mindray, Shenzhe, China), Pentra XL (ABX 80 Horiba®, France) and ADVIA 120 Hematology (Siemens Healthineers Brasil).

For serum ferritin and serum iron analyses were used Bioclin® KIT by immunoturbidimetry and colorimetric assays, respectively, carried out in a Bioclin 3000 (Bioclin/Quibasa) device. Respectively, the range values were: 20 - 220 mg/L for men and 20 - 110 mg/L for women as dosages of Ferritin.

To genomic DNA extraction, all samples were sent to the Molecular Biology Laboratory of the Federal University of Amazonas (UFAM) to finalize the procedures, using the BIOPUR Mini Spin Plus® extraction kit, following the manufacturer's recommendations. The integrity and DNA quantification were performed using NANODROP™ 2000 equipment (Thermofisher®).

Genotyping of the  $\alpha$ -thalassemia 3.7kb deletion was performed by ASO-PCR as described by Baysal and Huisman<sup>(13)</sup>, while 4.2kb deletion by Multiplex-PCR<sup>(14)</sup> The PCR products were submitted to electrophoresis (Bio-Rad, EUA) in agarose gel in 1.5% under a constant 80 volts for 45 minutes and visualized under ultraviolet light<sup>(13,14)</sup>. Molecular amplifications were performed using the T100 thermal cycler (Bio-Rad, USA)

Statistical analysis softwares used were: IBM SPSS Statistics, Version 19.0. and GraphPad Prism version 5.0. The distribution of variables analysis was performed using the Kolmogorov-Smirnov test. The ANOVA parametric test was used to analyze the distribution of means of quantitative variables with normal distribution within categories. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used for the off-normal distributions.



## RESULTS

The studied population sample was composed beginning in the capital, 356 (19.7%) samples, 232 (12.8%) Iranduba, 287 (15.9%) in Manacapuru, 370 (20.5%) in Presidente Figueiredo, 301 (16.6%) in Itacoatiara and 263 (14.5%) in Coari.

A total of 1809 samples were collected, of which 760 (42%) were male subjects and 1049 female (58%). The minimum age for collection was 18 years old. The mean age among males was  $35.3 \pm 14.78$  years and  $36.7 \pm 14.95$  for females. Table 1 shows the total number of participants for each city, as well as the frequency by gender and average age (Table 1).

The Alpha Thalassemia screening was performed in all participants and only  $-\alpha 3.7$  deletion was identified in 143 individuals (7.9%) of the total, being 108 (6%) heterozygotes ( $-\alpha 3.7/\alpha\alpha$ ) and 35 (1.9%) homozygous ( $\alpha 3.7/\alpha 3.7$ ) for the deletion (Table 2).

Table 3 shows the Leukocytes counts (WBC) and erythrocytes (RBC), Hemoglobin (Hgb), Mean Corpuscular Volume (MCV) and Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) and Anisocytosis Index (RDW), in addition analyses to the serum iron and serum ferritin. We performed a stratification of the  $\alpha$ -thal genotype, demonstrated between only normal characterization or absent deletion ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) (**A**), only heterozygous ( $-\alpha 3.7/\alpha\alpha$ ) (**B**) and only homozygotes ( $\alpha 3.7/\alpha 3.7$ ) (**C**). The associations analyze among the  $\alpha$ -thal genotypes were statistically significant among all parameters hematological ( $<.001$ ), except serum Iron and serum Ferritin analyses between carrier's  $\alpha$ -thal. Although they were statistically different, the hematological indices and parameters of all cities had values normal the reference values.

Table 4 shows the hematological data and analysis of serum ferritin and serum iron by city, stratified by gender. Hematological levels and iron test values were higher in men than women, which is in accordance with the literature.

Hemoglobin, hematocrit and RBC values were corrected for sex. Multivariate analysis of variance (MANOVA) was used to adjusted variables to mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), with the corresponding values in patients with microcytic. When individualizing individuals with microcytosis (MCV  $<80$  fL), a total of

158 was found. Of these, 13 had iron deficiency and were withdrawn from the analysis. The allele and genotypic frequencies for the various groups are shown in Figure 2.

## DISCUSSION

In the Amazon, the evaluation of the possible presence of  $\alpha$ -thal was still based only on screening methods, such as hematological indices and supravital staining of Hb H bodies, or sent another Brazilian state for fidelity diagnosis. Worldly, we believe that none of these products is fully reliable or sensitive to detect silent or heterozygous  $\alpha$ -thal carriers. This problem was solved by the arise of the molecular technic for the various determinants of alpha thalassemia <sup>(15-17)</sup>.

Due to the fact that alpha thalassemia never had studied by molecular procedures here Amazon Region, is relatively unknow your real prevalence in Amazon region, and maybe  $\alpha$ -thal has been an underestimate <sup>(18)</sup>.

As expected, the  $\alpha$ -thal 3.7 determinant was the most common in this study, being deletion found in 7.9%, consistent with the high incidence all states from Brazil <sup>(19,20)</sup>.

With news molecular diagnostics thecnics, has been progress to determine the prevalence for alpha thalassemia around the world. Observing the majority of studies worldwide, including Brazil, a-thal 3.7 kb deletion is one of the most common, accounting for prevalences ranging from 70% and 90% in the regions of Melanesia and Nepal; to 70.7% in Iran, 72.8% in regions, 35.2% in India and 16.3% in Thailand, 40% in African countries and 5 a 20% in Brazil <sup>(21-24)</sup>.

In the state of Amazonas, have indigenous as hierarchical base centuries ago. The neo-Brazilian formation took place from a social and geographic colonization that mixed with of Spaniards, English, French, Dutch, Portuguese; as well as Irish, Arab-Turkish, Italian, Japanese, Scandinavian and Jewish. Due to the need for labor due to the increasing demands of the First Rubber Cycle on Brazil, industry that required a considerable number of workers, Manaus received a large number of immigrants involving many Latin American, European countries and Africana's <sup>(25-27)</sup>.

On Brazilian populations, many studies were performed to determinate the prevalence and incidence to Alpha Thalassemia. Among the studies, in the interior of São Paulo, in Genetic Counseling Outpatient Clinic Project, the frequency of 26.44% of individuals was fund with 3.7kb (heterozygous), emphasizing the need for the implantation of molecular tests, especially to identify family history for hereditary

anemias <sup>(28)</sup>. In the city of Campinas, a study was carried out comprising 169 individuals attended at the hematology clinic of the University Hospital of UNICAMP, with diagnosis of 49.9% of the microcytosis and hypochromia patients <sup>(29)</sup>. In Minas Gerais State, identified the prevalence of hemoglobinopathies of 10.46% in neonates with -3.7kb in heterozygous. These data reinforced the importance of Neonatal Screening programs in order to diagnose hemoglobinopathies, especially alpha thalassemia <sup>(30)</sup>. In a neonate population, a study in Salvador observed the prevalence of 22.2% with deletion - $\alpha$ 3.7 and 2.5% in homozygous <sup>(31)</sup>.

In our study, the characterization of the population through the laboratory analysis including its hematological data and the serum iron and ferritin dosages allowed to differentiate and individualize the populations. Exclusion criteria were established to establish a population pattern without biases in both the description of the hematological characteristics to the exclusion carriers of onco-hematological diseases, as well as the pregnant women and individuals under 18-year-old.

The results of the observations and comparisons of hematological indices among alpha thalassemia genotypes were stratified independently of iron deficiency. The values of HCM and VCM corroborate with the literature when they demonstrate subtle reductions and were statistically significant.

The comparison between the hematological were essential to characterize each population studied and to highlight how different the populations are, even concentrating on nearby and integrated areas, such as the Metropolitan Region of Manaus. We demonstrated that eight individuals have concomitantly a-thal and Iron deficiency, representing of 4% of the total number of individuals with alpha Thalassemia.

This study was essential to highlight the importance of Thalassemia as a public health problem, characterizing a population not yet described and highlighting the importance of assessing its frequency. Our results to contribute to the populations of the participating cities by directing the diagnostic results to the medicals, aiming at a better monitoring and management of individuals who might not obtain this data at another time.

This is the first study carried out to estimate the prevalence of alpha thalassemia in the Amazonian population using molecular methods.

## CONCLUSIONS

The prevalence of the 7.9% corroborate with others Brazilians studies. The present study demonstrates the importance and relevance to performed of genetic anemia diagnostic in region Amazonia, principally as an important test for differential diagnosis, especially among iron deficiency anemia.

## REFERENCES

1. Cançado RD. Talassemias alfa Alpha thalassemias Rodolfo. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2006;28(2):81-87.
2. Koza K. Hemoglobinopathies and thalassemias – genetic basis and molecular diagnosis. 2012;(7):589–94.
3. Koury MJ, Sheftel AD, Ponka P. Erythropoiesis, Hemoglobin Synthesis, and Erythroid Mitochondrial Iron Homeostasis. Handb Porphyr Sci (Volume 27). 2013; 27:41–84.
4. Goh S, Lee YT, Bhanu N V, Cam MC, Desper R, Martin BM, et al. A newly discovered human globin gene. Platelets. 2005;106(4):1466–72.
5. Higgs DR, Weatherall DJ. The Alpha Thalassaemias. Cell Mol Life Sci. 2009;66(7):1154–62.
6. Dotto FRC. Talassemias alfa e beta: revisão [Internet]. 2005. Available from: [http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/1564/Dotto\\_Fatima\\_Rosane\\_Colpo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/1564/Dotto_Fatima_Rosane_Colpo.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (Acesso em 21/05/2018).
7. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine. Star. 2015. 2958 p.
8. Spier C. Wintrobe's Atlas of Clinical Hematology. Am J Surg Pathol. 2008;32:1428.
9. Hartevelde CL, Higgs DR, Petrou M, Brugiattelli M, Old J, Hurley P, et al. A-Thalassaemia. Orphanet J Rare Dis. 2010;5(1):13.
10. Ribeiro DM, Sonati MF. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassaemia. Vol. 7, Genetics and Molecular Research. 2008. p. 1045–53.
11. Li CK. New trend in the epidemiology of thalassaemia. Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 2017;39:16–26.
12. Hardison RC. Evolution of Hemoglobin and Its Genes. 2012;1–18.

13. Baysal E, Huisman THJ. Detection of common deletional  $\alpha$ -thalassemia-2 determinants by PCR. *Am J Hematol.* 1994;46(3):208–13.
14. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, et al. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for  $\alpha$ -thalassemia. *Blood*, vol. 98, no. 1, pp. 250-251, 2001.
15. Karen DF. Clinical evaluation of hemoglobinopathies: Part I. Thalassemia. *The Warde Medical Laboratory Article Archives.* 2003; 14 (2).
16. Higgs D R, Goodburn S E Y, Lamb J, Clegg J B and weatherall DJ. alpha-Thalassemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature.* 1983; 306: 398-400.
17. Cürük, MA, Kiline Y, Evrúke C, Ozgüven FT, Akosy K and Yüregir, GT. Prenatal diagnosis of Hb H disease caused by a homozygosity for the  $\alpha 2$  polyA (AATAAA>AATAAG) mutation. *Hemoglobin.* 2001; 25: 255-258.
18. Foglietta E, Deidda G, Graziani B, Modiano G, Bianco I. Detection of  $\alpha$ -globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica.* 1996;81(5):387–96.
19. Wagner SC, Silvestri MC, Bittar CM, Friedrisch JR, Silla LMR, Para C. Prevalence of thalassemias and variant hemoglobins in patients with non-ferropenic anemia. *bras hematol hemoter.* 2005;27(1):37–42.
20. Organization Health W. Thalassaemia and other haemoglobinopathies. 2006. [http://apps.who.int/gb/archive/pdf\\_files/EB118/B118\\_5-en.pdf](http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/EB118/B118_5-en.pdf) (Acesso em 20/01/2019).
21. Hardison RC. Evolution of Hemoglobin and Its Genes. 2012;1–18
22. Sankar VH, Arya V, Tewari D, Gupta UR, Pradhan M. Genotyping of alpha-thalassemia in microcytic hypochromic anemia patients from North India. 2006;47(4):391–5.
23. Arezo Karamzade, Hadi Mirzapour, Majid Hoseinzade, Sara Asadi, Tahere Gholamrezapour PT& MS.  $\alpha$ -Globin Gene Mutations in Isfahan Province, Iran. *Int. J. Hemoglobin. Res.* 2014;38(3).
24. Manning LR, Russell JE, Padovan JC, Chait BT, Popowicz A, Manning RS, et al. Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. *Protein Sci.* 2007;16(8):1641–58.
25. César F, Xavier C, César F, Xavier C. Tese de Doutorado Migrações Internacionais na Amazônia Brasileira : Impactos na Política Migratória e na Política Externa. 2012.
26. Amaz RV. Revista Veredas Amazônicas – Nov – nº 01, vol i, 2011. issn: 2237-

4043. 2011;I(V).

27. Belchior M, Brasileiro I. Características Étnico-raciais da população: Classificações e Identidades. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). <https://www.ibge.gov.br/> (Acesso em 10/11/2018).
28. Nunes D, Galvani CM, Pegoraro PP, Sucena TA, Barril N. Prevalence and Epidemiological Aspects of Patients with Hemoglobinopathies in a Genetic Counseling Outpatient Clinic. 2017;11(1):100–3.
29. Sonati MF. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. Brazilian. J. Med. Biol. Res. 2001.
30. Carlos AM, Souza RAV, Souza BMB de, Pereira G de A, Tostes Júnior S, Martins PRJ, et al. Hemoglobinopathies in newborns in the southern region of the Triângulo Mineiro, Brazil. Cross-sectional study. Sao Paulo Med. J. 2015;133(5):439–44.
31. Adorno E., Couto F., Moura Neto JP, Menezes J., Rêgo M, Reis M, *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. Cad. Saúde Pública. 2005;21(1):292–8.

Table 1 - Age and gender frequency of cities included in the study.

<b>Location (N)</b>	<b>Gender</b>	<b>N (%)</b>	<b>Age Mean/SD</b>
<b>Manaus (356)</b>	Male	195 (54.8)	32,8 ± 11,4
	Female	161 (45.2)	33,7 ± 12,0
<b>Iranduba (232)</b>	Male	89 (38.4)	31,9 ± 13,7
	Female	143 (61.6)	32,4 ± 11,4
<b>Manacapuru (287)</b>	Male	121 (42.2)	34,0 ± 12,3
	Female	166 (57.8)	35,3 ± 13,0
<b>Presidente Figueiredo (370)</b>	Male	135 (36.5)	43,9 ± 16,2
	Female	235 (63.5)	41,7 ± 17,0
<b>Itacoatiara (301)</b>	Male	111 (36.9)	37,2 ± 19,8
	Female	190 (63.1)	42,3 ± 17,5
<b>Coari (263)</b>	Male	109 (41.4)	31,1 ± 10,8
	Female	154 (58.6)	30,9 ± 10,3

Table 2. Distribution of alpha 3.7 Kb deletion genotypes among subjects and grouped by gender.

Location	Gender	Alpha Thalassemia - N (%)		
		$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha-/ \alpha\alpha$	$\alpha-/ \alpha-$
Manaus	Male	185 (94.8)	5 (2.6)	5 (2.6)
	Female	143 (88.8)	16 (9.9)	2 (1.3)
Iranduba	Male	81 (91.1)	6 (6.7)	2 (2.2)
	Female	134 (93.7)	6 (4.2)	3 (2.1)
Manacapuru	Male	113 (93.4)	5 (4.1)	3 (2.5)
	Female	161 (97.0)	3 (1.8)	2 (1.2)
Presidente Figueiredo	Male	120 (88.9)	12 (8.9)	3 (2.2)
	Female	212 (90.2)	18 (7.7)	5 (2.1)
Itacoatiara	Male	102 (91.9)	7 (6.3)	2 (1.8)
	Female	170 (89.5)	16 (8.4)	4 (2.1)
Coari	Male	100 (91.7)	8 (7.4)	1 (0.9)
	Female	145 (94.2)	6 (3.9)	3 (1.9)



Table 3 - Hematologic Parameters Characterization and levels of serum Ferritin and Serum Iron among Alpha Thalassemia genotypes 3,7kb deletion in Metropolitan Region of Manaus.

	Manaus	Iranduba	Manacapuru	Presidente Figueiredo	Itacoatiara	Coari	p-value
<b>Wide type (<math>\alpha\alpha / \alpha\alpha</math>) (A)</b>							
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	6.9 $\pm$ 0.8	6.9 $\pm$ 1.6	7.4 $\pm$ 1.4	9.0 $\pm$ 4.6	6.5 $\pm$ 2.0	6.9 $\pm$ 1.5	<.001
RBC ( $\times 10^6/\text{mm L}$ )	4.6 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.5	4.7 $\pm$ 0.6	4.7 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.5	<.001
Hg (g/dL)	13.9 $\pm$ 1.4	13.0 $\pm$ 1.4	13.6 $\pm$ 1.4	13.5 $\pm$ 1.5	13.7 $\pm$ 1.4	13.0 $\pm$ 1.6	<.001
Hct (%)	42.4 $\pm$ 4.1	39.0 $\pm$ 4.4	40.7 $\pm$ 4.7	41.5 $\pm$ 4.2	40.7 $\pm$ 4.3	40.3 $\pm$ 4.9	<.001
MCV (fL)	90.9 $\pm$ 4.3	90.0 $\pm$ 7.6	86.6 $\pm$ 5.3	88.5 $\pm$ 4.8	85.4 $\pm$ 4.7	91.2 $\pm$ 5.7	<.001
MCH	29.9 $\pm$ 1.9	30.2 $\pm$ 2.3	29.1 $\pm$ 2.5	28.9 $\pm$ 2.1	28.8 $\pm$ 1.2	29.4 $\pm$ 1.9	<.001
MCHC (pg)	32.9 $\pm$ 1.3	33.5 $\pm$ 1.6	33.6 $\pm$ 2.6	32.6 $\pm$ 1.7	33.4 $\pm$ 1.5	32.2 $\pm$ 1.3	<.001
RDW (%)	13.4 $\pm$ 1.2	13.0 $\pm$ 0.7	13.6 $\pm$ 0.9	13.5 $\pm$ 0.7	14.0 $\pm$ 0.6	12.8 $\pm$ 0.8	<.001
Serum Iron ( $\mu\text{g/dL}$ )	81.8 $\pm$ 4.2	93.7 $\pm$ 25.6	85.4 $\pm$ 25.7	83.3 $\pm$ 32.5	90.6 $\pm$ 32.6	96.2 $\pm$ 32.3	<.001
Ferritin ( $\mu\text{g/dL}$ )	137.1 $\pm$ 52.7	110.1 $\pm$ 33.2	109.8 $\pm$ 31.3	94.9 $\pm$ 25.3	96.3 $\pm$ 26.6	112.0 $\pm$ 47.0	<.001
<b>heterozygous (<math>-\alpha 3.7 / \alpha\alpha</math>) (B)</b>							
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	6.3 $\pm$ 0.9	7.0 $\pm$ 2.1	7.8 $\pm$ 1.2	9.5 $\pm$ 6.4	6.1 $\pm$ 1.4	7.0 $\pm$ 2.1	<.001
RBC ( $\times 10^6/\text{mm L}$ )	4.4 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 0.6	4.7 $\pm$ 1.0	<.001
Hg (g/dL)	12.1 $\pm$ 1.1	12.0 $\pm$ 1.5	14.5 $\pm$ 1.8	12.3 $\pm$ 1.6	13.4 $\pm$ 1.2	12.3 $\pm$ 3.5	<.001
Hct (%)	38.3 $\pm$ 2.7	34.9 $\pm$ 4.2	42.6 $\pm$ 5.3	38.5 $\pm$ 5.5	38.7 $\pm$ 3.8	38.2 $\pm$ 8.1	.005
MCV (fL)	86.1 $\pm$ 5.7	77.2 $\pm$ 6.8	78.9 $\pm$ 2.9	85.1 $\pm$ 10.1	78.7 $\pm$ 5.3	79.9 $\pm$ 5.5	<.001
MCH	27.3 $\pm$ 2.2	26.6 $\pm$ 3.2	26.8 $\pm$ 1.4	27.3 $\pm$ 3.1	27.1 $\pm$ 1.6	24.9 $\pm$ 2.3	.007
MCHC (pg)	31.7 $\pm$ 1.6	34.4 $\pm$ 2.0	34.0 $\pm$ 1.7	32.2 $\pm$ 2.3	34.5 $\pm$ 1.6	31.1 $\pm$ 1.5	<.001
RDW (%)	12.4 $\pm$ 1.1	12.6 $\pm$ 1.5	13.8 $\pm$ 0.4	13.8 $\pm$ 0.8	13.9 $\pm$ 0.7	12.5 $\pm$ 1.4	<.001
Serum Iron ( $\mu\text{g/dL}$ )	76.8 $\pm$ 5.5	78.4 $\pm$ 31.3	84.0 $\pm$ 25.5	68.4 $\pm$ 33.5	81.7 $\pm$ 35.4	81.6 $\pm$ 46.9	.064
Serum Ferritin ( $\mu\text{g/dL}$ )	101.8 $\pm$ 40.9	103.4 $\pm$ 46.0	109.5 $\pm$ 31.3	91.9 $\pm$ 39.3	97.1 $\pm$ 33.3	114.0 $\pm$ 60.7	.065
<b>homozygous (<math>\alpha 3.7 / \alpha 3.7</math>) (C)</b>							
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	7.2 $\pm$ 0.9	7.4 $\pm$ 1.3	8.7 $\pm$ 1.0	8.2 $\pm$ 2.7	5.1 $\pm$ 1.7	7.1 $\pm$ 0.3	0.022
RBC ( $\times 10^6/\text{mm L}$ )	4.6 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 1.1	5.4 $\pm$ 0.8	4.8 $\pm$ 1.3	5.5 $\pm$ 1.0	4.9 $\pm$ 0.1	0.694
Hg (g/dL)	12.2 $\pm$ 1.9	10.0 $\pm$ 3.1	14.1 $\pm$ 1.2	13.2 $\pm$ 2.2	12.6 $\pm$ 2.1	10.4 $\pm$ 0.7	0.032
Hct (%)	38.4 $\pm$ 5.4	35.0 $\pm$ 8.3	45.8 $\pm$ 2.4	39.9 $\pm$ 5.9	37.3 $\pm$ 5.7	32.4 $\pm$ 1.9	0.020
MCV (fL)	79.1 $\pm$ 5.2	67.0 $\pm$ 8.1	84.8 $\pm$ 8.4	84.5 $\pm$ 15.9	69.1 $\pm$ 9.9	65.3 $\pm$ 3.8	0.005
MCH	25.1 $\pm$ 2.5	19.1 $\pm$ 4.3	26.1 $\pm$ 2.8	27.7 $\pm$ 4.0	23.1 $\pm$ 3.3	21.1 $\pm$ 1.6	0.001
MCHC (pg)	31.7 $\pm$ 1.6	28.2 $\pm$ 3.1	30.8 $\pm$ 1.9	33.1 $\pm$ 3.2	33.4 $\pm$ 1.5	32.3 $\pm$ 0.7	0.011
RDW (%)	11.2 $\pm$ 0.7	13.0 $\pm$ 0.8	13.6 $\pm$ 0.9	13.1 $\pm$ 0.9	13.7 $\pm$ 0.7	12.9 $\pm$ 1.2	<.001
Serum Iron ( $\mu\text{g/dL}$ )	70.2 $\pm$ 5.4	53.2 $\pm$ 19.6	104.7 $\pm$ 17.0	74.5 $\pm$ 49.8	92.4 $\pm$ 39.7	79.9 $\pm$ 21.1	0.175
Serum Ferritin ( $\mu\text{g/dL}$ )	86,55 $\pm$ 49.2	96.2 $\pm$ 47.8	92,41 $\pm$ 31.3	98,36 $\pm$ 49.5	85.8 $\pm$ 24.2	81.5 $\pm$ 9.4	0.746

Note: WBC: White Blood Cell Count; RBC: Red Blood Cell Count; Hb: Haemoglobin; Hct: Haematocrit; MCV: Mean Corpuscular Volume; MCH: Mean Corpuscular Hb; MCHC: Mean Corpuscular Hb Concentration; RDW: red blood cell distribution width; SD: standard deviation.

Table 4 - Hematological data and levels of serum ferritin and serum Iron among study participants.

	Manaus			Iranduba			Manacapuru			Presidente Figueiredo			Itacoatiara			Coari		
	N=195	N=161	p-value	N=89	N=143	p-value	N=121	N=166	p-value	N=135	N=235	p-value	N=111	N=190	p-value	N=109	N=154	p-value
	Mean ± SD			Mean ± SD			Mean ± SD			Mean ± SD			Mean ± SD			Mean ± SD		
	Male	Female		Male	Female		Male	Female		Male	Female		Male	Female		Male	Female	
<b>WBC (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	7.0 ± 0.8	6.6 ± 0.9	<.001	6.6 ± 1.9	7.1 ± 1.5	.072	7.4 ± 1.5	7.5 ± 1.3	.735	8.6 ± 3.6	9.3 ± 5.3	.182	6.3 ± 2.1	6.5 ± 1.9	.506	7.0 ± 1.7	6.8 ± 1.4	.308
<b>RBC (x10<sup>6</sup>/mmL)</b>	4.8 ± 0.4	4.4 ± 0.4	<.001	4.6 ± 0.5	4.2 ± 0.5	<.001	4.8 ± 0.6	4.6 ± 0.5	<.001	4.9 ± 0.5	4.5 ± 0.4	<.001	5.1 ± 0.6	4.6 ± 0.5	<.001	4.7 ± 0.6	4.2 ± 0.5	<.001
<b>Hb (g/dL)</b>	14.4 ± 1.2	13.0 ± 1.4	<.001	13.7 ± 1.3	12.4 ± 1.5	<.001	14.0 ± 1.4	13.4 ± 1.4	<.001	14.5 ± 1.7	12.8 ± 1.0	<.001	14.4 ± 1.3	13.3 ± 1.3	<.001	13.7 ± 1.8	12.3 ± 1.5	<.001
<b>Hct (%)</b>	44.0 ± 3.5	39.7 ± 3.8	<.001	40.9 ± 3.9	37.2 ± 4.4	<.001	41.9 ± 5.2	40.0 ± 4.2	.002	43.8 ± 4.7	39.7 ± 3.4	<.001	43.0 ± 4.4	39.0 ± 3.6	<.001	42.6 ± 5.2	38.2 ± 4.4	<.001
<b>MCV (fL)</b>	90.7 ± 4.5	90.1 ± 5.2	.232	89.4 ± 9.3	88.5 ± 8.3	.431	85.9 ± 5.8	86.7 ± 5.1	.200	88.1 ± 5.0	88.1 ± 6.4	.945	84.3 ± 6.6	84.7 ± 5.1	.612	90.5 ± 5.9	89.9 ± 7.5	.506
<b>MCH (pg)</b>	29.8 ± 1.9	29.5 ± 2.4	.286	29.9 ± 2.9	29.6 ± 3.0	.559	28.9 ± 2.9	29.0 ± 2.1	.644	29.1 ± 2.2	28.5 ± 2.3	.010	28.3 ± 1.5	28.7 ± 1.5	.022	29.1 ± 2.0	29.0 ± 2.6	.898
<b>MCHC (pg)</b>	32.8 ± 1.1	32.8 ± 1.7	.762	33.4 ± 1.6	33.5 ± 2.0	.806	33.7 ± 3.3	33.5 ± 2.0	.525	33.1 ± 1.9	32.4 ± 1.6	.000	33.6 ± 1.4	33.9 ± 1.2	.059	32.1 ± 1.3	32.2 ± 1.3	.516
<b>RDW</b>	13.7 ± 1.4	12.8 ± 1.0	<.001	13.0 ± 0.8	13.0 ± 0.8	.862	13.6 ± 0.8	13.6 ± 1.0	.789	13.5 ± 0.7	13.5 ± 0.7	.504	14.0 ± 0.8	14.0 ± 0.6	.680	12.8 ± 0.9	12.9 ± 0.9	.373
<b>Iron (μg/dL)</b>	81.8 ± 4.4	80.7 ± 5.0	.037	102.1 ± 25.3	85.8 ± 25.4	<.001	89.2 ± 24.5	83.2 ± 26.2	.052	88.2 ± 36.4	78.2 ± 30.7	.005	95.0 ± 35.3	87.0 ± 31.1	.042	100.1 ± 28.4	91.6 ± 35.9	.040
<b>Ferritin (μg/L)</b>	177.7 ± 27.4	83.9 ± 19.5	<.001	114.1 ± 35.1	105.9 ± 33.8	.076	114.0 ± 31.8	107.4 ± 30.7	.082	89.8 ± 30.9	96.7 ± 24.9	.020	104.6 ± 30.7	91.8 ± 23.5	<.001	156.3 ± 34.0	80.1 ± 24.9	<.001

Figure 1. Comparison of hematological parameters (RBC count (A), Hemoglobin level (B) and hematocrit (C)) between alpha thalassemia genotypes by gender.

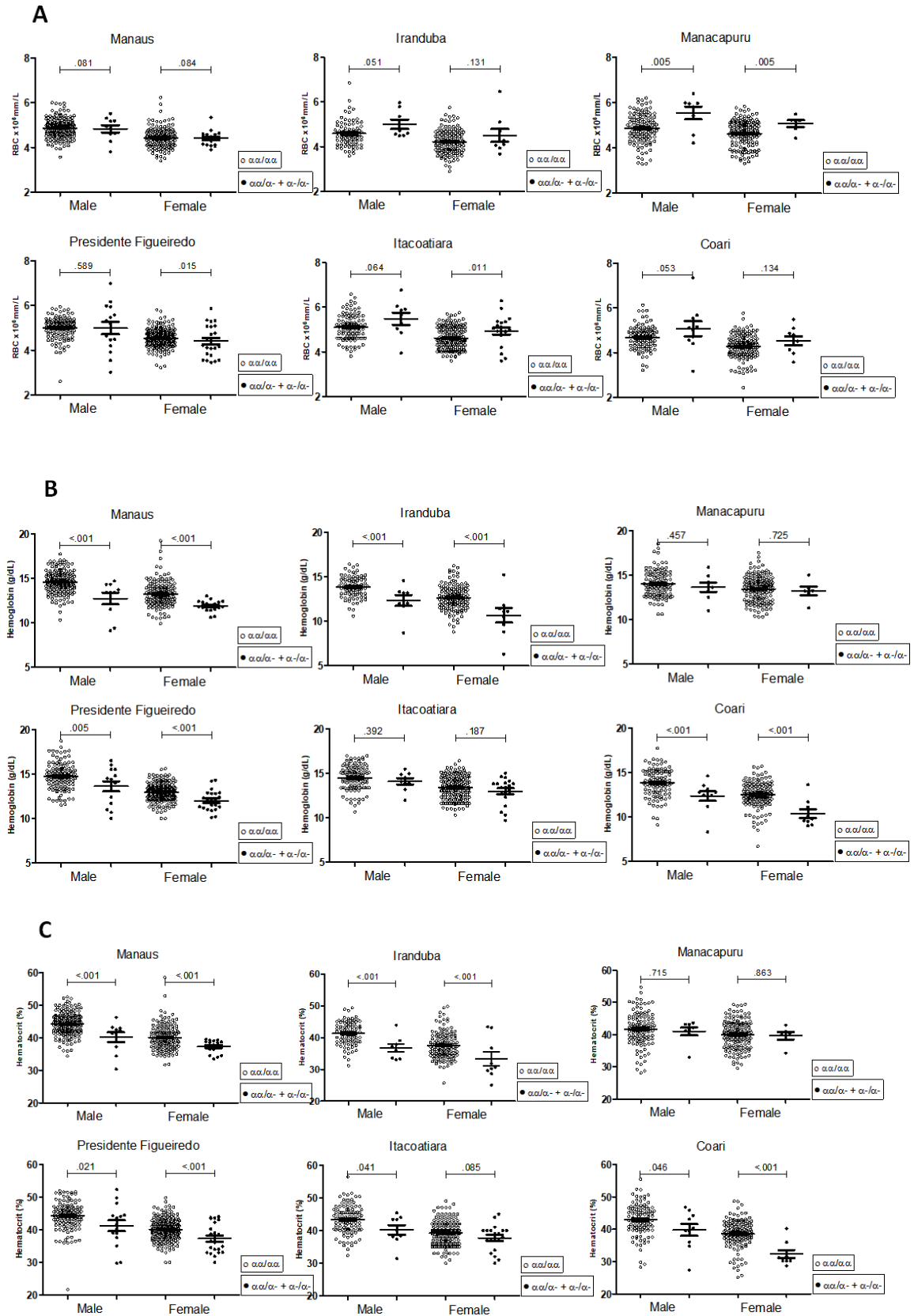
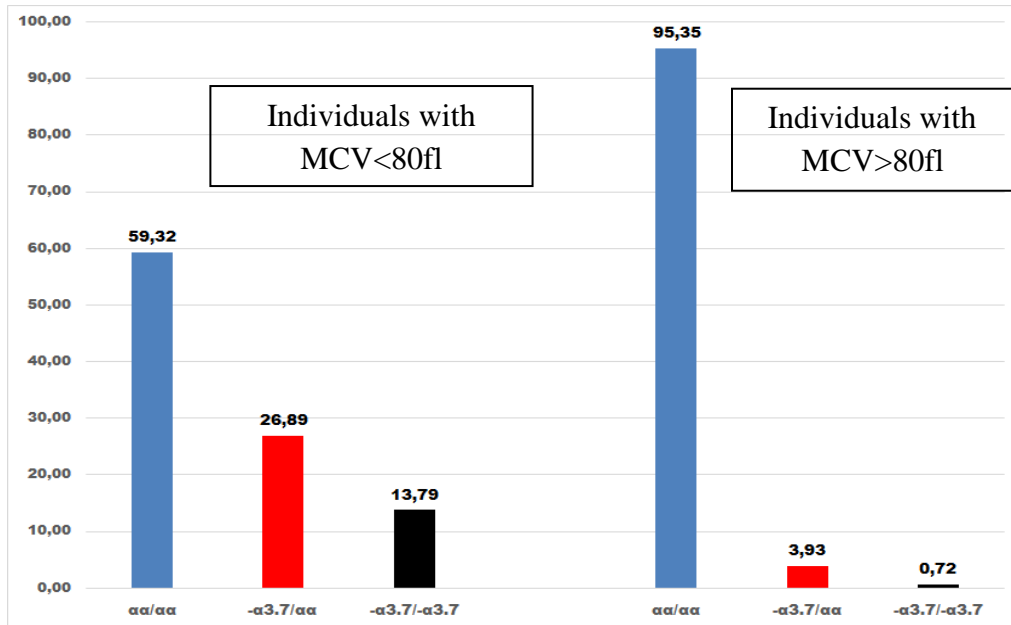


Figure 2. Frequency of the 3.7 alpha genotypes between individuals with microcytic and normocytic erythrocytes.



## 4.2 Artigo 2

### DETECTION OF COMMON ALPHA-THALASSEMIA DELETIONAL IN AMAZON BLOOD DONORS

Fernanda Cozendey Anselmo<sup>1</sup>, Marilda de Souza Gonçalves<sup>2</sup>, Sérgio Roberto Lopes Albuquerque<sup>2</sup>, Nelson Abraham Fraiji<sup>2</sup>, José Pereira de Moura Neto<sup>1,3</sup>

1 Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

2 Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brasil.

3 Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus, Amazonas, Brasil.

*\*Address correspondence to:*

José Pereira de Moura Neto, Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Avenida General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 - Coroado I, Manaus - AM, 69067-005, phone + 55-92-3305-1181- R:2007 or [jp-mn@hotmail.com](mailto:jp-mn@hotmail.com)

**Sponsorships:**

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) – Processo: 1094/2013-FAPEAM.

**ABSTRACT**

Alpha thalassemia is highly prevalent in the plural society of Brazil and is a public health problem. There is limited knowledge of its accurate frequency and distribution in the Amazon Region. Knowing the frequency of thalassemia and the prevalence of responsible mutations is therefore an important step in the understanding and control program. Hematological and molecular data, in addition to serum iron, serum ferritin from 989 unrelated first-time blood donors from Amazonas Hemoterapy and Hematology Foundation (FHEMOAM) were performed. In this study, the subjects were screened for  $-\alpha^{3.7/4.2/20.5}$ ,  $-\text{SEA}$  and  $-\text{MED}$  deletions. Of the 713 (72.1%) male donors and 275 (27.9%) females were performed to Alpha thalassemia screening between years 2016 and 2017. The aims of this analysis were to describe the distribution of various alpha thalassemia alleles by gender, along with their genotypic interactions, and to illustrate the hematological changes associated with each phenotype. Amongst the patients, 5.35% (n=53) were diagnosed with deletion  $-\alpha^{3.7}$  and only one donor to  $\alpha^{4.2}$  deletion. Of the individuals with  $-\alpha^{3.7}$ , 85.8% (n=46) were heterozygous and 14.20% (n=7) homozygous. The frequency of the  $-\alpha^{3.7}$  deletion was higher in male (5.89%) than in female (4.0%). Statistical analysis no showed a significant difference in the distribution of  $-\alpha^{3.7}$  by gender (p=0,217). No  $-\alpha^{20.5}$ ,  $-\text{SEA}$  and  $-\text{MED}$  deletions was found. Randomly, 479 subjects were analyzed to serum iron, serum ferritin, with 1,04% iron deficient (n=5) and none with very high levels of stored iron (>220  $\mu\text{g/dL}$ ). Alpha-thalassemia-2  $^{3.7\text{Kb}}$  deletion was the most common allele detected in Manaus Blood Donors, corroborating is the most common type of  $\alpha$ -thalassemia found throughout the world. As expected, the mean of hematological data was significantly lower in alpha thalassemia carriers (p<.001), mainly homozygous genotype. Leukocytes and platelet count did not differ significantly. Due to the small number of individuals with iron deficiency found in our blood donors, did not possibility to the differential diagnosis between the two types of anemia, even because minor changes were found among hematological parameters with iron deficiency and alpha thalassemia. Despite this, This study showed that the values of hematological parameters, especially MCV and MCH are lower in with iron deficients donors, especially when associated with  $\alpha$ -thal and therefore it may be useful to discriminate between the different types of microcytic anaemia. In conclusion, we believed screening for thalassemia trait should be included as part of a standard blood testing before blood donation. Should be noted this was the first study to performed out the screening for alpha deletions in blodd donors from the Manaus region and further studies are required to look at the effects of donated thalassemic blood.

## INTRODUCTION

Thalassemias are the most common monogenic disease prevalent worldwide, include in Brazil. Thalassemia's have high frequency in the Italy, Middle East, India, South and Southeast Asia. The most common thalassemia deletional alleles are  $-\alpha^{3.7}$  and  $-\alpha^{4.2}$ . The  $-\alpha^{3.7}$  allele has been observed worldwide, while the  $-\alpha^{4.2}$  is most common in Asian countries. <sup>(1-3)</sup>

Although many regions of the world still do not have demonstrated data, current studies show that about 7% of the world population has at least one hemoglobin disorder. <sup>(4,5)</sup>

The current Brazilian population was formed by successive migratory waves from the 16th to 18th centuries (Africans Slaves) and 19th and 20th centuries of the Europeans. <sup>(6)</sup>

Brazilian population have many genetic studies has been documented this heterogeneity with non-uniform European, African and Amerindian pattern. For the Northern populations generally have higher African and Amerindians contributions when compared to other Brazilian groups. <sup>(7-11)</sup>

Several laboratory tests may be used to help detect and diagnose Thalassemia like: hemoglobin electrophoresis, complete blood count, Blood smear, Iron studies, DNA analysis (Genetic testing). <sup>(12)</sup>

Alpha thalassemia carriers are asymptomatic & usually having no hematologic abnormalities. Complications are mostly found in thalassemia beta major and intermediate patients. In silent carrier state thalassemic patients are essentially asymptomatic and the complete blood count, hemoglobin electrophoresis, and peripheral smear are usually normal. Slight hypochromia and microcytosis may be evident by microscopic evaluation. <sup>(13-17)</sup>

Since blood donors provide blood, their health is of considerable importance for both the donor and the recipient, hence, blood donors are screened for communicable diseases to avoid their transmission.

Likewise, screening for thalassemia may help in providing blood and red blood cell concentrates with maximum functional capacity. Detection of thalassemia in blood donors may reflect the spectrum of the disease in the population.

This is the first published report in Manaus and Amazon region that identifies thalassemia carriers among blood donors at the HEMOAM.

## MATERIALS AND METHODS

The studied population sample is composed by 989 first-time blood donors attending the Amazonas Hemoterapy and Hematology Foundation (FHMOAM) in Manaus, capital of the Amazonas State, Brazil between years 2016 and 2017.

Even though the minimum age allowed to donate blood was 16 years old (Artigo 21 da Lei 8.069/90), only donors with above 18 years old participated in this study. In addition, only participated in the study to those individuals that for the first time in their life donated blood.

Peripheral blood samples for the hematological analysis were obtained during a blood donation routine in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and no anticoagulants Vacutainer blood collection tube and transported to the laboratory. The hematological investigations performed included a full blood count using the automated hematologic analyzer BC-5800 (Mindray, Shenzhen, China); data have been obtained for the overall count of red blood cells (RBCs), concentration of hemoglobin (Hgb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), Red Cell Distribution width (RDW), total leukocyte and platelet count. To tests to determine iron and ferritin serum were measured as implemented in the automated A25 platform (BioSystems SA, Barcelona, Spain) using Ferritin *K081 KIT* (BIOCLIN) and *Iron Serum K017 KIT* (BIOCLIN).<sup>(18,19)</sup>

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using HiYield Genomic DNA extraction kit (BioAmerica Inc., USA). NanoDrop ND-1000 (ISOGEN LIFE SCIENCE, Netherlands) was used to measure DNA concentration.

All samples was tested to confirm to hemoglobin normal "AA" using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems).

All six sets of primer from manufacturer was provided in 100 µM solution and diluted for PCR amplification used 2,5 µL of 50 µM stock primer was diluted with 45 µL of ultra-pure H<sub>2</sub>O in order to prepare 50 µL of 10µM primer. PCR conditions were as described previously<sup>(20)</sup> using *QIAGEN Multiplex PCR Kit (1000 reactions - Cat No./ID 206143)* with minor changes. In brief, PCR was performed using approximately 50 ng of genomic DNA in 50 µL reaction volumes containing 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,0 ul 5x Q-Solution, 0.35 µmol/L each primer Table 1, including primers that act as internal controls; 250 µmol/L DNTPs; 2.5 U of Taq polymerase (Qiagen); and RNase-Free Water. Reactions



were incubated at *T100® gradient thermal cycler (BIORAD, Hercules, California, EUA)* with an initial 10 minutes denaturation at 96°C, followed by 34 cycles at 96°C for 45 seconds, 60°C for 45 seconds, and 72°C for 150 seconds and a final extension at 72°C for 10 minutes.

Descriptive statistics were used to hematological data, ferritin and iron serum. Differences in continuous variables between two groups were analyzed using the Student t or Mann-Whitney test for Gaussian and non-Gaussian distributed variables respectively. one-way ANOVA was performed to average and standard Deviation. A p value less than or equal to 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism Software v. 5.0 (GraphPad Prism Software Inc. San Diego, California, USA) and SPSS version 19.

Table 1. Primers used for detection of common deletional determinants of alpha-thalassemia.

<b>Primer Code</b>	<b>5' 3' Sequence</b>	<b>Fragment Size (Base Pairs)</b>
<b>LIS1-F</b>	GTCGTC ACTGGCAGCGTAGATC	~ 2503
<b>LIS1-R</b>	GATTCCAGGTTGTAGACGGACTG	
<b><math>\alpha 2^{3.7}</math>F</b>	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	~ 2022
<b><math>\alpha 2</math> R</b>	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	
<b><math>\alpha 2^{3.7}</math>F</b>	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	~ 1800
<b><math>3.7/20.5</math>R</b>	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	
<b>SEA-F</b>	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	~ 1350
<b>SEA-R</b>	AGCCACGTTGTGTTCATGGC	
<b>4.2F</b>	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	~1630
<b>4.2 R</b>	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	
<b>20.5F</b>	GCCCAACATCCGGAGTACATG	~1000
<b><math>3.7/20.5</math>R</b>	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	
<b>FIL-F</b>	TGCAAATATGTTTCTCTCATTCTGTG	~1170
<b>FIL-R</b>	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC	

## RESULTS AND DISCUSSION

A total of the 989 first-time blood donors, being 713 (72.1%) male and 275 (27.9%) females were analyzed, with 53 of them (5.35%) confirmed to  $-\alpha^{3.7}$  deletion. The  $-\alpha^{4.2}$  deletion was detected only one subject. No subjects  $-\alpha^{20.5}$ ,  $-\alpha^{SEA}$  and  $-\alpha^{MED}$  deletions was found, suggesting the probable presence of a “rare”  $\alpha$ -thal genotypes in Amazon Region to be as in other Brazilian populations. The results were summarized in Table 2

The total alleles to  $\alpha$ -thal frequency found from the random blood donors' samples is similar to that estimated in others studies from Brazilian population (average among 2,5 -8%). Our study showed lower  $\alpha$ -thal frequency when compared to work from Uberaba Regional Blood Center, Hemominas Foundation, Uberaba, Brazil, being found in blood donors the prevalence of the 14.89% to  $\alpha$ -thal with all cases being heterozygous for the  $-\alpha^{3.7}$ .<sup>(21-23)</sup>

Still, we believed that this frequency it is probably underestimated since the that blood donors are generally healthier people and therefore have hematological data with values equal to or above normal reference values when compared to the population served at health posts and hospitals, even if they are normal patients without clinical manifestations.

As expected, the mean of hematological data was significantly lower in  $\alpha$ -thal carriers ( $p < .001$ ). Leukocytes and platelet count did not differ significantly (table3). On comparing hematological parameters independent of gender, had the most pronounced microcytosis in the cases with homozygous genotype. Microcytosis was found in all homozygous cases, but it is also important to remember that normal RBC indices do not rule out  $\alpha$ -thal carrier.<sup>(24)</sup> Our results corroborate with the national and international literature that alpha thalassemia, mainly the  $\alpha^{-3.7}$  deletion, is one of the main causes in individuals without anemia of microcytosis and mild or severe hypochromia. These results stand out in the clinic, since these hematological data are often interpreted as indicators of iron deficiency.<sup>(25,26)</sup>

We found that  $\alpha$ -thal is a common cause of microcytosis, given that a high proportion (42.2%) of the microcytic blood donors carried  $\alpha^{-3.7}$  deletions. Randomly, 479 subjects were analyzed to test iron and ferritin, with 1.04% iron deficient ( $n=5$ ) and none with very high levels of stored iron ( $>220$   $\mu\text{g/dL}$ ). Microcytic hypochromic anemia is a common hematological abnormality and it is usually caused by iron deficiency and /or

thalassemia, usually genes  $\alpha$  deletion Our results point out indicating the importance of investigating, besides serum iron levels, the  $\alpha$ -thal to prevent medical intervention and iron therapy unnecessary in subjects with microcytic anemia due to thalassemia. <sup>(27-29)</sup>

The actually literature have that serum iron and ferritin dosage are a good indicator to investigate iron stores, thereby verify the early detection of iron deficiency. Nonetheless, in cases where ferritin levels are within the reference values or increased, other tests such as total iron binding capacity, transferrin saturation may help to better characterize the type of anemia. <sup>(30,31)</sup>

In blood banks from Brazil, although there are rigid and regulated techniques, it is still a great problem to enhance the identification of all types and causes of anemia. This is due to the need to use different methodologies in the differential diagnosis [16]. However, several studies have shown good results using hematological parameters of the conventional hemogram. <sup>(32,33)</sup>

Another interesting finding found in our results was the tendency of RDW elevation proportionally to the loss of the alphas genes, corroborating with other studies in the literature. The thalassemia patients have smaller and more homogeneous erythrocytes (mainly microcytic), which leads us to correlate high RDW higher in iron deficiency than in thalassemia (Figure 1). <sup>(34-36)</sup>

We understand the difficulty of screening for alpha thalassemia genotypes, especially which for the final diagnosis it is necessary to include technique that is currently expensive and with few people qualified for it. However, we consider that molecular techniques should be included as part of standard blood tests before blood donation. I even think that national policies should be reformulated to select the blood used for healthy transfusion and with no risk.

## REFERENCES

1. Flint J, Harding RM, Boyce AJ and Clegg JB (1993) The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* 6:215-262.
2. John P. Greer JP, Arber DA, Glader B, et al. *Wintrobe's Clinical Hematology* 2013. ISBN 9781451172683.
3. Murtaza Mustafa, A. Thiru, E M. Illzam, H. Firdaus, A M. , et al. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Carrier Detection in Thalassemia *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. Volume 15, Issue 11 Ver. VII (November. 2016), PP 122-126 DOI: 10.9790/0853-151107122126.
4. Cao A, Galanello R. Beta thalassemia. *Genet Med*, 2010;12:61-76.
5. Modiano G, Morpugo G, Terrenato L, et al. Protection against malaria morbidity: Near –fixation of the alpha thalassemia in a Nepalese population. *Am J HumanGentic*.1991;48(2):390-7.
6. Salzano FM and Bortolini MC (2002) *The Evolution and Genetics of Latin American Populations*. Cambridge University Press, Cambridge, 512 pp.
7. Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, et al. (2003) Historical genetics: Spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol* 15:824-834.
8. Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM and Hutz MH (2006) Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet* 70:822-828.
9. Leite FP, Santos SE, Rodriguez EM, et al. (2009) Linkage disequilibrium patterns and genetic structure of Amerindian and non-Amerindian Brazilian populations revealed by long-range X-STR markers. *Am J Phys Anthropol* 139:404-412.
10. MOURA, H., *As Migrações na Região Norte em Período Recente: Uma Abordagem Preliminar*. Texto IESAM. N. 1. IESAM/Fundação Joaquim Nabuco. Manaus, 1998.
11. OLIVEIRA. Ir. Márcia de. *Levantamento de dados sobre a realidade migratória*. (Mimeo). Pastoral do Migrante. Manaus, 2000.
12. *How Are Thalassemia Diagnosed?*". NHLBI. July 3, 2012. Retrieved 5 September 2016.
13. Satwani H, Raza J, Alam M, Kidwai A. Previous studies from various regions of the Brazil have reported considerable prevalence's in blood donors. However, such blood is considered suitable for blood transfusion when its hemoglobin level falls within the normal range. *Endocrine complications in thalassemias; Frequency and association with ferritin levels*, P P J, 29(2), 2005, 113-9.

14. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Science, 2001.
15. Zago, Marco & F. Costa, Fernando & Tone, Luiz & Bottura, C. (1983). Hereditary Hemoglobin Disorders in a Brazilian Population. *Human heredity*. 33. 125-9. 10.1159/000153362.
16. Kimura EM, Oliveira DM, Jorge SE, et al. Investigating alpha-globin structural variants: a retrospective review of 135,000 Brazilian individuals. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2015; 37(2):103–108.
17. Nunes LAS, Grotto HZW, Brenzikofer R, et al. Hematological and Biochemical Markers of Iron Status in a Male, Young, Physically Active Population. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 349182.
18. Moghadam AM, Natanzi MM, Djalali M, et al. Relationship between blood donors' iron status and their age, body mass index and donation frequency. *Sao Paulo Med J.* 2013;131(6):377-83. doi: 10.1590/1516-3180.2013.1316554.
19. Bahar, Rosnah & Hassan, Rosline & Abdullah, et al. Detection of Common Deletional Alpha-Thalassemia Spectrum by Molecular Technique in Kelantan, Northeastern Malaysia. *ISRN hematology*. 2012. 462969. 10.5402/2012/462969.
20. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, et al. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for  $\alpha$ -thalassemia. *Blood*, vol. 98, no. 1, pp. 250–251, 2001.
21. A.E.S. Souza, G.L. Cardoso, S.Y.L. Takanashi and J.F. Guerreiro.  $\alpha$ -Thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarém, Pará State. *Genetics and Molecular Research* 8 (2): 477-481 (2009).
22. de Souza RA1, Carlos AM, de Souza BM, Rodrigues CV, Pereira Gde A, Moraes-Souza H. A-Thalassemia: Genotypic Profile Associated with Ethnicity and Hematological Differentiation of Iron Deficiency Anemia in the Region of Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Hemoglobin*. 2015;39(4):264-9. doi: 10.3109/03630269.2015.1037890. Epub 2015 Jul 16.
23. Carneiro JS, Goncalves MS, Albuquerque SRL, Fraiji NA, Moura Neto JP. Beta-Globin Haplotypes and Alpha-Thalassemia 3.7 kb Deletion in Sickle Cell Disease Patients From the Occidental Brazilian Amazon. *Journal of Hematology & Multiple Myeloma*. Remedy Publications LLC. *Journal of Hematology & Multiple Myeloma* 2017 | Volume 2 | Issue 1 | Article 1009.
24. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human  $\alpha$  globin gene cluster. *Blood*. 1989; 73:1081-104 PMID:2649166
25. Sharma M, Pandey S, Ranjan R, Seth T & Saxena R. Prevalence of Alpha Thalassemia in Microcytic Anemia: a Tertiary Care Experience from North India. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2015, 7(1): e2015004, DOI 10.4084/MJHID.2015.004.

26. Borges, E & Wenning, M.R.S.C. & Kimura, E.M. & Gervásio, S.A. & Costa, F.F. & Sonati, M.F.. (2001). High prevalence of a thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*. 34. 759-62. 10.1590/S0100-879X2001000600009.
27. Ali M1, Lafferty J. *Clin Invest Med*. 1992 Oct;15(5):401-5. The clinical significance of hemoglobinopathies in the Hamilton region: a twenty-year review.
28. Origa R, Moi P. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. 2005 Nov 1 [updated 2016 Dec].
29. Winichagoon P, Kumbunlue R, Sirankapracha P, Boonmongkol P, Fucharoen S. Discrimination of various thalassemia syndromes and iron deficiency and utilization of reticulocyte measurements in monitoring response to iron therapy. *Blood Cells Mol Dis*. 2015 Apr;54(4):336-41. doi: 10.1016/j.bcnd.2015.01.010. Epub 2015 Jan 20.
30. Matos JF, Dusse LMS, Borges KBG, et al. A new index to discriminate between iron deficiency anemia and thalassemia trait. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2016;38 (3):214–19.
31. Jalali MT, Mohseni A, Keikhaei B, et al. Evaluation of diagnostic efficacy of serum sTfR assay in iron-deficiency anemia and beta-thalassemia trait in Shafa hospital, Ahvaz, Iran 2010. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16 (10):1441–45.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 34, de 29 de maio de 2014. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos. [Internet] Brasília: Ministério da Saúde; 2014 [cited 3 Mar 2017]. Available from: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0034\\_11\\_06\\_2014.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0034_11_06_2014.pdf).
33. Giordano PC. Strategies for basic laboratory diagnostics of the hemoglobinopathies in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls. *Int J Lab Hematol*. 2013;35:465–79. DOI:10.1111/ijlh.12037. Epub 2012 Dec 7.
34. Jameel T, Baig M, Ahmed I, Hussain MB, Alkhamaly MBD. Differentiation of beta thalassemia trait from iron deficiency anemia by hematological indices. *Pak J Med Sci*. 2017 May-Jun;33(3):665-669. doi: 10.12669/pjms.333.12098.
35. Velasco-Rodríguez D, Blas C, Alonso-Domínguez JM, Vega G, Soto C, García-Raso A, Llamas-Sillero P. Cut-Off Values of Hematologic Parameters to Predict the Number of Alpha Genes Deleted in Subjects with Deletional Alpha Thalassemia. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 13;18(12). pii: E2707. doi: 10.3390/ijms18122707
36. Aydogan G, Keskin S, Akici F, Salcioglu Z, Bayram C, Uysalol EP, Gucer TNT, Ersoy G, Ozdemir N. Causes of Hypochromic Microcytic Anemia in Children and Evaluation of Laboratory Parameters in the Differentiation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2018 Dec 14. doi: 10.1097/MPH.0000000000001382. [Epub ahead of print]

Table 2. Overall alpha Thalassemia genotypes in the among first-time blood donors from FHEMOAM (2016-2017).

<b>Gender</b>	<b><math>\alpha</math>-globin genotypes</b>				<b>Total</b>
	<b><math>\alpha\alpha/\alpha\alpha</math></b>	<b><math>-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha</math></b>	<b><math>\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}</math></b>	<b><math>-\alpha^{4.2}</math></b>	
<b>Male (%)</b>	670 (93.9)	37 (5.2)	05 (0.7)	01 (0.1)	714
<b>Female (%)</b>	264 (96.0)	9 (3,3)	02 (0.7)	---	275
<b>Total (%)</b>	935 (94.4)	46 (4.7)	07 (0.7)	01 (0.1)	989

Table 3. Hematologic, ferritin serum and iron serum characterization between  $\alpha^{3.7}$  genotypes and gender from first-time blood donors from FHEMOAM (2016-2017).

Parameters Data	$\alpha$ -globin genotypes			p-value	$\alpha$ -globin genotypes			p-value	$\alpha$ -globin genotypes			p-value
	(All)				(Male)				(Female)			
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$		$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$		$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	$\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$	
<b>WBC</b> (x10 <sup>3</sup> /μL)	6.92±.96	7.21±.68	7.16±1.11	.174	6.99±.95	7.33±.63	7.19±1.57	.179	6.68±.96	6.84±.73	7.11±.88	.802
<b>RBC</b> (x10 <sup>6</sup> /mm L)	4.74±.43	5.04±.35	5.57±.76	<.001	4.87±.38	5.11±.32	5.76±.73	<.001	4.42±.36	4.77±.31	5.09±.35	<.001
<b>Hg</b> (g/dL)	14.13±1.28	14.05±1.41	12.11±1.38	<.001	14.60±1.1	14.47±1.2	12.54±1.4	<.001	12.99±1.1	12.35±.7	11.05±.91	.009
<b>Hct</b> (%)	43.21±3.32	43.13±3.03	42.01±2.66	.591	44.26±2.9	43.81±2.7	42.58±2.5	.292	40.32±2.7	39.51±2.1	39.1±1.9	.659
<b>MCV</b> (fL)	90.39±4.42	84.97±4.81	74.49±7.28	<.001	90.91±4.41	85.83±4.70	74.54±2.89	<.001	89.12±4.2	81.41±3.6	73.59±.5	<.001
<b>MCH</b> (pg/l)	29.82±1.82	27.87±2.34	21.98±3.09	<.001	29.99±1.7	28.34±2.2	22.09±3.7	<.001	29.42±1.9	25.93±1.7	21.69±.29	<.001
<b>MCHC</b> (g/dl)	32.96±1.08	32.77±1.42	29.43±1.82	<.001	32.99±1.44	33.01±1.43	29.40±2.21	<.001	32.89±1.2	31.83±1.1	29.48±.61	<.001
<b>RDW</b> (%)	13.27±.89	14.59±1.23	16.13±1.51	<.001	12.43±.91	13.85±1.2	16.18±1.4	<.001	12.88±.72	13.52±.54	15.11±2.3	<.001
<b>Platelet</b> (x10 <sup>9</sup> / L)	278.3±98.8	261.6±61.8	277.4±92.8	.461	272.2±87.4	261.3±72.4	257.4±124.5	.709	293.3±106.6	263.1±54.9	281.7±38.2	.693
<b>Iron Serum</b> (μg/dL)	91.29±19.31	82.15±102.4	60.29±28.2	<.001	81.9±5.5	76.6±4.5	51.2±27.5	<.001	120.6±17.5	99.5±30.8	78.5±26.4	<.001
<b>Ferritin Serum</b> (μg/dL)	156.1±47.7	157.4±45.9	118.2±59.66	<.001	179.1±28.1	169.8±21.4	121.12±79.7	<.001	88.1±22.6	87.5±26.1	84.4±24.4	.894



## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank all participants attending the HEMOAM for contributing and participating in this study. Also, the authors thank the staff of the Molecular Biology Laboratory of the Federal University of Amazonas (UFAM) and Gonçalo Moniz Institute – IGM (FIOCRUZ/BAHIA) for the technical support. Finally, the authors thank the Foundation for Research Support of the State of Amazonas (FAPEAM) for financial support. The sponsors of this study are public or nonprofit organizations that support science in general. They had no role in gathering, analyzing or interpreting the data.

Declaration of Interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

## 5. CONCLUSÃO

Ao estimarmos a frequência da Talassemia Alfa na população da Região Metropolitana de Manaus, o fato de encontrarmos prevalência de 7,9% corrobora com outros estudos brasileiros. O presente estudo demonstra a importância e relevância do diagnóstico de anemia genética na região Amazônica, destacando a amplitude das hemoglobinopatias, principalmente como um importante teste para o diagnóstico diferencial, especialmente entre anemia ferropriva.

A prevalência de 5,35% de talassêmicos no grupo de doadores de sangue ressalta o quanto importante é diagnóstico prévio da deleção. Mesmo compreendendo a rigidez com a qual o ciclo do sangue é estruturado, a possibilidade de um teste que viabilizasse a identificação de portadores de hemoglobinopatias potencializaria ainda mais a seleção de doadores, além de limitar a doação por parte dos portadores de talassemia alfa minor.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dotto FRC. Talassemias alfa e beta: revisão [Internet]. 2005. Available from: [http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/1564/Dotto\\_Fatima\\_Rosane\\_Colpo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/1564/Dotto_Fatima_Rosane_Colpo.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (Acesso em 03/06/2018).
2. Cançado RD. Talassemias alfa Alpha thalasseмииs Rodolfo. Rev bras hematol hemoter 2006;28(2)81-87.
3. Koza K. Hemoglobinopathies and thalasseмииs – genetic basis and molecular diagnosis. 2012;(7):589–94.
4. Simões BP, Pieroni F, Barros GMN, Machado CL, Cançado RD, Salvino MA, et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. Rev Bras Hematol Hemoter. 2010;32:46–53.
5. Manning LR, Russell JE, Padovan JC, Chait BT, Popowicz A, Manning RS, et al. Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. 2007;16(8):1641–58.
6. Koury MJ, Sheftel AD, Ponka P. Erythropoiesis, Hemoglobin Synthesis, and Erythroid Mitochondrial Iron Homeostasis. Handb Porphyr Sci (Volume 27) [Internet]. 2013;27:41–84.
7. Hardison RC. Evolution of Hemoglobin and Its Genes. 2012;1–18.
8. Levings PP, Bungert J. The human beta-globin locus control region. Eur J Biochem. 2002;269(6):1589–99.
9. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harrison’s Principles of Internal Medicine. Star. 2015. 2958 p.
10. Spier C. Wintrobe’s Atlas of Clinical Hematology. Am J Surg Pathol. 2008;32:1428.
11. Harteveld CL, Higgs DR, Petrou M, Brugiatielli M, Old J, Hurley P, et al. A-Thalassaemia. Orphanet J Rare Dis [Internet]. 2010;5(1):13.
12. Ribeiro DM, Sonati MF. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassaemia. Vol. 7, Genetics and Molecular Research. 2008. p. 1045–53.

13. Hillman R, Ault K, Rinder H. Hematology in Clinical Practice. 4th Edition. 2005. p. 53–64.
14. Hoffbrand A V., Moss PAH. Fundamentos em Hematologia. 6<sup>a</sup>. Artmed Editora LTDA., editor. São Paulo; 2013. 384 p.
15. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. 2004;159–76.
16. Lorenzi TF. Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica. Editora Gu. Rio de Janeiro; 2006. 724 p.
17. Weatherall D, Provan A. Red cells I: inherited anaemias. Lancet. 2000;355(9210):1169–75.
18. Weatherall DJ, Dc W, Weatherall. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. 2012;115(22):4331–6.
19. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: Biochemical properties and clinical correlates. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(3).
20. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassaemia Syndromes: Fourth Edition. The Thalassaemia Syndromes: Fourth Edition. 2008. 1-846 p.
21. Weatherall DJ, Clegg JB. Public Health Reviews Inherited haemoglobin disorders : an increasing global health problem. 2001;79(8).
22. Borges E, Wenning MRSC, Kimura EM, Gervásio SA, Costa FF, Sonati MF. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. Brazilian J Med Biol Res. 2001
23. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Galanello Origa Orphanet J Rare Dis [Internet]. 2010;5:1–15.
24. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. Dtsch Ärzteblatt Int [Internet]. 2011;108(31–32):532–40.
25. Higgs DR, Weatherall DJ. The Alpha Thalassaemias. Cell Mol Life Sci. 2009;66(7):1154–62.
26. Longo DL, Piel FB, Weatherall DJ. The  $\alpha$ -Thalassaemias. N Engl J Med. 2014;20371(13):1908–16.

27. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. Thalassaemia. *The Lancet*. 2017.
28. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge University Press. 2009. 884 p.
29. Birgens H, Ljung R. The thalassaemia syndromes. 2007;11–25.
30. Mare A De, Groeneger AH, Schuurman S, Bergh FATJM Van Den, Slomp J. Assay For The Seven Most Prevalent  $\alpha$ -Thalassemia. 2010;34 (December 2009):184–90.
31. Voon HPJ, Vadolas J, Higgs D, Vickers M, Wilkie A, Pretorius I, et al. Controlling alpha-globin: a review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassemia. *Haematologica*. 2008;93(12):1868–76.
32. Borg J, Georgitsi M, Aleporou-Marinou V, Kollia P, Patrinos GP. Genetic recombination as a major cause of mutagenesis in the human globin gene clusters. *Clin Biochem*. 2009;42(18):1839–50.
33. Waye JS, Chui DHK. The  $\alpha$ -globin gene cluster: Genetics and disorders. *Clin Investig Med*. 2001;24(2):103–9.
34. Vichinsky E. Complexity of alpha thalassemia: Growing health problem with new approaches to screening, diagnosis, and therapy. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010. p. 180–7.
35. Vichinsky EP. Alpha thalassemia major--new mutations, intrauterine management, and outcomes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;35–41.
36. Steinberg MH, Bernard G. Forget, Douglas R. Higgs, David J. Weatherall. Disorder of Hemoglobin Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. 2<sup>a</sup>. Cambridge University Press, editor. Cambridge; 2009. 884 p.
37. Weatherall DJ. Thalassaemia: the long road from bedside to genome. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2004;5(8):625–31.
38. Adorno EV, Zanette Â, Lyra I, Seixas MO, Reis MG, Gonçalves MS. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. *Genet Mol Biol*. 2008;31(3):621–5.

39. Connes P, Monchanin G, Perrey S, Wouassi D, Atchou G, Forsuh A, et al. Oxygen uptake kinetics during heavy submaximal exercise: Effect of sickle cell trait with or without alpha-thalassemia. *Int J Sports Med.* 2006;27(7):517–25.
40. Machado P, Mendes C, Rosário VE do, Arez AP. A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária. *Rev Pan-Amazônica Saúde.* 2010;1(4):85–96.
41. Gao NG, Gao A, Sriskandan S, Slater J.  $\alpha$ -Thalassemia and Protection from Malaria. Vol. 3, *PLoS Medicine.* 2006. p. 564.
42. Danquah I, Mockenhaupt FP. A+-Thalassaemia and Malarial Anaemia. *Trends Parasitol.* 2008;24(11):479–81.
43. Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Gellert S, Otchwemah RN, Dietz E, Anemana SD, et al.  $\alpha$ -thalassemia protects African children from severe malaria. October. 2004;104(7):2003–6.
44. Para S, Mungkalasut P, Chanda M, Nuchprayoon I, Krudsood S, Cheepsunthorn CL. An observational study of the effect of hemoglobinopathy, alpha thalassemia and hemoglobin E on *P. vivax* parasitemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2018;10(1):1–7.
45. Weatherall DJ. The definition and epidemiology of non-transfusion-dependent thalassemia. *Blood Rev.* 2012;26(SUPPL.1):S3–6.
46. Li CK. New trend in the epidemiology of thalassaemia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017;39:16–26.
47. Adorno E., Couto F., Moura Neto JP., Menezes J., Rêgo M, Reis M., et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador , Bahia , Northeast Brazil Hemoglobinopatias em recém-nascidos de Salvador , Bahia , Nordeste do Brasil. *Cad Saude Publica.* 2005;21(1):292–8.
48. Couto FD, De Albuquerque ABL, Adorno E V., De Moura Neto JP, De Freitas Abbehusen L, De Oliveira JLB, et al.  $\alpha$ -thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: A molecular and hematological analysis. *Clin Lab Haematol.* 2003;25(1):29–34.

49. Aleluia MM. Avaliação de Biomarcadores em Indivíduos com Doença Falciforme da Região Sul da Bahia [Internet]. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz; 2016.
50. Alcoforado GH de M. Prevalência de talassemia alfa+ (deleção - $\alpha$ 3.7) na população adulta do estado do Rio Grande do Norte. Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2011
51. Meissner OR V. Diagnóstico molecular da talassemia  $\alpha$ + (deleção - $\alpha$ 3.7) em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia atendidos no Hemocentro Dalton Barbosa Cunha em Natal, Rio Grande do Norte Molecular. :90–1.
52. Souza AES, Cardoso GL, Takanashi SYL, Guerreiro JF.  $\alpha$ -Thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarém, Pará State. Genet Mol Res. 2009;8(2):477–81.
53. Tomé-alves R, Marchi-salvador DP, Orlando GM, Palharini LA, Imperial RE, et al. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia - importância diagnóstica. 2000;22(3):388–94.
54. Belisario AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM, Viana MB. Coinheritance of  $\alpha$ -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. Hemoglobin. 2010;34(6):516–29.
55. Filho ILS, Gonçalves MS, Adorno E V, Campos DP, Fleury MK. Triage de hemoglobinopatias e avaliação da degeneração oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme (HbAS), expostos a riscos ocupacionais. Rev Bras Hematol Hemoter. 2005;27(3):183–7.
56. Melo-Reis PR De, Naoum PC, Diniz-Filho JAF, Dias-Penna KGB, Mesquita MM De, Balestra FA, et al. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes no estado de Goiás, Brasil. J Bras Patol e Med Lab. 2006;42(6):425–30.
57. Hessel Tormen T. Frequência de TA (-3.7) em pacientes portadores de doenças falciformes em Curitiba - Paraná [Internet]. Universidade Federal do Paraná; 2015.
58. Wagner SC, Silvestri MC, Bittar CM, Friedrisch JR, Silla LMR, Para C. Prevalence of thalassemias and variant hemoglobins in patients with non-ferropenic anemia. bras hematol hemoter. 2005;27(1):37–42.

59. Lindenau JD-R. Frequência de mutações nos genes das cadeias alfa e beta da hemoglobina no Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
60. Ministério da Saúde Conselho Nacional de Saúde. Conselho Nacional de Saúde (Brasil). Resolução n o 466, de 12 de dezembro de 2012. Available from: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466\\_12\\_12\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html) (Acesso em 15/01/2019).
61. Brasil. LEI N° 11.105, DE 24 DE MARÇO DE 2005. Available from: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/lei/111105.html](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.html) (Acesso em 23/07/2018).
61. Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO N° 347, DE 13 DE JANEIRO DE 2005. Cons Nac SAÚDE. 2005;12-3.
62. IBGE. Panorama Populacional [Internet]. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2018. Available from: [www.ibge.com.br](http://www.ibge.com.br) (Acesso em 10/12/2018).
63. Lei Complementar n° 59, de 27 de dezembro de 2007. Diário Oficial do Estado do Amazonas [Internet]. 2007. <http://fnembrasil.org/wp-content/uploads/2017/10/RM-MANAUS-Lei-Complementar-59.pdf> (Acesso em 12/07/2018).
64. Baysal E, Huisman THJ. Detection of common deletional  $\alpha$ -thalassemia-2 determinants by PCR. Am J Hematol. 1994;46(3):208-13.
65. Foglietta E, Deidda G, Graziani B, Modiano G, Bianco I. Detection of  $\alpha$ -globin gene disorders by a simple PCR methodology. Haematologica. 1996;81(5):387-96.

## 7. ANEXOS





PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DAS HEMOGLOBINOPATIAS ESTRUTURAIS E DE SÍNTESE NA REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS-AMAZONAS.

**Pesquisador:** José Pereira de Moura neto

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 2

**CAAE:** 30868114.0.0000.5020

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 834.086

**Data da Relatoria:** 15/10/2014

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se da resposta ao Parecer No. 721.224, de 16/07/2014. O estudo foi classificado pelo pesquisador responsável, José Pereira de Moura Neto, docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, na Área Temática Especial Área 1. Genética Humana (Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;), Grande Área 2. Ciências Biológicas e Grande Área 4. Ciências da Saúde. O estudo tem como finalidade investigar a prevalência de hemoglobinopatias (HGP) nesta população, avaliando não só as condições sociais do local onde habitam como também correlacionar esses fatores com eventos de morbidade da doença.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Identificar a prevalência de alterações estruturais da hemoglobina e a presença das talassemias alfa e beta na população da cidade de Manaus e circunvizinhas e correlacionar com as características da população estudada, pois não existem dados sobre o assunto para esta região.

**Objetivo Secundário:**

**Endereço:** Rua Teresina, 4950  
**Bairro:** Adrianópolis **CEP:** 69.057-070  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3305-5130 **Fax:** (92)3305-5130 **E-mail:** cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 834.088

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O pesquisador responsável indica que haverá armazenamento de amostra, e justificou este armazenamento. Todas as amostras estarão sob responsabilidade do pesquisador responsável Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto, professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

O detalhamento da metodologia e recrutamento foi devidamente detalhado.

O pesquisador inseriu documento com título RESPOSTA AS PENDENCIAS Projeto Hemoglobinopias 2.doc, e em 16/09/2014 às 12:54:35, onde declara que a fase de o início das coletas para novembro de 2014, embora no item Cronograma do Protocolo gerado em 16/09/2014 13:49:48 ainda conste a etapa de Entrevista e Coleta Material terá início em 20/08/2014 e término em 31/07/2015.

O Orçamento está adequadamente apresentado, com todos os itens de custeio e capital.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

FOLHA DE ROSTO: Adequada. Assinada pelo pesquisador responsável, e pela Diretora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em exercício, Profa. Cynthia Tereza Corrêa da Silva.

INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS: Apresentado na resposta do pesquisador e separado apensado ao protocolo em 08/07/2014 11:21:16. ADEQUADO.

TERMO DE ANUÊNCIA: Nas submissões anteriores somente foi apensado a anuência da Fundação de Apoio ao HEMOAM Sangue Nativo, assinada pela Coordenadora Administrativa e Financeira, Érica Sousa Garcia. Portanto, foi solicitado pelo CEP a apresentação das anuências do Hospital Lázaro Reis, Manacapuru, do Hospital Geral José Mendes em Itacoatiara e do Centro de Saúde de Iranduba na cidade de Iranduba, que DEVIAM SER CONCEDIDAS PELO MAIOR RESPONSÁVEL DESTAS INSTITUIÇÕES, OU GESTOR LEGALMENTE AUTORIZADO PARA ANUÊNCIAS DESTA NATUREZA, EM PAPEL TIMBRADO DA INSTITUIÇÃO (VER PARECER ANTERIOR). Entretanto, foram apensados:

1) Arquivo Anuencia Hospital Geral José Mendes - Itacoatiara.pdf, apensado em 16/09/2014 12:57:21, constando de PAPEL TIMBRADO COM CABEÇALHO DA UFAM FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DATADO DE ITACOATIARA 28 DE JULHO DE 2014, com declaração de anuência assinada e com carimbo do Sr. Marcelo da Rocha Benlolo, Diretor Geral do Hospital Geral José

Endereço: Rua Teresina, 4950  
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 834.086

Mendes.

2) Arquivo Anuência Sec Saúde - Itacoatiara.pdf, apensado em 16/09/2014 12:56:22, constando DE PAPEL TIMBRADO COM CABEÇALHO DA UFAM FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DATADO TAMBÉM DE ITACOATIARA 28 DE JULHO DE 2014 com declaração da de anuência assinada e SEM carimbo pela Sra. Marly Barros Freire, indicando Diretora sem identificar a instituição (documento trocado?);

3) Arquivo Anuência Centro de Saúde - Iranduba.pdf, apensado em 16/09/2014 12:56:52, constando de PAPEL TIMBRADO COM CABEÇALHO DA UFAM FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DATADO TAMBÉM DE ITACOATIARA 28 DE JULHO DE 2014 com declaração da de anuência assinada e com carimbo pela Sra. Laene Conceição Gadelha, Secretária Municipal de Saúde de Itacoatiara (documento trocado?);

4) Arquivo Anuência Hospital Lázaro Reis - Manacapuru.pdf, apensado em 16/09/2014 12:55:58, sem qualquer cabeçalho, DATA EM MANAUS 29 DE JULHO DE 2014, com declaração da de anuência assinada e com carimbo do Sr. Marcelo Alves Cabral, indicando Diretor Geral Hospital e Maternidade Manacapuru, sem fazer referência se esta instituição corresponde à Unidade Mista Hospital Regional de Manacapuru e Maternidade Cecilia Cabral, local da coleta indicado pelo pesquisador.

Considerando as inconsistências entre local da anuência e local das instituições e que nenhum dos documentos apensados atende ao solicitado pelo CEP no parecer anterior onde dizia... [Entretanto, NÃO FORAM APENSADAS as anuências das instituições inseridas na resposta do pesquisador: o Hospital Lázaro Reis, Manacapuru, do Hospital Geral José Mendes em Itacoatiara e do Centro de Saúde de Iranduba na cidade de Iranduba. As anuências devem ser concedidas pelo maior responsável destas instituições, ou gestor legalmente autorizado para anuências desta natureza, em papel timbrado da instituição.] declaramos os documentos apresentados INADEQUADOS.

TCLE: Foram atendidas as solicitações do parecer anterior.

#### Recomendações:

##### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente protocolo de pesquisa apresenta relevância social e científica, porém não atendeu as pendências do Parecer anterior quanto aos termos de anuência do Hospital Lázaro Reis, Manacapuru, do Hospital Geral José Mendes em Itacoatiara e do Centro de Saúde de Iranduba na cidade de Iranduba, que por se tratarem de instituições de pleno direito deveriam ser apresentadas

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**PROJETO DE PESQUISA**

**Pesquisa:** Estudo do impacto nas rejeições imunes em terapia celular dos sistemas Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton e Gerbich no Hemocentro do Amazonas.

**Coordenador:** Sérgio Roberto Lopes Albuquerque

**Local:** Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

93312.4.0000.0009

**Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Coordenador Principal:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**PARECER**

**Parecer:** 213.167

**Data de Emissão:** 08/02/2013

**Justificativa do Projeto:**

Estratégias para aumentar a segurança transfusional tem sido cada vez mais necessárias na hemoterapia. A genotipagem de grupos sanguíneos pode reduzir as reações transfusionais com a transfusão de bolsas compatíveis em pacientes com alto anticorpos dirigidos contra o sistema sanguíneo de alta frequência, assim como em indivíduos com auto anticorpos.

**Pesquisa:**

Determinar a frequência dos sistemas Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton e Gerbich em gestantes e doadores de sangue atendidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM.

**Riscos e Benefícios:**

O momento da coleta do sangue será realizado por um profissional treinado, utilizando agulhas, bolsas e tubos descartáveis o que reduzirá o risco de alguma contaminação durante o processo de



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** MAPEAMENTO GENÉTICO EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

**Pesquisador:** José Pereira de Moura neto

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 2

**CAAE:** 46020315.4.0000.5020

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmaceuticas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.178.117

**Data da Relatoria:** 05/08/2015

**Apresentação do Projeto:**

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, responsáveis por mais de 17 milhões de óbitos ao ano. Aproximadamente 80% desses casos são registrados em países majoritariamente de baixa e média renda, representando 30% do total registrado no mundo. Estudos relativos à epidemiologia, fisiopatologia, biologia molecular, a identificação de genes e mapas genéticos têm sido capazes de estabelecer uma base sólida, tanto para o diagnóstico e tratamento da medicina cardiovascular. Estudos genéticos confirmaram diversas associações entre polimorfismos e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Além disso, sabemos que a distribuição dos diversos genótipos e de seus alelos depende das características étnicas das populações estudadas. Existem no Brasil inúmeros estudos genéticos relacionados às DCV, porém, no estado do Amazonas poucos são os conhecimentos relacionando polimorfismos genéticos em portadores de DCV. Objetivo: Nosso projeto tem o intuito de caracterizar molecularmente, hematologicamente e bioquimicamente marcadores relacionados à doença cardiovascular em pacientes atendidos no Hospital Universitário Francisca Mendes – HUFM, hospital de referência em cardiopatas, atendendo pacientes de todo o Amazonas e também de outros estados. Metodologia: Serão incluídas no presente estudo pacientes atendido nas clínicas, ambulatórios e os que irão



Continuação do Parecer: 1.178.117

realizar cirurgia cardíaca no Hospital Universitário Francisca Mendes, após concordarem com a participação no estudo, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A entrevista aos pacientes ocorrerá durante o atendimento e sua internação na Instituição. Dados relativos aos pacientes também serão obtidos dos prontuários médicos do hospital. Perspectivas: Entendemos da importância da diversidade genética para um estabelecimento de tratamento adequando aos pacientes portadores de DCV, além de direcionar uma tratamento preventivo desta patologia. Dados hematológicos e bioquímicos são fundamentais no diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes. A inclusão dos dados moleculares trará abordagem terapêutica mais precisa e rápido, o que ajudará remover complicações bioquímicas,

incluindo fatores precipitantes para DCV, e melhorará na prevenção e no tratamento rápido, adequando e ideal ao paciente.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Determinar os dados hematológicos, bioquímicos e demográficos nos pacientes. Confirmar a frequência dos polimorfismos utilizando-se o painel TruSight Cardiomyopathy Target Genes.

**Objetivo Secundário:**

- Determinar os dados hematológicos e bioquímicos nos pacientes;
- Determinar a frequência dos polimorfismos em genes importantes envolvendo cardiopatia;
- Associar os polimorfismos encontrados como dados hematológicos e bioquímicos, identificando possíveis marcadores na gravidade clínica;
- Correlacionar os polimorfismos encontrados com a clínica dos pacientes;
- Determinar possíveis biomarcadores moleculares e hematológicos com de risco para gravidade ou proteção para doença Cardiovascular

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

RISCOS E BENEFÍCIOS - APRESENTADOS E ADEQUADOS.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O modelo de estudo é uma coorte prospectiva onde serão incluídas pacientes atendido nas

Endereço: Rua Teresina, 4950  
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.178.117

clínicas, ambulatórios e os que irão realizar cirurgia cardíaca no Hospital Universitário Francisca Mendes, após concordarem com a participação no estudo, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou do Termo de Assentimento. Cumpre ressaltar que por se tratar de um estudo de Coorte, será explicado à cada pacientes sobre as coletas de dados clínicos, hematológicos e bioquímicos posteriores para cada momento de seu retorno, e que para isso não será necessário recoletar o sangue, uma vez que pegaremos os dados que constarão no prontuário médico. Considerando-se possíveis perdas em torno de 25%, o tamanho adotado foi de 1200 indivíduos. Serão excluídos do estudo indivíduos que discordarem com sua participação no estudo e que não quiserem assinar o TCLE. A abordagem aos pacientes ocorrerá durante o atendimento e a internação na Instituição e juntamente a esta será explicitado o projeto em questão e explicação do Termo de Consentimento. Desta forma, o paciente possuirá livre arbítrio para participar ou não do Projeto. Objetivo 1: As amostras de sangue serão coletadas por profissional habilitado, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Serão coletados a vácuo cinco mililitros de sangue venoso em EDTA (ácido etileno de aminotetraoético di-sódico). Uma fração do sangue será encaminhada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para procedimentos de análises moleculares. Os perfis hematológicos e bioquímicos serão encaminhadas aos os setores agência transfusional e laboratório do Hospital Universitário Francisca Mendes – HUFM. O hemograma será realizado o no aparelho ADVIA 120 e a bioquímica no LABMAX. Objetivo 2: Os indivíduos responderão ao questionário para coleta de dados demográficos, socioeconômicos e clínicos. A complementação relativa aos dados clínicos será obtida dos possíveis prontuários médicos existentes de acompanhamento dos mesmos. Objetivo 3: Para as análises moleculares, o DNA genômico será isolado de leucócitos a partir de 200L de sangue, utilizando-se o método direto QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), conforme protocolo do fabricante. O DNA será armazenado a -20 oC até o momento das análises atendendo a Resolução 441/2011-CNS durante o período necessário para as análises moleculares dos genes abaixo citados. Todavia, o material coletado (amostra de sangue) poderá ser armazenado por até 10 anos para futuras análises se somente autorizado pelo participante.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

FOLHA DE ROSTO: ADEQUADA. Assinada pelo pesquisador responsável, e pela Diretora em exercício da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Endereço: Rua Teresina, 4950  
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE  
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 1.178.117

**TERMO DE ANUÊNCIA: ADEQUADO.** Foi apresentada anuência do Diretor do Hospital Universitário Francisca Mendes, Dr. Pedro Elias de Souza.

**TCLEs: FORAM REAPRESENTADOS E ESTÃO ADEQUADOS.**

**ORÇAMENTO: R\$ 7.519,00 - RECURSOS PRÓPRIOS**

**CRONOGRAMA: INÍCIO 01/09/2015; COLETA DE DADOS 01/09/2015 31/10/2016; TÉRMINO 31/08/2017.**

**INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS APRESENTADO.**

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O presente protocolo de pesquisa apresenta relevância científica, reapresentado por apresentar pendências na primeira apresentação nos riscos, metodologias, TCLE e orçamento. O protocolo foi reapresentado e atende completamente a resolução 486/12 do CNS. Diante do exposto somos pela aprovação. Salvo melhor juízo é o parecer.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

MANAUS, 10 de Agosto de 2015

---

**Assinado por:**  
**Eliana Maria Pereira da Fonseca**  
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4950  
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br