



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA**

PÂMELA LOURDES PEREIRA DA SILVA

***SCREENING DO PERFIL HEMOGLOBÍNICO DE PESSOAS COM DOENÇA
FALCIFORME EM TRATAMENTO PELO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE NA
CIDADE DE BARREIRAS - BA***

BARREIRAS - BA

2025

PÂMELA LOURDES PEREIRA DA SILVA

**SCREENING DO PERFIL HEMOGLOBÍNICO DE PESSOAS COM DOENÇA
FALCIFORME EM TRATAMENTO PELO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE NA
CIDADE DE BARREIRAS - BA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Oeste da Bahia como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharela em
Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Paola
Rodrigues Venancio.

BARREIRAS - BA

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

S586 Silva, Pâmela Lourdes Pereira da.

Screening do perfil hemoglobínico de pessoas com doença falciforme em tratamento pelo Sistema Único de Saúde na Cidade de Barreiras - BA. / Pâmela Lourdes Pereira da Silva. – 2025.

58f.

Orientador: Profª Drª Larissa Paola Rodrigues Venancio.

Monografia (Graduação) – Bacharelado em Medicina. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2025.

1. Polimerase Chain Reaction. 2. Hemoglobinopatias. 3. Hb S. 4. Hb C. 5. Beta talassemia. I. Venancio, Larissa Paola Rodrigues. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 610

Biblioteca Universitária de Barreiras - UFOB



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA

Centro das Ciências Biológicas e da Saúde

Curso de Medicina

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos **28** dias do mês de **fevereiro** de **2025**, às **14h30**, em sessão pública realizada na sala 13 do prédio 2 do CRES da Universidade Federal do Oeste da Bahia, na presença da Banca Examinadora presidida pela **Profª Drª Larissa Paola Rodrigues Venancio** e composta pelos examinadores: **Profª. Drª. Josilene Ramos Pinheiro Michelsen (Uninassau)** e **Profª. M.Sc. Emilia Miguel Soares (PPGBiociências/UNESP)**, a aluna **Pâmela Lourdes Pereira de Souza** apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Screening do perfil hemoglobínico de pessoas com Doença Falciforme em tratamento pelo Sistema Único de Saúde na cidade de Barreiras - BA”** como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Medicina. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **aprovação** do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao aluno e demais presentes e eu, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim e pelos demais examinadores.

Documento assinado digitalmente



LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO
Data: 28/02/2025 16:53:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª Larissa Paola Rodrigues Venancio – presidente da banca examinadora

Documento assinado digitalmente



JOSILENE RAMOS PINHEIRO MICHELSEN
Data: 08/03/2025 13:25:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª Josilene Ramos Pinheiro Michelsen

Documento assinado digitalmente



EMILIA MIGUEL SOARES
Data: 06/03/2025 08:40:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª M.Sc. Emilia Miguel Soares

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, por ter possibilitado concluir mais uma etapa, de modo a vencer os obstáculos com sabedoria, aprendizado e discernimento nas decisões tomadas.

À minha família, minha mãe Maristela, meu pai Ivan, meu irmão Thales e meu namorado Lucas, por todo amor, carinho, companheirismo, apoio, incentivo, conselhos e cuidado de sempre ao longo da minha vida e da minha formação acadêmica. Sem vocês eu não chegaria até aqui e essa conquista não é só minha, é nossa.

Às minhas melhores amigas Zaira e Geovana por sempre torcerem por mim, vibrarem as minhas realizações, obrigada por todos os conselhos, momentos que compartilhamos e por me impulsionarem a conquistar meus objetivos. À minha amiga Lhaise, obrigada por sempre estar presente e me ajudar a crescer na graduação e como futura médica, você me inspira. Aos meus familiares e amigos que mesmo com a distância geográfica, se tornam presentes, incentivam e acreditam em mim.

Aos meus amigos que a graduação me presenteou, Ana Paula, Ingrid, Késsio e Suelem que dividem as vivências da Universidade comigo. Aos meus amigos do Laboratório de Agentes e Infecciosos e Vetores (LAIIVE), Ilana e Manoel, obrigada pelos conselhos e por dividirem tantos momentos de trabalho comigo, por todos os ensinamentos e compartilhamentos de experiências.

À minha orientadora professora Dra. Larissa Paola Rodrigues Venancio por confiar em mim para desenvolver este trabalho, acreditar no meu potencial, por estar sempre solícita, me auxiliar nos momentos de dúvidas e dividir comigo seus conhecimentos e experiências na ciência. Tenho muito orgulho e me sinto privilegiada por fazer parte da sua equipe de pesquisa.

À equipe do Programa de Atenção à Pessoa com Doença Falciforme do município de Barreiras – BA pelo apoio ao grupo de pesquisa desde o início e aos pacientes por aceitarem participar do estudo e confiarem em nós, uma possibilidade de mais informações sobre a sua condição genética.

Aos docentes do curso por compartilharem seus conhecimentos e experiências.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do estudo.

SILVA, P.L.P. *Screening* do perfil hemoglobínico de pessoas com doença falciforme em tratamento pelo Sistema Único de Saúde na cidade de Barreiras – BA. **Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso**, Bacharelado em Medicina, Universidade Federal do Oeste da Bahia.

RESUMO

A Doença Falciforme (DF) é constituída por um grupo de hemoglobinopatias caracterizada pela presença de pelo menos um alelo Hb S, uma variante estrutural da Hb A originada por uma mutação pontual no 6º códon do gene β -globina (*HBB*). A fisiopatologia desta alteração associa-se à anemia hemolítica, processos de isquemia e hipóxia tecidual por vaso-oclusão. A Hb S pode se apresentar em heterozigose composta com outras variantes estruturais, como a Hb C, Hb D e Hb E ou ainda com mutações de β -talassemia. Este estudo propôs identificar o perfil hemoglobínico de indivíduos portadores de DF em acompanhamento pelo Programa de Atenção à Pessoa com DF (PAPDF) do município de Barreiras-BA. Para isso, foi realizada a coleta de sangue periférico de portadores da doença, do qual foi feita a extração de DNA genômico com uso da resina Chelex. A análise das mutações de variantes estruturais foi realizada por PCR-RFLP, sendo as endonucleases de restrição HpyF3I (DdeI), BseMII (BspCNI) e EcoRI para as variantes Hb S, Hb C e D-LA respectivamente. As variantes de síntese para β -talassemia foram analisadas por PCR-AE, sendo investigadas as mutações IVSI-6, IVSI-110, IVSI-1 e CD39. Amostras que não tiveram o perfil hemoglobínico para β -talassemia definido com base nas mutações investigadas por PCR, foi realizado o sequenciamento genético do gene *HBB*. Foram analisados 97 indivíduos, com idade entre 1 e 71 anos. Do total de amostras investigadas, 69 (71,14%) são Hb SS, 23 (23,71%) Hb SC, 1 (1,03%) Hb CC e 1 (1,03%) S/ β^+ -talassemia mutação IVSI-6. Outrossim, pela genotipagem para Hb S, 3 (3,09%) foram definidos como Hb S₋ e para essa definição, foi realizado o sequenciamento genético que identificou o alelo Hb S em heterozigose com variantes de β -talassemia a saber: a rs713040, IVSII-16 e IVSII-666, assim como, confirmação do indivíduo portador da mutação IVSI-6 de β^+ -talassemia. Além disso, foi possível observar discordâncias entre o diagnóstico estabelecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em relação aos métodos de biologia molecular em 12,37% dos indivíduos avaliados. Portanto, foram identificados portadores de variantes Hb S e Hb C em homozigose e em heterozigose composta, variantes de β -talassemia (rs713040, IVSI-6, IVSII-16 e IVSII-666) em heterozigose composta com Hb S, determinando a frequência Hb SS > Hb SC > S/ β -talassemia > Hb CC. Ademais, a análise por biologia molecular mostra-se mais eficiente do que os métodos utilizados pelo SUS para diagnóstico de portadores de DF. Assim, o presente estudo identificou, pela primeira vez, o perfil hemoglobínico de participantes do PAPDF do município de Barreiras-BA por biologia molecular, descrevendo assim, a genética de hemoglobinopatias de uma região do Brasil ainda não investigada.

Palavras-chave: *Polimerase Chain Reaction*; hemoglobinopatias; Hb S; Hb C; beta talassemia.

SILVA, P.L.P. Screening of the hemoglobin profile of people with sickle cell disease being treated by the Unified Health System in the city of Barreiras – BA. **Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso**, Bachelor of Medicine, Federal University of Western Bahia.

ABSTRACT

Sickle Cell Disease (SCD) is a group of hemoglobinopathies characterized by the presence of at least one Hb S allele, a structural variant of Hb A originating from a point mutation in the 6th codon of the β -globin gene (HBB). The pathophysiology of this alteration is associated with hemolytic anemia, ischemic processes, and tissue hypoxia due to vaso-occlusion. Hb S can appear in heterozygous form combined with other structural variants such as Hb C, Hb D, and Hb E, or even with mutations of β -thalassemia. This study aimed to identify the hemoglobin profile of individuals with SCD under follow-up in the Sickle Cell Disease Care Program (PAPDF) of the municipality of Barreiras-BA. To achieve this, peripheral blood samples were collected from disease carriers, from which genomic DNA was extracted using Chelex resin. The analysis of mutations in structural variants was performed by PCR-RFLP, using the restriction endonucleases HpyF3I (DdeI), BseMII (BspCNI), and EcoRI for the Hb S, Hb C, and D-LA variants, respectively. The synthesis variants for β -thalassemia were analyzed by PCR-AE, investigating the mutations IVSI-6, IVSI-110, IVSI-1, and CD39. For samples with an undefined hemoglobin profile for β -thalassemia based on the mutations investigated by PCR, genetic sequencing of the HBB gene was performed. A total of 97 individuals, aged between 1 and 71 years, were analyzed. Of the total samples investigated, 69 (71.14%) were Hb SS, 23 (23.71%) were Hb SC, 1 (1.03%) was Hb CC, and 1 (1.03%) had S/ β^+ -thalassemia with the IVSI-6 mutation. Furthermore, genotyping for Hb S revealed that 3 (3.09%) were classified as Hb S₋, and for this classification, genetic sequencing identified the Hb S allele in heterozygosity with β -thalassemia variants, namely: rs713040, IVSII-16, and IVSII-666, as well as confirmation of the individual carrying the IVSI-6 mutation of β^+ -thalassemia. Additionally, discrepancies were observed between the diagnosis established by the Unified Health System (SUS) and the molecular biology methods in 12.37% of the evaluated individuals. Therefore, carriers of Hb S and Hb C variants in homozygosity and compound heterozygosity, as well as β -thalassemia variants (rs713040, IVSI-6, IVSII-16, and IVSII-666) in compound heterozygosity with Hb S, were identified, determining the frequency as Hb SS > Hb SC > S/ β -thalassemia > Hb CC. Moreover, molecular biology analysis proved to be more efficient than the methods used by SUS for diagnosing SCD carriers. Thus, this study, for the first time, identified the hemoglobin profile of participants in the PAPDF program in the municipality of Barreiras-BA using molecular biology, describing the genetics of hemoglobinopathies in a region of Brazil that had not yet been investigated.

Keywords: Polymerase Chain Reaction; hemoglobinopathies; Hb S; Hb C; beta thalassemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação esquemática da estrutura tetramérica da hemoglobina com identificação das cadeias globínicas, grupos heme e átomo de ferro.....10
- Figura 2.** Representação esquemática da ontogenia das cadeias globínicas com identificação das famílias gênicas α -globina e β -globina, expressão dos genes e tipos de hemoglobinas ao decorrer do período de desenvolvimento humano.....12
- Figura 3.** Representação esquemática das alterações genéticas no gene HBB que dão origem a HbS, HbC e β -talassemia.....15
- Figura 4.** Representação esquemática das posições das mutações deletionais de PHHF-1 (Black) e PHHF-2 (Ganense) no cromossomo 11.....18
- Figura 5.** Representação esquemática da fisiopatologia da Doença Falciforme.....19
- Figura 6.** Representação esquemática das principais complicações clínicas da Doença Falciforme.....20
- Figura 7.** Mapa com representação do número estimado de nascimentos com anemia falciforme mundial a cada 100.000 nascidos em 2015.....22
- Figura 8.** Mapa com representação da distribuição de casos de DF no Brasil em 2020....22
- Figura 9.** Fluxograma de diagnóstico de Doença Falciforme e encaminhamento a Centros de Referência.....24

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AE	Alelo-Específico
AVE	Acidente vascular encefálico
CD	Mutação em códon
CD44	Códon 44
CD39	Códon 39
DMSO	Dimetilsulfóxido
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina A (normal)
Hb C	Hemoglobina C
Hb D-LA	Hemoglobina D-Los Angeles
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb S	Hemoglobina S
Hb S/ β -talassemia	Interação entre Hb S e beta talassemia
<i>HBB</i>	Gene β -globina
HC	Hidroxicarbamida
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HU	Hidroxiureia
IVS	Mutação em íntron
IVSI-1	Mutação no íntron 1, nucleotídeo 1
IVSI-110	Mutação no íntron 1, nucleotídeo 110
IVSI-5	Mutação no íntron 1, nucleotídeo 5
IVSI-6	Mutação no íntron 1, nucleotídeo 6
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
ng/ μ L	Nanograma por microlitro
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
PAPDF	Programa de Atenção à Pessoa com Doença Falciforme
RFLP	Polimorfismo por Tamanho de Fragmentos de Restrição
SUS	Sistema Único de Saúde
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UTR	Região transcrita e não traduzida
α	Gene alfa
ζ	Gene zeta
ε	Gene epsílon
γ^G	Gene gama glicina
γ^A	Gene gama alanina
δ	Gene delta
β	Gene beta
β^+	Beta mais talassemia
β^0	Beta zero talassemia

SUMÁRIO

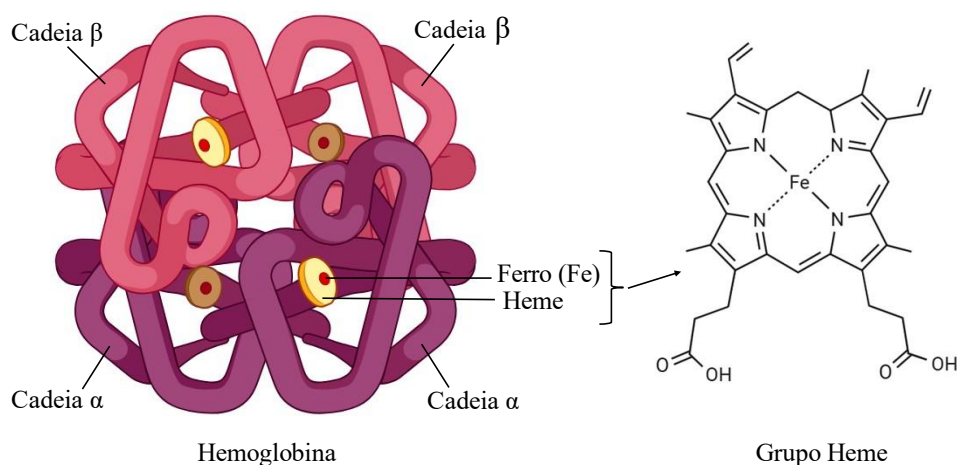
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Hemoglobina.....	10
1.2 Hemoglobinopatias	12
1.2.1 Variantes estruturais de hemoglobina - Alterações qualitativas	13
1.2.2 Talassemia: Variante de síntese de hemoglobina - Alteração quantitativa....	15
1.3 Doença Falciforme	18
1.3.1 Fisiopatologia da Doença Falciforme	18
1.4 História da mutação falciforme e sua distribuição no Brasil.....	20
1.5 Diagnóstico de hemoglobinopatias no Brasil.....	23
1.6 Tratamento da Doença Falciforme no Brasil	25
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivo específico	28
4 ARTIGO	29
5 CONCLUSÃO.....	52
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma proteína tetramérica formada por duas cadeias alfa (α) e duas cadeias beta (β), além de quatro moléculas heme ligadas a um átomo de ferro (Figura 1), sendo responsável pelo transporte de gases no organismo, principalmente de oxigênio (O_2) dos pulmões para os tecidos e retorno de dióxido de carbono (CO_2), além de outros gases, como óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO) (Schechter, 2008).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura tetramérica da hemoglobina com identificação das cadeias globínicas, grupos heme e átomo de ferro.



Legenda: Estrutura quaternária da molécula de hemoglobina, composta por ligações das cadeias globínicas que contribuem com a estabilidade da proteína. Fonte: Autoria própria, criado com BioRender, 2025.

As cadeias globínicas α e β são expressas por genes localizados em duas famílias gênicas ou também chamadas de *cluster*, a α -globina localizada no braço curto do cromossomo 16 e a família β -globina, localizado no braço curto do cromossomo 11. Essas famílias gênicas são constituídas por pseudogenes e genes funcionais dispostos na ordem de expressão de acordo com o período do desenvolvimento humano intrauterino. Pseudogenes são sequências de DNA não funcionais que apresentam semelhança com genes funcionais (Ip *et al.*, 2020).

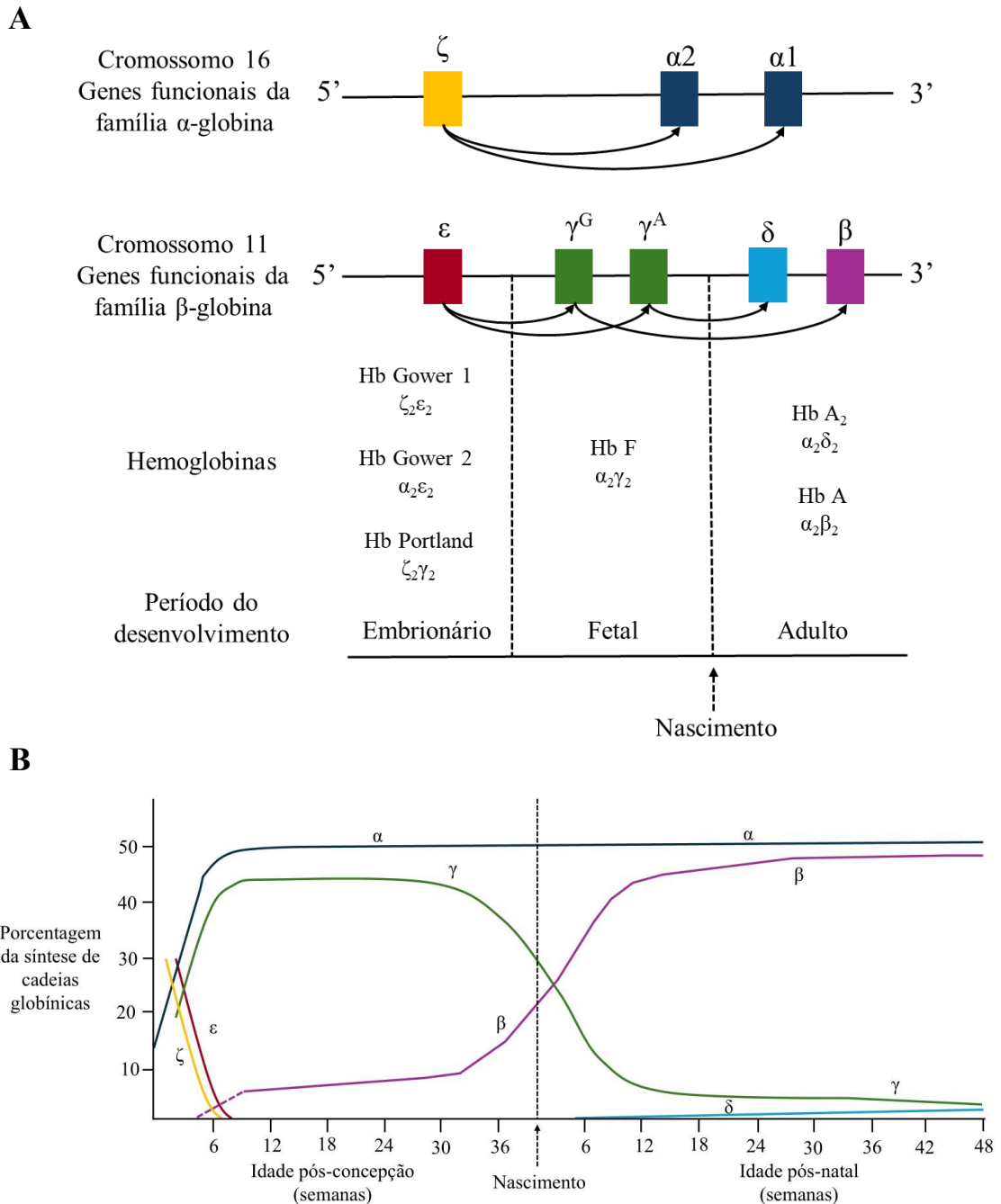
Na família α -globina os genes funcionais são zeta (ζ) (*HBZ*), $\alpha 2$ (*HBA2*) e $\alpha 1$ (*HBA1*), enquanto que os pseudogenes são *pseudo zeta* ($\Psi\zeta$), *pseudo alfa 2* ($\Psi\alpha 2$) e *pseudo alfa 1* ($\Psi\alpha 1$); os genes *mu* (μ) e teta 1 (θ) também fazem parte da família α -globina e já foram considerados pseudogenes, porém, são encontrados RNAm desses genes no tecido eritroide embrionário humano, mas as concentrações são baixas e não formam uma hemoglobina viável (Brasil, 2024a). A família β -globina possui os genes funcionais

épsilon (ϵ) (*HBE1*), gama glicina (γ^G) (*HBG2*), gama alanina (γ^A) (*HBG1*), delta (δ) (*HBD*) e β (*HBB*), e o pseudogene *pseudo beta* ($\Psi\beta$) (Figura 2A) (Schechter, 2008).

A expressão gênica das globinas ocorre de modo temporal durante o desenvolvimento dos seres humanos, originando diferentes moléculas de Hb que são controladas por elementos regulatórios de acordo com os períodos de desenvolvimento (embrionário, fetal e adulto), promovendo a ativação e silenciamento dos genes (Figura 2A e 2B).

No início da gestação, compreendendo o período embrionário, são sintetizadas as Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) sendo o sítio de eritropoiese o saco vitelino (Dzierzak; Philipsen, 2013). No período fetal, a Hb Fetal (Hb F) ($\alpha_2\gamma_2$) é a sintetizada e possui maior afinidade pelo oxigênio quando comparada à Hb adulta (Hb A), sendo o sítio de eritropoiese alterado para fígado e baço (Weatherall; Clegg, 2001). Após o nascimento, que compreende o período adulto, por volta dos 6 meses, a Hb A ($\alpha_2\beta_2$) e Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) são as hemoglobinas predominantes, com redução gradual da expressão das cadeias γ por silenciamento gênico, sendo o perfil hemoglobínico adulto composto majoritariamente por Hb A (95 - 98%), em seguida a Hb A₂ (2,0 - 3,3%) e Hb F (0,1 - 1,2%) e a eritropoiese é realizada pela medula óssea (Ivaldi *et al.*, 2007).

Figura 2. Representação esquemática da ontogenia das cadeias globínicas com identificação das famílias gênicas α -globina e β -globina, expressão dos genes e tipos de hemoglobinas ao decorrer do período de desenvolvimento humano.



Legenda: A. Organização dos genes funcionais da família α -globina localizada no cromossomo 16 e da β -globina no cromossomo 11. A ordem de transcrição 5' - 3' está indicada da esquerda para a direita e as setas curvas indicam a ativação e silenciamento da expressão gênica de acordo com o período de desenvolvimento intrauterino. B. Porcentagem da expressão dos genes das cadeias globínicas de acordo com as semanas de desenvolvimento humano. Fonte: Autoria própria, 2025.

1.2 Hemoglobinopatias

Hemoglobinopatias constituem um grupo de alterações genéticas de herança autossômica recessiva que causam modificações na expressão de cadeias globínicas, as

quais podem resultar em alterações na estrutura da hemoglobina originando as variantes estruturais, ou seja, tipos de Hb variantes da Hb A, como as Hb S, Hb C, Hb D-Los Angeles (Hb D-LA) e Hb E ou alterações quantitativas, onde ocorre modificação na proporção de codificação das cadeias α -globina e β -globina, que são as variantes de síntese, também chamadas de Talassemias, originando assim, a α -talassemia e a β -talassemia (Mamas *et al.*, 2022). Além disso, também pode ocorrer alterações de período de síntese, que é a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), uma condição em que o indivíduo continua expressando as cadeias γ após o nascimento, apresentando níveis elevados de Hb F ao longo da vida (Lu *et al.*, 2022).

1.2.1 Variantes estruturais de hemoglobina - Alterações qualitativas

A Hb S (HBB:c.20A>T), também chamada de mutação falciforme, é a variante estrutural da Hb A mais comum no mundo, originada por uma mutação *missense* no 6º códon do gene *HBB*, ocasionada pela troca do nucleotídeo adenina por timina (Figura 3A e 3B), resultando na substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina (Kato *et al.*, 2018; Shriner; Rotimi, 2018). O alelo Hb S em homozigose origina o quadro de Anemia Falciforme (AF), quando em heterozigose com a Hb A tem-se o traço falciforme e a heterozigose com outra hemoglobinopatia, tem-se o quadro de Doença Falciforme (DF). Além disso, a condição de Hb S em heterozigose com outra variante estrutural ou β -talassemia, é geneticamente chamado de heterozigoto composto.

A Hb C (HBB: c.19G>A) também é causada por uma mutação de ponto no 6º códon do gene *HBB*, resultando na troca do aminoácido ácido glutâmico por lisina (Figura 3B) (Esoh; Wonkam, 2021). O indivíduo heterozigoto Hb SC ou Hb C/ β -talassemia, pode apresentar quadro clínico mais grave, enquanto Hb C em homozigose pode levar a anemia hemolítica e indivíduos Hb AC são assintomáticos (Goheen; Campino; Cerami, 2017).

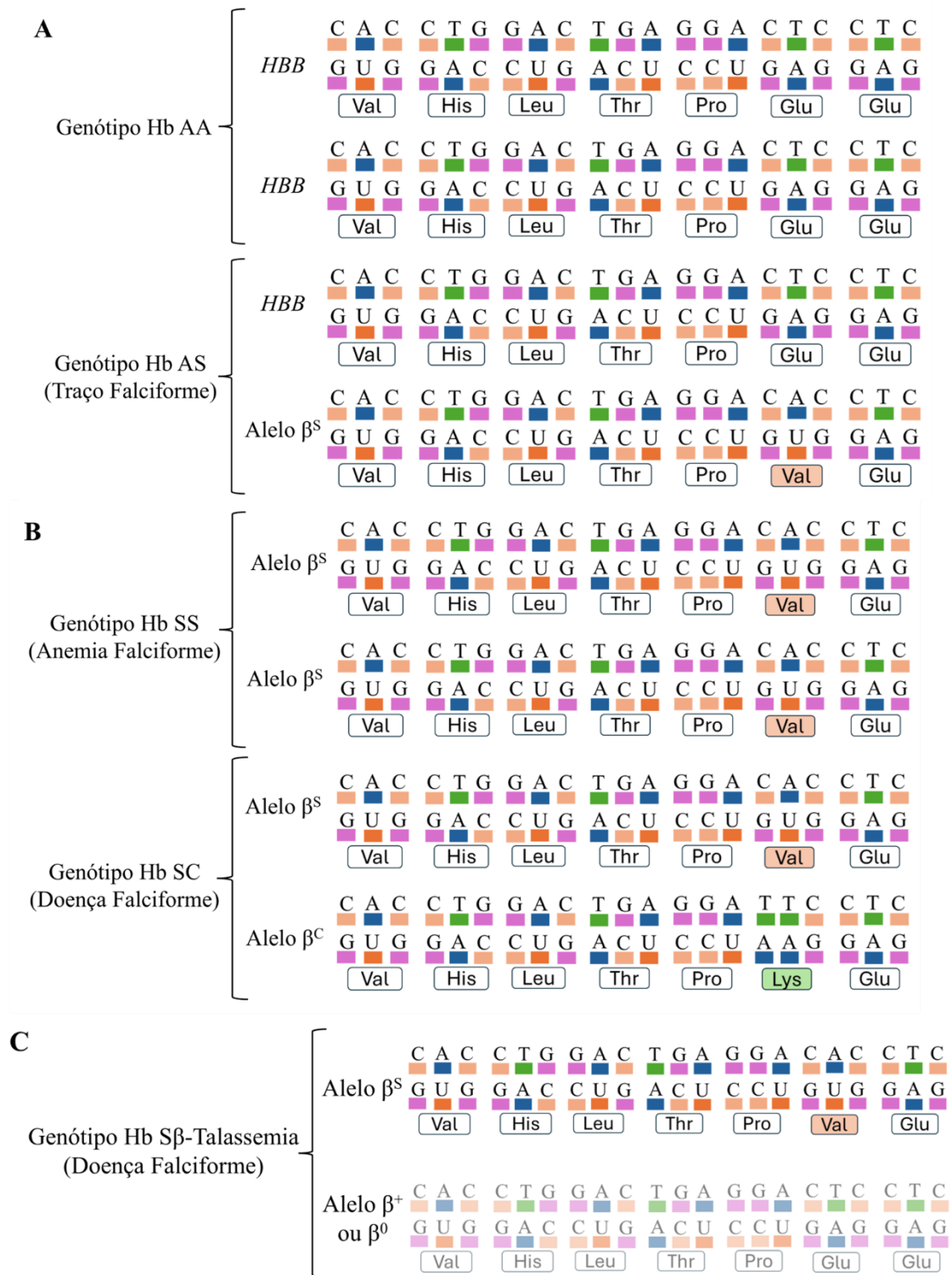
A variante Hb D-LA (HBB: c.364G>C), também conhecida como Hb D-Punjab, depois de Hb S e Hb C, é a variante mais comum mundialmente, com predominância na região Punjab, noroeste da Índia, causada por uma mutação pontual no códon 121 do gene *HBB*, levando a troca do aminoácido glutamina pelo ácido glutâmico (Torres *et al.*, 2015). A Hb D-LA pode se apresentar em heterozigose com Hb A, não desencadeando alterações hematológicas ou clínicas, enquanto que em homozigose (Hb DD), herança rara, pode se apresentar com anemia hemolítica de leve a moderada; o heterozigoto composto Hb S/D-LA apresenta problemas clínicos moderados a graves, semelhante a AF, enquanto o heterozigoto Hb D-LA/ β -talassemia pode apresentar anemia microcítica hipocrômica ou

sem alterações hematológicas e clínicas significativas (Patel *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2012).

A anemia microcítica hipocrômica é definida por análise dos parâmetros hematológicos no exame do hemograma, com redução dos níveis em relação aos valores de referência, sendo anemia observada por níveis de Hb baixa, a microcitose por redução do Volume Corpuscular Médio (VCM), o qual analisa o tamanho médio dos eritrócitos e a hipocromia ocorre por baixos níveis de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), um parâmetro que avalia a quantidade de hemoglobina no interior do eritrócito (Harteveld; Higgs, 2010).

A Hb E (HBE1: c.79G>A) é causada por uma mutação de ponto no 26º códon do gene *HBB*, resultando na troca de lisina por ácido glutâmico (Olivieri; Pakbaz; Vichinsky, 2011). O alelo Hb E, quando em homozigose (Hb EE) é caracterizado por eritrócitos com morfologia anormal, anemia microcítica hipocrômica, com padrões hematológicos semelhantes a β -talassemia e os indivíduos heterozigotos Hb E (Hb AE), podem apresentar anemia leve. Quando em heterozigose Hb E/ β -talassemia ou co-herança Hb E/ α -talassemia, os indivíduos portadores podem desenvolver problemas clínicos de gravidade variável (Fucharoen; Weatherall, 2012).

Figura 3. Representação esquemática das alterações genéticas no gene *HBB* que dão origem a HbS, HbC e β -talassemia.



Legenda: β^S : beta S; β^C : beta C; β^+ : beta +; β^0 : beta 0. Fonte: Autoria própria, 2025.

1.2.2 Talassemia: Variante de síntese de hemoglobina - Alteração quantitativa

As talassemias são anemias microcíticas hipocrômicas causadas pela redução da síntese das cadeias α -globina ou β -globina, levando a α -talassemia e β -talassemia,

respectivamente, podendo ocorrer a redução parcial (α^+ ou β^+) ou total (α^0 ou β^0) na expressão dos seus respectivos genes (Weatherall; Clegg, 2001; Wagner *et al.*, 2010).

A α -talassemia é geralmente causada por *crossing-over* desigual, erro no pareamento dos genes *HBA2* e *HBA1*, resultando em deleção gênica, sendo as mutações $-\alpha3.7$ mais frequente na África e na região do Mediterrâneo e a $-\alpha4.2$, na Ásia, deleção de 3.7 kb e 4.2 kb, respectivamente (Borg *et al.*, 2009). No Brasil, além dessas duas mutações deletoriais que causam α -talassemia, há registros também da $-\alpha20.5$, deleção de 20.5 kb (frequente na região do Mediterrâneo), sendo a $-\alpha3.7$ com maior frequência (Wenning *et al.*, 2000). Quanto a Região Nordeste do Brasil, $-\alpha3.7$ também é a mutação deletorial mais frequente no Rio Grande do Norte (Alcoforado *et al.*, 2012) e na Bahia (Adorno *et al.*, 2005).

Na α^+ -talassemia, os indivíduos heterozigotos ou também chamados de portadores silenciosos ($-\alpha/\alpha$) apresentam leve ou nenhuma alteração hematológica, já os homozigotos α^+ -talassemia ($-\alpha/-\alpha$) e heterozigotos α^0 -talassemia ($--/\alpha\alpha$) podem apresentar moderada microcitose e hipocromia, enquanto que a expressão de apenas um gene α ($--/\alpha$) leva a chamada Doença de Hb H (Hb formada por tetrâmeros de cadeia β), causando anemia hemolítica crônica moderada ou grave, associado a icterícia e hepatoesplenomegalia; já o heterozigoto α^0 -talassemia ($--/--$) causa a Hidropsia fetal de Hb Bart (Hb formada por tetrâmeros do gene γ), caracterizada por grave hipóxia tecidual e óbito fetal (Mota *et al.*, 2017).

A β -talassemia é mais comumente causada por mutações pontuais, sendo as seguintes mutações mediterrâneas encontradas constantemente no Brasil: mutações β^0 CD39 (HBB: c. 118C>T) e IVSI-1 (HBB: c. 92+1G>T); mutações β^+ IVSI-110 (HBB: c. 93-21G>A) e IVSI-6 (HBB: c. 92+6T>C) (Araújo *et al.*, 2003; Reichert *et al.*, 2008).

A redução da expressão das cadeias β (Figura 3C) resulta em excesso de disponibilidade de cadeias α no eritrócito, o que culmina na sua precipitação e resulta em danos na membrana celular com conseqüente rompimento e liberação do conteúdo intraeritrocitário (hemólise) (Danjou; Anni; Galanello, 2011). No primeiro ano de vida, período em que ocorre a redução da expressão das cadeias γ para expressão da cadeia β -globina, indivíduos com β -talassemia podem apresentar palidez, atraso no crescimento e hepatoesplenomegalia (Higgs; Engel; Stamatoannopoulos, 2012).

Quanto a apresentação clínica, indivíduos com β -talassemia menor ou traço (β/β^+ , β/β^0) são assintomáticos ou podem apresentar um fenótipo discreto com anemia leve e assim, não precisam de tratamento; já os portadores de β -talassemia intermediária (β^+/β^+ ,

β^+/β^0) são sintomáticos, mas podem não precisar de transfusões sanguíneas frequentes (Carrocini *et al.*, 2017). Porém, indivíduos com β -talassemia maior (β^0/β^0) são sintomáticos com um curso grave da doença, podendo necessitar de transfusão sanguínea regularmente para tentativa da correção da anemia microcítica hipocrômica (Galanello; Origa, 2010), além da possível necessidade do uso de quelante de ferro para reduzir a sobrecarga de ferro nos órgãos, uma condição que influencia na morbidade e mortalidade desses indivíduos (Cançado; Jesus, 2007).

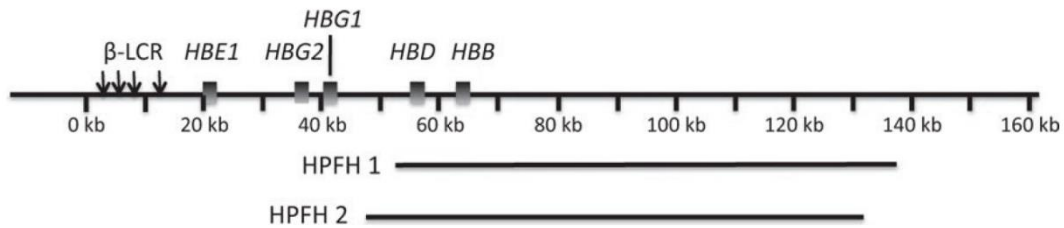
1.2.3 Variante de período de síntese: Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF)

A PHHF constitui uma condição genética causada por mutações deletionais ou não deletionais que resultam em expressão de Hb F ao longo de toda a vida do indivíduo. As mutações deletionais PHHF-1 (Black) e PHHF-2 (Ganense) são causadas por deleções no gene β -globina de 85 kb e 84 kb, respectivamente (Figura 4), resultando na continuidade de expressão das cadeias γ , os genes *HBG2* e *HBG1*, sendo mais frequentes em indivíduos de ascendência africana (Ngo *et al.*, 2019). A PHHF-3 (Indiana) é caracterizada por uma deleção de 48,5 kb e é mais frequente na Índia (Hariharan *et al.*, 2020).

Além da PHHF, outras condições genéticas podem estar associadas ao aumento dos níveis de Hb F ao longo da vida do indivíduo, como o haplótipo β^S Senegal e Árabe-Indiano (Powars *et al.*, 1994; Habara; Shaikho; Steinberg, 2017) e a presença dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) *XMNI-HBG2* na região promotora do gene *HBG2* (um dos SNPs envolvidos no haplótipo Árabe-Indiano) e região intergênica *HBSIL-MYB*, regulam positivamente a expressão gênica dos genes da cadeia γ e o gene 11A do linfoma/leucemia de célula B (*BCL11A*) regula negativamente a expressão das cadeias γ (Mohammad *et al.*, 2022).

Níveis elevados de Hb F (acima de 20%) podem melhorar o fenótipo de hemoglobinopatias incluídas na Doença Falciforme, como em indivíduos que apresentam o genótipo Hb S/PHHF (Rees *et al.*, 2010), assim como, PHHF associada a β -talassemia (Galanello; Origa, 2010), de modo a reduzir as complicações clínicas da fisiopatologia da doença e a necessidade de transfusões sanguíneas e internações hospitalares (Ngo *et al.*, 2019).

Figura 4. Representação esquemática das posições das mutações deletionais de PHHF-1 (Black) e PHHF-2 (Ganense) no cromossomo 11.



Legenda: HPFH - Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal. Fonte: Ngo *et al.*, 2019.

1.3 Doença Falciforme

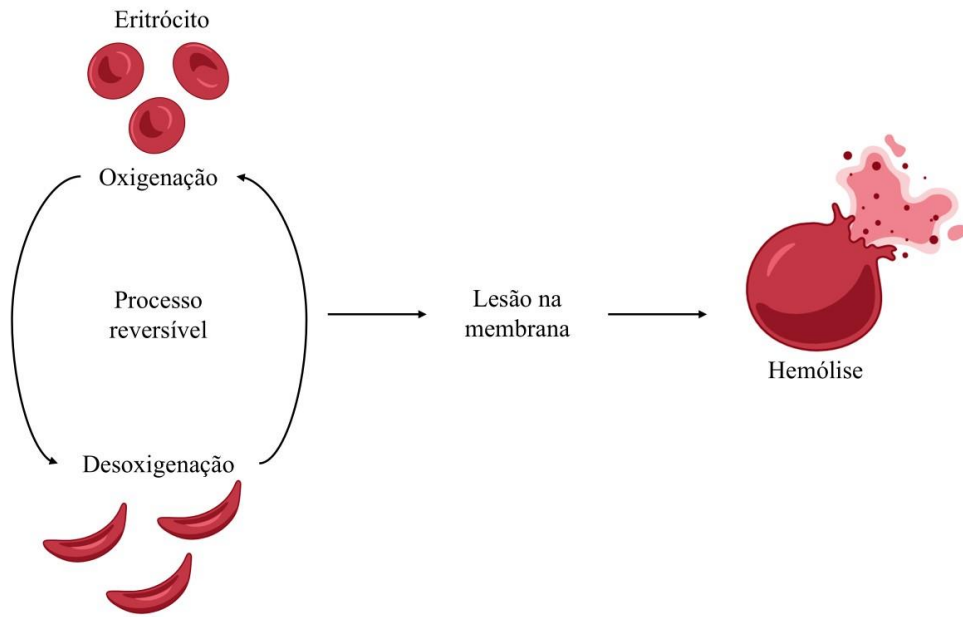
1.3.1 Fisiopatologia da Doença Falciforme

A presença do aminoácido valina originada pela mutação falciforme gera um sítio hidrofóbico que, em baixas concentrações de oxigênio (desoxigenada), forma uma ligação de hidrogênio com uma região hidrofóbica lateral constituída por leucina, alanina e fenilalanina, levando à polimerização da Hb S e, conseqüentemente, à falcização das hemácias, uma alteração estrutural também chamada de drepanócito (Ghatge *et al.*, 2017). A polimerização intraeritrocitária é um importante componente da fisiopatologia da DF, pois a falcização torna o eritrócito mais rígido, dificultando a passagem microvascular e propenso a hemólise, haja vista que os processos de falcização e reversão provocam alterações estruturais na membrana da célula (Figura 5A), causando aumento do estresse oxidativo no indivíduo, desencadeando novos processos hemolíticos e inflamatórios (Papageorgiou *et al.*, 2018; Sundd; Gladwin; Novelli, 2019).

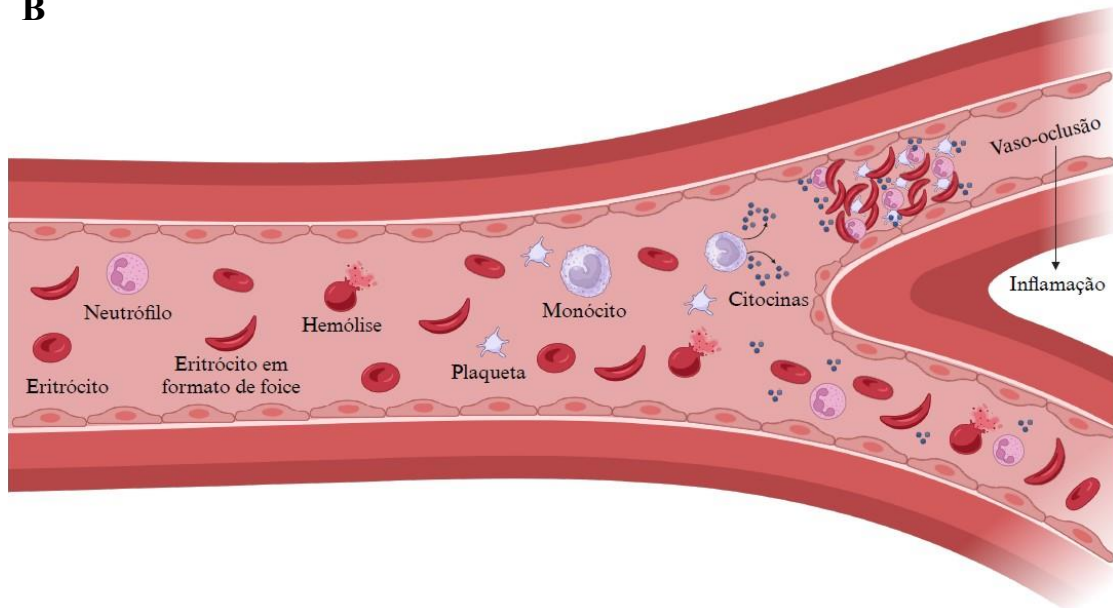
Além disso, o drepanócito provoca o recrutamento de leucócitos, ativação plaquetária e adesão endotelial, resultando em isquemia e hipóxia tecidual por vaso-occlusão (Figura 5B) e seguidamente, vasodilatação vascular e lesões de reperfusão, responsáveis por crises de dor recorrentes e diversas complicações clínicas, como necrose da cabeça do fêmur, acidente vascular encefálico (AVE), úlcera de perna, síndrome torácica aguda, inflamação crônica e outras complicações (Figura 6) (Williams; Thein, 2018; Nader; Romana; Connes, 2020).

Figura 5. Representação esquemática da fisiopatologia da Doença Falciforme.

A

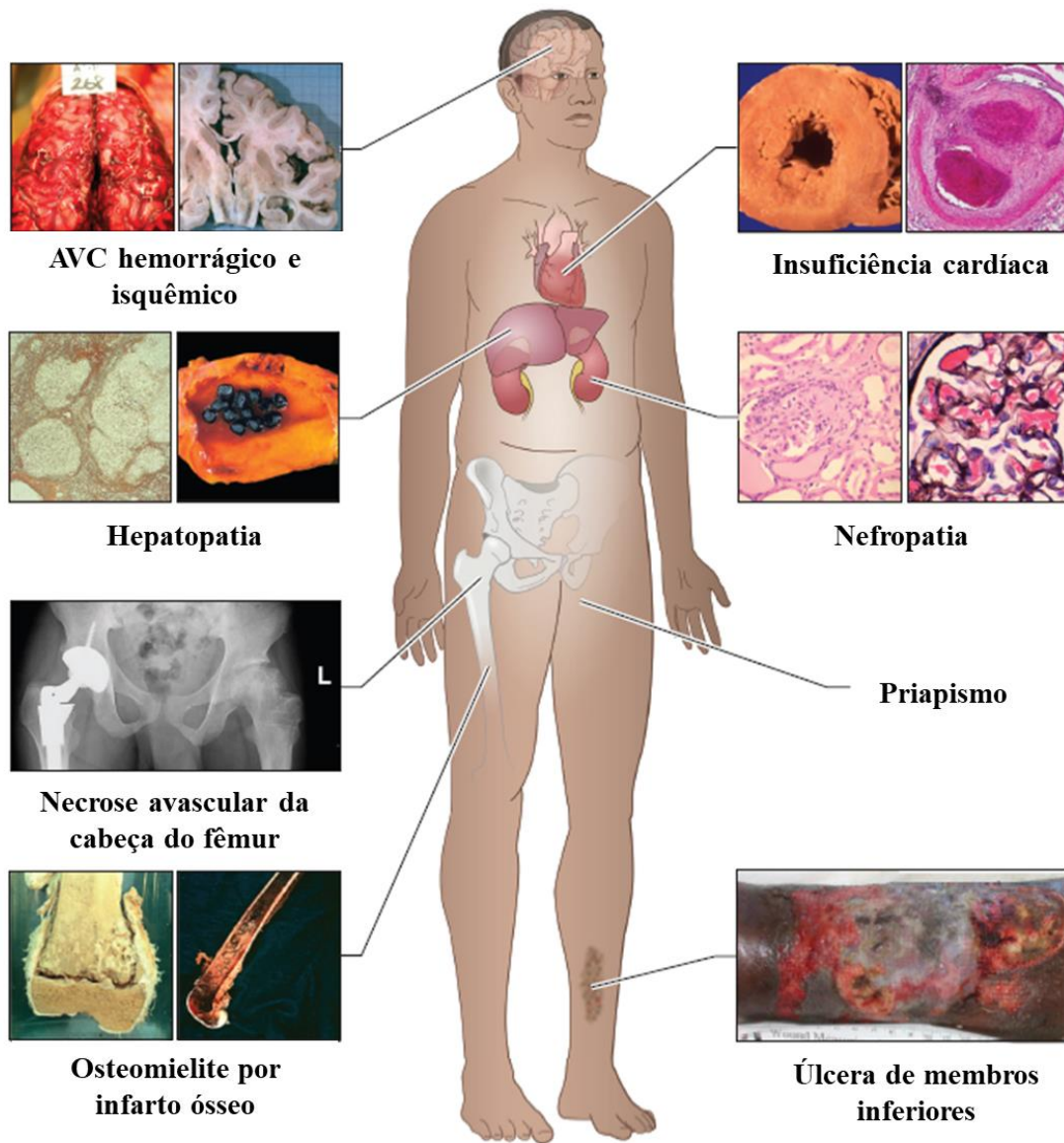


B



Legenda: Durante a desoxigenação, ocorre a polimerização intraeritrocitária da Hb S, causando a falcização do eritrócito, um mecanismo reversível que causa lesão na membrana e resulta em hemólise. A liberação do conteúdo do eritrócito aumenta o estresse oxidativo e atua como elementos pró-inflamatórios, ativando células endoteliais, recrutando macrófagos e neutrófilos, além de causar agregação plaquetária. Esses mecanismos resultam em vaso-oclusão, ocasionando inflamação, lesões por reperfusion, isquemia e hipóxia tecidual. Fonte: Autoria própria, criado com BioRender, 2025.

Figura 6. Representação esquemática das principais complicações clínicas da Doença Falciforme.



Fonte: Modificado de Williams; Thein, 2018.

1.4 História da mutação falciforme e sua distribuição no Brasil

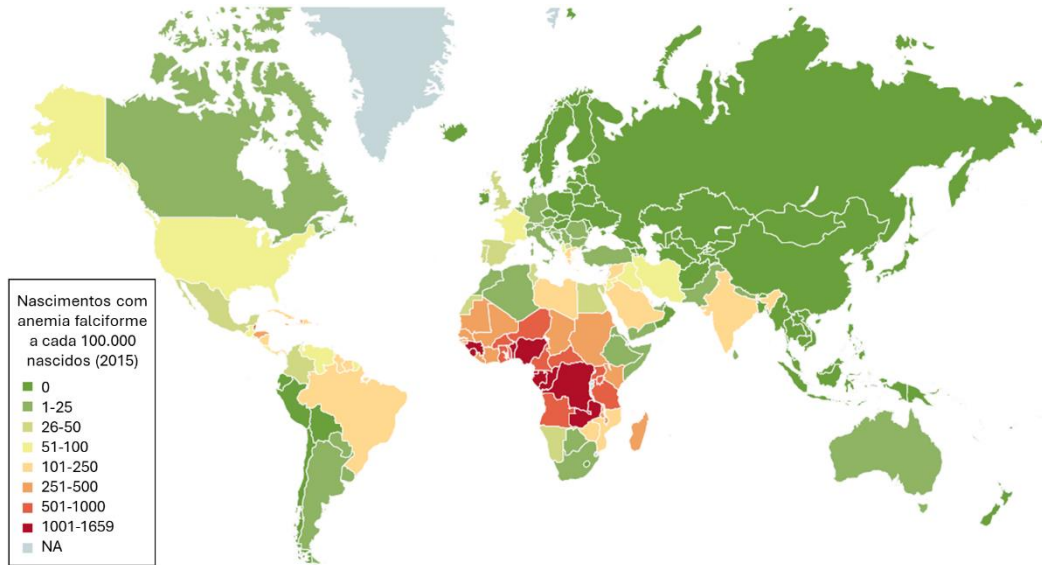
A mutação falciforme surgiu no continente Africano há pelo menos 7.000 anos, apresentando ampla distribuição global, com uma média anual de 300.000 recém-nascidos no mundo (Piel *et al.*, 2013; Shriner; Rotimi, 2018). Essa frequência mundial da mutação falciforme pode ser explicada pela vantagem do heterozigoto, a qual resulta em proteção contra a malária, doença grave causada pelo protozoário *Plasmodium falciparum* (Esoh; Wonkam, 2021), pois indivíduos heterozigotos para o alelo Hb S são menos propensos a contrair a doença, com baixa contagem do parasita e menor propensão ao quadro clínico grave, apresentando uma vantagem de sobrevivência quando

comparado aos indivíduos que não possuem a mutação, favorecendo o aumento da frequência do alelo falciforme nas áreas com alta incidência de malária (Serjeant, 2013).

A população do Brasil foi formada com a colonização do país por Portugal, originando a miscigenação constituída por povos indígenas, africanos, europeus e asiáticos distribuídos por todo o território (Auricchio *et al.*, 2007). A partir do ano de 1550, cerca de quatro milhões de africanos foram deslocados ao Brasil por imigração forçada e submetidos a escravidão, dessa forma, a mutação falciforme foi distribuída pelo país, tornando a DF a hemoglobinopatia mais frequente, se apresentando de forma heterogênea pelo território brasileiro em decorrência da origem étnica da população (Zago; Costa, 1985). A unidade federativa da Bahia foi o território em que os portugueses chegaram ao Brasil no ano de 1500 além de ser um dos principais estados brasileiros de recebimento de africanos submetidos a escravidão (Fonseca; Neto; Gonçalves, 2013).

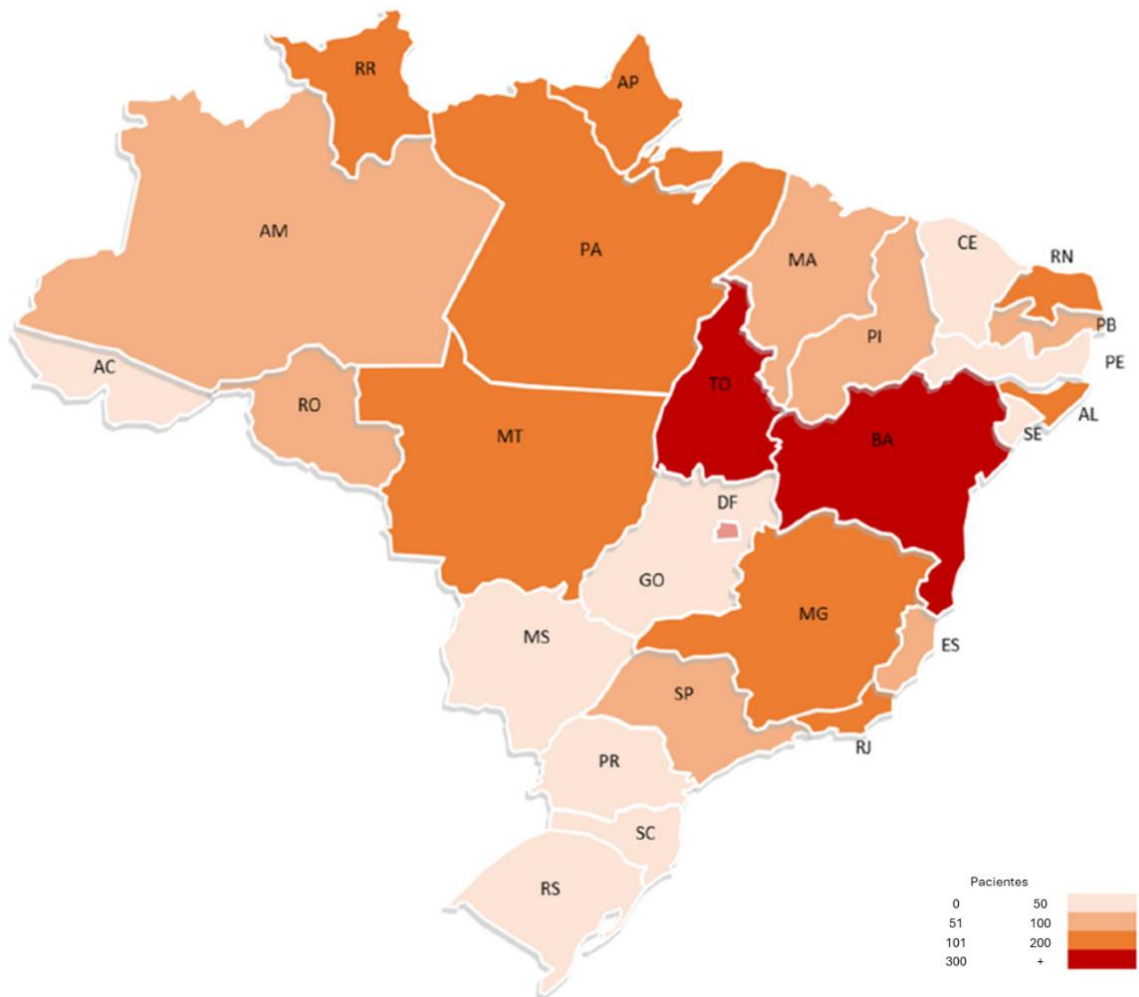
A frequência de nascimentos com AF é variável no Brasil, sendo que no ano de 2015, foram identificados entre 101 e 250 recém-nascidos a cada 100.000 nascimentos (Kato *et al.*, 2018). Quanto aos estados brasileiros, a frequência é mais expressiva nos estados com maior número de afrodescentes, como na Bahia, que a cada 650 recém-nascidos, 1 é portador de AF, em seguida o Rio de Janeiro com taxa de incidência de 1:1.200, seguido por Pernambuco, Maranhão e Minas Gerais, todos com taxa de 1:1.400 nascidos (Silva-Pinto *et al.*, 2019). No ano de 2020, Tocantis e Bahia foram os estados brasileiros com maior número de indivíduos com DF, sendo a Bahia o estado com maior frequência (Figura 8), com um total de 6112 indivíduos, correspondendo a 24,02% em relação ao total de casos registrados na Região Nordeste (Santos *et al.*, 2023). Dessa forma, é perceptível que a Bahia se destaca pela frequência de DF em relação a todo o Brasil, sendo nesse estado, que a DF foi demonstrada pela primeira vez com padrões de herança mendeliana autossômica recessiva por Accioly (1947).

Figura 7. Mapa com representação do número estimado de nascimentos com anemia falciforme mundial a cada 100.000 nascidos em 2015.



Legenda: NA: Não se aplica. Fonte: Modificado de Kato *et al.*, 2018.

Figura 8. Mapa com representação da distribuição de casos de DF no Brasil em 2020.



Fonte: Santos *et al.*, 2023.

1.5 Diagnóstico de hemoglobinopatias no Brasil

No Brasil, o diagnóstico de hemoglobinopatias é feito baseado em técnicas de eletroforese, hemograma completo e dosagem de Hb F, podendo ser complementado por outros testes em casos de diagnóstico inconclusivo para a correta análise (Anvisa, 2002). O diagnóstico precoce teve início no ano de 2001, no qual a triagem neonatal das hemoglobinopatias foi incluída no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) por meio do Teste do Pezinho. Já o diagnóstico tardio é feito para indivíduos que não realizaram a triagem neonatal em decorrência do nascimento anterior a 2001.

As principais técnicas laboratoriais utilizadas na triagem neonatal de hemoglobinopatias são a eletroforese por focalização isoelétrica (FIE) e a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) de troca catiônica (Brasil, 2024a). Outras técnicas complementares que podem ser utilizadas são a eletroforese alcalina em acetato de celulose, eletroforese ácida em ágar ou agarose, teste de solubilidade e dosagem de Hb A₂, sendo importante ressaltar que os neonatos triados como possíveis portadores de DF devem ser reavaliados para confirmação de AF ou outra hemoglobinopatia após o sexto mês de vida em decorrência da ontogenia das cadeias globínicas, pois o gene *HBB* é expresso após o nascimento (Anvisa, 2002; Brasil, 2024a). Dessa forma, a maioria dos indivíduos com β -talassemia não são identificados na triagem neonatal, sendo aos seis meses de vida um período ideal para confirmação diagnóstica (Brasil, 2002).

Nos casos de indivíduos portadores de Hb S em heterozigose com outra variante estrutural, é necessária a associação de técnicas de eletroforese alcalina e ácida para o correto diagnóstico; nos casos de Hb S em heterozigose com talassemias e PHHF, há semelhança no padrão da eletroforese, sendo necessária a quantificação de Hb A₂ e F para correto diagnóstico (Tabela 1) (Brasil, 2024a). Além disso, o diagnóstico de α -talassemia só é mais preciso por técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e *Southern blotting*, além de análise do hemograma, onde o VCM e a HCM podem estar reduzidos (Anvisa, 2002).

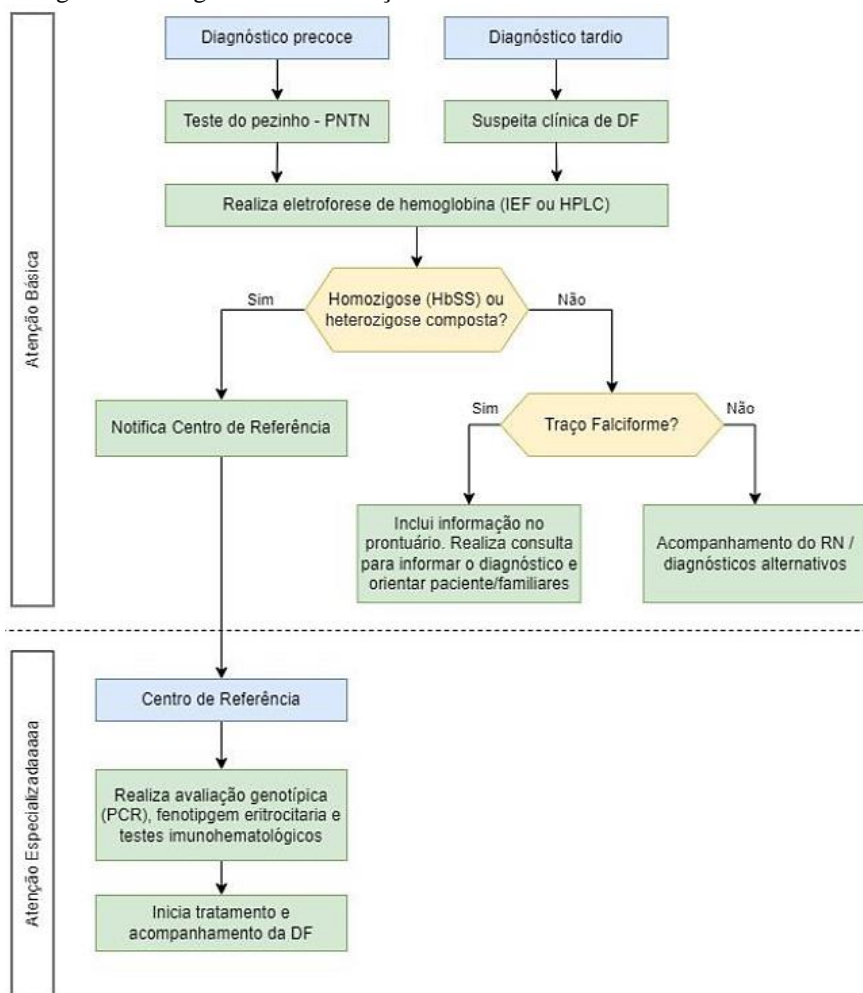
A Atenção Primária é a porta de entrada para o SUS e muitas vezes, é por meio desta que ocorrem suspeitas diagnósticas de DF de acordo com o quadro clínico apresentado no atendimento médico. Com isso, diante do resultado do Teste do Pezinho ou suspeita clínica de diagnóstico tardio de hemoglobinopatias, deve-se solicitar eletroforese de hemoglobina e confirmando a AF ou heterozigose composta, é realizado o encaminhamento para Centros de Referência em Hematologia para acompanhamento (Figura 9) (Brasil, 2024b).

Tabela 1. Parâmetros de diagnóstico diferencial das Síndromes Falciformes no Brasil.

Doença falciforme	Hemoglobinas presentes	%HbA ₂	VCM	Hemólise e crises de falcização
Hb SS	S, F, A ₂	Normal	Normal	Presente
Hb S/β ⁰ -tal	S, F, A ₂	Aumentada	Diminuído	Presente
Hb S/β ⁺ -tal	S, F, A ₂ , A (10-30%)	Aumentada	Diminuído	Presente
Hb S/δβ	S, F, A ₂	Normal ou diminuída	Diminuído	Presente
Hb S/α-tal	S, F, A ₂	Normal	Normal ou diminuída	Presente
Hb SC	S, F, C, A ₂	Normal	Normal	Presente
Hb SD	S, F, D, A ₂	Normal	Normal	Presente
Hb S/PHHF	S, F, A ₂	Normal	Normal	Ausente
Hb AS	A (maior que 60%) S, F, A ₂	Normal	Normal	Ausente

Legenda: Hb: Hemoglobina; tal: Talassemia; PHHF: Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal; VCM: Volume Corpuscular Médio. Fonte: Anvisa (2002).

Figura 9. Fluxograma de diagnóstico de Doença Falciforme e encaminhamento a Centros de Referência.



Legenda: HPLC: cromatografia líquida de alta resolução, IEF: eletroforese por focalização isoeétrica, PCR: Reação em Cadeia da Polimerase. Nota: A avaliação genotípica por método de biologia molecular (PCR) para confirmação de hemoglobinopatias não é realizada de maneira obrigatória, mas pode ser previsto nos casos em que não foi possível confirmar o diagnóstico com os métodos disponíveis. Fonte: Brasil, 2024b.

1.6 Tratamento da Doença Falciforme no Brasil

Em decorrência da origem genética da DF e da possibilidade de complicações clínicas do nascimento até a vida adulta do indivíduo, é necessário planejamento terapêutico precoce de acordo com a apresentação clínica e medidas profiláticas, objetivando diminuir consequências dos processos fisiopatológicos envolvidos na doença e assim, melhorar a qualidade de vida dos indivíduos (Cançado; Jesus, 2007). Dessa forma, é necessário acompanhamento médico frequente em centros de referência.

É importante a profilaxia contra infecções por meio do uso de antibióticos e vacinação, associado a cuidados com a hidratação e nutrição desses indivíduos, além da realização de transfusão sanguínea quando necessário, como nos casos de Acidente Vascular Encefálico (AVE), síndrome torácica aguda, anemia, sequestro esplênico, dentre outras indicações (Anvisa, 2001). Além disso, está incluído o uso de medicamentos para o controle da dor, além de quelante de ferro e ácido fólico nos casos necessários, assim como profilaxia antibiótica ao longo da vida nos casos de esplenectomia (Higgins *et al.*, 2022).

A *Food and Drug Administration* (FDA), órgão governamental dos Estados Unidos da América, autorizou quatro medicamentos para redução das complicações agudas da AF: Hidroxicarbamida (HC) ou também chamada de Hidroxiuréia (HU) (antineoplásico) a L-glutamina (aminoácido que objetiva reduzir o estresse oxidativo), Crizanlizumab (anticorpo monoclonal que inibe a P-selectina) e o Voxelotor (inibidor da polimerização da Hb S), aprovados respectivamente em 1998, 2018, 2019, 2020 (Park; Bao, 2022). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) autorizou apenas o uso de Crizanlizumab e da HC (Brasil, 2022). Vale salientar que, em setembro de 2024, o laboratório que realiza a produção do Voxelotor suspendeu a comercialização em decorrência da correlação com aumento dos episódios de crises vaso-oclusivas identificados em estudos clínicos (Pfizer, 2024), assim, o medicamento foi descontinuado.

A HC, em uso *off label*, é o medicamento mais utilizado para tratamento da AF no Brasil, com mecanismo de ação ainda não totalmente esclarecido, mas que aumenta os níveis de Hb F no organismo, podendo ser utilizada em bebês a partir dos 9 meses de idade (Higgins *et al.*, 2022). Vale salientar que a Hb F possui maior afinidade pelo oxigênio em relação a Hb A e Hb S, com isso, diminui os danos à membrana do eritrócito que seriam causados pela polimerização da Hb S, diminuindo as complicações da doença (Ngo *et al.*, 2019).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas é o tratamento que possibilita a cura da AF, mas com indicações apenas em casos de graves complicações clínicas e baixa resposta ao tratamento, além de necessitar de um doador e de compatibilidade HLA (Antígeno Leucocitário Humano), haja vista que há risco de aumento de morbidade e mortalidade, assim como, complicações inerentes ao procedimento (Brasil, 2024b). Dessa forma, embora curativa, não é uma terapêutica segura para uso em todos os indivíduos portadores de AF.

O avanço em estudos genéticos desenvolveu um método denominado CRISPR/Cas9, uma estratégia que possibilita uma edição genética por meio da quebra da dupla fita de DNA em um local específico e realizar o reparo de uma mutação que causa uma doença, seja por adição, exclusão, correção ou interrupção de sequências e em seguida, junção das extremidades e infusão no indivíduo (Park; Bao, 2021).

As estratégias ideais do uso do CRISPR ainda estão em desenvolvimento e apresentam alto custo financeiro, mas é uma possibilidade para aplicação no tratamento da AF, como por exemplo, na regulação negativa em regiões controladoras de expressão dos genes *HBG1* e *HBG2*, promovendo aumento da síntese de Hb F e uma possibilidade de melhora clínica da AF grave (Sharma *et al.*, 2023), ou ainda na correção da mutação pontual *missense* no gene *HBB* que causa a mutação falciforme (Magis *et al.*, 2022). Apesar das possibilidades de execução, CRISPR/Cas9 ainda não é uma terapia genética disponível para a população mundial em função do alto custo financeiro e da necessidade de estudos que confirmem a segurança do método e eficácia na aplicação em seres humanos (Tariq *et al.*, 2024).

2 JUSTIFICATIVA

A implementação da triagem neonatal das hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal do Brasil em 2001 proporcionou um importante progresso quanto ao conhecimento a nível nacional de pessoas portadoras de DF. Entretanto, a atualização de dados epidemiológicos são fundamentais para compreender a cobertura da triagem neonatal por todas as regiões do Brasil (Silva-Pinto *et al.*, 2019). Além disso, vale destacar que, cerca de 80% da população da Bahia é negra ou parda, um importante destaque para a relevância histórica da população afrodescendente no estado (Fonseca; Neto; Gonçalves, 2013). Assim, este é o primeiro estudo a investigar o perfil hemoglobínico de indivíduos portadores de DF no oeste baiano.

O Programa de Atenção à Pessoa com Doença Falciforme (PAPDF) do município de Barreiras-BA atende 678 pessoas portadoras de DF e outras hemoglobinopatias da região oeste da Bahia. Desses, 286 indivíduos são portadores de pelo menos um alelo S e não há registro de indivíduos portadores de Hb D. Acredita-se que o número de pessoas com DF na região oeste da Bahia ainda seja subestimado, haja vista que há indivíduos que são atendidos pelo SUS em Salvador-BA ou Brasília-DF e com isso, não há registro no PAPDF de Barreiras-BA. Entretanto, podem haver indivíduos que não estão registrados em algum serviço de saúde de atendimento a pessoas portadoras de DF por falta de conhecimento ou por dificuldade de acesso ao mesmo. Outra problemática destacada pelos profissionais da equipe multidisciplinar do PAPDF de Barreiras-BA é a estigmatização e falta de conhecimento que os indivíduos enfrentam por conta da pouca informação, especialmente dos profissionais da saúde, implicando em dificuldade de acesso e atendimento em unidades de saúde na cidade e na região (PAPDF, 2023, comunicação pessoal).

Desse modo, a análise simultânea de diferentes fatores genéticos envolvidos com a modulação da expressão fenotípica da DF, pode contribuir de forma singular para a compreensão dos desafios que se apresentam na construção de uma política pública de saúde que venha a atender uma demanda específica de um grupo suscrito desta população de pessoas portadoras de DF no oeste da Bahia, aperfeiçoando a universalidade, equidade e integralidade do atendimento no serviço de saúde, assim como ideal acolhimento desses indivíduos, favorecendo assim, o atendimento multiprofissional e a promoção da saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar o perfil genético relacionado às variantes estruturais e de síntese de hemoglobina em indivíduos portadores de doença falciforme participantes do Programa de Atenção à Pessoa com Doença Falciforme do município de Barreiras-BA.

3.2 Objetivo específico

- Identificar o genótipo dos indivíduos investigados quanto à presença de Hb S em homozigose ou em heterozigose composta com outras variantes estruturais (Hb C e Hb D-Los Angeles);
- Investigar a presença de variantes de síntese de cadeias globínicas (β -talassemia) em heterozigose composta com Hb S.

Os resultados deste estudo foram compilados em um manuscrito a ser submetido à revista *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* (Elsevier) (FI: 1,8). Dessa forma, foi previamente redigido seguindo o formato da revista supracitada. Além disso, foi elaborado com mais detalhes tendo a finalidade de complementar esta monografia.

4 ARTIGO

Screening do perfil hemoglobínico de pessoas com Doença Falciforme em tratamento pelo Sistema Único de Saúde no oeste baiano

Pâmela Lourdes Pereira da Silva¹; Larissa Paola Rodrigues Venancio¹

¹Grupo de Estudos em Genética Molecular (GEGMol), Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia

Resumo

Hemoglobinopatias constituem um conjunto de alterações genéticas da molécula de hemoglobina normal adulta (Hb A), as quais podem ser variantes estruturais, como Hb S, Hb C e Hb D-LA ou variantes de síntese, que são as talassemias α e β . A Doença Falciforme (DF) é formada por um grupo de condições genéticas associadas a presença de pelo menos um alelo Hb S com outra variante de Hb. A Hb S é uma variante de ampla distribuição mundial e no Brasil, a Bahia é o estado de maior frequência de casos de DF. Visto que os principais dados sobre estas alterações no estado da Bahia referem-se à indivíduos da região da capital do estado e recôncavo baiano, este estudo teve como objetivo realizar, pela primeira vez, a investigação do perfil hemoglobínico de portadores de DF atendidos pelo Programa de Atenção à Pessoa com DF no município de Barreiras, região oeste do estado da Bahia. Foram investigadas as variantes Hb S, Hb C e Hb D-LA por PCR-RFLP e mutações de β -talassemia IVSI-6, IVSI-110, CD39 e IVSI-1 por PCR-AE. Nos genótipos de β -talassemia não definidos por PCR, foi realizado o sequenciamento genético do gene *HBB*. Foram analisados 97 indivíduos, dos quais 69 (71,14%) são Hb SS, 23 (23,71%) Hb SC, 1 (1,03%) Hb CC, 1 (1,03%) S/ β^+ -talassemia mutação IVSI-6 e 3 (3,09%) Hb S₋. O sequenciamento genético confirmou a presença da mutação IVSI-6 anteriormente detectada por PCR-AE, mas também evidenciou a presença das variantes rs713040 (*HBB*:c.9T>C), IVSII-16 e IVSII-666 associadas a Hb S. Outrossim, foram observadas divergências entre o diagnóstico realizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em comparação à PCR em 12 (12,37%) indivíduos. Dessa forma, análises de biologia molecular associadas às técnicas clássicas para definição de perfil genético de herança de hemoglobinas mostram-se importantes para definição correta do diagnóstico destas alterações, contribuindo de maneira mais eficaz com a conduta clínica.

Palavras-chave: *Polimerase Chain Reaction*; Hb S; Hb C; IVSI-6; IVSII-16; IVSII-666.

Introdução

Hemoglobinopatias são originadas por alterações genéticas no gene β -globina (*HBB*), sendo a Hb S a alteração mais comum, resultante de uma mutação pontual no 6º códon do gene *HBB* (GAG>GTG), ocasionando a substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina¹. Em baixas concentrações de oxigênio, a Hb S é propícia à polimerização, levando a falcização das hemácias, podendo ocasionar isquemia por vaso-

occlusão em tecidos e órgãos, inflamação crônica, crises dolorosas recorrentes, anemia hemolítica, dentre várias outras complicações². Nesse sentido, a Doença Falciforme (DF) engloba um grupo de hemoglobinopatias constituídas por pelo menos um alelo Hb S.

As hemoglobinopatias podem ser originadas por alterações qualitativas na estrutura da hemoglobina, além de variações quantitativas na expressão do gene β -globina ou dos genes α -globina, causando as Talassemias, ou ainda de período de síntese, como a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), levando ao aumento dos níveis de Hb Fetal (Hb F) a longo da vida do indivíduo e possível melhora clínica das complicações da Hb S em portadores de S/PHHF³. Desse modo, vários padrões de herança relacionados à DF podem ser originados. A homozigose de Hb S (Hb SS) é denominada Anemia Falciforme (AF) e traço falciforme quando em heterozigose com Hb A (Hb AS). A DF pode se apresentar com Hb S em heterozigose composta com outra variante estrutural, como Hb SC, SD e SE, heterozigose composta com β -talassemia (β^0 ou β^+) ou co-herança com α -talassemia (α^0 ou α^+)⁴. A gravidade clínica de DF pode variar de acordo com o genótipo, onde indivíduos SS e S/ β^0 apresentam clínica moderada a grave, SC e S/ β^+ , leve a moderada e os indivíduos Hb AS podem ser assintomáticos e com padrões hematológicos normais⁵.

O Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), elaborado pelo Ministério da Saúde do Brasil, incluiu em sua 1ª edição de 2002, a Triagem Neonatal das Hemoglobinopatias, a qual consiste na identificação de crianças portadoras de DF com clínica significativa, como a AF, traço falciforme, β -talassemia, α -talassemia e hemoglobinas variantes, um importante passo para o diagnóstico precoce no Brasil⁶. Porém, a atualização de dados epidemiológicos é fundamental para compreender a cobertura da triagem neonatal por todas as regiões do Brasil⁷.

Os principais trabalhos sobre hemoglobinopatias no estado da Bahia trazem informações sobre o perfil genético de pessoas residentes na capital do estado e no Recôncavo Baiano. Neste contexto, este é o primeiro estudo a investigar o perfil hemoglobínico de indivíduos portadores de DF e atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Oeste da Bahia, região Nordeste do Brasil. Além de ser uma forma de divulgação de informação e conhecimento genético dessa população, contribui para o entendimento da composição genética brasileira envolvendo a DF em uma região da Bahia ainda não investigada.

Materiais e Métodos

1 Coleta de amostras e Casuística

Os indivíduos atendidos pelo Programa de Atenção à Pessoa com DF do município de Barreiras-BA foram convidados a participar do estudo, sendo incluídas as pessoas com ausência de dor no dia da coleta de sangue periférico, que não realizaram transfusão sanguínea nos últimos 120 dias, ausência de gravidez e de transplante de medula óssea. Noventa e sete indivíduos adequaram-se aos critérios de inclusão, portanto, puderam e aceitaram ter suas amostras analisadas. Este estudo teve aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB) sob registro CAAE: 29075620.6.0000.5026.

2 Extração de DNA genômico total e análise da integridade e qualidade

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico total ou leucócitos conforme protocolo com resina Chelex 100⁸, modificado no Laboratório de Agentes Infeciosos e Vetores (LAIVE), na UFOB, conforme descrito a seguir.

Inicialmente, foram adicionados 200µL da solução de Chelex 5% em microtubos de polipropileno de 2,0mL e aquecidos por 10 minutos a 100°C, adicionando em seguida, 500µL de sangue periférico total (ou volume de leucócitos disponível), aquecendo novamente por 8 minutos e em seguida, homogeneizado com agitador de tubos tipo Vortex e aquecido por 7 minutos. Seguidamente, os tubos foram centrifugados a 12.000xg por 1 minuto e 30 segundos em temperatura ambiente. Posteriormente, 500µL de sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5mL.

Em seguida, foi adicionado ao sobrenadante, 250µL de solução de acetato de amônio 7,5M. A solução foi homogeneizada e mantida em gelo por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram vortexadas por 5 segundos e centrifugadas por 10 minutos em 12.000rpm, a temperatura ambiente. Finalizando essa etapa, 720µL do sobrenadante contendo DNA genômico foi transferido para um novo microtubo de 1,5mL, no qual foi adicionado 72µL de acetato de sódio 3M.

Logo depois, foi adicionado 200µL de etanol absoluto gelado, levado ao vortex por 5 segundos e mantido em incubação por 4 horas em freezer para precipitação do DNA. Seguidamente, as amostras foram centrifugadas por 1 hora a 4°C em 15.000xg. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 200µL de etanol 75% gelado e em seguida, os microtubos foram centrifugados a 15.000rpm por 10 minutos a 4°C. O passo anterior foi repetido e logo após, o etanol foi retirado e o pellet lavado com 200µL de

isopropanol e deixado secando em fluxo laminar. Ao final da secagem, foi adicionado 10µL de TE 1X (Tris-EDTA), incubado a 55°C por 10 minutos e posteriormente, deixado overnight na geladeira, para total solubilização da amostra e em seguida, foi estocada em freezer.

A análise da integridade do material genômico foi realizada pelo método de eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio e analisado em transiluminador ultravioleta. A concentração e a qualidade do DNA extraído foram obtidos por espectrofotometria com uso do Varioskan Lux (ThermoFisher Scientific).

3 Investigação do perfil genético hemoglobínico

A investigação do perfil genético hemoglobínico por meio das amostras de DNA foi realizado por análise molecular com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e os indivíduos que não tiveram genótipo definido por esse método, foi necessária a análise por sequenciamento genético do gene *HBB* para identificação da mutação presente.

3.1 Hb S⁹ e Hb C¹⁰ por PCR-RFLP

A detecção das mutações para Hb S (HBB:c.20A>T) e Hb C (HBB: c.19G>A) foi realizada por meio de PCR-RFLP, conforme descrito pelo seguinte protocolo de amplificação: tampão sem MgCl₂ na concentração final de 1X, dNTPs na concentração final de 0,05mM, MgCl₂ na concentração final de 1,9mM, oligonucleotídeo iniciadores HBS1 5' GGCAGAGCCATCTATTGCTTA 3' e HBS2 5' ACCTTAGGGTTGCCATAAC 3' nas concentrações finais de 0,4µM, Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) na concentração final de 0,1U/µL, DNA genômico total na concentração final de 4,2ng/µL. O restante da reação foi completado com água ultrapura para volume final de 24µL. O ciclo de PCR consistiu em: 1. Desnaturação inicial, por 5 minutos a 94°C; 2. Desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento de oligonucleotídeos iniciadores por 30 segundos a 55°C, extensão por 1 minuto a 72°C; os três processos ocorreram em 35 ciclos; 3. Extensão final por 10 minutos a 72°C; 4. 4°C infinito. O tamanho do fragmento amplificado foi de 382 pb que foi analisado em gel de agarose 1,5%.

Após a análise da amplificação, o produto da PCR foi submetido ao processo de digestão enzimática seguindo o protocolo de digestão descrito pelo fabricante para o uso das endonucleases de restrição HpyF3I (DdeI) e BseMII (BspCNI) para as mutações de Hb S e Hb C, respectivamente. A análise da digestão da enzima foi realizada em

eletroforese em gel de agarose 2,5% e interpretada conforme representado na Figura 1 para Hb S e Figura 2 para Hb C.

Figura 1. Representação esquemática da análise da digestão enzimática da endonuclease de restrição HpyF3I (DdeI) para detecção da hemoglobina variante Hb S em gel de agarose 2,5%.

Genótipo	1 alelo β S	2 alelos β S	Tamanho da banda
Nenhum alelo β S			201 pb
1 alelo β S	■		288 pb
2 alelos β S		■	87 e 88 pb

Legenda: Indivíduos homocigotos selvagens apresentaram fragmentos de 201, 87 e 88 pb; heterocigotos, 288, 201 e 87 e 88 pb; e homocigotos mutantes, fragmentos 288, 87 e 88 pb. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

Figura 2. Representação esquemática da análise da digestão enzimática da endonuclease de restrição BseMII (BspCNI) para detecção da hemoglobina variante Hb C em gel de agarose 2,5%.

Genótipo	1 alelo β C	2 alelos β C	Tamanho da banda
Nenhum alelo β C			303 pb
1 alelo β C	■		382 pb
2 alelos β C		■	79 pb

Legenda: Indivíduos homocigotos selvagens apresentam fragmentos de 303 e 79 pb; heterocigotos, 382, 303 e 79 pb; e homocigotos mutantes, fragmento de 382 pb. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

3.2 Hb D-LA¹⁰ por PCR-RFLP

A detecção da mutação para Hb D-LA (HBB: c.364G>C) foi executada conforme protocolo de amplificação descrito a seguir: tampão sem MgCl₂ na concentração final de 1X, dNTPs na concentração final de 0,15mM, MgCl₂ na concentração final de 2,0mM, oligonucleotídeo iniciadores HbD-LA-F 5' TGCCTCTTTGCACCATTCTA 3' e HBB3ReD-LA 5' GACCTCCCACATTCCCTTTT 3' nas concentrações finais de 0,8 μ M, Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) na concentração final de 0,06U/ μ L, DNA genômico total na concentração final de 4,0ng/ μ L. O restante da reação foi completado com água ultrapura para volume final de 25 μ L. O ciclo de PCR consistiu em: 1. Desnaturação inicial, por 5 minutos a 94°C; 2. Desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento de oligonucleotídeos iniciadores por 30 segundos a 62°C, extensão por 1 minuto a 72°C; os três processos ocorreram em 35 ciclos; 3. Extensão final por 10 minutos a 72°C; 4. 4°C infinito. O tamanho do fragmento amplificado foi de 564 pb que foi analisado em gel de agarose 2,0%, 100 Volts, por 30 minutos. Após análise da amplificação, o produto da PCR foi submetido ao processo de digestão enzimática

seguindo o protocolo de digestão descrito pelo fabricante para o uso da endonuclease de restrição EcoRI. A análise da digestão da enzima foi realizada em gel de agarose 2,0% e interpretada conforme representado na Figura 3.

Figura 3. Representação esquemática da análise da digestão enzimática da endonuclease de restrição EcoRI para detecção da hemoglobina variante Hb D-LA em gel de agarose 2,0%.

Nenhum alelo β D-LA	1 alelo β D-LA	2 alelos β D-LA	Tamanho da banda
	██████████	██████████	564 pb
██████████	██████████		296 pb
██████████	██████████		268 pb

Legenda: Indivíduos homocigotos selvagens apresentam fragmentos de 296 e 268 pb; os heterocigotos, 564, 296 e 268 pb; e homocigotos mutantes, fragmento 564 pb. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

3.3 β -talassemia por PCR-AE¹¹

As mutações de β -talassemia escolhidas para investigação em decorrência da maior frequência no Brasil foram: IVSI-6 (HBB:c.92+6T>C), IVSI-110 (HBB:c.93-21G>A), CD39 (HBB:c.118C>T) e IVSI-1 (HBB:c.92+1G>A). A detecção das mutações foi realizada por PCR-AE e consistiu em reações realizadas por meio do preparo de dois mix de amplificação, sendo um para o alelo normal (W) e o segundo para o alelo mutante (M), utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada mutação e oligonucleotídeos iniciadores de controle interno da reação, HBBF 5' GGCTGTCATCACTTAGACCTCA 3' e HBBR 5' AGAAGGGGAAAGAAAACATCAA 3', com amplificação de 659 pb.

3.2.1 β^+ -talassemia (mutações IVSI-6 e IVSI-110)

A detecção de β^+ -talassemia (mutação IVSI-6) foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos IVSI-6W 5' GTCTTGTAACCTTGATA 3' e IVSI-6M 5' GTCTTGTAACCTTGATG 3', amplificação de 337pb, conforme descrito pelo seguinte protocolo de amplificação: tampão sem MgCl₂ na concentração final de 1,1X, dNTPs na concentração final de 0,22mM, MgCl₂ na concentração final de 2,17mM, DMSO na concentração final de 6,52%, oligonucleotídeos iniciadores HBBF e HBBR nas concentrações finais de 0,22 μ M, IVSI-6W e IVSI-6M nas concentrações finais de 1,1 μ M, Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) na concentração final de 0,1U/ μ L, DNA genômico total na concentração final de 4,35ng/ μ L. A reação foi completada com água ultrapura para volume final de 23 μ L. O ciclo de PCR consistiu em: 1. Desnaturação

inicial, por 7 minutos a 95°C; 2. Desnaturação por 50 segundos a 94°C, anelamento de oligonucleotídeos iniciadores por 50 segundos a 56°C, extensão por 50 segundos a 72°C; os três processos ocorreram em 32 ciclos; 3. Extensão final por 7 minutos a 72°C; 4. 4°C infinito.

A detecção de β^+ -talassemia (mutação IVSI-110) foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos IVSI-110W 5' GGGTGGGAAAATAGACC 3' e IVSI-110M 5' GGGTGGGAAAATAGACT 3'; amplificação de 337pb, conforme descrito pelo seguinte protocolo de amplificação: tampão sem MgCl₂ na concentração final de 1X, dNTPs na concentração final de 0,18mM, MgCl₂ na concentração final de 1,5mM, DMSO na concentração final de 4%, oligonucleotídeos iniciadores HBBF e HBBR nas concentrações finais de 0,16 μ M, IVSI-110W e IVSI-110M nas concentrações finais de 0,8 μ M, Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) na concentração final de 0,02U/ μ L, DNA genômico total na concentração final de 4,0ng/ μ L. A reação foi completada com água ultrapura para volume final de 25 μ L. O ciclo de PCR consistiu em: 1. Desnaturação inicial, por 7 minutos a 95°C; 2. Desnaturação por 50 segundos a 94°C, anelamento de oligonucleotídeos iniciadores primers por 1 minuto a 55,5°C, extensão por 50 segundos a 72°C; os três processos ocorreram em 32 ciclos; 3. Extensão final por 7 minutos a 72°C; 4. 4°C infinito. A análise da amplificação das duas mutações foi realizada em gel de agarose 2,0% conforme representado na Figura 4.

Figura 4. Representação esquemática da análise da amplificação para detecção de β^+ -talassemia (mutações IVSI-6 e IVSI-110), em gel de agarose 2,0%.

Ausência de mutação		Presença de 1 alelo mutante		Presença de 2 alelos mutantes		Tamanho da banda
Tubo W	Tubo M	Tubo W	Tubo M	Tubo W	Tubo M	
■	■	■	■	■	■	659 pb
■		■	■		■	337 pb











Legenda: Indivíduos homocigotos selvagens apresentam fragmentos de 659 e 337 pb no microtubo W e 659 pb no microtubo M; os heterocigotos, 659 e 337 pb no microtubo W e M; e homocigotos mutantes, fragmento 659 pb no microtubo W e 659 e 337 pb no microtubo M. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

3.2.2 β^0 -talassemia (mutações CD39 e IVSI-1)

A detecção de β^0 -talassemia (mutação CD39) foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos CD39W 5' GACTCAAAGAACCTCTG 3' e CD39M 5' GACTCAAAGAACCTCTA 3', amplificação de 439 pb, conforme descrito pelo seguinte protocolo de amplificação: tampão sem MgCl₂ na concentração final de 1X, dNTPs na concentração final de 0,2mM, MgCl₂ na concentração final de 1,0mM, DMSO

na concentração final de 4%, oligonucleotídeos iniciadores HBBF e HBBR nas concentrações finais de 0,2 μ M, CD39W e CD39M nas concentrações finais de 1,0 μ M, Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) na concentração final de 0,05U/ μ L, DNA genômico total na concentração final de 4,0ng/ μ L. A reação foi completada com água ultrapura para volume final de 25 μ L. O ciclo de PCR consistiu em: 1. Desnaturação inicial, por 7 minutos a 95°C; 2. Desnaturação por 50 segundos a 95°C, anelamento de oligonucleotídeos iniciadores por 50 segundos a 53,5°C, extensão por 50 segundos a 72°C; os três processos ocorreram em 32 ciclos; 3. Extensão final por 7 minutos a 72°C; 4. 4°C infinito. A análise da amplificação foi realizada em gel de agarose 2,0% conforme representado na Figura 5.

Figura 5. Representação esquemática da análise da amplificação para detecção de β^0 -talassemia (mutação CD39), em gel de agarose 2,0%.

Ausência de mutação		Presença de 1 alelo mutante		Presença de 2 alelos mutantes		Tamanho da banda
Tubo W	Tubo M	Tubo W	Tubo M	Tubo W	Tubo M	
						659 pb
						439 pb

Legenda: Indivíduos homocigotos selvagens apresentam fragmentos de 659 e 439 pb no microtubo W e 659 pb no microtubo M; os heterocigotos, 659 e 439 pb no microtubo W e M; e homocigotos mutantes, fragmento 659 pb no microtubo W e 659 e 439 pb no microtubo M. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

A detecção de β^0 -talassemia (mutação IVSI-1) foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos IVSI-1W 5' GTGACCTTGATACCAAC 3' e IVSI-1M 5' GTGACCTTGATACCAA 3', amplificação de 268 pb, conforme descrito pelo seguinte protocolo de amplificação: tampão sem MgCl₂ na concentração final de 1X, dNTPs na concentração final de 0,2mM, MgCl₂ na concentração final de 1,0mM, DMSO na concentração final de 2%, oligonucleotídeos iniciadores HBBF e HBBR nas concentrações finais de 0,2 μ M, IVSI-1W e IVSI-1M nas concentrações finais de 1,0 μ M, Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) na concentração final de 0,05U/ μ L, DNA genômico total na concentração final de 4,0ng/ μ L. A reação foi completada com água ultrapura para volume final de 25 μ L. O ciclo de PCR consistirá em: 1. Desnaturação inicial, por 7 minutos a 95°C; 2. Desnaturação por 50 segundos a 94°C, anelamento de oligonucleotídeos iniciadores por 50 segundos a 54°C, extensão por 1 minuto a 72°C; os três processos ocorreram em 32 ciclos; 3. Extensão final por 7 minutos a 72°C; 4. 4°C

infinito. A análise da amplificação foi realizada em gel de agarose 2,0% conforme representado na Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática da análise da amplificação para detecção de β^0 -talassemia (mutação IVSI-1), em gel de agarose 2,0%.

Ausência de mutação		Presença de 1 alelo mutante		Presença de 2 alelos mutantes		Tamanho da banda
Tubo W	Tubo M	Tubo W	Tubo M	Tubo W	Tubo M	
██████	██████	██████	██████	██████	██████	659 pb
██████		██████	██████		██████	268 pb

Legenda: Indivíduos homocigotos selvagens apresentam fragmentos de 659 e 268 pb no microtubo W e 659 pb no microtubo M; os heterocigotos, 659 e 268 pb no microtubo W e M; e homocigotos mutantes, fragmento 659 pb no microtubo W e 659 e 268 pb no microtubo M. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

3.4 Estratégia molecular para sequenciamento genético¹²

A análise por sequenciamento genético foi aplicada nas amostras que não tiveram genótipo de β -talassemia definido de acordo com as mutações investigadas. A estratégia molecular foi realizada com a amplificação do gene *HBB* em três fragmentos, possibilitando o rastreamento de mutações na região promotora da β -globina, éxons, íntrons e regiões não-traduzidas (UTR). O *screening* para identificação de mutações foi conduzido, portanto, em um fragmento de 1825 pb. Os pares de *primers* utilizados foram descritos por Carrocini¹² e Carrocini e colaboradores¹³.

O fragmento 1 foi amplificado utilizando o seguinte protocolo de amplificação: tampão sem $MgCl_2$ na concentração final de 1X, dNTPs na concentração final de 0,04mM, $MgCl_2$ na concentração final de 1,69mM, oligonucleotídeo iniciadores HBBPe1F 5' ACTCCTAAGCCAGTGCCAGA 3' e HBBPe1R 5' CACGTGCAGCTTGTCACAG 3' nas concentrações finais de 0,16 μ M, Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) na concentração final de 0,05U/ μ L, DNA genômico total na concentração final de 2,6ng/ μ L. O restante da reação foi completado com água ultrapura para volume final de 38,4 μ L. O tamanho do fragmento amplificado foi de 640 pb. O fragmento 1 foi submetido a ciclagem por PCR-*touchdown*, no qual a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores tem uma redução de 1°C em cada ciclo, nos 10 ciclos iniciais, iniciando em 73°C e diminuindo até 63°C. O ciclo da PCR-*touchdown* consistiu em: 1. Desnaturação inicial, por 5 minutos a 95°C; 2. Desnaturação por 30 segundos a 95°C, anelamento de oligonucleotídeos iniciadores por 45 segundos a 73°C, extensão por 1 minuto a 72°C, sendo essa etapa 2 realizada em 10 ciclos; 3. Desnaturação

por 30 segundos a 95°C, anelamento de oligonucleotídeos iniciadores por 45 segundos a 63°C, extensão por 1 minuto a 72°C; os três processos ocorreram por 30 ciclos; 4. Extensão final por 7 minutos a 72°C; 5. 4°C infinito.

O fragmento 2 foi amplificado utilizando o seguinte protocolo de amplificação: tampão sem MgCl₂ na concentração final de 1X, dNTPs na concentração final de 0,04mM, MgCl₂ na concentração final de 1,69mM, oligonucleotídeo iniciadores HBB2 seq F 5' TCTGTCCACTCCTGATGCTG 3' e HBB2 seq R 5' GCAAATTACCCTGATTTGGTC 3' nas concentrações finais de 0,13μM, Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) na concentração final de 0,05U/μL, DNA genômico total na concentração final de 2,6ng/μL. O restante da reação foi completado com água ultrapura para volume final de 38,4μL. O tamanho do fragmento amplificado foi de 663 pb.

O fragmento 3 foi amplificado utilizando o seguinte protocolo de amplificação: tampão sem MgCl₂ na concentração final de 1X, dNTPs na concentração final de 0,04mM, MgCl₂ na concentração final de 3,13 mM, oligonucleotídeo iniciadores HBB3 seq F 5' TTGGAATATATGTGTGCTTATTTGC 3' e HBB2 seq R 5' GACCTCCCACATTCCCTTTT 3' nas concentrações finais de 0,16μM, Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) na concentração final de 0,05U/μL, DNA genômico total na concentração final de 2,6ng/μL. O restante da reação foi completado com água ultrapura para volume final de 38,4μL. O tamanho do fragmento amplificado foi de 829 pb.

O ciclo da PCR dos fragmentos 2 e 3 consistiu em: 1. Desnaturação inicial, por 5 minutos a 95°C; 2. Desnaturação por 30 segundos a 95°C, anelamento de oligonucleotídeos iniciadores por 45 segundos a 65°C para o fragmento 2 e 60°C para o fragmento 3, extensão por 1 minuto a 72°C; os três processos ocorreram por 40 ciclos; 3. Extensão final por 7 minutos a 72°C; 4. 4°C infinito.

Os três fragmentos foram analisados em gel de agarose 2,0%. Após a análise da amplificação, o produto da PCR foi submetido ao processo de quantificação por espectrofotometria com uso do Varioskan Lux (ThermoFisher Scientific). Em seguida, as reações foram purificadas com o reagente ExoSAP-IT Express® (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo do fabricante e as amostras submetidas ao sequenciamento. A análise das sequências genéticas e dos eletroferogramas foi realizada no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*¹⁴, *Phred/Phrap/Consed*^{15,16}, sendo executado o alinhamento com a ferramenta *Clustal W sequence alignment*¹⁷ associado ao pacote

BioEdit. A sequência consenso do gene β -globina utilizada para o alinhamento das sequências das amostras investigadas foi disponibilizada pelo banco de dados *GenBank* (NC_000011.10; Gene ID: 3034). A identificação das variantes encontradas foi realizada por meio do acesso ao banco de dados HbVar (*A database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemia mutations*)¹⁸.

3.5 Análise dos dados

Este é um estudo de corte transversal, caráter quantitativo e descritivo, portanto, para avaliação dos dados gerados, cada participante teve seu genótipo tabulado para determinação da frequência absoluta e relativa de cada variante investigada.

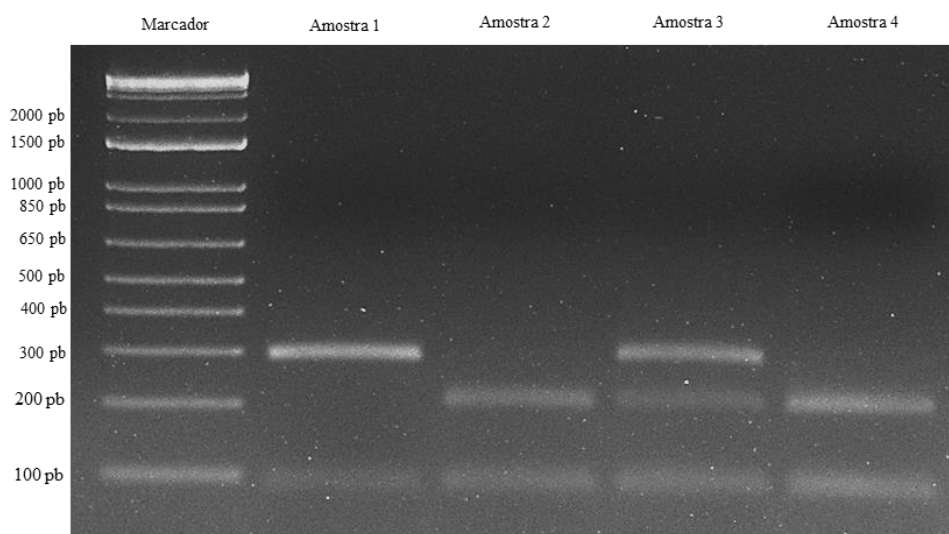
Resultados

1 Perfil hemoglobínico

Entre os 97 indivíduos analisados, 56 são do sexo feminino (58,59%) e 41 do sexo masculino (42,27%), com idade média de $21 \pm 14,17$ anos, com variação de 1 a 71 anos. Do total de indivíduos analisados, 69 (71,14%) são homocigotos para Hb S, 23 (23,71%) são heterocigotos compostos Hb SC, 1 (1,03%) indivíduo foi definido como homocigoto para Hb C, 1 (1,03%) para S/ β^+ -talassemia mutação IVSI-6 e 3 indivíduos (3,09%) foram identificados portadores de um alelo Hb S (S₋). As Figuras 7 e 8 apresentam a fotografia da interpretação dos resultados das reações de PCR-RFLP em gel de agarose.

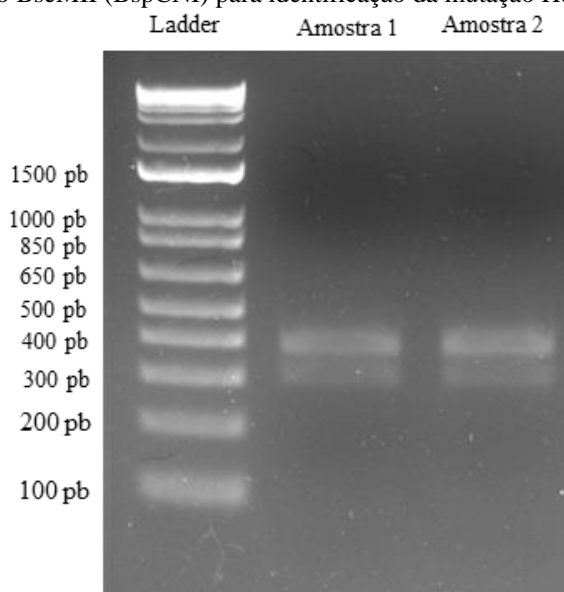
Para definição do perfil hemoglobínico desses indivíduos S₋, assim como, confirmação do genótipo do indivíduo S/IVSI-6, anteriormente detectado por PCR-AE, foi realizado o sequenciamento genético do gene *HBB* que evidenciou as seguintes variantes de β -talassemia: rs713040 (*HBB*:c.9T>C) (Figura 9A e 9B), IVSI-6 (*HBB*:c.92+6T>C), conhecida como talassemia portuguesa (Figura 10), IVSII-16 (*HBB*:c.315+16G>C) (Figura 11) e IVSII-666 (*HBB*:c.316-185C>T) (Figura 12). As mutações rs713040, IVSII-16 e IVSII-666 foram detectadas nos 4 indivíduos analisados em homocigose ou heterocigose e IVSI-6 em 1 indivíduo em heterocigose, o mesmo identificado por PCR-AE. Além dessas, também foi confirmada a presença do alelo Hb S (Figura 9A e 9B) nos 4 indivíduos em heterocigose, conforme identificado por PCR-RFLP. A Tabela 1 mostra a região do gene em que as mutações foram identificadas, símbolo de apresentação no HbVar, fenótipo e origem étnica. A Figura 13 apresenta um desenho esquemático que representa a localização das mutações encontradas neste estudo no gene *HBB*.

Figura 7. Fotografia da eletroforese em gel de agarose a 2,5% para análise da digestão enzimática da endonuclease de restrição HpyF3I (DdeI) para identificação da mutação Hb S em quatro amostras.



Legenda: Na lateral esquerda, encontra-se identificado o tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular. Amostra 1 é homocigoto para Hb S, amostras 2 e 4 não apresentam o alelo Hb S; amostra 3 é heterocigoto para Hb S. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

Figura 8. Fotografia da eletroforese em gel de agarose a 2,5% para análise da digestão enzimática da endonuclease de restrição BseMII (BspCNI) para identificação da mutação Hb C em duas amostras.



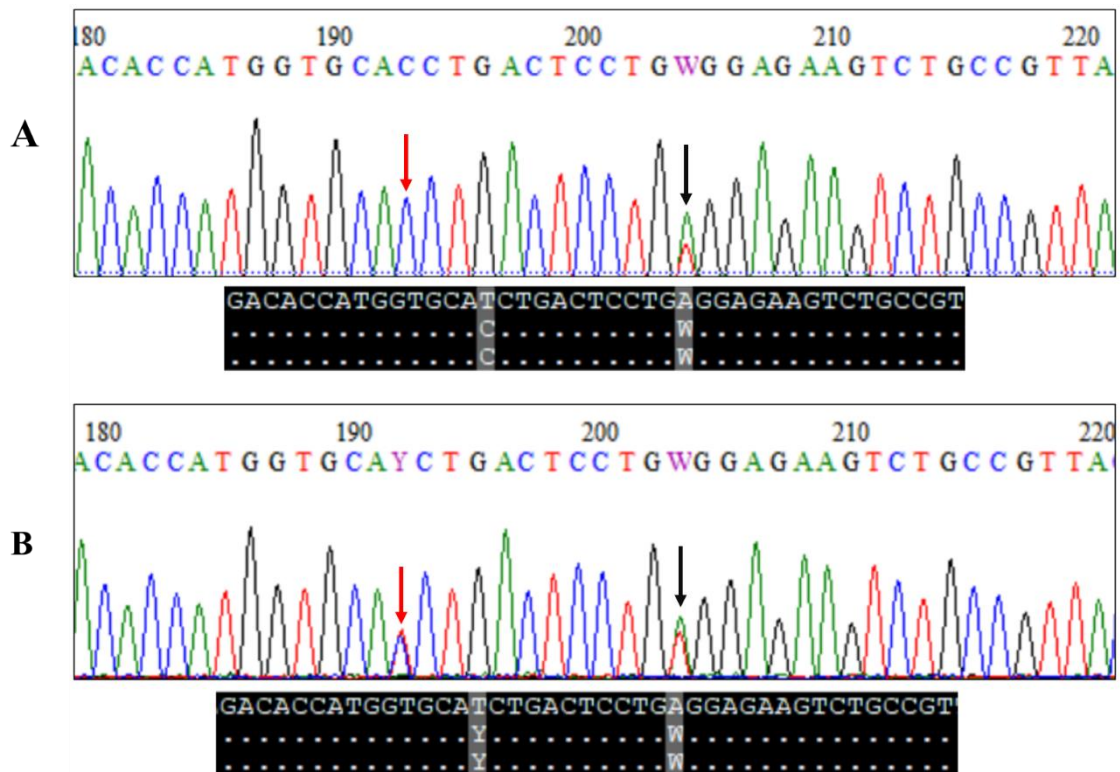
Legenda: Na lateral esquerda, encontra-se identificado o tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular. As duas amostras possuem 1 alelo para Hb C. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

Tabela 1. Mutações de β -talassemia identificadas em indivíduos no oeste baiano.

Região do gene <i>HBB</i>	Símbolo HbVar	Mutação	Fenótipo	Origem étnica
Éxon 1	HBB:c.9T>C	rs713040	Silencioso	Indiana
Íntron 1	HBB:c.92+6T>C	IVSI-6	β^+	Mediterrânea
Íntron 2	HBB:c.315+16G>C	IVSII-16	Neutro	Indiana
Íntron 2	HBB:c.316-185C>T	IVSII-666	Neutro	Indiana

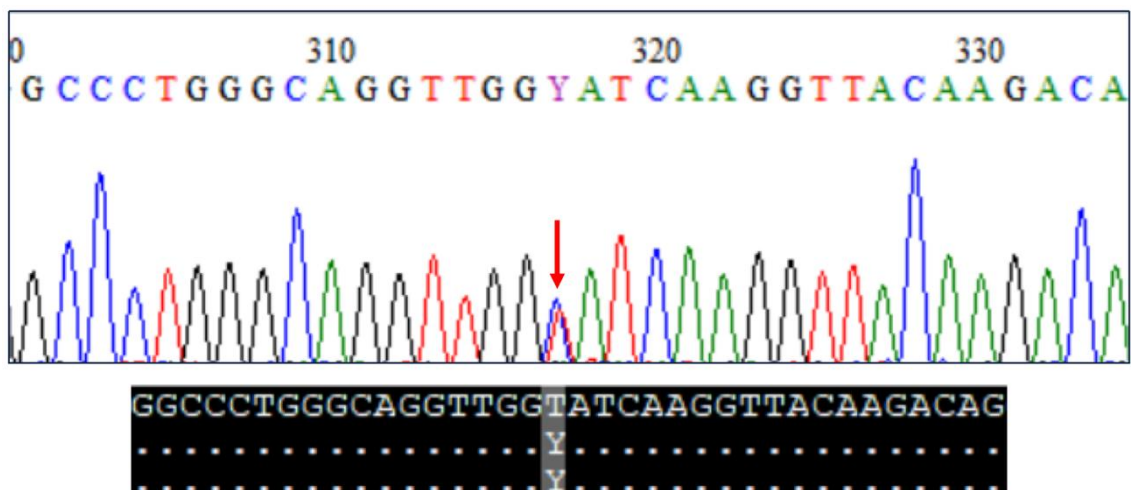
Legenda: β^+ : redução parcial na síntese da cadeia β . Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

Figura 9. Eletroferogramas do sequenciamento genético do gene *HBB* de indivíduos portadores de variantes de hemoglobina.



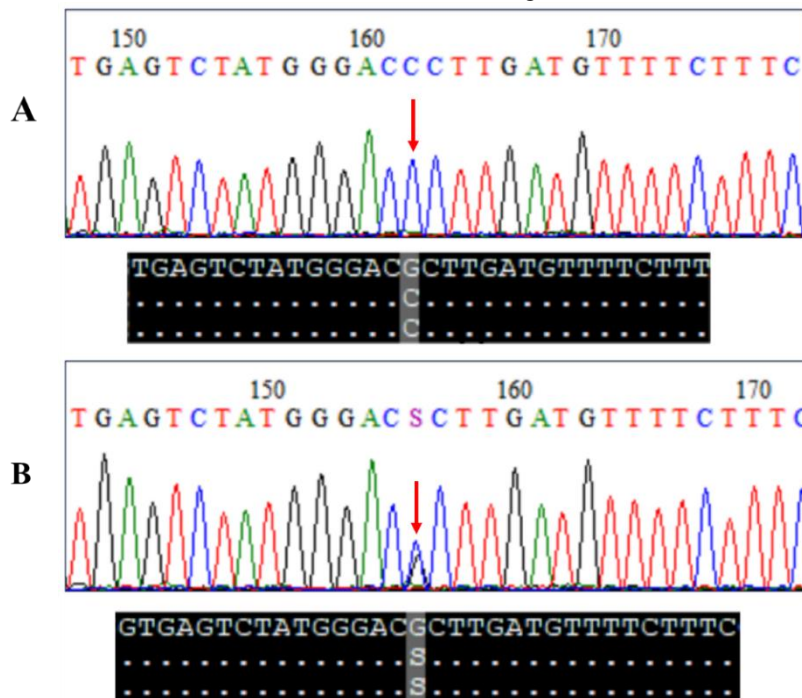
Legenda: As setas vermelhas indicam a mutação rs713040 (HBB:c.9T>C) em homocigose (A) e heterocigose (B) e a seta preta, a mutação de Hb S (HBB:c.20A>T) em heterocigose. Abaixo de cada eletroferograma é apresentado o alinhamento das *reads* com a sequência consenso (primeira linha). W: A/T; Y: C/T Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

Figura 10. Eletroferograma do sequenciamento genético do gene *HBB* de indivíduo portador de variante de síntese de hemoglobina (β -talassemia).



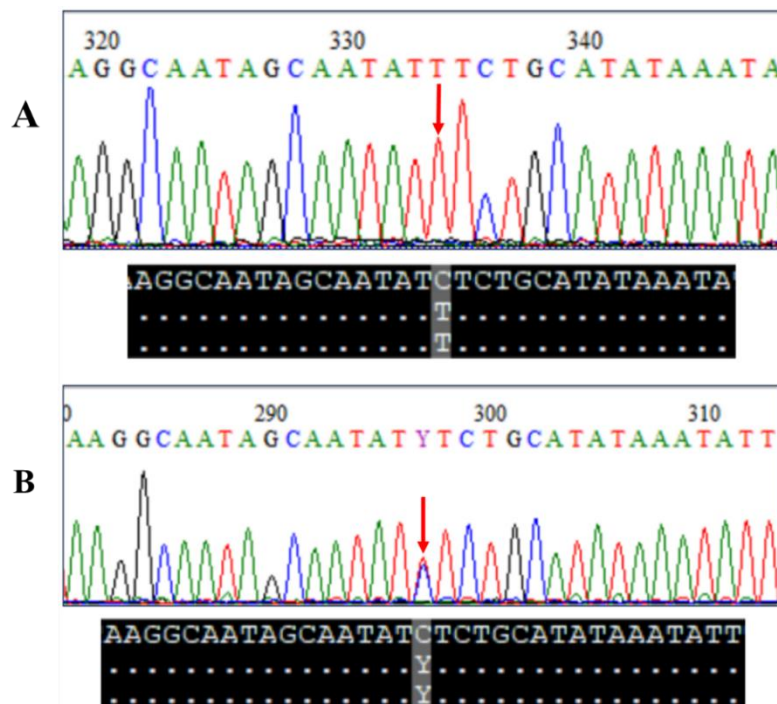
Legenda: A seta vermelha indica a mutação IVSI-6 (HBB:c.92+6T>C) em heterocigose. Abaixo do eletroferograma é apresentado o alinhamento das *reads* com a sequência consenso (primeira linha). Y: C/T. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

Figura 11. Eletroferogramas do sequenciamento genético do gene *HBB* de indivíduos portadores de variante de síntese de hemoglobina.



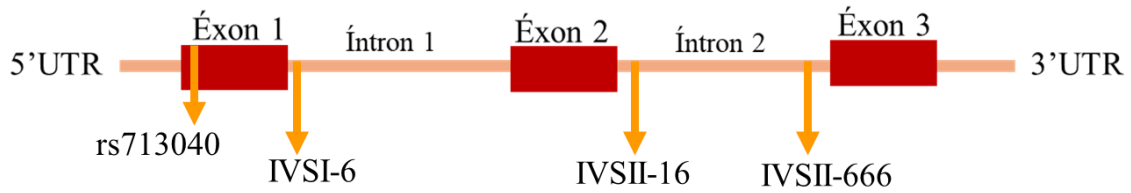
Legenda: A seta vermelha indica a mutação IVSII-16 (HBB:c.315+16G>C) em homozigose (A) e heterozigose (B). Abaixo de cada eletroferograma é apresentado o alinhamento das *reads* com a sequência consenso (primeira linha). S: C/G. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

Figura 12. Eletroferogramas do sequenciamento genético do gene *HBB* de indivíduo portador de variante de síntese de hemoglobina.



Legenda: A seta vermelha indica a mutação IVSII-666 (HBB:c.316-185C>T) em homozigose (A) e heterozigose (B). Abaixo de cada eletroferograma é apresentado o alinhamento das *reads* com a sequência consenso (primeira linha). Y: C/T. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

Figura 13. Representação esquemática do gene *HBB* com identificação dos locais das mutações rs713040, IVSI-6, IVSII-16 e IVSII-666.



Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

Dois dos indivíduos analisados por sequenciamento que apresentam Hb S, IVSII-16 e IVSII-666, possuem um fenótipo S/ β -talassemia com anemia microcítica hipocrômica discreta e Hb A₂ com valores de 3,5% e 3,6%. Entretanto, o outro indivíduo que possui essas três mutações não apresenta fenótipo com alterações hematológicas importantes. O indivíduo que, além dessas mutações, também possui IVSI-6, apresenta Hb A₂ de 5,1%.

Diante disso, 69 amostras analisadas são portadoras de AF, 27 são portadores de DF, sendo 23 Hb SC e 4 S/ β -talassemia e 1 indivíduo portador de doença de hemoglobina C, determinando a frequência de genótipos Hb SS > Hb SC > Hb S/ β -talassemia > Hb CC. Neste estudo, nenhum portador de Hb D-Los Angeles foi identificado.

2 Diagnóstico estabelecido pelo SUS e os métodos de Biologia Molecular

Ao longo da análise dos dados, foi possível identificar discordâncias entre o diagnóstico estabelecido pelo SUS e os métodos de biologia molecular realizado neste estudo em 12 amostras (12,37%). Dois indivíduos diagnosticados pelo SUS como heterozigoto composto Hb SC, foi confirmado que 1 é Hb CC e o outro é Hb SS; 2 diagnósticos inconclusivos entre Hb SS ou Hb SC foi definido sendo 1 Hb SS e o outro Hb SC. Além disso, entre seis (6) indivíduos com diagnóstico de AF, 5 foram confirmados portadores de genótipo Hb SC e 1 S/ β -talassemia (mutações rs713040, IVSII-16 e IVSII-666); 1 indivíduo diagnosticado anteriormente como S/ β -talassemia foi confirmado Hb SS; e 1 diagnóstico inconclusivo entre Hb AS ou S/ β -talassemia foi confirmado S/ β -talassemia (mutações rs713040, IVSI-6, IVSII-16 e IVSII-666) (Tabela 2).

Tabela 2. Discordâncias entre o diagnóstico definido pelo SUS em relação à PCR.

Nº de indivíduos	Diagnóstico	
	SUS	Biologia Molecular
2	SC	1 CC e 1 SS
2	Inconclusivo entre Hb SS ou Hb SC	1 SS e 1 SC
6	Hb SS	5 SC e 1 S/β-tal
1	S/β-tal	SS
1	Inconclusivo entre AS ou Sβ-tal	S/β-tal

Legenda: Nº: número; β-tal: Beta-talassemia. Fonte: Elaborado pelas autoras, 2025.

Discussão

1 Hemoglobinopatias na Região Nordeste do Brasil e no Estado da Bahia

Estudos que objetivam a investigação de hemoglobinopatias na Região Nordeste do Brasil e mais especificamente no estado da Bahia, ainda são distribuídos de forma heterogênea no território, sendo que os trabalhos na Bahia se concentram na capital do estado, Salvador-BA, e cidades circunvizinhas. Vale salientar que, Barreiras-BA localiza-se cerca de 860 km de distância da capital baiana.

Na Região Nordeste do Brasil, Araújo e colaboradores¹⁹ analisaram 1.940 amostras de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, por meio da eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose. Na presença de hemoglobinas anormais, os pesquisadores realizaram a eletroforese em gel de ágar pH 6,2 para constatação das hemoglobinas variantes S e C. Do total de amostras analisadas, os autores descreveram que 1.903 (98,09%) possuem genótipo normal, 29 amostras (1,5%) traço falciforme, AF foi observada apenas em 1 (0,05%), portadores de Hb AC foi detectado em 6 (0,31%) e identificaram 1 (0,05%) heterozigoto para α -talassemia, genótipo Hb A/Bart.

Ainda na Região Nordeste, no estado de Pernambuco, Araújo e colaboradores²⁰ avaliaram pacientes com diagnóstico de talassemia em acompanhamento pelo Hospital de Hematologia do Recife e encontraram a seguinte frequência de mutações de β -talassemia em ordem decrescente: IVSI-6, IVSI-1, IVSI-5, IVSI-110 e por último, CD39. Vale destacar que, com exceção da mutação IVSI-5 que é de origem Asiática, as demais são de origem Mediterrânea²¹.

No estado da Bahia, Adorno e colaboradores²² analisaram 581 recém-nascido em Salvador, Bahia, Brasil, quanto a presença de hemoglobinas variantes por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Os autores descreveram que 480 (82,6%) das amostras investigadas apresentaram perfil hemoglobínico normal (Hb AA), 57 (9,8%)

apresentaram Hb S em heterozigose com Hb A (traço falciforme), 38 (6,5%) heterozigotos Hb AC, um (0,2%) neonato portador de Hb SS e cinco (0,9%) portadores de Hb SC, assim, identificaram uma frequência em ordem decrescente de Hb AA, Hb AS, Hb AC, Hb SC e por último, Hb SS.

Aleluia e colaboradores²³, analisaram em seu estudo, 200 indivíduos com DF acompanhados pelo Centro de Referência em Doença Falciforme de Itabuna, Bahia, Brasil. Desses, 141 são portadores de AF e 59 são heterozigotos compostos para Hb SC, dessa forma, também identificaram a maioria dos pacientes com genótipo Hb SS seguido de Hb SC, como foi identificado neste estudo. Nesse sentido, é perceptível que a Bahia possui importante representatividade quanto a presença de variantes de hemoglobina, o que pode ocorrer em decorrência da formação étnica do estado, com elevada miscigenação racial e significativa carga genética oriunda do continente africano e inserido no Brasil por imigração forçada, no período da história em que essa população foi submetida a escravidão²².

Quanto a investigação de β -talassemia na Bahia, Fonseca e colaboradores²⁴ avaliaram adolescentes dispensados do serviço militar do Centro de Seleção do Exército em Salvador, Bahia e detectaram a mutação CD44 (HBB:c.135delC), identificada com frequência em judeus e rara em populações do Oriente Médio e Mar Mediterrâneo. Assim, fica ainda mais explícita a ocorrência de fluxo gênico com a miscigenação racial na Bahia.

Para o contexto deste estudo, vale destacar considerações históricas da Bahia, do Oeste Baiano e a cidade de Barreiras-BA. A região Oeste da Bahia não pertenceu sempre a este estado ao longo da sua história. Anteriormente era denominada Comarca do Rio São Francisco e pertencia ao estado de Pernambuco, mas com o objetivo de organizar administrativamente o Império, Dom Pedro I, em 1824, mudou o pertencimento da região para Minas Gerais e em 1827, este território a esquerda do Rio São Francisco tornou-se pertencente à Província da Bahia²⁵.

O estado da Bahia foi o primeiro local de chegada dos portugueses no ano 1500 e a partir disso, foi também o principal ponto de comércio marítimo com Ásia, Europa e África, incluindo africanos submetidos a escravidão, sendo estes continentes, localizados na região do Mar Mediterrâneo²⁴. Nesse sentido, também vale compreender o comércio marítimo de Pernambuco nesse período, haja vista que o Oeste Baiano pertenceu anteriormente a este estado. Pernambuco também foi um ponto de rota marítima de comércio na Região Nordeste por portugueses, também com destaque ao comércio de africanos e a troca de produtos com Ásia e Europa²⁶.

A povoação do Oeste da Bahia iniciou com a invasão de holandeses na Região Nordeste no século XVII objetivando a expansão da pecuária²⁵. Vale salientar que, o Oeste Baiano é uma região com destaque pela ascensão do agronegócio. Por volta de 1985, a região Oeste da Bahia foi alvo do Programa de Desenvolvimento dos Cerrados II (Proceder II) pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), um incentivo ao avanço agrícola no Cerrado, o que atraiu a atenção dos sulistas pois, era uma região propícia à agricultura de larga escala e com possibilidade de incentivo financeiro do Governo Federal, o que levou a um fluxo migratório do Sul do Brasil para esta região, assim como de outras regiões do Brasil para povoar um território em ascensão econômica²⁷.

Nesse sentido, é possível perceber que a região Oeste teve sua população formada por forte migração intrarregional e, considerando sua distância da capital baiana, e o pertencimento anterior do território do Oeste da Bahia a Pernambuco, pode-se sugerir que a mutação mediterrânea IVSI-6 encontrada na população deste estudo, tenha origem das rotas de comércio marítimo realizadas por Pernambuco, além da forte influência portuguesa na colonização do Brasil.

As variantes de síntese do gene *HBB* identificadas neste estudo, rs713040, IVSII-16 e IVSII-666, foram consultadas no HbVar, o qual indica que as três mutações são de origem Indiana. A rs713040 é um SNP localizado no éxon 1, códon 2, onde ocorre uma troca de timina por citosina (CAT>CAC); contudo, trata-se de uma mutação silenciosa não causando condição deletéria. O HbVar também indica que IVSII-16 e IVSII-666 são mutações localizadas no íntron 2 e não há informações quanto ao fenótipo de indivíduos portadores, mas que são consideradas mutações neutras.

No Brasil, informações sobre portadores das mutações rs713040, IVSII-16 e IVSII-666 são escassos. Este pode ser o primeiro estudo a descrever a herança dessas 3 variantes em associação com Hb S, além da associação destas com IVSI-6 no Brasil. Carrocini e colaboradores¹³ descreveram a ocorrência da mutação IVSII-16 em portadores homocigotos para β -talassemia do Rio de Janeiro, mas indicaram como um dos polimorfismos comumente encontrados na β -talassemia, não indicando haver alterações fenotípicas associadas a esta mutação nos indivíduos analisados. Por outro lado, Souza e colaboradores²⁸ analisaram uma família composta por pai, mãe e filha na cidade de Vitória da Conquista-BA, sendo os três com perfil Hb AA, mas que apresentavam anemia microcítica hipocrômica relevante. Os autores encontraram rs713040 nos três indivíduos, além de IVSII-16 em mãe e filha.

Uçucu e colaboradores²⁹ analisaram um indivíduo portador do alelo Hb S que apresentava fenótipo S/ β -talassemia precisando de transfusão sanguínea frequente na Turquia. Os autores identificaram a associação de Hb S, IVSII-16 e IVSII-666 e indicam que, talvez, essas variantes de β -talassemia que são consideradas neutras, em associação com Hb S, podem alterar o fenótipo do indivíduo para S/ β -talassemia. Isso talvez seja explicado pela possível modulação de IVSII-16 e IVSII-666 no *splicing* do RNA mensageiro a depender da distância entre éxon e íntron, podendo assim, não serem consideradas neutras e resultarem em alterações hematológicas³⁰.

Assim, conforme relato na literatura a possibilidade da mudança do perfil para S/ β -talassemia com Hb S, IVSII-16 e IVSII-666 em associação, os achados desse estudo também podem sugerir essa interação. Além disso, estes resultados podem indicar a necessidade de investigações mais detalhadas de mutações de variantes de síntese na população brasileira, a fim de auxiliar a interpretação dos achados clínicos e no acompanhamento/condução terapêutica.

Em decorrência da miscigenação racial do Brasil, é perceptível que estudos que investiguem heranças genéticas de hemoglobinopatias são essenciais, haja vista que podem ser identificadas mutações raras ou ainda não descritas em comparado aos relatos das quatro mutações pontuais de origem mediterrâneas de β -talassemia mais encontradas na Região Nordeste, que são IVSI-6, IVSI-110, IVSI-1 e CD39³¹, sendo IVSI-6 a mutação com maior frequência²⁰ e também a mutação detectada neste estudo.

A implementação da triagem neonatal das hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal do Brasil em 2001 proporcionou um importante progresso quanto ao conhecimento a nível nacional de pessoas portadoras de DF. Dessa forma, são necessários novos estudos para identificação da frequência e dos tipos de variantes de hemoglobina existentes no Brasil, assim como atualização de dados epidemiológicos, que são essenciais para conhecimento genético das diferentes regiões do Brasil. Nesse sentido, este estudo é um importante progresso na área e, visando preencher esta lacuna, realizou pela primeira vez a descrição genética de uma região brasileira ainda não investigada, identificando indivíduos homocigotos para Hb C, heterocigotos S/IVSI-6 e variantes rs713040, IVSII-16 e IVSII-666 em homocigose ou heterocigose associada com Hb S no estado da Bahia.

2 Discordância entre o diagnóstico estabelecido pelo SUS e a análise por Biologia Molecular

As discordâncias de genótipo identificadas neste estudo podem ser compreendidas pelos métodos de diagnóstico de hemoglobinopatias realizado pelo SUS no Brasil, que consiste no uso de técnicas de eletroforese de hemoglobina, hemograma e dosagem de Hb F, podendo ser solicitado outros exames nos casos de diagnóstico inconclusivo, como a dosagem de Hb A₂, a qual encontra-se aumentada em indivíduos com β -talassemia³². Vale salientar que, a identificação de hemoglobina variante não pode ser realizada apenas com a eletroforese em decorrência da possibilidade de migração semelhante entre várias hemoglobinas³³.

A distinção entre o perfil Hb S e Hb D não é possível com o uso do teste de eletroforese de hemoglobina em pH alcalino em decorrência da sobreposição quanto a migração das variantes³⁴, enquanto em pH ácido, coincide com a Hb A³⁵. Além disso, nos testes eletroforéticos em pH alcalino, a Hb E migra de modo semelhante a Hb C e A₂, enquanto que em pH ácido, é semelhante a Hb A₂, sendo necessário utilizar testes em associação para confirmação do diagnóstico³⁶.

É perceptível que os atuais métodos utilizados na Triagem Neonatal de Hemoglobinopatias no Brasil são importantes para garantir o atendimento médico aos indivíduos portadores de DF pelo SUS e são considerados sensíveis para a identificação de indivíduos afetados, mas podem ser limitados em decorrência das dificuldades de diferenciar com seguridade os genótipos, como Hb SS de Hb S/ β^0 -talassemia³⁷. Além disso, HPLC pode ser considerado um método de auxílio na identificação de variantes de hemoglobina, sendo a análise do DNA o método de identificação definitiva mais preciso³⁸, podendo o método de PCR ser uma opção de exame nos casos de discordância diagnóstica, haja vista que a correta identificação do genótipo dos indivíduos contribui com a compreensão da história clínica e conseqüentemente, prognóstico e tratamento adequado para a condição genética detectada.

Conclusão

Foram identificados portadores de variantes estruturais Hb S e Hb C em homozigose e em heterozigose composta, além de portadores de variantes de síntese β -talassemia (rs713040, IVSI-6, IVSII-16 e IVSII-666) em heterozigose com Hb S no estado da Bahia. Destaca-se os achados referentes às mutações IVSII-16 e IVSII-666, que em associação com HbS podem gerar resposta fenotípicas, e podem ser a primeira

descrição da associação dessas mutações no Brasil. Além disso, a análise por biologia molecular mostra-se mais eficiente do que os métodos de eletroforese de proteína e exames laboratoriais para definição do genótipo de portadores de DF, contribuindo na melhor caracterização do perfil genético e no direcionamento mais efetivo do acompanhamento e tratamento da fisiopatologia dos portadores destas mutações.

Financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), aprovado pelo Edital FAPESB n°012/2021, termo de outorga PET0006/2022 (LPRV), além de bolsa do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (PLPS).

Referências

1. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L et al. Sick cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;15(4),18010. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>.
2. Nader E, Romana M, Connes P. The Red Blood Cell - Inflammation Vicious Circle in Sick Cell Disease. *Front Immunol*. 2020;11(454). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00454>.
3. Esoh K, Wonkam A. Evolutionary history of sickle-cell mutation: implications for global genetic medicine. *Hum Mol Genet*. 2021;30(2):119-28. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab004>.
4. Rodrigues DO, Ferreira M, Pereira P, Bustamante M, Campos E, Oliveira C. Diagnóstico histórico da triagem neonatal para doença falciforme. *Rev. APS*. 2010;13(1):34-45. <https://periodicos.ufjf.br/index.php/aps/article/view/14322>.
5. Ferraz MH, Murão M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2007;29(3):218-22. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300005>.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação Geral de Atenção Especializada. Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
7. Silva-Pinto A, Queiroz MC, Zamaro PJ, Arruda M, Santos HP. The Neonatal Screening Program in Brazil, Focus on Sick Cell Disease (SCD). *International Journal of Neonatal Screening*. 2019;5(1). <https://doi.org/10.3390/ijns5010011>.
8. Singh U, Kumari M, Iyengar S. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biol Proced Online*. 2018;20(12). <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0077-6>.
9. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HÁ, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>.
10. Bonini-Domingos CR. Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias. São José do Rio Preto-SP: HN Editora; 2006.

11. Bertholo LC. Amplificação gênica alelo específica e multiplex no diagnóstico laboratorial de hemoglobinas anormais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. 2005. <http://hdl.handle.net/11449/100126>.
12. Carrocini GC. Elementos de regulação e microRNAs envolvidos na modulação dos níveis de hemoglobina fetal em indivíduos portadores de beta- hemoglobinopatias. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências. São José do Rio Preto. 2015. <http://hdl.handle.net/11449/127764>.
13. Carrocini GC, Venancio LP, Pessoa VL, Lobo CL, Bonini-Domingos CR. Mutational Profile of Homozygous β -Thalassemia in Rio de Janeiro, Brazil. *Hemoglobin*. 2017;41(1):12-5. <https://doi.org/10.1080/03630269.2017.1289958>.
14. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999;41:95-8.
15. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998;8(3):175-85. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>.
16. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998;8(3):186-94. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>.
17. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(22):4673-80. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
18. Giardine B, Borg J, Viennas E, Pavlidis C, Moradkhani K, Joly P et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:1063-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt911>.
19. Araújo MC, Serafim ES, Castro Júnior WA, Medeiros TM. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 2004;20(1):123-8. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000100027>.
20. Araújo AS, Silva Júnior W, Leão SA, Bandeira FC, Petrou M, Modell B, Zago MA. A Different Molecular Pattern of β -Thalassemia Mutations in Northeast Brazil. *Hemoglobin*. 2003;27(4):211-7. <https://doi.org/10.1081/hem-120026045>.
21. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J. Rare Dis*. 2010;5(11). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-11>.
22. Adorno EV, Couto FD, Neto JP, Menezes JF, Rêgo M, Reis MG, Gonçalves MS. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad. Saúde Pública*. 2005;21(1):292-8. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000100032>.
23. Aleluia MM, Fonseca TC, Souza RQ, Neves FI, Guarda CC, Santiago RP et al. Comparative study of sickle cell anemia and hemoglobin SC disease: clinical characterization, laboratory biomarkers and genetic profiles. *BMC Hematology*. 2017;17(15). <https://doi.org/10.1186/s12878-017-0087-7>.
24. Fonseca SF, Neto JP, Gonçalves MS. Prevalence and molecular characterization of β -thalassemia in the state of Bahia, Brazil: first identification of mutation HBB: c.135delC in Brazil. *Hemoglobin*. 2013;37(3):285-90. <https://doi.org/10.3109/03630269.2013.771271>.
25. Sica HC. Criação do Estado do Rio São Francisco como solução geopolítica para o desenvolvimento da região Oeste da Bahia. *Revista de Geopolítica*. 2019;10(2):87-99.
26. Almeida SC. Rotas Atlânticas: O comércio de escravos entre Pernambuco e a Costa da Mina (c. 1724-c.1752). Dossiê: Escravidão e Liberdade na Diáspora Atlântica. 2018;37. <https://doi.org/10.1590/1980-4369e2018022>.

27. Brandão PR. Um Estado para o Oeste Baiano? Reflexões para o debate sobre discurso identitário e mitos fundadores do pretense Estado do (Rio) São Francisco. *ACTA Geográfica*. 2014;8(16):10-21. <https://10.5654/actageo2014.0004.0014>.
28. Souza CL, Reis EM, Lopes JS, Gonçalves MS, Anselmo FC, Neto JP. Descrição de mutação rara (HBB:C.92+81C>T) na região não codificante do gene β -globina em uma família da cidade de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. *Hematol. Transfus. Cell. Ther.* 2022;44(2):42. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.070>.
29. Uçucu S, Karabiyik T, Azik FM. IVS-II-16 (G>C) (HBB: c.315+16G>C) or IVS-II-666 (C>T) (HBB: c.316-185C>T) Mutations Trigger an Hb S (HBB: c.20A>T)/ β +Thalassemia Phenotype in an Hb S Trait Patient. *Hemoglobin*. 2021;45(2):225-27. <https://doi.org/10.1080/03630269.2021.1965620>.
30. Chauhan W, Fatma R, Zaka-ur-Rab Z, Afzal M. Direct sequencing of β -globin gene reveals a rare combination of two exonic and two intronic variants in a β -thalassemia major patient: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2022;16(362). <https://doi.org/10.1186/s13256-022-03605-2>.
31. Reichert VC, Castro SM, Wagner SC, Albuquerque DM, Hutz MH, Leistner-segal S. Identification of β thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann. Hematol.* 2007;87(5):381-4. <https://doi.org/10.1007/s00277-007-0418-z>.
32. ANVISA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doença Falciforme. 1ª ed. Brasília: ANVISA; 2002.
33. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Diagnóstico Laboratorial das Hemoglobinopatias. Brasília: Ministério da Saúde; 2024.
34. Bonini-Domingos CR. Compound heterozygosity for hemoglobin S and D: what do we need to know? *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2016;3(8):188-9. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.06.001>.
35. Torres LS, Okumura JV, Silva DG; Bonini-Domingos CR. Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2015;37(2):120-6. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.02.007>.
36. Vichinsky E. Hemoglobin E Syndromes. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2007;1:79-83. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2007.1.79>.
37. Williams TN, Thein SL. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2018;19:113-47. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021320>.
38. Szuberski J, Oliveira JL, Hoyer JD. A comprehensive analysis of hemoglobin variants by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Int. J. Lab. Hematol.* 2012;34(6):594-604. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2012.01440.x>.

5 CONCLUSÃO

- Foram identificadas as variantes estruturais Hb S e Hb C em homozigose e em heterozigose composta nas amostras analisadas.

- A maior frequência de variantes estruturais pertence à Hb S, em seguida Hb C. Em terceiro lugar, as variantes de síntese (talassemias).

- Variantes de síntese da cadeia β globina detectadas foram rs713040, IVSI-6, IVSII-16 e IVSII-666 em heterozigose ou homozigose, além de heterozigose composta com Hb S.

- As variantes de síntese identificadas estão associadas a mutações β^+ com resposta fenotipicamente conhecida (IVSI-6).

- As variantes IVSII-16 e IVSII-666 não apresentam dados fenotípicos e hematológicos descritos e, portanto, previamente consideradas neutras. Contudo, há descrição de que a associação com Hb S gera alterações hematológicas levando à quadro de DF. A identificação destas variantes, até onde há informação, é a primeira realizada no Brasil.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A implementação do Plano Nacional de Triagem Neonatal em 2001, o qual incluiu as hemoglobinopatias no Teste do Pezinho, é um importante passo para que os portadores dessas condições genéticas tenham acesso ao diagnóstico precoce, atendimento médico especializado, assim como tratamento adequado. Além disso, a triagem neonatal possibilita o conhecimento de casos de hemoglobinopatias no Brasil e com isso, o entendimento das necessidades dessa população, podendo ser o ponto de partida para o desenvolvimento de políticas públicas direcionadas a esse grupo de pessoas.

Além disso, vale salientar que, é primordial o acompanhamento desses indivíduos seguindo os princípios do SUS, os quais consistem em: Universalização, que preconiza a garantia de acesso da população a serviços de saúde; Equidade, um significativo princípio pra ser aplicado na Anemia Falciforme, haja vista que os indivíduos podem apresentar crises dolorosas em decorrência dos eventos vaso-oclusivos da doença e com isso, precisam de atendimento diferencial efetivo que possa contemplar as necessidades na sua condição de saúde; e Integralidade por meio da conexão entre diferentes setores que possam proporcionar melhorias na saúde da população, como garantia do atendimento multiprofissional essencial para os indivíduos com DF.

Levando em consideração que o diagnóstico de hemoglobinopatias é realizado por meio da solicitação e interpretação correta de exames laboratoriais, percebe-se a importância da Educação Continuada para os profissionais de saúde desde a Atenção Básica, os quais realizam o acolhimento inicial desse indivíduo, até a equipe de atendimento especializado, haja vista que o treinamento e capacitação profissional desde o atendimento inicial dos indivíduos portadores dessas condições genéticas ao diagnóstico laboratorial, tratamento, acompanhamento e esclarecimentos sobre o curso clínico da doença, são fatores primordiais para o atendimento integral preconizado pelo SUS.

Dessa forma, a investigação do perfil hemoglobínico de portadores de DF no Oeste da Bahia realizado pela primeira vez neste trabalho, contribui com o conhecimento genético dessa população ainda não investigada. Além disso, pode ser uma fonte de atualização epidemiológica quanto a variantes genéticas presentes nessa população, podendo auxiliar no entendimento do curso clínico da doença e, conseqüentemente, contribuir com acompanhamento e tratamento mais efetivos, o que pode resultar em melhor qualidade de vida desses indivíduos.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, Jessé. Anemia Falciforme: Apresentação de um caso com infantilismo. **Arquivos da Universidade da Bahia, Faculdade de Medicina**, vol. 2, n. 1, p. 169-198, 1947.
- ARAÚJO, Anderson S.; SILVA JR., Wilson A.; LEÃO, Silvana A. C.; BANDEIRA, Flavia C. G. M.; PETROU, Mary; MODELL, Bernadette; ZAGO, Marco A. A Different Molecular Pattern of β -Thalassemia Mutations in Northeast Brazil. **Hemoglobin**, vol. 27, n. 4, p. 211-217, 2003.
- ANVISA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doença Falciforme**. 1ª ed. Brasília: ANVISA, 2002.
- AURICCHIO, Maria Teresa Balester de Mello; VICENTE, João Pedro; MEYER, Diogo; MINGRONI-NETTO, Regina Célia. Frequency and Origins of Hemoglobin S Mutation in African-Derived Brazilian Populations. **Human Biology**, vol. 79, n. 6, p. 667-677, 2007.
- BORG, Joseph; GEORGITSIS, Marianthi; ALEPOROU-MARINO, Vassiliki; KOLLIA, Panagoula; PATRINOS, George P. Genetic recombination as a major cause of mutagenesis in the human globin gene clusters. **Clinical Biochemistry**, vol. 42, n. 18, p. 1839-1850, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação Geral de Atenção Especializada. **Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- BRASIL. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único De Saúde (CONITEC). **Monitoramento do Horizonte Tecnológico: Medicamentos para o tratamento da Doença Falciforme**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Diagnóstico Laboratorial das Hemoglobinopatias**. Brasília: Ministério da Saúde, 2024a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação e do Complexo Econômico-Industrial da Saúde. Portaria conjunta SAES/SECTICS nº 16, de 01 de novembro de 2024. Dispõe sobre a aprovação do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 de setembro de 2024b.
- BORG, Joseph; GEORGITSIS, Marianthi; ALEPOROU-MARINO, Vassiliki; KOLLIA, Panagoula; PATRINOS, George P. Genetic recombination as a major cause of mutagenesis in the human globin gene clusters. **Clinical Biochemistry**, vol. 42, n. 18, p. 1839-1850, 2009.
- CANÇADO, Rodolfo D.; JESUS, Joice A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, vol. 29, n. 3, p. 203-206, 2007.
- CARROCINI, Gisele C.S.; VENANCIO, Larissa P. R.; PESSOA, Viviani L. R.; LOBO, Clarisse L.C.; BONINI-DOMINGOS, Claudia R. Mutational Profile of Homozygous β -Thalassemia in Rio de Janeiro, Brazil. **Hemoglobin**, vol. 41, n. 1, p. 12-15, 2017.
- DANJOU; Fabrice; ANNI, Franco; GALANELLO, Renzo. Beta-thalassemia: from genotype to phenotype. **Haematologica**, vol. 96, n. 11, p. 1573-1575, 2011.
- DZIERZAK, Elaine; PHILIPSEN, Sjaak. Erythropoiesis: Development and Differentiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol. 3, a011601, 2013.
- ESOH, Kevin; WONKAM, Ambrose. Evolutionary history of sickle-cell mutation: implications for global genetic medicine. **Human Molecular Genetics**, vol. 30, n. 2, p. 119-128, 2021.
- FONSECA, Silvana F.; NETO, José P. Moura; GONÇALVES, Marilda S. Prevalence and molecular characterization of β -thalassemia in the state of Bahia, Brazil: first identification of mutation HBB: c.135delC in Brazil. **Hemoglobin**, vol. 37, n. 3, p. 285-290, 2013.

GALANELLO, Renzo; ORIGA, Raffaella. Beta-thalassemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, vol. 5, n. 11, 2010.

GHATGE, Mohini S.; AHMED, Mostafa H.; OMAR, Abdel Sattar; PAGARE, Piyusha P.; ROSEF, Susan; KELLOGG, Glen E.; ABDULMALIK, Osheiza; SAFO, Martin K. Crystal structure of carbonmonoxy sickle hemoglobin in R-state conformation. **Journal of Structural Biology**, vol 194, n. 3, p. 446-450, 2016.

GOHEEN, Morgan M.; CAMPINO, Susana; CERAMI, Carla. The role of the red blood cell in host defence against falciparum malaria: an expanding repertoire of evolutionary alterations. **British journal of haematology**, vol. 179, n. 4, p. 543-556, 2017.

HABARA, Alawi H.; SHAIKHO, Elmutaz M.; STEINBERG, Martin H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: The Arab-Indian haplotype and new therapeutic agents. **American Journal of Hematology**, vol. 92, n. 11, p. 1233-1242, 2017.

HARIHARAN, Priya; KISHNANI, Pooja; SAWANT, Pratibha; GORIVALE, Manju; MEHTA, Pallavi; KARGUTKAR, Neha; COLAH, Roshan; NADKARNI, Anita. Genotypic-phenotypic heterogeneity of $\delta\beta$ -thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) in India, **Annals of hematology**, vol. 99, n. 7, p. 1475-1483, 2020.

HARTEVELD, Cornelis L.; HIGGS, Douglas R. α -thalassaemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, vol. 5, n. 13, 2010.

HIGGS, Douglas R.; ENGEL, James Douglas; STAMATOANNOPOULOS, George. Thalassaemia. **The Lancet**, vol. 379, 2012.

IP, Jack Chi-Ho; XU, Ting; SUN, Jin; LI, Runsheng; CHEN, Chong; LAN, Yi; HAN, Zhuang; ZHANG, Haibin; WEI, Jiangong; WANG, Hongbin; TAO, Jun; CAI, Zongwei; QIAN, Pei-Yuan; QIU, Jian-Wen. Host-Endosymbiont Genome Integration in a Deep-Sea Chemosymbiotic Clam. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 38, n. 2, p. 502-518, 2020.

IVALDI, Giovanni; LEONE, Daniela; VIAGGI, Chiara; PASCOTTO, Dino. Variabilità delle frazioni emoglobiniche dalla nascita all'età adulta in condizioni fisiologiche e patologiche. **Biochimica Clinica**, vol. 31, n. 4, 2007.

KATO, Gregory J.; PIEL, Frédéric B.; REID, Clarice D.; GASTON, Marilyn H.; OHENE-FREMPONG, Kwaku; KRISHNAMURTI, Lakshmanan; SMITH, Wally R. PANEPINTO, Julie A.; WEATHERALL, David J.; COSTA, Fernando F.; VICHINSKY, Elliott P. Sickle cell disease. **Nature Reviews**, vol. 4, a18010, 2018.

LU, Dian; XU, Zhiliang; PENG, Zhiyong; YANG, Yinghong; SONG, Bing; XIONG, Zeyu; MA, Zhirui; GUAN, Hongmei; CHEN, Bangzhu; NAKAMURA, Yukio; ZENG, Juan; LIU, Nengqing; SUN, Xiaofang; CHEN, Diyu. Induction of Fetal Hemoglobin by Introducing Natural Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin Mutations in the γ -Globin Gene Promoters for Genome Editing Therapies for β -Thalassemia. **Frontiers in Genetics**, vol. 17, n. 13, 2022.

MAGIS, Wendy; DEWITT, Mark A.; WYMAN, Stacia K.; VU, Jonathan T.; HEO, Seok-Jin; SHAO, Shirley J.; HENNING, Finn; ROMERO, Zulema G.; CAMPO-FERNANDEZ, Beatriz; SAID, Suzanne; MCNEILL, Matthew S.; RETTIG, Garrett R.; SUN, Yongming; WANG, Yu; BEHLKE, Mark A.; KOHN, Donald B.; BOFFELLI, Dario; WALTERS, Mark C.; CORN, Jacob E.; MARTIN, David I. K. High-level correction of the sickle mutation is amplified *in vivo* during erythroid differentiation. **iScience**, vol. 25, n. 6, 2022.

MAMAS, Thalia; KAKOUROU, Georgia; VRETTOU, Christina; TRAEGER-SYNODINOS, Joanne. Hemoglobinopathies and preimplantation diagnostics. **International Journal of Laboratory Hematology**, vol. 44, p. 21-27, 2022.

- MOHAMMAD, Siti Nur Nabeela A'ifah; IBERAHIM, Salfarina; RAHMAN, Wan Suriana Wan Ab; HASSAN, Mohd Nazri; EDINUR, Hisham Atan; AZLAN, Maryam; ZULKAFI, Zefarina. Single Nucleotide Polymorphisms in *XMNI-HBG2*, *HBSIL-MYB*, and *BCL11A* and Their Relation to High Fetal Hemoglobin Levels That Alleviate Anemia. **Diagnostics (Basel)**, vol. 12, n. 6, 2022.
- MOTA, Natália O.; KIMURA, Elza M.; FERREIRA, Roberta D.; PEDROSO, Gisele A.; ALBUQUERQUE, Dulcinéia M.; RIBEIRO, Daniela M.; SANTOS, Magnun N. N.; BITTAR, Cristina M.; COSTA, Fernando F.; SONATI, Maria de Fatima. Rare α^0 -thalassemia deletions detected by MLPA in five unrelated Brazilian patients. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 40, n. 4, p. 768-773, 2017.
- NADER, Elie; ROMANA, Marc; CONNES, Philippe. The Red Blood Cell - Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. **Frontiers in Immunology**, vol. 11, a454, 2020.
- NGO, Duyen A.; AYGUN, Banu; AKINSHEYE, Idowu; HANKINS, Jane S.; BHAN, Ishir; LUO, Hong Y.; STEINBERG, Martin H.; CHUI, David H.K. Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. **British journal of haematology**, vol. 156, n. 2, p. 259-264, 2019.
- PANDEY, Sanjay; MISHRA, Rahasya Mani; PANDEY, Sweta; SHAH, Vineet; SAXENA, Renu. Molecular characterization of hemoglobin D Punjab traits and clinical-hematological profile of the patients. **São Paulo Medical Journal**, vol.130, n. 4, p. 248-251, 2012.
- PAPAGEORGIOU, D. P.; ABIDI, S. Z.; CHANG, H.-Y.; LI, X.; KATO, G. J.; KARNIADAKIS, G. E.; SURESH, S.; DAO, M. Simultaneous polymerization and adhesion under hypoxia in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 115, n. 38, p. 9473-9478, 2018.
- PARK, So Hyun; BAO, Gang. CRISP/Cas 9 gene editing for curing sickle cell disease. **Transfusion and Apheresis Science**, vol. 60, n. 1, 2021.
- PATEL, Dilip K.; MASHON, Ranjeet S.; PATEL, Siris; DASH, Preetinanda M.; DAS, Bhabani S. β -globin gene haplotypes linked with the Hb D-Punjab [β 121(GH4) Glu→Gln, GAA>CAA] mutation in eastern India. **Hemoglobin**, vol. 34, n. 6, p. 530-537, 2010.
- PIEL, Frédéric B.; HAY, Simon I.; GUPTA, Sunetra; WEATHERALL, David J.; WILLIAMS, Thomas N. Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010-2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. **Plos Medicine**, vol. 10, n. 7, e1001484, 2013.
- PFIZER. *Pfizer Voluntarily Withdraws All Lots of Sickle Cell Disease Treatment OXBRYTA® (voxelotor) From Worldwide Markets*. 25 de set. de 2024. Disponível em: <<https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-voluntarily-withdraws-all-lots-sickle-cell-disease>>. Acesso em: 29/01/2025.
- POWARS, D.R.; MEISELMAN, H.J.; FISHER, T.C.; HITI, A.; JOHNSON, C. Beta-S gene cluster haplotypes modulate hematologic and hemorheologic expression in sickle cell anemia. Use in predicting clinical severity. **The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, vol. 16, n. 1, p. 55-61, 1994.
- REES, David C.; WILLIAMS, Thomas.; GLADWIN, Mark T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, vol. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.
- REICHERT, Vivian C. D.; CASTRO, Simone M. de; WAGNER, Sandrine C.; ALBUQUERQUE, Dulcinéia M. de; HUTZ, Mara H.; LEISTNER-SEGAL, Sandra. Identification of β thalassemia mutations in South Brazilians. **Annals of Hematology**, vol. 87, n. 5, p. 381-384, 2007.
- SANTOS, Rui Leonardo; RODRIGUES, Waldecy; PRATA, David; TREVISAN, Daniela Mascarenhas de Queiroz; BERMEJO, Paulo Henrique de Souza; MOREIRA, Marina Figueiredo. Covid-19 impacts: Ethnic and regional inequalities in sickle cell disease patient care in Brazil. **Heliyon**, vol. 9, n. 11, 2023.
- SCHECHTER, Alan N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, vol. 112, n. 10, 2008.

SERJEANT, Graham R. The natural history of sickle cell disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol. 3, n. 10, a011783, 2013.

SHARMA, Akshay; BOELEN, Jaap-Jan; CANCIO, Maria; HANKINS, Jane S.; BHAD, Prafulla; AZIZY, Marjohn; LEWANDOWSKI, Andrew; ZHAO, Xiaojun; CHITNIS, Shripad; PEDDINTI, Radhika; ZHENG, Yan; KAPOOR, Neena, Kapoor; CICERI, Fábio; MACLACHLAN, Timothy; YANG, Yi; LIU, Yi; YUAN, Jianping; NAUMANN, Ulrike; YU, Vionnie W. C.; STEVENSON, Susan C.; VITA, Serena de; LABELLE, James L. CRISPR-Cas9 Editing of the HBG1/HBG2 Promoters to Treat Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, vol. 389, n. 9, 2023.

SHRINER, Daniel; ROTIMI, Charles N. Whole-Genome-Sequence-Based Haplotypes Reveal Single Origin of the Sickle Allele during the Holocene Wet Phase. **The American Journal of Human Genetics**, vol. 1, n. 2, p. 547-556, 2018.

SILVA-PINTO, Ana; QUEIROZ, Maria Cândida Alencar de; ZAMARO, Paula Juliana Antoniazco; ARRUDA, Miranete; SANTOS, Helena Pimentel dos. The Neonatal Screening Program in Brazil, Focus on Sickle Cell Disease (SCD). **International Journal of Neonatal Screening**, vol. 5, n. 1, 2019.

SUNDD, Prithu; GLADWIN, Mark T.; NOVELLI, Enrico M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Pathology**, vol. 14, p. 263-292, 2019.

TARIQ, Hamza; KHURSHID, Fatima; KHAN, Muhammad Hamza; DILSHAD, Aamna; ZAIN, Ahmad; RASOOL, Warda; JAWAID, Alishba; KUNWAR, Digbijay; KHANDUJA, Sneha; AKBAR, Anum. CRISPR/Cas9 in the treatment of sickle cell disease (SCD) and its comparison with traditional treatment approaches: a review. **Annals of Medicine & Surgery**, vol. 86, p. 5938-5946, 2024.

WAGNER, Sandrine C.; CASTRO, Simone M. de; GONZALEZ, Tatiana P.; SANTIN, Ana P.; FILIPPON, Leticia; ZALESKI, Carina F.; AZEVEDO, Laura A.; AMORIM, Bruna; CALLEGARI-JACQUES, Sidia M.; HUTZ, Mara H. Prevalence of common α -thalassemia determinants in south Brazil: Importance for the diagnosis of microcytic anemia. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 33, n. 4, p. 641-645, 2010.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, vol. 79, n. 8, 2001.

WENNING, M. R.; KIMURA, E. M.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T.; GERVÁSIO, S.; JORGE, S. B. de; BORGES, E.; SILVA, N. M.; SONATI, M. F. α -globin genes: thalassaemic and structural alterations in a Brazilian population. Brazilian journal of medical and biological research. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 33, n. 9, p. 1041-1045, 2000.

ZAGO, M. A.; COSTA, Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 79, n. 3, p. 385-388, 1985.