



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UnB

LARISSA LEMOS MENDANHA CAVALCANTE

**Desenvolvimento de algoritmo diagnóstico para detecção de
hemoglobinopatias e estudo de prevalência em contexto de saúde pública
pediátrica no Distrito Federal**

Brasília

2026



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UnB

LARISSA LEMOS MENDANHA CAVALCANTE

**Desenvolvimento de algoritmo diagnóstico para detecção de
hemoglobinopatias e estudo de prevalência em contexto de saúde pública
pediátrica no Distrito Federal**

Tese apresentada para defesa de doutorado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília – UnB, como requisito final para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Orientador: Dr. Ricardo Camargo

Brasília

2026

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, base de tudo o que sou. Ao meu pai, *in memoriam*, cuja presença segue viva em cada passo desta caminhada — sua força, seus ensinamentos e seu amor continuam sendo o meu norte, mesmo na ausência. À minha mãe, por ser meu porto seguro, exemplo de coragem e dedicação, e por nunca ter soltado a minha mão, mesmo nos momentos mais difíceis.

Às minhas irmãs, pelo companheirismo, pelas palavras de incentivo e por compartilharem comigo cada conquista e cada desafio, tornando essa jornada mais leve e significativa.

Ao meu orientador, pela confiança, orientação e disponibilidade ao longo de toda essa trajetória. Sua contribuição foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este percurso se tornasse realidade — familiares, amigos, professores e colegas de trabalho — meu mais sincero agradecimento. Cada gesto de apoio, cada palavra de incentivo e cada contribuição, direta ou indireta, foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Este título não é apenas meu, mas de todos que caminharam ao meu lado.

RESUMO

As hemoglobinopatias são doenças genéticas hereditárias de ampla distribuição mundial, decorrentes de variantes nos genes das globinas que afetam a produção ou a função da hemoglobina. A disseminação mundial é uma consequência das migrações populacionais, o que favoreceu a miscigenação e a dispersão exacerbada dos genes anormais da hemoglobina. As hemoglobinopatias incluem as talassemias, resultantes de redução ou ausência na síntese de cadeias globínicas; as hemoglobinas variantes, causadas por alterações estruturais; e a Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal. A hemoglobinopatia mais frequente e, conjuntamente, uma das mais relevantes no globo é a doença falciforme (principalmente a anemia falciforme, HbSS). Ela concentra a maior parcela de hemoglobinopatias graves em âmbito mundial e é responsável por significativa carga de morbimortalidade, especialmente em populações de origem africana. As hemoglobinopatias cursam com sintomas variáveis, desde formas leves ou assintomáticas até quadros graves e crônicos, marcados por anemia, palidez, fadiga e dor, que pode ser crônica ou em crises agudas. A heterogeneidade genotípica e fenotípica dessas condições impõe desafios significativos ao diagnóstico, especialmente em contextos de triagem neonatal e serviços públicos com alta demanda e diversidade étnica. Limitações dos métodos convencionais favorecem subdiagnóstico ou classificação inadequada, impactando condução clínica, prognóstico e estratégias de prevenção. Nesse cenário, a integração de técnicas de biologia molecular torna-se essencial para aumentar a acurácia diagnóstica, permitir detecção precoce, orientar aconselhamento genético e subsidiar políticas públicas mais efetivas. O estudo teve como principal objetivo desenvolver e implantar algoritmo de diagnóstico molecular para detecção de hemoglobinopatias em crianças e adolescentes atendidos em serviço de saúde pública do Distrito Federal. O objetivo secundário foi realizar, de maneira inédita, um estudo epidemiológico abrangente no Distrito Federal, pela escassez de estudos amplos e com maior detalhamento genotípico, e por apresentar uma das populações de maior heterogeneidade genética do Brasil. O estudo realizado foi descritivo e analítico, com delineamento transversal em uma coorte retrospectiva de pacientes pediátricos com idade entre 0 e 19 anos, no período de 2017 a 2025. Foram incluídos todos os casos admitidos pelo Programa de Triagem Neonatal do Distrito Federal e os atendidos no ambulatório de hematologia

do Hospital da Criança de Brasília, com diagnóstico inconclusivo pelos métodos convencionais de triagem e/ou desvios nos índices hematimétricos e achados clínicos/citológicos suspeitos de hemoglobinopatias. As amostras de sangue periférico foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa Translacional do Hospital da Criança de Brasília para diagnóstico confirmatório por métodos de biologia molecular. A análise dos dados foi descritiva, com foco na frequência dos genótipos, e incluiu variáveis demográficas (idade e sexo), índices hematimétricos (Hb, VCM, HCM, RDW, reticulócitos e ferritina sérica, ajustados por faixa etária) e o perfil de hemoglobinas (HbA₁, HbA₂, HbF e hemoglobinas anômalas). Foram diagnosticados 415 casos pediátricos com alterações hemoglobínicas, entre alfa-talassemia, beta-talassemia, hemoglobina variante e Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF). O perfil hematológico e de hemoglobinas dos pacientes diagnosticados foram, em geral, associados à presença de anemia leve ou moderada, microcitose e hipocromia. A variante mais prevalente foi a HbS em heterozigose, causadora da doença falciforme, seguida da HbC e Hb Korle Bu. Já a HbS em homozigose relativa à anemia falciforme foi detectada em 18 pacientes. Os dados encontrados nesse estudo mostram uma expressiva variabilidade de hemoglobinas e uma grande diversidade racial presente em indivíduos nascidos no Distrito Federal e entorno, sendo considerada uma população heterogênea constituída de indivíduos de diversas regiões brasileiras, com ascendência africana, asiática, italiana, ameríndia, espanhola e portuguesa. Foi possível implementar um conjunto de técnicas integradas em um algoritmo racional, que demonstrou elevada resolutividade diagnóstica e viabilidade de manutenção no contexto do SUS. Com o estabelecimento dos métodos de biologia molecular, já foram detectadas uma série de variantes com importante impacto clínico e prognóstico relacionadas à alfa e beta talassemias, além de variantes nunca descritas em banco de dados.

Palavras-chave: Hemoglobinopatia, Talassemia, Triagem Neonatal, Diagnóstico Molecular.

ABSTRACT

Hemoglobinopathies are hereditary genetic disorders with a wide global distribution, resulting from mutations in globin genes that affect the production or function of hemoglobin. Their worldwide dissemination is largely a consequence of population migrations, which have promoted admixture and the broad spread of abnormal hemoglobin genes. Hemoglobinopathies include thalassemias, characterized by reduced or absent synthesis of globin chains; structural hemoglobin variants; and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. Among these, sickle cell disease (particularly sickle cell anemia, HbSS) is the most frequent and one of the most clinically significant worldwide, accounting for a substantial proportion of severe cases and contributing to considerable morbidity and mortality, especially in populations of African ancestry. Clinical manifestations of hemoglobinopathies are variable, ranging from mild or asymptomatic forms to severe, chronic conditions marked by anemia, pallor, fatigue, and pain, which may be persistent or occur in acute crises. The genotypic and phenotypic heterogeneity of these disorders poses significant challenges for diagnosis, particularly in neonatal screening programs and public health services with high demand and ethnic diversity. Limitations of conventional methods may lead to underdiagnosis or misclassification, thereby impacting clinical management, prognosis, and prevention strategies. In this context, the integration of molecular biology techniques becomes essential to improve diagnostic accuracy, enable early detection, guide genetic counseling, and support more effective public health policies. The primary objective of this study was to develop and implement a molecular diagnostic algorithm for the detection of hemoglobinopathies in children and adolescents receiving care in the public health system of the Federal District, Brazil. The secondary objective was to conduct, in an unprecedented manner, a comprehensive epidemiological study in the Federal District, given the scarcity of large-scale studies with detailed genotypic characterization and the region's highly heterogeneous population. This was a descriptive and analytical study with a cross-sectional design, based on a retrospective cohort of pediatric patients aged 0 to 19 years, evaluated between 2017 and 2025. All cases identified through the Neonatal Screening Program of the Federal District, as well as patients followed at the hematology outpatient clinic of the Hospital da Criança de Brasília with inconclusive results from conventional screening methods and/or abnormal hematimetric indices

and clinical or cytological findings suggestive of hemoglobinopathies, were included. Peripheral blood samples were analyzed at the Translational Research Laboratory of the same institution for confirmatory diagnosis using molecular biology techniques. Data analysis was descriptive, focusing on genotype frequency, and included demographic variables (age and sex), hematimetric indices (hemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, red cell distribution width, reticulocyte count, and serum ferritin adjusted for age), and hemoglobin profiles (HbA₁, HbA₂, HbF, and abnormal hemoglobins). A total of 415 pediatric cases with hemoglobin alterations were diagnosed, including alpha-thalassemia, beta-thalassemia, hemoglobin variants, and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. The hematological and hemoglobin profiles were generally associated with mild to moderate anemia, microcytosis, and hypochromia. The most prevalent variant was heterozygous HbS, followed by HbC and Hb Korle Bu. Homozygous HbS, corresponding to sickle cell anemia, was identified in 18 patients. The findings reveal a marked variability of hemoglobin types and significant racial diversity among individuals born in the Federal District and surrounding areas, reflecting a highly heterogeneous population composed of individuals from different regions of Brazil with African, Asian, Italian, Amerindian, Spanish, and Portuguese ancestry. The study enabled the implementation of a set of molecular techniques within a rational diagnostic algorithm, demonstrating high diagnostic resolution and feasibility for incorporation into the public health system. With the establishment of molecular methods, several clinically and prognostically relevant mutations related to alpha- and beta-thalassemias were identified, as well as variants not previously described in existing databases.

Keywords: Hemoglobinopathies, Thalassemia, Neonatal Screening, Molecular Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção das diferentes hemoglobinas ao longo do desenvolvimento humano (King, 2022).....	04
Figura 2. Estrutura da hemoglobina (King, 2014).	05
Figura 3. Apresentação esquemática dos clusters de alfa e beta e seus elementos regulatórios nos cromossomos 16p e 11p, respectivamente. Farashi & Hartevelde (2018).....	07
Figura 4. Distribuição mundial das principais hemoglobinopatias.....	10
Figura 5. Representação esquemática da fisiopatologia molecular da hemoglobina S (HbS)	12
Figura 6. Representação esquemática da herança autossômica recessiva e transmissão genética da hemoglobina S para os descendentes.....	13
Figura 7. Classificação genotípica e fenotípica de alfa talassemias. (Adaptado de Rosenberg & Rosenberg, 2012).....	16
Figura 8. Principais deleções envolvidas na α -talassemia (Hartevelde & Higgs, 2010).....	18
Figura 9. Algoritmo metodológico definido para o diagnóstico de hemoglobinopatias no Laboratório de Pesquisa Translacional do Hospital da Criança de Brasília.....	40
Figura 10. Variante deletional de 3,7kb por MLPA (A), hemoglobina variante Taybe detectada por sequenciamento genético do gene de alfa globina(B), e, ambas alterações no mesmo gene (<i>HBA2</i>) do paciente (C).....	41
Figura 11. Número de indivíduos caracterizados molecularmente e diagnosticados com α e β - talassemia, Hb variante e Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal	

(PHHF), e com co-herança entre eles.....47

Figura 12. Comparação entre os grupos A, C1, C2, D1 e D2 em relação aos parâmetros hematológicos VCM, reticulócitos, RDW e HbF.....52

Figura 13. Impacto do estado do ferro (ferritina < 30 ng/mL, vermelho; ≥ 30 ng/mL, azul) no VCM e no HCM dos genótipos A (alfa-silencioso), B (traço alfa) e C1 (HbS/alfa-silencioso).....52

Figura 14. Distribuição regional das principais variantes genéticas associadas às β-talassemias no Brasil.....55

Figura 15. Distribuição das hemoglobinas variantes identificadas na coorte estudada.....59

Figura 16. Eletroferograma obtido por sequenciamento de Sanger evidenciando a variante gerada por duplicação de 12 pares de bases no éxon 2 do gene da alfa-globina *HBA1*.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de referência de índices hematimétricos para as diferentes faixas etárias (PNCQ, Bain <i>et al</i> , 2017; Ministério da Saúde, 2023).....	26
Tabela 2. Valores de referência de hemoglobinas para as diferentes faixas etárias (Ivaldi <i>et al</i> , 2007).....	26
Tabela 3. Classes de hemoglobinopatias encontradas em pacientes pediátricos, respectivas frequências e distribuição por idade e sexo, atendidos no Hospital da Criança de Brasília.....	38
Tabela 4. Hemoglobinopatias isoladas ou associadas encontradas em pacientes pediátricos atendidos no serviço de saúde pública do Distrito Federal, especificadas por genótipo, número de cópias e variante do tipo HGVS (human genome variation society).....	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP – Adenosina trifosfato

BPG (2,3-BPG) – 2,3-bifosfoglicerato

CO₂ – Dióxido de carbono

DF – Doença falciforme

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EKLF – Fator eritroide Krüppel-like

GATA1 – Fator de transcrição eritroide GATA-1

GAP-PCR – Polymerase Chain Reaction para deleções (PCR gap)

Hb – Hemoglobina

HbA – Hemoglobina A

HbA₁ – Hemoglobina A₁

HbA₂ – Hemoglobina A₂

HbC – Hemoglobina C

HbD – Hemoglobina D

HbE – Hemoglobina E

HbF – Hemoglobina fetal

HbH – Hemoglobina H

HbS – Hemoglobina S

HbSS – Genótipo homozigoto para HbS

HBA1 – Gene da alfa-globina 1

HBA2 – Gene da alfa-globina 2

HBB – Gene da beta-globina

HBG1 – Gene da gama-globina 1

HBG2 – Gene da gama-globina 2

HCM – Hemoglobina corpuscular média

HGVS – Human Genome Variation Society

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HU – Hidroxiureia

IEF – Focalização isoeletrica

IVS – Sequência interveniente (íntron)

Kb – Quilobase

LCR – Região de controle do locus

MCS – Multispecies Conserved Sequences

MCSR – Regiões conservadas multiespécies regulatórias

MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

mRNA – RNA mensageiro

NF-E2 – Fator nuclear eritroide 2

NTDT – Talassemias não dependentes de transfusão

O₂ – Oxigênio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PHHF – Persistência hereditária da hemoglobina fetal

PNCQ – Programa Nacional de Controle de Qualidade

PNTN – Programa Nacional de Triagem Neonatal

PO₂ – Pressão de oxigênio

RDW – Red cell distribution width

RNA – Ácido ribonucleico

SUS – Sistema Único de Saúde

VCM – Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Hemoglobinas: ontogênese	2
1.2	Hemoglobinas: Estrutura e função.....	4
1.3	Agrupamentos gênicos das globinas	6
1.4	Hemoglobinopatias.....	9
1.5	Variantes genéticas que causam impacto estrutural na hemoglobina.....	11
1.6	Talassemias	14
1.7	Alfa-talassemias	15
1.8	Beta-talassemias.....	18
1.9	Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal	22
1.10	Relevância do diagnóstico molecular como complemento da Triagem Neonatal	23
2.	Objetivos.....	27
2.1	Objetivo Geral	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3	Materiais e métodos.....	27
3.1	Tipo de estudo e casuística	27
3.2	CrITÉrios de exclusão	30
3.3	Coleta de material biológico e extração de DNA genômico	30
3.4	Padronização dos métodos moleculares e construção do algoritmo-diagnóstico.....	30
3.5	GAP-PCR para Alfa-Talassemia e Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF).....	30
3.6	MLPA.....	32
3.7	Sequenciamento genético	33
3.8	Análise dos dados	34
3.9.	Caracterização hematológica e molecular das alfa-talassemias	35
4	Resultados e Discussão.....	37
4.1	Construção do algoritmo-diagnóstico	37
4.2	Descrição geral e frequência de genótipos de hemoglobinopatias na população estudada	41
4.3	Alfa-talassemias	47
4.4.	Caracterização hematológica e molecular das alfa-talassemias	49
4.5	Beta-talassemias	53
4.6	Hemoglobinas variantes	57
5	Conclusões.....	62
6	Referências Bibliográficas.....	64

1 Introdução

As hemoglobinopatias constituem as doenças monogênicas hereditárias mais frequentes e letais a nível mundial. São ocasionadas por distúrbios genéticos da hemoglobina (Hb), devido a variantes nos genes envolvidos na síntese das globinas ou em suas regiões regulatórias (Williams, Weatherall, 2012; Piel et al., 2013; Taher, 2018).

A hemoglobina pode ser afetada de maneira quantitativa, em que há um defeito na produção de uma ou mais cadeias da globina, resultando em ausência total ou redução acentuada de cadeias a serem formadas; ou qualitativa, por meio de uma ou mais variantes estruturais que alteram a sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica, levando à produção de uma hemoglobina anormal (Forget, Bunn, 2013; Shang, Xu, 2017). A depender dos genes envolvidos, as hemoglobinopatias compreendem as talassemias, denominadas alfa ou beta talassemias, as variantes estruturais e a Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF) (Rosenfeld et al., 2019).

Segundo os últimos dados de epidemiologia global publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 330 mil casos de hemoglobinopatia ocorrem a cada ano (83% representam casos de anemia falciforme e 17% de talassemia), sendo a grande maioria (90%) em países de média e baixa renda (Modell, Darlison, 2008). Estima-se que aproximadamente 3,4% das mortes entre menores de 5 anos têm relação com a herança genética de alguma hemoglobinopatia (Shang, Xu, 2017).

Os dados ainda sugerem que cerca de 7% da população mundial fenotipicamente saudável seja portadora de uma variante responsável pelo desenvolvimento desses distúrbios da hemoglobina, principalmente doença falciforme (DF) e talassemia (Piel, 2016), e que 1,1% dos casais apresentam o risco de gerarem filhos com alguma hemoglobinopatia (Higgs et al., 2012; Williams, Weatherall, 2012).

A prevalência desses distúrbios é maior em regiões tropicais, muito embora, por meio de migrações populacionais generalizadas, venha se espalhando amplamente na Europa, América do Norte e Austrália (Taylor et al., 2012; Aguilar Martinez et al., 2014; Williams, Weatherall, 2012). As talassemias são essencialmente prevalentes no Sul e Sudeste Asiáticos, nos países do Mediterrâneo e Oriente Médio (Wong et al., 2016). A doença falciforme (DF) é particularmente comum entre aqueles cujos ancestrais vieram da África Subsaariana, sendo encontradas no Hemisfério

Ocidental (América do Sul, Caribe e América Central), Arábia Saudita, Índia e países mediterrâneos como Turquia, Grécia e Itália (CDC, 2022).

O Brasil é o país da América Latina que detém a maior população afrodescendente e as maiores estimativas populacionais para anemia falciforme, com ocorrência de 1 caso a cada 1000 recém-nascidos. A prevalência de recém nascidos portadores do traço falciforme é de aproximadamente 100 mil casos por ano (Huttle et al., 2015).

Diferentes defeitos das hemoglobinas podem ser co-herdados, dando origem a uma série de genótipos complexos e fenótipos clínicos com altos graus de severidade. As manifestações clínicas e a gravidade variam com o tipo de hemoglobinopatia formado pelo desequilíbrio nas cadeias de globina, podendo ser desde quase imperceptíveis até letais (Gohari-Saleh et al., 2015).

Devido à alta prevalência e ao impacto na saúde global a cada ano, as hemoglobinopatias têm sido consideradas um problema mundial de saúde pública cada vez mais sério. Por estes motivos, muitos países implementaram programas nacionais de triagem neonatal de forma a oferecer maior qualidade de vida aos afetados através do diagnóstico precoce das formas mais graves da doença e da detecção de possíveis portadores. O aconselhamento a casais em risco, a conscientização dos familiares e a disponibilidade de condutas terapêuticas adequadas são medidas adotadas para aumentar a qualidade de vida dos pacientes afetados por essas doenças (Ramalho et al., 2002; Traeger- Synodinos et al., 2017).

1.1 Hemoglobinas: ontogênese

A hemoglobina é uma molécula indispensável à vida humana e foi uma das primeiras proteínas globulares a ser estudada por cristalografia de difração de raios X, o que rendeu o Prêmio Nobel de Química a Max Ferdinand Perutz e John Kendrew, em 1962, pela descoberta da estrutura tridimensional da hemoglobina, a proteína dos glóbulos vermelhos do sangue (Maia, 2019). Trata-se de uma metaloproteína com peso molecular de aproximadamente 64.500 daltons, constituída por quatro subunidades formando uma estrutura quaternária, cada uma tendo um grupo proteico formado pelas cadeias polipeptídicas - as globinas, e por um grupo prostético - grupo heme ou ferroprotoporfirina IX (Loukopoulos, 2002; Marengo-Rowe, 2006).

Ao longo do desenvolvimento humano, as cadeias polipeptídicas sofrem alterações fisiológicas e se combinam, dando origem à formação de diferentes

hemoglobinas em diferentes locais hematopoiéticos, caracterizando as fases embrionária, fetal e adulta (Patrinos, Antonarakis, 2010).

As mudanças relacionadas ao padrão de síntese de hemoglobinas no processo de ontogênese são acompanhadas por mudanças no sítio principal de eritropoiese. Sendo assim, os eritrócitos das três fases originam-se de diferentes células precursoras e a diferenciação de ambos ocorre de forma independente (Palis, 2014). A figura 1 evidencia os tipos de hemoglobinas e suas concentrações esperadas nas diferentes etapas da vida humana.

No embrião a eritropoiese ocorre de forma predominante no saco vitelínico, nas quatro primeiras semanas de gestação. Nessa fase, os genes ζ - globina (zeta) e ϵ - globina (épsilon) encontram-se ativos e associados formando a Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$). O sítio principal de hematopoese começa a se mover do saco vitelínico para o fígado fetal, aproximadamente na quinta semana de gestação. A partir da sexta semana, os genes ϵ -globina são silenciados e os genes α , β e γ -globina são ativados. A Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) e Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) estão presentes até a décima segunda semana da fase embrionária, e logo deixam de ser produzidas. Essas três hemoglobinas são primordiais no desenvolvimento funcional do embrião.

A partir da décima segunda semana de gestação, a síntese das Hb embrionárias é interrompida e a hemoglobina predominante passa a ser a fetal (HbF), formada por duas cadeias α (alfa) e duas cadeias γ (gama). Designada como $\alpha_2\gamma_2$, a Hb fetal é produzida no fígado e no baço, durante a gestação até os primeiros 6 meses de vida pós-natal. Essa hemoglobina é fundamental na distribuição de oxigênio na fase fetal, constituindo cerca de 70% da hemoglobina total ao nascimento e menos de 1% no adulto (Hardison, 2012). Ao final do período de gestação, a Hb passa a ser produzida na medula óssea e a síntese de cadeias γ (gama) é amplamente substituída pela síntese de cadeias β (beta). Com isso, a hemoglobina A (HbA), formada por duas subunidades alfa e duas subunidades beta ($\alpha_2\beta_2$), têm sua produção aumentada de forma gradativa. Esta é sintetizada em uma concentração perto de 10% até o nascimento, chegando a 95% do total de hemoglobinas em torno do sexto mês de vida. Este percentual se estende às Hb normais do adulto, (Akinsheye et al., 2011; Hardison, 2012).

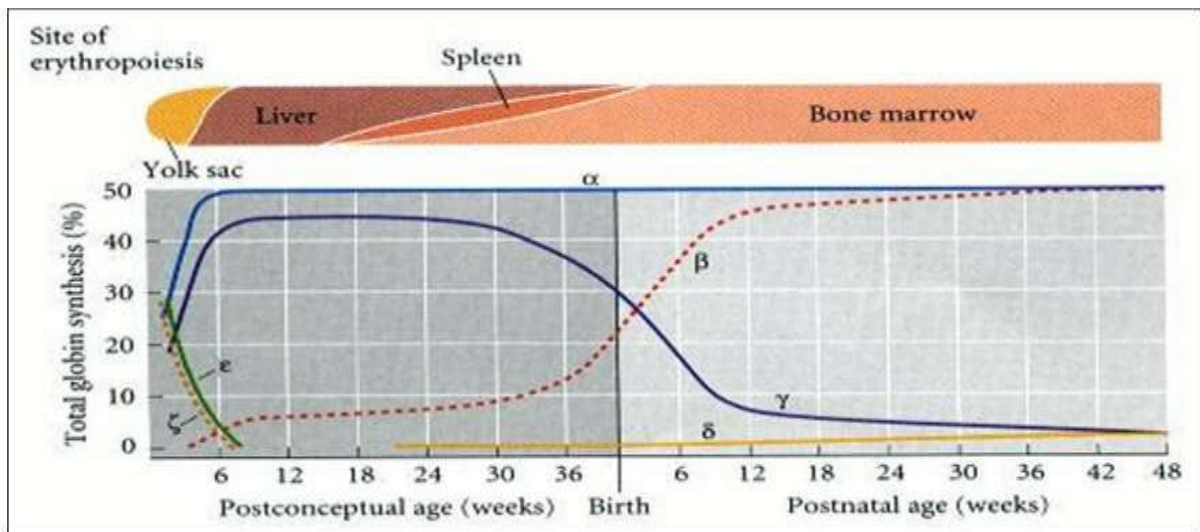


Figura 1. Produção das diferentes hemoglobinas ao longo do desenvolvimento humano (King, 2022).

As cadeias δ (delta) são produzidas a partir da vigésima quinta semana e ao combinar-se com as cadeias α (alfa) dão origem à segunda principal hemoglobina do adulto, a hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$). Sua concentração é baixa até o nascimento e permanecendo dessa forma até a fase adulta, com percentual de 2,5% a 3,5% (Naoum, 2014). Dessa forma, nos adultos, as hemoglobinas predominantes são designadas HbA, HbA₂ e Hb fetal.

1.2 Hemoglobinas: Estrutura e função

Cada hemoglobina carrega duas cadeias polipeptídicas de α -globina (alfa) e duas de β -globina (beta), semelhantes em comprimento, mas diferindo na sequência de aminoácidos (Marengo-Rowe, 2006). As quatro cadeias são dobradas, formando uma bolsa hidrofóbica em torno do grupo heme, o qual é constituído por um íon de ferro central (Fe^{2+}) complexado com quatro átomos de nitrogênio (Krieger, Philips, 2005), e encontra-se associado a uma cadeia polipeptídica de 141 resíduos de aminoácidos alfa e 146 resíduos de aminoácidos beta (incluindo β , δ e γ) (figura 2) (Ouellette, Rawn, 2014). O oxigênio, em um processo conhecido como oxigenação, se liga de forma reversível ao grupo heme (Krieger, Philips, 2005). Em sua região central, as quatro cadeias globínicas reservam um espaço para o 2,3-BPG (bifosfoglicerato), um metabólito derivado da glicólise anaeróbica que facilita a liberação de oxigênio (Peñuela, 2005).

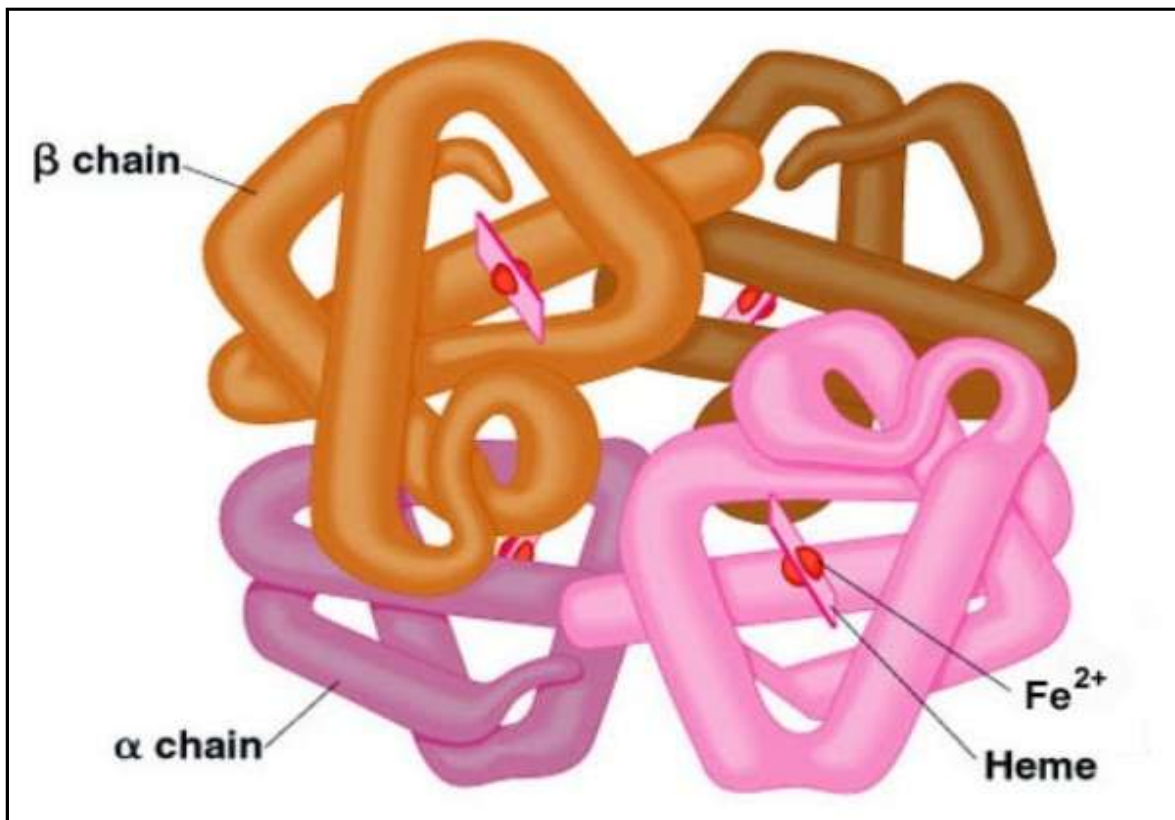


Figura 2. Estrutura da hemoglobina (King, 2014).

A hemoglobina é sintetizada durante o processo de maturação dos eritrócitos e é caracterizada como uma molécula polifuncional, a qual desempenha uma série de funções no corpo humano. Sabidamente, a sua função principal é transportar oxigênio (O_2), ao se ligar eficientemente ao oxigênio presente nos pulmões e liberá-lo eficientemente nos tecidos, de forma cooperativa, além de realizar o transporte direto e indireto de dióxido de carbono (CO_2) dos tecidos para os pulmões (Ahmed et al, 2020). Os glóbulos vermelhos contêm cerca de 640 milhões de hemoglobinas. O grupo heme é essencial para o transporte do oxigênio e as cadeias hemoglobínicas, por sua vez, o protegem contra a oxidação, além de tornar a molécula de Hb solúvel e permitir uma variação de afinidade ao O_2 (Hoffbrand et al., 2008). A Hb é uma molécula alostérica em que possui a capacidade de alternar entre duas estruturas quaternárias diferentes, de desoxihemoglobina (estado T), em que possui baixa afinidade ao O_2 , a oxihemoglobina (estado R), quando possui alta afinidade ao O_2 , sendo que esta transição de um estado para o outro é responsável pela curva sigmoide de dissociação do O_2 (Bain, 2001).

Sua forma alostérica está envolvida na cooperatividade, em que a ligação de

O₂ resulta em mudanças conformacionais no grupo heme. Isso ocorre porque a interação de um ligante em um sítio provoca alteração nas propriedades de ligação de um outro sítio na mesma proteína. Sendo assim, quando o primeiro O₂ se liga à hemoglobina, a proteína sofre uma mudança em sua conformação, a qual é transmitida para as outras cadeias do oligômero, aumentando a afinidade pelo segundo O₂, e assim por diante (Ouellette, Rawn, 2014).

A afinidade da molécula de hemoglobina ao oxigênio é regulada pela alteração das concentrações de alguns cofatores intracelulares, como pH, dióxido de carbono e a enzima bifosfoglicerato mutase. O 2,3-BPG tem a capacidade de diminuir a afinidade pelo oxigênio ao combinar-se com as cadeias β da desoxihemoglobina (Krieger, Philips, 2005). Quando há liberação de oxigênio nos tecidos, as cadeias β são afastadas, permitindo a entrada do 2,3-BPG e o estabelecimento de pontes salinas entre as cadeias. Quando há captação de oxigênio nos pulmões, as pontes salinas são quebradas, as cadeias β se juntam e o 2,3-BPG é deslocado do centro da hemoglobina, aumentando a afinidade da molécula para o oxigênio (Loukopoulos, 2002). Quanto menor for a pressão de oxigênio (PO₂), mais BPG será produzido para manter o processo de transferência de oxigênio para os tecidos. Esse fenômeno é frequentemente observado em situações de hipóxia, nas quais o corpo responde a condições de baixo suprimento de oxigênio (Krieger, Philips, 2005).

As funções bioquímicas das hemoglobinas têm sido muito exploradas e incluem a catálise do componente heme (nitrito redutase, monooxigenase, alquil-hidroperoxidase) e da apoproteína (esterase, lipoxigenase), metabolismo do óxido nítrico, formação de hemoglobina ligada à membrana, regulação do metabolismo eritrocitário e do pH, além de desempenhar funções fisiológicas de seus produtos catabólicos (ferro, CO, bilirrubina, peptídeos) (Ahmed et al., 2020). Uma atenção especial tem sido dada à participação da Hb na transdução de sinais em eritrócitos. Alguns parâmetros eritrocitários, como estado de oxigênio, formação de ATP, regulação do pH, equilíbrio redox e estado de citoesqueleto, têm sido discutidos em relação à hemoglobina (Kosmachevskaya e Topunov 2018).

1.3 Agrupamentos gênicos das globinas

Os genes de alfa e beta-globina estão dispostos em dois agrupamentos gênicos, chamados de clusters, separados em diferentes cromossomos de acordo com a ordem de expressão durante o desenvolvimento humano (figura 3). A

expressão de ambas as cadeias é regulada por interações complexas entre fatores de transcrição e elementos regulatórios, atuando na ativação e desligamento de genes de forma específica em diferentes estágios e tecidos (Farashi, Hartevel, 2018).

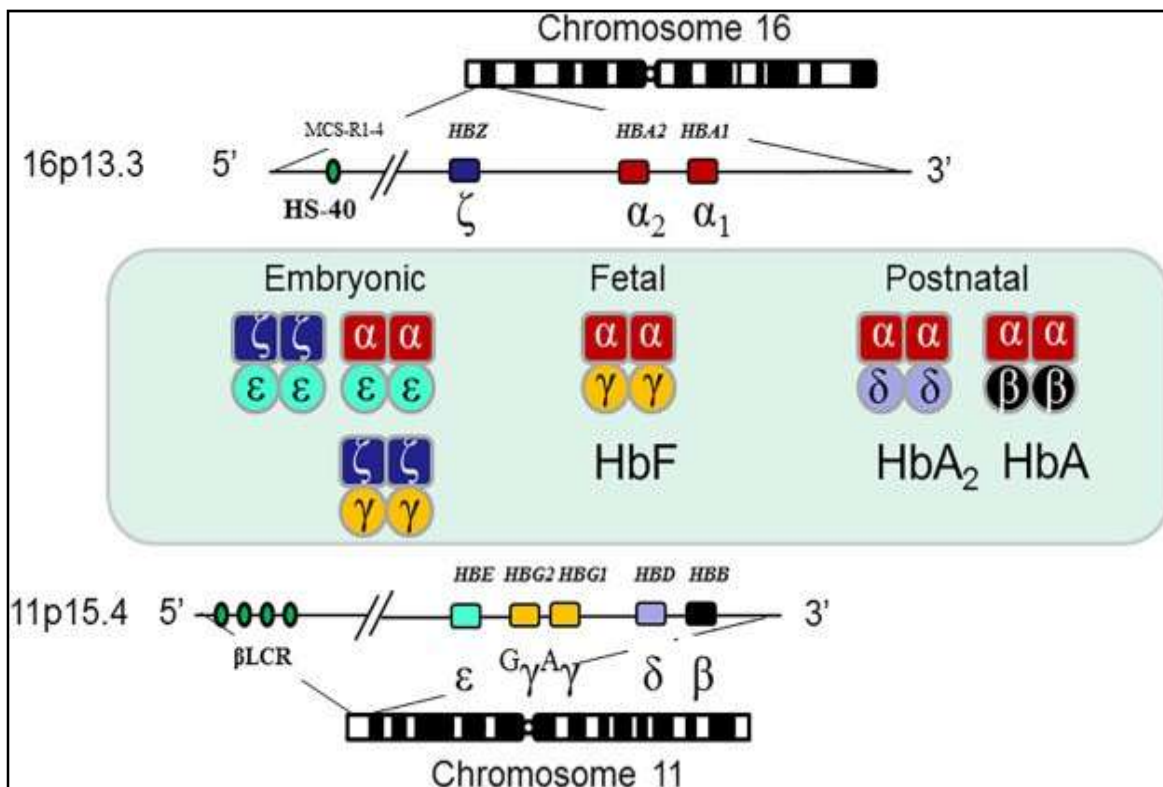


Figura 3. Apresentação esquemática dos clusters de alfa e beta e seus elementos regulatórios nos cromossomos 16p e 11p, respectivamente. Farashi, Hartevel, (2018).

O agrupamento do gene da alfa-globina está presente no genoma humano em duas cópias, α_1 e α_2 , localizados no segmento distal da região telomérica do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3). Cada locus codifica a síntese da cadeia de α -globina, o que significa que, em condições normais, cada ser humano possui quatro alelos funcionais. Os genes α_1 e α_2 , nomeados como *HBA1* e *HBA2*, são idênticos e codificam proteínas idênticas, e cada um consiste em três éxons e dois íntrons (Rosenberg & Rosenberg, 2012; Turgeon, 2012). No entanto, o gene α_2 apresenta expressão duas a três vezes maior em comparação com o gene α_1 na produção total de cadeias tipo alfa. Entretanto, a tradução do mRNA de α_1 é realizada com maior rapidez, o que justifica o fato de não haver muita diferença de expressão entre os dois genes (Galanello, Cao, 2011).

O agrupamento gênico da alfa-globina possui mais de 28 Kb e inclui o gene embrionário zeta (ζ), que codifica as cadeias de hemoglobina embrionária, os genes

alfas duplicados ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e três pseudogenes ($\Psi\zeta 1$, $\Psi\alpha 1$ e $\Psi\alpha 2$), que não são expressos por possuírem variantes. Deste modo, os genes são organizados ao longo do cromossomo na ordem 5' - ζ - $\Psi\zeta 1$ - $\Psi\alpha 2$ - $\Psi\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ - θ - 3' e estão cercados por três genes amplamente expressos (*MPG*, *NPLR3* e *Luc7L*) (Higgs, 2013).

Ambos os genes *HBA* são expressos de forma contínua ao longo da vida, com exceção do gene embrionário, sintetizado apenas nas primeiras 6 semanas após o nascimento (Barrett et al., 2017).

A expressão dos genes *HBA* é controlada por quatro sítios regulatórios, situados entre 10Kb e 48Kb à montante do gene ζ embrionário, com sequências não codificantes altamente conservadas e hipersensíveis à ação da enzima DNase I. Esses sítios, chamados de *Multispecies Conserved Sequences* (MCS), são caracterizados como *MCSR1* (HS-48), *MCSR2* (HS-40), *MCSR3* (HS-33) e *MCSR4* (HS-10), de acordo com a distância a qual se localizam em relação ao gene embrionário ζ (Higgs, 2013). O *MCSR2* é considerado o elemento regulatório principal da expressão do gene α -globina. Deleções nesse gene acarretam em diminuição acentuada da expressão dos genes α e os valores podem ser inferiores a 5%. O *MCSR2* atua na regulação da expressão por intermédio de alguns fatores de transcrição presentes nas células eritroides, sendo que os principais são o *GATA1* e o fator nuclear eritroide 2 (NF-E2) (Ribeiro, Sonati, 2008; Wu et al., 2017).

A expressão dos genes de cluster β é semelhante aos genes de cluster α . Cada célula somática contém dois genes da beta globina (*HBB*), que estão presentes no braço curto do cromossomo 11(11p15.5) e expressam a β -globina na mesma proporção em relação à quantidade de alfa globina produzida pelos quatro genes *HBA*. O gene *HBB* abrange aproximadamente 1,6 kb e tem três éxons e dois íntrons, semelhantes aos genes da α -globina, porém com um íntron 2 consideravelmente maior (IVSII) (Turgeon, 2012). O agrupamento gênico da beta globina abrange aproximadamente 1,6Kb um gene embrionário épsilon (ϵ), dois genes fetais ($G\gamma$ e $A\gamma$), um pseudogene ($\psi\beta 1$) e dois adultos (δ e β), dispostos na ordem 5' - ϵ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\Psi\beta$ - δ - β - 3'. As proteínas $G\gamma$ e $A\gamma$ são codificadas pelos genes fetais *HBG2* e *HBG1*, respectivamente. As letras “G” e “A” são designadas para diferenciar o aminoácido presente na posição 136 de cada uma: glicina em $G\gamma$ e alanina em $A\gamma$. Tal diferença gera mudanças conformacionais na proteína e consequentes alterações fisiológicas na eritropoiese e no fornecimento de oxigênio, que são importantes na circulação fetal

(Ansari et al., 2019; Fossen, 2019).

A região LCR (Região de Controle do Locus) constitui uma importante região regulatória, específica de células eritroides, que além de manter a cromatina em um estado de abertura, funciona como um *enhancer* da transcrição do gene, por meio da interação com as sequências promotoras TATA, CAAT e CACCC, e com os fatores de transcrição *GATA1*, *NF-E2* e *EKLF* (Thein, 2005). É composta por cinco regiões hipersensíveis à DNase I, (*HS-1*, *HS-2*, *HS-3*, *HS-4*, *HS-5*), localizadas de 4 a 20 Kb à montante do gene ϵ . LCR é extremamente importante, de modo que a sua ausência impacta em baixa expressão das beta globinas (Levings, Bungert, 2002; Cao, Galanello, 2010).

1.4 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são desordens genéticas e hereditárias, ocasionadas por variantes nos genes que codificam as cadeias globínicas. Essas desordens incluem as talassemias, causadas por distúrbios na produção de uma ou mais cadeias de globina; as hemoglobinas variantes, originadas por alterações estruturais das cadeias, levando na maioria dos casos, à substituição de aminoácidos e modificação da porção proteica; e uma condição conhecida como Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF) (Rosenfeld et al., 2019). Dependendo do gene envolvido e do tipo de variante, podem resultar em anemia, diminuição do tempo de vida dos eritrócitos (hemólise) e outras patologias sistêmicas (Sabath, 2017).

As hemoglobinopatias estão entre as doenças genéticas com maior prevalência mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 270 milhões de pessoas possuem genes que produzem hemoglobinas anômalas em diferentes combinações, podendo apresentar um amplo espectro de gravidade (Backes et al., 2005).

As talassemias e Hb variantes são altamente prevalentes em regiões do Mediterrâneo, África Subsaariana, Oriente Médio, sul e sudeste asiático e subcontinente indiano. Porém, essas doenças estão se tornando cada vez mais comuns em outros lugares do mundo, como Europa e América do Norte (Aguilar Martinez et al., 2014). A Figura 4 ilustra a distribuição mundial das hemoglobinopatias. As áreas de elevada frequência coincidem amplamente com regiões historicamente endêmicas para malária, refletindo a vantagem seletiva conferida pelo estado

heterozigoto para determinadas variantes da hemoglobina, como HbS, HbC e talassemias (Harteveld e Higgs, 2010). A disseminação mundial é uma consequência das migrações populacionais, o que favoreceu a miscigenação e a dispersão exacerbada dos genes anormais da hemoglobina (Taher et al., 2018).

Acredita-se que o estabelecimento de hemoglobinopatias em regiões endêmicas de malária (Mediterrâneo, Oriente Médio, Sudoeste da Ásia e África) tenha sido justificado pela teoria do efeito seletivo como proteção contra a malária, doença infecciosa cujo ciclo ocorre, em grande parte, nos eritrócitos. Dessa forma, os indivíduos com comprometimento funcional dos eritrócitos possuem maior resistência à infecção pelo *Plasmodium falciparum*, e, portanto, maior sobrevivência nessas regiões (Taylor et al., 2012).

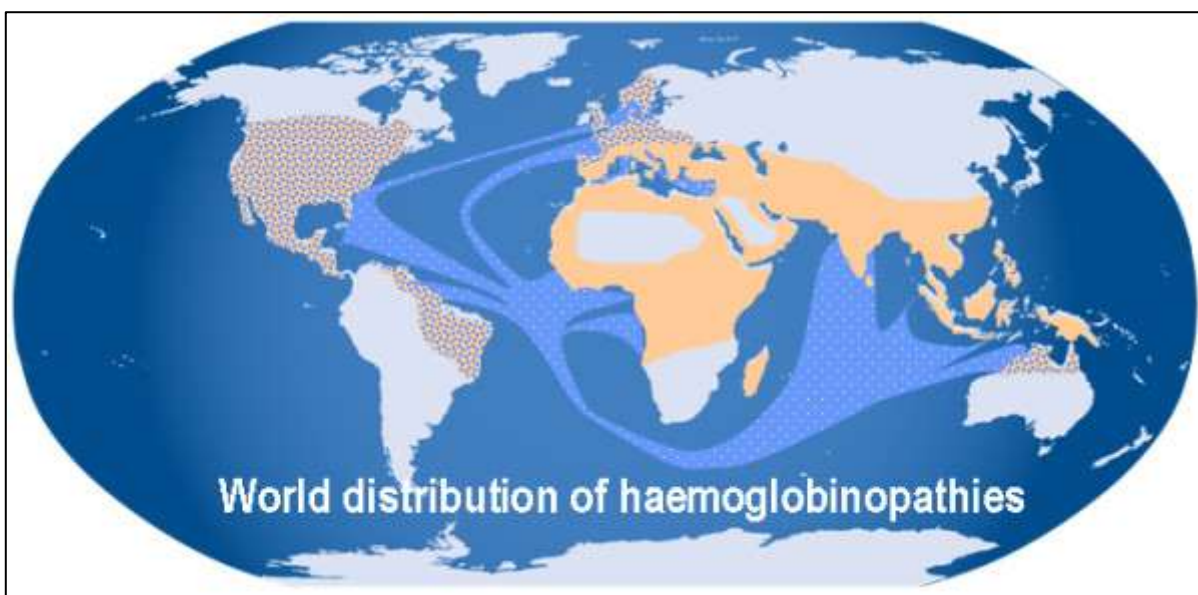


Figura 4. Distribuição mundial das principais hemoglobinopatias. As maiores frequências são observadas na África, Mediterrâneo, Oriente Médio, Índia e Sudeste Asiático, com distribuição fortemente associada às regiões historicamente endêmicas para malária. As áreas pontilhadas nas Américas, Europa e Oceania refletem a expansão dessas doenças para além de suas regiões de origem, resultado de processos migratórios históricos e contemporâneos, incluindo tráfico transatlântico de africanos, imigração mediterrânea e movimentos populacionais globais mais recentes. Adaptado de Harteveld e Higgs (2010).

Apesar dos avanços na triagem neonatal e da ampliação dos estudos regionais, o Brasil ainda carece de levantamentos epidemiológicos nacionais recentes e abrangentes que permitam estimar com precisão a prevalência das diferentes hemoglobinopatias, especialmente talassemias e variantes raras da hemoglobina, em uma população altamente miscigenada. Grande parte dos dados disponíveis deriva

da triagem neonatal, hemocentros, estudos regionais e levantamentos epidemiológicos específicos (Rosenfeld et al., 2019).

De acordo com o banco de dados de hemoglobinas variantes e talassemias (HbVar), pelo menos 1920 variantes já foram caracterizadas molecularmente pelo mundo e descritas como causadoras de variantes anormais de hemoglobina ou talassemias, que incluem variantes de ponto, deleções, inserções e fusões envolvendo um ou mais genes da hemoglobina (Giardine et al., 2014).

Embora as informações sobre a distribuição e frequência dos dados epidemiológicos globais sejam limitadas, as hemoglobinopatias hereditárias constituem um importante problema de saúde pública e tendem a gerar uma carga crescente para os sistemas de saúde. Adicionalmente, os avanços na saúde pública têm aumentado a sobrevivência dos indivíduos afetados, ampliando a necessidade de diagnóstico e acompanhamento especializado (Williams & Weatherall, 2012).

1.5 Variantes genéticas que causam impacto estrutural na hemoglobina

As variantes que causam impacto estrutural nas hemoglobinas resultam, principalmente, de alterações que envolvem a substituição de uma base por outra, chamadas de variantes de ponto ou Single Nucleotide Variants (SNVs). Contudo, alterações mais complexas, como pequenas deleções ou inserções (INDELS) também podem originar variantes estruturais da hemoglobina. Essas alterações podem modificar a sequência de aminoácidos, o dobramento da proteína e as propriedades físico-químicas da molécula, como estabilidade, solubilidade, afinidade pelo oxigênio e interação entre as subunidades globínicas. Dependendo da localização e da natureza da variante, podem ocorrer impactos nos diferentes níveis estruturais da hemoglobina (Steinberg MH et al., 2009; Munkongdee et al., 2020).

Um exemplo clássico de hemoglobina variante é hemoglobina S (HbS), a mais frequente na América e no Brasil, com maior predominância nas regiões Norte e Nordeste, pela composição negróide da população. Fatores como a colonização de escravos e a consequente miscigenação racial contribuíram para a disseminação da HbS, levando a uma prevalência elevada na população brasileira (Soares et al., 2017). Por isso, a HbS vem sendo considerada uma das doenças genéticas mais impactantes no cenário epidemiológico brasileiro (Ramalho et al, 2003). A HbS é originada por uma variante de ponto no gene *HBB*, decorrente da troca de uma adenina (A) por uma

timina (T), que leva à substituição de ácido glutâmico hidrofílico, carregado negativamente, por uma valina neutra e hidrofóbica na posição 6 da cadeia de β -globina. O indivíduo homozigoto (HbSS) apresenta uma manifestação clínica grave, altamente frequente, principalmente entre os povos da África e afrodescendentes, denominada Anemia Falciforme (AF). A substituição de um único aminoácido na cadeia beta leva a hemoglobina a assumir uma configuração diferente, e em condições de baixo nível de oxigênio, desidratação ou acidose, ocorre a polimerização da hemoglobina, resultando em alteração da forma redonda das hemácias para forma de foice ou lua crescente, em um fenômeno conhecido como falcização. As hemácias falciformes tornam-se rígidas e se rompem com mais facilidade do que as de formato normal, e passam a durar menos tempo que o usual de 120 dias na circulação sanguínea, em média 10 dias, resultando em crises vaso-oclusivas, prejudicando o fluxo sanguíneo e o fornecimento de oxigênio (Ngo, Steinberg, 2014). A Figura 5 ilustra a base molecular da hemoglobina S e as consequências sofridas pela molécula alterada. Outras alterações fisiopatológicas incluem hemólise crônica, anemia, isquemia tecidual, sequestro esplênico, suscetibilidade a infecções e quadros complexos de lesões orgânicas (Debaun, Kirkham, 2016; Gladwin, 2016).



Figura 5. Representação esquemática da fisiopatologia molecular da hemoglobina S (HbS). A variante de ponto no gene da β -globina promove a substituição do ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia β , alterando as propriedades físico-químicas da hemoglobina. Em condições como hipóxia, acidose e desidratação, ocorre polimerização da HbS, levando à deformação eritrocitária, falcização e hemólise.

O indivíduo heterozigoto herda de um dos pais o gene da hemoglobina S e do outro o da hemoglobina normal HbA, sendo considerado portador do traço falciforme (HbAS). Nesse caso, em condições fisiológicas normais, o indivíduo é assintomático,

apresenta índices hematológicos normais e a expectativa de vida é semelhante à da população geral. Não há necessidade de tratamento, uma vez que o traço não é designado como doença. No entanto, cabe reiterar que, apesar de não acarretar em sintomatologia clínica, a importância da detecção é para orientação genética ao portador ou à sua família, de acordo com o Consenso Brasileiro sobre atividades esportivas e militares, e herança falciforme (Brasil, 2009). Na forma homozigótica (HbSS) causadora da AF, ambos os pais são portadores do traço, e o indivíduo recebe um gene da hemoglobina S do pai e o outro da mãe (Ngo, Steinberg, 2014; Cardoso et al., 2017). A figura 6 demonstra o padrão de herança autossômica recessiva da hemoglobina S, evidenciando as probabilidades de filhos normais, portadores ou afetados conforme o status genético dos genitores. Quando apenas um dos genitores é portador, há 50% de chance de descendentes portadores e 50% de indivíduos sem alteração genética. Quando ambos os genitores são portadores, existe 25% de probabilidade de filhos afetados pela forma homozigótica (anemia falciforme), 50% de portadores e 25% de indivíduos sem a forma alterada. O traço falciforme está distribuído pelo mundo todo, presente em aproximadamente 8% dos afro-americanos e em mais de ¼ em algumas regiões da África. A alta frequência é encontrada em algumas partes da Arábia Saudita, Grécia, populações tribais da Índia e do Brasil (Steinberg, 2008).

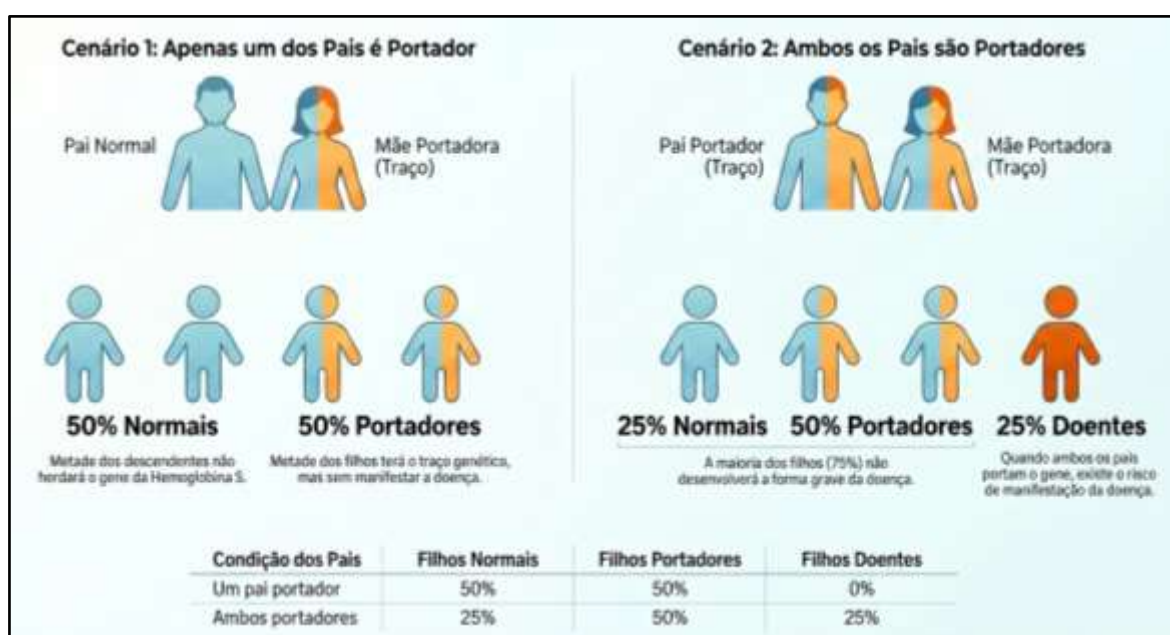


Figura 6. Representação esquemática da herança autossômica recessiva e das probabilidades de transmissão genética da hemoglobina S para os descendentes.

Existem outras hemoglobinas variantes, como a HbC, HbD-Los Angeles e HbE, também causadas por alterações de nucleotídeos em sequências codificadoras do gene *HBB*, resultando em substituição de aminoácidos (Kountouris et al, 2014). São encontradas em menor frequência e podem estar sozinhas ou em par com a HbS, integrando um grupo denominado Doença Falciforme (DF), do qual também fazem parte as S/β talassemias. De maneira geral, apesar das particularidades que as distinguem, as combinações S/C, S/D e S/E têm manifestações clínicas e hematológicas semelhantes, por isso, universalmente, as condutas são iguais, levando-se em consideração apenas o curso mais ou menos severo de cada uma delas (Rees et al., 2010; Freitas et al., 2018). Existem ainda aproximadamente 200 subtipos de outras variantes mais raras (Kohne, 2011, Chiappe, 2017).

A HbC é originada por uma substituição do ácido glutâmico pela lisina na sexta posição da cadeia de β-globina. Essa variante torna a HbC menos solúvel do que a HbA, formando cristais hexagonais (vistos no esfregaço periférico). Em heterozigose é assintomática e em homozigose é caracterizada pela anemia hemolítica moderada. A co-herança com a HbS impacta em aumento de significância clínica, com crises hemolíticas crônicas e crises de falcização, porém, menos graves e frequentes do que as observadas nos pacientes com anemia falciforme (Piel et al., 2013). A variante de HbE resulta da troca do aminoácido lisina pela ácido glutâmico no códon 26 do gene *HBB*. As alterações de um indivíduo heterozigoto são mínimas ou ausentes. Em homozigose, pode-se observar anemia microcítica e hipocrômica com inúmeras hemácias em alvo (Fucharoen, Weatherall, 2012).

1.6 Talassemias

As síndromes talassêmicas constituem as hemoglobinopatias de síntese e são desordens decorrentes da ausência ou diminuição da produção de uma ou mais cadeias de globina α, β, γ ou δ, gerando um desequilíbrio das suas quantidades relativas e um tetrâmero hemoglobínico anômalo. Esse desequilíbrio provoca um acúmulo das cadeias codificadas pelos genes não afetados, que se precipitam na membrana das hemácias como agregados insolúveis, levando à diminuição da sobrevivência dessas células devido à destruição precoce antes de alcançarem o estado de completa maturação (Urbinati et al., 2004; Greer et al., 2013).

O número de moléculas completas de hemoglobina por célula torna-se limitado

em função da maturação deficiente dos eritrócitos, resultando em uma anormalidade laboratorial característica das talassemias, que é a microcitose, caracterizada pela diminuição do VCM (volume corpuscular médio) (Sabath, 2017). As talassemias são classificadas em alfa, beta, delta, delta-beta e gama- delta-beta, conforme os tipos de cadeia em que a produção está comprometida (Chiappe, 2017). As talassemias α e β são as mais frequentes, uma vez que compõem as hemoglobinas presentes na vida adulta, e ao sofrerem variantes, resultam em uma síntese reduzida de hemoglobina A (Sonati, 2008).

As talassemias podem ser co-herdadas com hemoglobinas variantes em complexas interações, desencadeando uma série de fenótipos clínicos e hematológicos. Algumas associações do tipo HbS/ β -talassemia e HbE/ β - talassemia possuem importante significância clínica (Clark, Thein, 2004).

1.7 Alfa-talassemias

As α -talassemias são caracterizadas por um déficit na produção das cadeias de α -globina, causadas por deleções parciais (α^+) ou totais (α^0) nos genes estruturais *HBA1* e *HBA2*, em aproximadamente 90% dos casos (Sabath, 2017). Variantes de ponto ou inserções de nucleotídeos em um dos quatro genes da alfa globina são causas menos frequentes, chamadas de não - delecionais, raras, restritas a determinadas regiões geográficas, representando 10% dos casos. A gravidade está relacionada de acordo com o número de alelos deletados (Kohne, 2011; Kountouris et al., 2014).

As alterações laboratoriais relacionadas à série vermelha e à eletroforese de hemoglobinas geralmente estão presentes em indivíduos afetados pela α - talassemia, como níveis de hemoglobina normais, baixos causando anemia, ou muito baixos causando anemia hemolítica grave, valores reduzidos de VCM e HCM (hemoglobina corpuscular média), contagem de eritrócitos normal ou aumentada, e dosagem normal ou diminuída de HbA₂, a depender do número de gene alfa funcionais (Farashi, Hartevel, 2018). A figura 7 mostra as consequências clínicas referentes a cada tipo de patologia molecular das α -talassemias. Em uma situação normal, ambos os alelos α_1 e α_2 são funcionais ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). O indivíduo que possui a deleção de um alelo (ex: α_2) é assintomático, pode apresentar uma anemia discreta e é considerado “portador silencioso do traço talassêmico”. O indivíduo com dois alelos deletados possui o “traço

α -talassêmico”, e a anemia ainda é considerada leve. Nesse caso, não interfere se for homozigoto ou heterozigoto para α_1 ou α_2 , visto que duas cópias do gene da alfa globina são idênticas e permanecem funcionais.

GENÓTIPO	$\alpha_1 \alpha_2$ $\alpha_1 \alpha_2$	α_1 $\alpha_1 \alpha_2$	 $\alpha_1 \alpha_2$	α_1 α_1 	α_1 	
FENÓTIPO	Normal	Portador traço talassêmico	Traço α -talassemia	Traço α -talassemia	Doença hemoglobina H	Hidropsia Fetal

Figura 7. Classificação genotípica e fenotípica de alfa talassemias. (Adaptado de Rosenberg, Rosenberg, 2012).

A deleção de 3 alelos funcionais é caracterizada como Doença de Hemoglobina H (HbH). A redução da síntese de cadeias alfa leva à formação de agregados de β -globina que se encontram em excesso, formando tetrâmeros de cadeia β não funcionais, denominados HbH (β_4). O excesso de tetrâmeros provoca danos aos precursores eritroides em maturação, resultando em eritropoiese ineficiente e hemólise. Nesse caso, é possível observar um quadro de anemia microcítica crônica e hemólise, que pode se manifestar com sintomas de fadiga, hepatoesplenomegalia e cálculos biliares pigmentados.

A forma mais grave de α -talassemia é letal, em que os quatro alelos são deletados. Nessa condição, não há expressão dos genes α , ao passo que há a produção de hemoglobina anormal composta por quatro cadeias gama, designada como Hb Bart's (γ_4). A Hb Bart's é incompatível com a vida extrauterina porque as cadeias gama possuem afinidade muito grande pelo oxigênio e, por este fato o fornecimento de oxigênio nos tecidos é consideravelmente afetado. Os fetos sofrem uma condição conhecida como hidropsia fetal, por acúmulos de líquido pelo corpo, causando ascite, derrames pleural e pericárdico, e edema do couro cabeludo. Na grande maioria dos casos, essa condição resulta em um aborto espontâneo. O fenótipo da Doença de Hb H, caracterizado como ($--/\alpha$), é formado pela heterozigose composta das deleções α^+ e α^0 . Portanto, casais que sejam ambos portadores heterozigotos do traço alfa-talassêmico podem originar um feto com a hidropsia fetal ($--/--$) (Rosenberg, Rosenberg, 2012; Farashi, Hartevel, 2018; Kaufman et al., 2021).

A α -talassemia é predominantemente encontrada em áreas tropicais e subtropicais, assim como o traço falciforme e o traço β -talassêmico, sendo que a

frequência do portador silencioso do traço é de 80-90% da população mundial (Piel, 2014).

A síntese reduzida de cadeia alfa configura a talassemia α^+ , originada por uma deleção parcial de um dos genes α (α_1 ou α_2), e entre as formas mais frequentes destacam-se as deleções $-\alpha_{3.7}$ e $-\alpha_{4.2}$. Cada um dos genes α está localizado dentro de uma região homóloga de 4 kb de comprimento, dividida em três subsegmentos, X, Y e Z, os quais são separados por três segmentos curtos e não homólogos, denominados I, II e III (Lacerra et al., 2004). Durante o processo de meiose, um pareamento incorreto dos cromossomos pode ser favorecido, devido ao alto grau de homologia dessas regiões, provocando uma recombinação desigual dos genes α . A deleção $-\alpha_{3.7}$ é resultado de uma recombinação meiótica desigual (crossing over) entre as regiões homólogas do tipo Z, eliminando 3,7 Kb de DNA. Com isso, há a formação de um gene α híbrido ($\alpha_1\alpha_2$) em uma das fitas do cromossomo, e três genes α na fita complementar ($\alpha\alpha\alpha$ anti3.7). De forma semelhante, a deleção $-\alpha_{4.2}$ também é ocasionada por um crossing over, porém entre regiões homólogas do tipo X, levando a remoção de 4,2 Kb de DNA, com deleção total do gene α_2 , restando um gene α_1 em um cromossomo e 3 genes α no outro ($\alpha\alpha\alpha$ anti4.2). Ambos os cromossomos com genes triplicados tendem a se perder nas divisões celulares subsequentes (Farashi, Hartevel, 2018; Higgs, 2013). A talassemia α^0 é caracterizada por ausência de síntese de cadeias de alfa globina através da deleção completa ou parcial de dois genes alfa em cis, ou seja, no mesmo cromossomo ($--/\alpha\alpha$). Algumas deleções desse tipo já foram descritas em diferentes regiões. As principais são -- SEA (Sudeste Asiático), -- MED (Mediterrâneo), -- FIL (Filipinas), -- THAI (Tailândia) e $-(\alpha) 20.5$. As deleções mais comuns da α^+ -talassemia e α^0 -talassemia são mostradas na Figura 8.

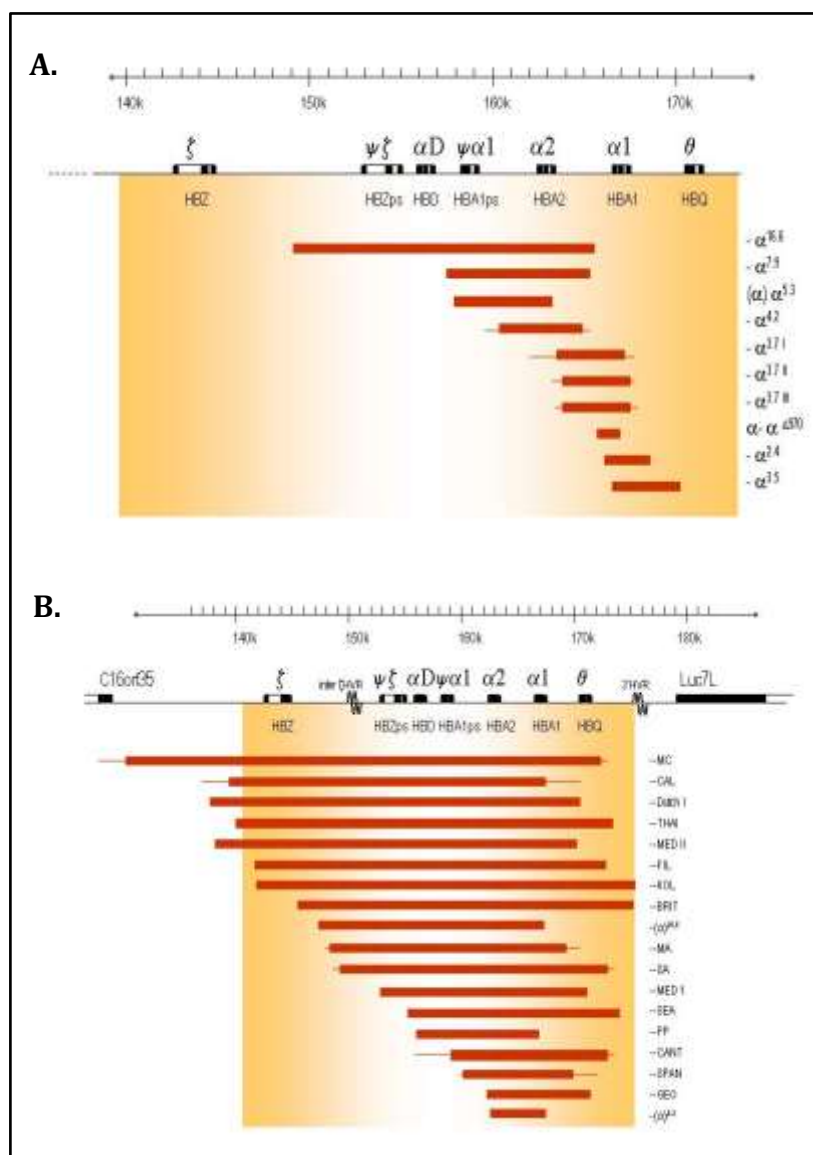


Figura 8. Principais deleções envolvidas na α -talassemia. Deleções de um gene α associadas à α^+ -talassemia (A) e deleções de dois genes α associadas à α^0 -talassemia (B). As barras indicam a extensão das deleções e as linhas finas representam regiões de incerteza dos pontos de quebra (Hartevelde & Higgs, 2010).

1.8 Beta-talassemias

As β talassemias são caracterizadas pela síntese reduzida ou ausente das cadeias de β globina, e por consequência, pela síntese aumentada de cadeias de α globina, que se precipitam nos precursores das hemácias, sofrem maturação anormal e são destruídos prematuramente na medula óssea, por dano mecânico e oxidativo (Origá, 2017).

A frequência da beta talassemia é variável entre diferentes regiões, de <1% a

16% (Colah, 2010) e já foram descritas mais de 300 variantes distintas nos genes *HBB* (Giardine et al, 2014). As bases moleculares da β talassemia são bastante heterogêneas, e as alterações vão desde variantes de ponto, pequenas deleções/inserções, a grandes deleções envolvendo todo o cluster de β , afetando a função do gene em níveis de transcrição, tradução ou pós- tradução (Shang, Xu, 2017).

As variantes podem levar a uma redução acentuada (β^+), redução ligeira (β^{++}) ou ausência (β^0) da síntese de cadeias de β globina. A gravidade desses fenótipos está associada com a razão de desequilíbrio das cadeias $\alpha:\beta$ e com a proporção de cadeias α livres, em excesso (Origa, 2017).

O genótipo β^0 pode ser decorrente de defeitos a nível de tradução, por variantes do tipo *nonsense*, quando há inserção prematura de um stop códon, resultando em um transcrito não funcional; ou por indels, quando há mudanças no quadro de leitura (*frameshift*) alterando a sequência de aminoácidos. O genótipo β^+ está comumente associado a variantes que interferem no início da transcrição, tradução ou na estabilidade do produto após a tradução (Thein, 2013).

Alguns recursos são utilizados pelo organismo para reduzir o número de cadeias de α globina não ligadas nas células vermelhas, que incluem a herança de variantes leves/silenciosas da β talassemia, a co-herança de alelos de α -talassemia e o aumento da produção da cadeia de γ -globina (Origa, 2017). A co-herança entre β e α talassemia é frequente em muitas populações, podendo ser simultaneamente homozigotos ou heterozigotos para α^+ ou heterozigotos para α^0 talassemia. Estudos de fenótipos de indivíduos com essas condições constataram que essa co-herança pode amenizar a severidade de β talassemia (Weatherall, 2001). As três classificações de β talassemia são definidas por seus achados clínico-laboratoriais e graus de severidade. A beta-talassemia *minor* compreende ao estado heterozigoto, conferindo a característica de portador ou traço talassêmico. O indivíduo herda um alelo β^+ ou β^0 (β^+/β ou β^0/β) e é geralmente assintomático, os níveis de hemograma são normais ou discretamente diminuídos, porém a microcitose e a hipocromia costumam ocorrer, em função da redução da síntese de HbA. Por muitas vezes a talassemia *minor* é confundida com a anemia ferropriva, uma vez que ambos provocam valores de VCM abaixo da referência. O déficit de hemoglobina é compensado pelo discreto aumento de outras formas de hemoglobina, comumente HbA2 (>3,5%) (Sayani, Kwiatkowski, 2015; Needs et al., 2021). Se ambos os pais forem portadores, a chance da criança

ser homozigota é de 25% (Galanello, Origa, 2010).

A beta talassemia *intermédia* detém uma ampla gama de apresentações clínicas, muito embora não seja grave a ponto de exigir transfusões regulares (Needs et al, 2021) e resultam de associações de alelos distintos, seja entre eles ou com alelos das hemoglobinas variantes. Os indivíduos podem ser homozigotos β^+ (β^+/β^+) ou heterozigotos (β^+/β^0), (Steinberg et al., 2009; Shang, Xu, 2017).

Clinicamente, a β talassemia segue um padrão heterogêneo e a maioria apresenta anemia moderadamente grave com os sintomas variando entre palidez, anemia, icterícia, hepatoesplenomegalia, alterações esqueléticas moderadas ou severas, entre outros (Cao & Galanello, 2010). Em casos mais severos, a criança precisa de avaliação e monitoramento regular, para prevenir o atraso no crescimento/desenvolvimento. Achados no exame físico podem sugerir hiperplasia eritroide e hematopoiese extramedular. No entanto, essa hematopoiese reativa é suficiente para compensar a anemia sem precisar de transfusão (Matta et al., 2014).

Os duplos heterozigotos de HbE/ β^+ ou HbE/ β^0 podem produzir o fenótipo da talassemia intermediária. Nesses casos, geralmente as crianças mantêm-se assintomáticas, e os sintomas mais graves podem surgir de acordo com o envelhecimento. Em decorrência da eritropoiese ineficiente, há maior absorção de ferro no sistema gastrointestinal, resultando em sobrecarga (Cao, Galanello, 2010). Sendo assim, o tratamento com quelante de ferro é indicado para evitar algumas complicações, como doenças cardíacas, hipertensão pulmonar, cirrose hepática, diabetes, trombose, entre outras. A talassemia intermediária, assim como a doença de HbH e HbE/ β fazem parte de um grupo de doenças chamadas Talassemia Não Dependentes de Transfusão (NTDT), e tem atraído bastante a atenção da comunidade científica (Vichinsky et al., 2016).

A forma mais severa de β talassemia é a talassemia *major*, conhecida como Anemia de Cooler, cuja sobrevivência só é possível através de transfusões sanguíneas regulares (Steinberg et al., 2009). A apresentação clínica da doença ocorre entre 6 e 24 meses de idade, fase em que há a transição da HbF para a hemoglobina do adulto (HbA) (Galanello, Origa, 2010).

Os indivíduos são em grande parte homozigotos para β^0 (β^0/β^0) e um pequeno grupo é heterozigoto composto de β^+ e β^0 (β^+/β^0) (Shang, Xu, 2017). No caso da ausência de cadeias beta (β^0), apenas a HbA₂ e a HbF estão presentes, e no caso

da β^+ , há a expressão de HbA, além de HbA2 e HbF, em decorrência da pequena quantidade de cadeia de β globina produzida (Rappaport et al., 2004). Os pacientes apresentam níveis elevados de HbF (geralmente acima de 90%), e de HbA2 (geralmente acima de 5%). A microcitose é presente, cujos índices de VCM são extremamente baixos, e na ausência de transfusões os níveis de hemoglobina também são essencialmente baixos (Brancaleoni et al., 2016).

Desde cedo, as crianças afetadas apresentam sintomas como anemia severa hipocrômica e microcítica, hemólise, problemas de alimentação, episódios recorrentes de febre, irritabilidade, déficit de crescimento e hepatoesplenomegalia, entre outros. Os lactentes não tratados podem sofrer retardo no crescimento, icterícia, palidez, hepatoesplenomegalia, além de desenvolver úlceras nas pernas, massas eritopoiéticas extramedulares e deformidades esqueléticas dos ossos longos (Origa, 2017).

Sem tratamento os indivíduos morrem na primeira ou segunda década de vida (Higgs, Engel, 2012; Sayani, Kwiatkowski, 2015). Com a regularidade da terapêutica transfusional, os pacientes tornam-se dependentes do sucesso da terapia da quelação de ferro, para evitar o desenvolvimento de complicações derivadas da sobrecarga de ferro, como fibrose no fígado, cardiomiopatia e disfunções endócrinas (Cao, Galanello, 2010; Needs et al., 2021). A transfusão e a terapia oral de quelação de ferro trouxeram melhora significativa da qualidade de vida dos pacientes com talassemia *major*, e o que antes era considerado fatal na primeira infância, agora representa uma doença crônica com maior expectativa de vida (Origa, 2017; Langhi Jr et al., 2016).

Casos incomuns de grandes deleções já foram descritos e envolvem uma parte ou todo o agrupamento do gene *HBB*, como ocorre nas $\delta\beta$ -talassemias (Forget, Bunn, 2013). A $\delta\beta$ -talassemia é uma condição associada à hemoglobinizacão deficiente dos eritrócitos, e resulta de deleções de extensão variável no cluster das β -globinas, que engloba os genes da β e δ globina. Com isso, há um aumento da quantidade de HbF em decorrência do aumento da produção de cadeias gama a fim de balancear, de forma parcial, a síntese precária das duas cadeias (Greer, 2013). Esse tipo de talassemia contém certa significância clínica quando aparece em homozigose, apresentando quadro semelhante ao verificado na talassemia intermediária, com anemia leve. Os heterozigotos $\delta\beta$ -talassêmicos apresentam características clínicas similares aos da talassemia menor, com leves alterações eritrocitárias, contendo níveis normais de HbA2 e HbF entre 5 e 20% (Capellini et al., 2014; Mansoori et al.,

2016). As síndromes da Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal também resultam de deleções deste agrupamento gênico ou de variantes pontuais nos promotores do gene *HBG* (Weatherall, 2001).

1.9 Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal

Em uma situação normal, as cadeias gama da Hb fetal são amplamente substituídas pelas cadeias beta da Hb A, momento em que o indivíduo adquire o seu padrão hemoglobínico definitivo. Entretanto, fatores genéticos podem impedir essa substituição, o que acarreta na síntese contínua de HbF e ocasionando a sua persistência na fase adulta (Manca, Masala, 2008).

Esse fenômeno ocorre na PHHF (Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal), uma condição clinicamente benigna originada por deleções no cluster do gene da β -globina ou variantes de ponto no promotor dos genes *HBG1* e *HBG2* (11p15.5). A transmissão da PHHF é co-dominante, e a homozigotia para a forma não deletional, até o momento, tem sido descrita em casos raros. (Sharma et al., 2020). A HbF funciona como um modulador genético de gravidade das características hematológicas e clínicas de algumas hemoglobinopatias. Os genes da hemoglobina fetal são regulados geneticamente, e o nível de HbF e sua distribuição entre os eritrócitos falciformes é altamente variável. Por isso, alguns pacientes com doença falciforme possuem altos níveis de HbF em relação a outros, estando associada a doença geralmente mais branda, porém não assintomática (Akinsheye et al., 2011). A HbF beneficia algumas complicações da doença falciforme ao inibir a polimerização de HbS, e também resulta em atenuação da gravidade clínica em pacientes com β -talassemia, devido ao aumento dos níveis de HbF (Mousinho-Ribeiro et al., 2008; Rosenfeld et al., 2019; Sharma et al., 2020).

Para compensar a expressão deficiente ou ausente da hemoglobina adulta A, a indução da expressão de HbF tem sido proposta como estratégia terapêutica. A hidroxiureia (HU) é um antimetabólito que interfere na síntese do DNA e está bem estabelecido no tratamento da doença falciforme, por aumentar os níveis de HbF e reduzir a necessidade de transfusões, sendo indicada para pacientes que apresentam crises de dor frequentes, síndrome torácica aguda ou anemia grave. Apesar de não ser aprovado ainda para uso nas β -talassemias, alguns estudos mostraram melhorias nos níveis de hemoglobina em pacientes com talassemia intermediária, tornando-se independentes de transfusão (Zaidi, Heeney, 2018; Holstein, Hohl, 2021).

1.10 Relevância do diagnóstico molecular como complemento da Triagem Neonatal

Com base no reconhecimento de que as hemoglobinopatias são essencialmente prevalentes no Brasil, bem como uma das maiores causas de morbimortalidade, em 2001, mediante a Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde, foi criado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), incluindo no Sistema Único de Saúde (SUS) a triagem para as hemoglobinopatias através do “Teste do Pezinho”. Todos os estados brasileiros foram habilitados a realizar esse teste, e desde então o PNTN vem passando por reformulações e ampliações com o objetivo de validar dados de incidência de hemoglobinopatias em todo o País, principalmente da doença e do traço falciforme (Brasil, 2001). O exame de triagem neonatal consiste na coleta de gotas de sangue do calcanhar do recém-nascido, que pode ser após 48 horas da primeira alimentação ou até o quinto dia de vida (Brasil, 2015). Trata-se de um exame de grande importância para a rápida identificação de recém-nascidos suspeitos com alterações hemoglobínicas, traços, fatores de risco e de doença no estágio inicial (Rosenfeld et al, 2019). As regiões que adotam a Triagem Neonatal, a exemplo do Distrito Federal, fornecem medidas preventivas e intervenções terapêuticas profiláticas, que têm proporcionado melhor qualidade de vida e aumento da sobrevivência (Kato et al., 2018).

O Hospital da Criança de Brasília (HCB) é o único centro de referência para atenção a crianças diagnosticadas com doença falciforme no Distrito Federal, as quais são admitidas no Programa de Atenção à Criança com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias a partir de três semanas de vida. Quando diagnosticada, a criança passa a ser acompanhada de forma regular no HCB, e a família recebe apoio, orientações e técnicas de autocuidado.

O Programa contempla uma assistência especializada, baseada no fornecimento de informações sobre a doença e seu caráter hereditário, introdução das primeiras medidas de profilaxia, esquema especial de vacinação, suplementação com ácido fólico, aconselhamento genético, suporte social, hemoterapia, terapia quelante de ferro e hidroxiureia, doppler transcraniano, protocolo para encaminhamento ao programa de transplantes, integração com a rede básica e com a associação de usuários (Brasil, 2015). Até o quinto ano de vida, período de maior ocorrência de óbitos e complicações graves, os cuidados profiláticos são essenciais para o tratamento (Brasil, 2013).

De acordo com dados da Triage Neonatal, a cada 1.200 nascimentos no Distrito Federal, pelo menos um recém-nascido tem a anemia falciforme. Dados obtidos de prontuários do HCB demonstram que um total de 1.163 crianças já passaram por atendimento no ambulatório de hematologia, e atualmente 781 pacientes entre 0 e 20 anos diagnosticados com doença falciforme, estão cadastrados no Programa e em tratamento ativo com atendimento regular, dos quais 87 fazem parte do programa de transfusão regular para prevenir o AVC (acidente vascular cerebral), uma das graves complicações da doença. As metodologias diagnósticas convencionais preconizadas pelo PNTN no rastreio de hemoglobinopatias inclui a eletroforese de hemoglobina, realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou focalização isoeletrica (IEF), a fim de se obter a quantificação das diferentes hemoglobinas e identificar Hbs anormais (Barrett et al., 2017).

Porém, considerando a complexidade clínica e biológica das hemoglobinopatias, muitos casos não são concluídos devido a limitações técnicas de separação das hemoglobinas, assim como as limitações fisiológicas, haja vista que a definição do perfil hemoglobínico “adulto” é obtido somente após o sexto mês de vida. Além disso, devido à complexidade dessas doenças, é possível que algumas variantes heterozigóticas não sejam detectadas através de protocolos laboratoriais *standard*, pois, embora sejam globalmente raras, podem ser comuns em determinadas populações étnicas (Barrett et al., 2017). Certas hemoglobinas variantes apresentam perfil eletroforético ou cromatográfico semelhante à HbS, devido à similaridade das características físico-químicas, acarretando em sobreposições que geram resultados falso-positivos para anemia falciforme e um diagnóstico errôneo da hemoglobina variante herdada. A interação da HbS com talassemias alfa e beta, assim como com deficiência de enzimas eritrocitárias, notadamente a G-6PD, dificulta o diagnóstico laboratorial.

Ademais, a alta taxa de HbF presente nas amostras pode sobrepujar a presença de algumas variantes, erros podem ocorrer na interpretação de casos em que houve transfusão sanguínea antes da coleta da amostra, detectando a HbA transfundida; e traços talassêmicos são subdiagnosticados pela dificuldade de detecção pelas técnicas bioquímicas atuais.

Sendo assim, o diagnóstico precoce e definitivo de portadores ou doentes que apresentam principalmente as formas mais graves das hemoglobinopatias, demandam métodos complementares e confirmatórios mais sensíveis, como os

moleculares, sendo essencial para o tratamento adequado, eliminando falsos positivos e todos os transtornos a ele associados. As complicações clínicas mais temidas são as que apresentam risco de vida, como o sequestro esplênico e as infecções por bactérias encapsuladas, que podem surgir no primeiro ano de vida (Ryan et al., 2010).

São inúmeras as hipóteses que sugerem uma avaliação pré-natal dos pais. Uma mulher portadora do traço falciforme pode gestar uma criança com doença falciforme se o pai também for portador do traço S, ou C, D, E, e vice-versa (Brasil, 2015). Na talassemia $\alpha 0$, por exemplo, um casal de heterozigotos tem 25% de probabilidade de conceber filhos com hidropsia fetal. Além do feto afetado não sobreviver, a mãe corre risco de ter pré-eclâmpsia e outras complicações obstétricas. O teste genético e o diagnóstico pré-natal são primordiais para prevenir esse tipo de condição e avaliar o risco de uma síndrome significativa na prole (Chui et al., 1998; Sabath, 2017).

Alguns governos já adotam políticas de prevenção pré-natal da alfa talassemia, como o chinês, que realiza o Diagnóstico Genético Pré-Implantacional (PGD), com o objetivo de evitar condições adversas, como a interrupção da gravidez (Xu et al., 2009).

Os diagnósticos obscuros ou errôneos podem sobrecarregar o atendimento especializado desnecessariamente ou levar a um tratamento indevido, muitas vezes trazendo transtornos aos seus familiares. A alfa talassemia é a hemoglobinopatia de maior dificuldade diagnóstica devido a falhas na interpretação de exames laboratoriais evidenciando assim a importância de técnicas de seleção e de confirmação, aplicadas em conjunto com a análise clínica e com os dados hematológicos (Cançado, 2006). Para o diagnóstico é necessário a análise dos índices eritrocitários a hematoscopia, abrangendo a análise da morfologia eritrocitária, a pesquisa de corpos de inclusão de Hb H e a eletroforese de Hb em pH alcalino. Como segunda opção, a dosagem de Hb A₂, a contagem de reticulócitos e a avaliação do suprimento de ferro contribuem para o diagnóstico de anemias de etiologia incerta (Belisário, 2012).

O indivíduo com suspeita de alfa talassemia apresenta microcitose sem causa prévia definida e em alguns casos anemia persistente, e na ausência de um diagnóstico confirmatório, acaba correndo o risco de ser tratado de forma inadequada com reposição de ferro, implicando em uma série de consequências, como o aumento

do índice de saturação de transferrina. Este, quando superior a 70%, leva à formação de espécies livres de ferro, que geram espécies reativas de oxigênio, provocando danos aos tecidos, disfunção de órgãos e até a morte (Fibach, Rachmilewitz, 2008).

Em relação às β -talassemias, o diagnóstico diferencial entre a intermediária e a major por caracterização molecular do gene *HBB* é essencial, pois cada uma exige uma abordagem terapêutica específica. O diagnóstico precoce da intermediária previne transfusões sanguíneas desnecessárias e complicações relacionadas à transfusão. Já o diagnóstico precoce da talassemia major torna possível o início correto das transfusões de sangue, diminuindo o risco de hiperesplenismo (Asadov et al., 2018).

Centros de pesquisa e laboratórios diagnósticos de ponta buscam a consolidação de um algoritmo diagnóstico que envolva técnicas clássicas de avaliação de migração eletroforética ou cromatográfica das hemoglobinas em associação com testes confirmatórios de biologia molecular, que seja efetivamente resolutivo e que preze pela racionalidade de recursos (Lee et al., 2019).

Embora seja uma condição de saúde bastante frequente, poucos estudos epidemiológicos sobre as hemoglobinopatias foram realizados no Distrito Federal. Estudo retrospectivo, que avaliou a prevalência do traço e da anemia falciforme no período de 2004 a 2006 no serviço público de triagem neonatal do DF, apontou coeficiente de prevalência de 3,23% para traço falciforme e 0,09% para anemia falciforme para nascidos vivos no Distrito Federal. Assim, o DF seria a quarta unidade da federação do Brasil com maior frequência de traço falciforme (Diniz et al., 2009). Em 1986, Tavares-Neto e colaboradores avaliaram por métodos eletroforéticos 3.137 indivíduos adultos (>20 anos) nascidos e residentes no DF. Por conta de limitações metodológicas da época, apenas algumas variantes foram documentadas (HbS, HbC, indicativos de alfa-talassemia e as suas associações).

Diante do exposto, em razão da importância clínica das hemoglobinopatias, da dificuldade diagnóstica em recém-nascidos, e à luz dos recentes avanços científicos, este estudo tem por objetivo ampliar o espectro e a precisão do diagnóstico precoce de hemoglobinopatias no Distrito Federal, por meio da implantação de um algoritmo molecular utilizando técnicas resolutivas, prezando pelo melhor custo-benefício, passíveis de serem mantidas no SUS, permitindo assim a intervenção terapêutica em antecipação ao aparecimento de sinais clínicos e, subsidiando o melhor controle dos sintomas.

Pela escassez de estudos epidemiológicos mais abrangentes e detalhamento genotípico no Distrito Federal, e por apresentar uma das populações de maior heterogeneidade genética do Brasil, o presente estudo propõe, de maneira inédita, verificar a frequência e os aspectos epidemiológicos de pacientes afetados por distúrbios hemoglobínicos, bem como caracterizar os elementos funcionais e estruturais de hemoglobinas variantes raras e, eventualmente, novas que surjam ao longo do desenvolvimento do projeto.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e implantar algoritmo de diagnóstico molecular para detecção de doença falciforme e outras hemoglobinopatias em crianças e adolescentes atendidos no serviço de saúde pública do Distrito Federal, e estabelecer, com base nos perfis genotípicos, a frequência dessas doenças na população em questão.

2.2 Objetivos Específicos

- Propor um algoritmo integrado baseado em dados de triagem neonatal, avaliação hematimétrica e caracterização molecular para o diagnóstico de hemoglobinopatias quantitativas e qualitativas;
- Realizar estudo epidemiológico e clínico dos pacientes diagnosticados com hemoglobinopatias no Distrito Federal;
- Caracterizar as hemoglobinas variantes identificadas na população estudada, com ênfase nas formas raras ou não descritas na literatura.

3 Materiais e métodos

3.1 Tipo de estudo e casuística

Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS) e do Hospital da Criança de Brasília, aprovado sob o registro CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) nº 56879716.0.0000.5553.

Habitualmente o Teste do Pezinho é realizado pelo Laboratório de Triagem Neonatal da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, situado no Hospital de Apoio de Brasília (HAB). Todos os recém-nascidos da rede pública, em média 3800

por mês, são submetidos a triagem por metodologia convencional de eletroforese de hemoglobinas. De acordo com a hipótese diagnóstica estabelecida a partir da alteração descrita, e em conjunto com dados clínicos e laboratoriais, os pacientes são direcionados ao ambulatório de hematologia do Hospital da Criança de Brasília José Alencar (HCB) para consulta, instrução e acompanhamento, que por sua vez, são encaminhados ao Laboratório de Pesquisa Translacional do HCB para investigação molecular, a fim de se caracterizar os elementos funcionais e estruturais de hemoglobinas.

Trata-se de um estudo descritivo e analítico, com delineamento transversal em uma coorte de pacientes pediátricos triados para hemoglobinopatias no ambulatório de Hematologia entre janeiro de 2017 e dezembro de 2025. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos por meio da revisão de prontuários e dos hemogramas e outros exames registrados pelo Laboratório de Análises Clínicas.

Foram incluídos no estudo indivíduos com idade entre 0 e 19 anos com alterações hematimétricas qualitativas ou quantitativas no Teste do Pezinho. Tanto os recém-nascidos que se mantiveram alterados após a repetição dos exames com seis meses de vida, como as crianças e adolescentes com alterações hematológicas persistentes foram incluídas para desfecho diagnóstico.

Vale salientar que o estudo teve como maior objetivo realizar o diagnóstico, pelo algoritmo molecular, das alterações mais complexas de casos com suspeita clínica de hemoglobinopatias, que não tenham sido detectadas pelas metodologias convencionais de triagem. Porém, as alterações mais facilmente identificadas pelo Teste do Pezinho, como o traço falciforme e variantes bem descritas (C, D, E), foram incluídas no estudo epidemiológico global.

Entre as alterações com relevância clínica ou epidemiológica detectadas em recém-nascidos ou crianças destacam-se FVarA, FVar, FSVar, FCVar, FS, FC, FSC, FVar1Var2, FF não prematuro, FAVar, AVar, FSA (com razão HbS/HbA $>1,2$ e $<2,0$), FCA (com razão HbC/HbA $>1,2$ e $<2,0$) e Hb Bart's.

Em relação aos parâmetros laboratoriais, foram incluídos indivíduos que apresentavam índices de hemoglobina (Hb, g/dL), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg), amplitude de distribuição eritrocitária (RDW, %), reticulócitos (%) e ferritina sérica (ng/mL) fora da normalidade, de acordo com os valores de referência específicos para cada faixa etária, segundo o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) (Bain et al, 2017) determinados em

hemocítômetro Sysmex XN-550/1000 (Roche cobas®). A deficiência de ferro foi estipulada pela ferritina < 30 ng/mL para todos os pacientes, independente da faixa etária (Ministério da Saúde, 2023).

Os perfis de hemoglobina foram avaliados por HPLC ou eletroforese capilar, incluindo a quantificação de HbF, HbA e HbA₂; a identificação de variantes de hemoglobina (picos atípicos) e a detecção de HbH ou Hb Bart's quando presentes, segundo valores normais referenciados por Ivaldi et al (2007). Para a análise molecular, o DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico usando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Os valores de referência estimados para cada parâmetro estão descritos nas tabelas 1 e 2 abaixo.

Tabela 1. Valores de referência de índices hematimétricos para as diferentes faixas etárias (PNCQ, Bain *et al*, 2017; Ministério da Saúde, 2023).

Valores de referência para índices hematimétricos						
Idade (faixa etária)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	HCM (pg)	Ferritina	Reticulócitos relativo (%)	RDW (%)
Recém-nascido	14-22	100-120	31-37	>30	2,0-5,0	
1-2 meses	11,5-16,5	92-116	30-36	>30	2,0-5,0	
2-3 meses	9,4-13,0	88-103	27-33	>30	2,0-5,0	
3-6 meses	11,1-14,1	68-84	24-30	>30	0,5-2,5	
6 meses-1 ano	11,1-14,1	72-84	24-30	>30	0,5-2,5	11,0-
1-2 anos	11,1-14,1	72-84	25-29	>30	0,5-2,5	16,0
2-6 anos	11,1-14,1	75-87	24-30	>30	0,5-2,5	
6-12 anos	11,0-14,0	77-95	25-33	>30	0,5-2,5	
>12 anos	13-17 (homem) 12-15 (mulher)	83-101	27-32	>30	0,5-2,5	

Tabela 2. Valores de referência de hemoglobinas para as diferentes faixas etárias (Ivaldi et al, 2007).

Valores de referência para hemoglobinas			
Idade (faixa etária)	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)
Recém-nascido	15-40	0-1	58-84
3-5 meses	65-90	1,3-2,1	9,0-40
5-8 meses	83-95	1,6-2,6	3,0-15
8-12 meses	89-96	1,8-2,9	1,0-10
1-2 anos	94-97	1,9-3,0	0,5-3,0
> 2 anos	95-98	2,0-3,5	0,1-1,2

Tanto a inclusão dos sujeitos elegíveis na pesquisa quanto a coleta de amostra foram voluntárias, realizadas mediante o consentimento livre e esclarecido dos pais ou responsáveis legais e/ou assentimento das crianças e adolescentes, e todas as etapas do estudo foram conduzidas em conformidade com as normas e diretrizes éticas vigentes. Amostras dos familiares foram solicitadas em alguns casos para confirmação diagnóstica e para auxiliar na caracterização de variantes raras e pouco descritas na literatura.

3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes submetidos a transfusão sanguínea recente (até três meses antes da coleta), em uso de terapias capazes de interferir nos níveis de hemoglobina, os casos com doença inflamatória crônica ativa conhecida e os pacientes com diagnóstico de anemia ferropriva ou anemia microcítica sem causa genética aparente.

3.3 Coleta de material biológico e extração de DNA genômico

Foram coletadas amostras de sangue periférico em tubo com anticoagulante EDTA dos pacientes alterados. Para a investigação molecular, o DNA genômico de leucócitos do sangue periférico foi extraído pelo método de purificação por acetato de amônio e precipitação alcoólica (protocolo *in house*), baseado no kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega).

3.4 Padronização dos métodos moleculares e construção do algoritmo-diagnóstico

Inicialmente os testes moleculares foram padronizados e validados em amostras controles com genótipo já conhecido, gentilmente cedidas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/São José do Rio Preto. Após a validação, todos os pacientes que cumpriram os critérios de inclusão foram submetidos a técnicas moleculares para genotipagem das hemoglobinas anormais, as quais serão listadas a seguir:

3.5 GAP-PCR para Alfa-Talassemia e Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF)

O GAP-PCR foi o método de escolha para detectar grandes deleções, que são responsáveis por causar ~90% das alfa-talassemias, e baseia-se na amplificação ao

longo de um dos pontos de interrupção, em que um primer é complementar à sequência excluída e outro é complementar ao DNA. Uma das vantagens da utilização desse método é a possibilidade em utilizar múltiplos primers para alvos diferentes em uma única reação. Nesse caso a PCR convencional seria inviável por conta da limitação em relação ao tamanho do alvo a ser amplificado, devido à distância entre os primers que flanqueiam a deleção. A escolha da posição de anelamento dos primers de GAP-PCR é estratégica para permitir amplificar longos fragmentos.

Foi utilizado um ensaio multiplex para detecção das 7 deleções mais comuns em alfa talassemia (α 3.7, α 4.2, --SEA, --THAI, $-(\alpha)$ 20.5, --MED e --FIL), de acordo com o protocolo adaptado de Tan *et al* (2001), cujos primers foram: α 2/3.7-F e 3.7/20.5-R, α 2/3.7-F e α 2-R, 4.2-F/4.2-R, SEA-F/SEA-R, THAI-F/THAI-R, 20.5-F e 3.7/20.5-R, MED-F/MED-R e FIL-F/FIL-R. Como controle de funcionamento da reação, foram utilizados os primers para amplificação do gene LIS (LIS1-F/LIS1-R).

O PCR multiplex foi conduzido utilizando-se o kit Multiplex PCR Plus Kit (Qiagen), contendo H₂O ultrapura, concentrações finais de 1X de Master Mix, 1X de Q-solution, 750 ng de DNA, e 16 primers em várias concentrações (tabela 3, anexos), totalizando um volume final de 15 μ L. As condições de ciclagem se basearam em 1 ciclo de desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 98°C por 45 segundos, anelamento a 62°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 135 segundos. A extensão final foi a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8% para visualização do tamanho do produto amplificado.

Outra aplicação do GAP-PCR foi para a análise de Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF) tipos 1 e 2, caracterizadas pela deleção dos genes δ e β no cluster de β -globina. As reações foram realizadas com base no protocolo adaptado de Craig *et al.*, (1994).

A PCR foi conduzida utilizando-se o kit Multiplex PCR Plus Kit (Qiagen), contendo H₂O ultrapura, concentrações finais de 1X de Master Mix, 1X de Q-solution, 0,2 μ M de cada primer e 750 ng de DNA, resultando em um volume final de 15 μ L. Os primers para PHHF1 consistiram em A1, A2 e A3, e para detecção da PHHF2 foram utilizados os primers B1, B2 e B3.

A variante PHHF-1 é originada por uma deleção de 106 kb, e a variante PHHF-2 é originada por uma deleção de 105 kb. A presença da deleção leva a uma aproximação dos sítios dos primers e à amplificação de uma banda específica da

deleção. Um terceiro primer, pensado para funcionar em condições semelhantes aos primers específicos da deleção, foi sintetizado de forma complementar à sequência removida pela deleção em questão, levando à amplificação de uma banda de controle normal. Consequentemente, nos casos heterozigotos para a deleção, duas bandas são amplificadas, sendo uma relativa à amplificação de controle normal e outra relativa à deleção. Os casos homozigotos são facilmente distinguíveis dos heterozigotos, pois apresentam um único fragmento, específico da deleção. Os indivíduos considerados como “wildtype (WT)” não apresentam a deleção, e apenas a banda de controle normal é amplificada (Craig et al., 1994).

A ciclagem consistiu em desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 98°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 90 segundos. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos. A temperatura de anelamento do primer para detecção de PHHF tipo 2 foi de 55°C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% para visualização do tamanho do produto amplificado.

3.6 MLPA

O MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) é um método semiquantitativo de alta sensibilidade baseado em PCR multiplex, capaz de detectar o número relativo de cópias de até 60 alvos diferentes em uma única reação. Através do MLPA é possível detectar duplicações, deleções, além de padrões aberrantes de metilação. Uma amostra de DNA genômico é hibridizada com um conjunto de sondas, e cada sonda consiste em uma sequência da região alvo e um par de primers universal, que permitem a amplificação simultânea de todas as regiões de interesse. Os fragmentos gerados pela PCR são separados e analisados em equipamento de eletroforese capilar para quantificação relativa do número de cópias em comparação ao de DNAs de indivíduos saudáveis (MRC-Holland).

O MLPA foi utilizado no diagnóstico das alfa-talassemias deletoriais mais comuns em casos inconclusivos no GAP-PCR, através do kit comercial *SALSA MLPA P140 HBA*. Para avaliar a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), quando não identificada no GAP-PCR, e o cluster de genes da beta-globina foi utilizado o kit *SALSA MLPA P102 HBB*, de acordo com as instruções do fabricante (MRC-Holland).

O protocolo utilizado para validação desta técnica envolve 5 etapas. A inicial

consiste em desnaturação da amostra de DNA (usamos concentração entre 50-250 ng), seguida de reconhecimento das sondas pela sequência DNA-específica e início do processo de hibridização, que pode durar de 16 a 20 horas. Em seguida as sondas são ligadas pela enzima ligase, formando um único fragmento. Durante a reação de PCR subsequente, todas as sondas ligadas são amplificadas simultaneamente, resultando em um conjunto de amplicons de PCR exclusivos. Os produtos amplificados geraram fragmentos de diferentes tamanhos, que foram separados por eletroforese capilar em analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems) e os resultados da detecção foram processados utilizando o Software MRC-Coffalyser (Coffalyser.Net™) (MRC-Holland). Em cada experimento de MLPA foram utilizadas três amostras de DNA de indivíduos sem as deleções, que serviram de controle para análise no software.

3.7 Sequenciamento genético

Para detecção das variantes pontuais (10% dos casos) e variantes raras de alfa globina, bem como variantes de beta e alterações típicas de talassemia, foi realizado o sequenciamento dos genes *HBA1*, *HBA2* e *HBB* em sequenciador automático de DNA ABI 3500 (Applied Biosystems).

O sequenciamento para alfa talassemia foi realizado segundo Kattamis *et al* (1996), com algumas adaptações no protocolo, utilizando C1/C9c (forward/reverse) como primers para amplificação do gene *HBA1* e C1/C3 (forward/reverse) para amplificação do gene *HBA2*. A reação de PCR foi conduzida utilizando-se o kit Multiplex PCR Plus Kit (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante.

As condições de ciclagem consistiram em 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% para visualização do tamanho do produto amplificado.

O sequenciamento para beta talassemia foi realizado seguindo o protocolo de Chan *et al* (2010), de forma adaptada. A amplificação do DNA foi realizada por meio do kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e o sequenciamento do gene completo foi realizado em duas etapas (PCR I e PCR II), cada uma com volume total de 15 uL. Com exceção dos primers utilizados em cada reação, ambas foram realizadas contendo as mesmas concentrações de reagentes, sendo H₂O ultrapura,

concentrações finais de 1X de tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,75 U de Taq polimerase, 0,2 µM de cada primer e 30 ng de DNA, totalizando um volume final de 15 µL. Os primers A/B (*forward/reverse*) foram utilizados na PCR I e os primers C/D (*forward/reverse*) foram utilizados na PCR II.

As condições consistiram em 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 3 minutos seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58,5°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos. Os primers usados na reação de sequenciamento foram A e E (*forward e reverse*) para a PCR I; e C e F (*forward e reverse*) para a PCR II, a uma concentração final de 0,32µM cada.

Para todos os sequenciamentos de DNA realizados, os amplicons foram purificados com ExoSAP-IT PCR Product Clean-Up Reagent (Applied Biosystems™, by ThermoFisher Scientific). Do produto purificado, 3 µL foram utilizados para reação de sequenciamento com o kit BigDye Terminator v3.1 (ThermoFisher Scientific), totalizando uma reação de 10 µL.

As reações foram precipitadas com etanol/EDTA e sequenciadas em analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas em software CLC Main Workbench versão 6.8 (CLC, QIAGEN Company).

3.8 Análise dos dados

A análise dos dados foi realizada de forma descritiva, baseada na frequência de alterações genético-moleculares de hemoglobinopatias e caracterização de hemoglobinas variantes, encontradas em recém-nascidos, crianças e adolescentes com até 19 anos de idade, encaminhados ao ambulatório de hematologia do HCB para consulta e avaliação molecular. Foram avaliadas variáveis demográficas, incluindo idade (estratificada por categorias intervalares) e sexo. As informações clínicas e laboratoriais foram obtidas por meio de prontuário eletrônico. Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística, sendo as variáveis categóricas descritas por meio de frequências absolutas (n) e relativas (%). As variáveis quantitativas contínuas foram descritas como média, desvio padrão, mínimo e máximo, ou como mediana, conforme a distribuição dos dados. No que se refere aos dados laboratoriais, os pacientes foram caracterizados com base nos parâmetros hematimétricos mais frequentemente comprometidos nos doentes, entre eles Hb, VCM, HCM, RDW, reticulócitos e ferritina sérica; e quanto ao perfil hemoglobínico

obtido por metodologias convencionais de triagem, que inclui a quantificação de HbA1, HbA2, HbF e Hb anômala.

3.9. Caracterização hematológica e molecular das alfa-talassemias

As alfa-talassemias foram encontradas em grande número neste estudo, sobretudo as silenciosas, por isso, de modo particular, esse subgrupo merece atenção devido à grande distribuição no Brasil, como resultado de migração histórica e intensa miscigenação populacional, além de ser subestimada por falta de triagem genética sistemática. Sendo assim, as alfa-talassemias foram caracterizadas quanto à coherança com variantes estruturais recorrentes de beta-globina e quanto às relações entre variáveis laboratoriais, demográficas e o status de ferro por meio da ferritina. Foram investigados aspectos relacionados à caracterização molecular e hematológica da α -talassemia em uma coorte pediátrica brasileira, fundamentando e complementando as análises apresentadas nesta dissertação.

Os genótipos obtidos foram agrupados e detalhados quanto à variante/deleção, zigosidade e combinação com outras variantes. Os participantes foram estratificados em quatro grupos de acordo com o genótipo da α -talassemia e a co-herança com variantes estruturais da hemoglobina. O Grupo A compreendia portadores silenciosos com deleção de um único gene da α -globina ($-\alpha/\alpha$). O Grupo B incluía indivíduos com traço de α -talassemia, caracterizado pela deleção de dois genes da α -globina ($-\alpha/-\alpha$ ou $--/\alpha\alpha$). O Grupo C abrangia indivíduos com α -talassemia (portadores silenciosos ou com traço) associada a variantes estruturais da α - ou β -globina, e foi subdividido da seguinte forma: C1, portadores silenciosos que co-herdam hemoglobina S heterozigótica (traço HbS); C2, portadores silenciosos com dupla heterozigosidade para HbS/HbC; e C3, portadores do traço de α -talassemia que co-herdam hemoglobina S homozigótica (HbSS). O grupo D incluía indivíduos com variantes estruturais da β -globina na ausência de α -talassemia, subdivididos em D1 (HbS heterozigoto), D2 (HbS/HbC duplo heterozigoto) e D3 (HbS homozigoto; HbSS). Para avaliar a associação entre o estado do ferro e as variáveis laboratoriais e demográficas em diferentes genótipos de α -talassemia, foram aplicados critérios predefinidos. A deficiência de ferro foi definida como ferritina sérica <30 ng/mL para todos os participantes, independentemente da idade. Anemia e microcitose foram definidas como valores de hemoglobina (Hb, g/dL) e volume corpuscular médio (VCM, fL) abaixo dos intervalos de referência específicos para a idade. A evidência de

hemólise ativa foi inferida a partir da contagem de reticulócitos (%) acima do limite superior da normalidade para a faixa etária correspondente.

Para avaliar a associação entre o estado do ferro e as variáveis laboratoriais e demográficas em diferentes genótipos de α -talassemia, foram aplicados critérios predefinidos. A deficiência de ferro foi definida como ferritina sérica <30 ng/mL para todos os participantes, independentemente da idade. Anemia e microcitose foram definidas como valores de hemoglobina (Hb, g/dL) e volume corpuscular médio (VCM, fL) abaixo dos intervalos de referência específicos para a idade. A evidência de hemólise ativa foi inferida a partir da contagem de reticulócitos (%) acima do limite superior da normalidade para a faixa etária correspondente.

Foram realizadas comparações pareadas independentes por meio do teste U de Mann-Whitney entre portadores de alfa-talassemia isoladas, associadas a variantes de beta globina e variantes de beta-globina isoladas. Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística, com as variáveis categóricas descritas utilizando frequências absolutas (n) e relativas (%). As variáveis quantitativas contínuas foram expressas como média e desvio padrão, ou mediana e intervalo interquartil, dependendo da distribuição dos dados. A aderência à normalidade de todas as variáveis contínuas foi previamente avaliada utilizando testes de normalidade (como o teste de Shapiro-Wilk ou o teste de Kolmogorov-Smirnov) para determinar a adequação de testes paramétricos ou não paramétricos. Para a avaliação comparativa dos índices hematimétricos e frações de hemoglobina entre diferentes genótipos (Grupos A, B, C e D), foram escolhidos testes não paramétricos, dada a distribuição assimétrica e o tamanho reduzido da amostra em subgrupos específicos de co-herança. Comparações independentes aos pares — como a avaliação entre portadores de alfa-talassemia silenciosa (Grupo A) e traço de alfa-talassemia (Grupo B), bem como interações com variantes de beta-globina (Grupos C e D) — foram conduzidas utilizando o teste U de Mann-Whitney. Adicionalmente, para investigar a modulação dos parâmetros eritrocitários pelo perfil de ferro, foi realizada uma estratificação interna de cada grupo de acordo com o estado do ferro (ferritina reduzida < 30 ng/mL versus ferritina normal ≥ 30 ng/mL). As diferenças intragrupo resultantes foram analisadas utilizando o teste U de Mann-Whitney ou o teste t de Student (ou o teste t de Welch para variâncias desiguais), sob a suposição de normalidade. Todas as análises estatísticas e construções gráficas foram realizadas no software R. O nível de significância estatística adotado para rejeitar a hipótese nula foi definido em $p <$

0,05.

4 Resultados e Discussão

4.1 Construção do algoritmo-diagnóstico

Para a construção do algoritmo diagnóstico, inicialmente selecionamos um conjunto de técnicas moleculares já bem estabelecidas, priorizando critérios de custo-efetividade e acessibilidade. As metodologias foram testadas visando maior resolatividade nos casos complexos e, ao mesmo tempo, viabilidade de manutenção e implementação sustentável no SUS.

Os indivíduos com alterações na eletroforese de hemoglobina, combinadamente ou não com alterações hematimétricas e manifestações clínicas, foram avaliados caso a caso para o delineamento experimental e a escolha do melhor método a ser utilizado, considerando a hipótese diagnóstica. A caracterização das hemoglobinas variantes de alfa e beta, sobretudo as mais frequentes na população brasileira (S, C, D-Los Angeles, Hasharon e G-Philadelphia) foi realizada por PCR seguida por sequenciamento direto pelo método Sanger. As principais deleções causadoras da alfa-talassemia foram inicialmente identificadas pela técnica de MLPA. Por esse método, é possível detectar as deleções de 3,7kb ($-\alpha^{3.7}$), 4,2 kb ($-\alpha^{4.2}$), Sudoeste Asiático ($--SEA$), ($--FIL$), ($--THAI$), ($--MED$), $-(\alpha)^{20.5}$, entre outras, em uma reação de tubo único. Essa metodologia se mostrou muito útil na detecção de deleções e/ou duplicações causadoras da alfa talassemia em 90% dos casos. Trata-se de uma técnica altamente resolutiva, completa e precisa, capaz de detalhar com grande exatidão a extensão das deleções identificadas. No entanto, apresenta custo mais elevado por teste, é trabalhosa e exige profissional experiente tanto na execução em bancada quanto na análise dos dados. Diante disso, o GAP-PCR foi o método pensado para diminuir o custo. Após demorada padronização e validação das reações, essa técnica foi incluída no algoritmo como forma de rastreio inicial das 7 deleções mais recorrentes em alfa talassemia. A maioria dos casos de alfa-talassemia foram elucidados, principalmente os portadores silenciosos com a deleção de 3,7kb ($-\alpha^{3.7}$), a mais prevalente no Brasil (de Souza et al., 2015). A partir daí, somente os casos inconclusivos foram submetidos ao MLPA. Nos casos negativos para as principais deleções, o sequenciamento gênico da alfa globina pelo método Sanger foi realizado para detecção das variantes pontuais ou não delecionais (10% dos casos)

(Kattamis et al, 1996).

A pesquisa das variantes de beta-talassemia mais frequentes na população foi realizada através do sequenciamento dos éxons, região promotora e junções éxon/íntron do gene *HBB* (Chan et al, 2010). Para os casos com suspeita de persistência hereditária de hemoglobina fetal, os métodos utilizados foram o GAP-PCR, conforme protocolo adaptado de Craig et al., (1994), ou, para os casos negativos, o MLPA do *cluster* beta (MRC-Holand). Diante de alguns casos inconclusivos, mas com clínica clara, foi incluído ao rol de testes moleculares o kit de MLPA para o *cluster* gênico da beta globina e o sequenciamento de delta globina (Sahli et al., 2012). O kit *SALSA MLPA Probemix P102 HBB* (MRC-Holland) foi incorporado com o intuito de diagnosticar beta talassemias raras, persistência hereditária da hemoglobina fetal, talassemia delta-beta, entre outras variações no número de cópias (CNV) no *cluster* gênico da beta globina. O sequenciamento de delta globina é necessário para o diagnóstico de variantes e alterações na expressão da hemoglobina A₂. O sequenciamento de alfa globina (*HBA*) pelo método Sanger foi inserido no algoritmo diagnóstico para possível detecção de variantes não deletoriais, principalmente os SNVs, nos casos suspeitos de alfa talassemia com clínica, caso não tenham sido detectadas pelo MLPA. A detecção de variantes nos genes da beta globina (*HBB*), delta (*HBD*) e gama (*HBG*) também foi realizada por sequenciamento gênico.

Diversos estudos têm sido desenvolvidos incluindo estratégias otimizadas e estruturadas em forma de algoritmos para o rastreamento de portadores e diagnóstico pré-natal de hemoglobinopatias. Nesse contexto, Munkongdee et al. (2020) enfatizam o papel central dos métodos laboratoriais combinados, incluindo HPLC e testes moleculares, na construção de fluxos diagnósticos mais eficientes e adaptáveis a diferentes contextos clínicos. Adicionalmente, Motiani et al., (2025) reforçam que a utilização de algoritmos diagnósticos baseados em parâmetros hematológicos iniciais permite uma triagem mais direcionada, reduzindo a necessidade de testes complexos em todos os pacientes.

De maneira semelhante, recente estudo destaca a importância de métodos diagnósticos sensíveis para identificação precoce de portadores e prevenção de formas graves da doença, e apresenta um algoritmo diagnóstico que inclui a importância da anamnese, especialmente a origem étnica de regiões com alta prevalência da doença, histórico familiar de anemia crônica ou transfusões, e

antecedentes pessoais de anemia com suplementação de ferro (Mensah, Sheth, 2021). Entretanto, o estudo restringiu-se à avaliação das α - e β -talassemias, embora pudesse abranger outras hemoglobinopatias, considerando a ampla diversidade existente.

No Brasil, o Ministério da Saúde disponibiliza diretrizes para o diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias, abrangendo métodos citológicos, bioquímicos, eletroforéticos e cromatográficos; entretanto, tais recomendações não contemplam a utilização de técnicas de biologia molecular como método confirmatório (Ministério da Saúde, 2024).

Diante disso, reforça-se a importância de fluxogramas diagnósticos integrados que tornam a abordagem mais precisa, padronizada e custo-efetiva.

A Figura 9 apresenta o algoritmo proposto neste estudo para o diagnóstico de hemoglobinopatias, com incorporação progressiva de técnicas de biologia molecular, em integração com informações clínicas e laboratoriais. Essa abordagem mostra-se potencialmente aplicável no contexto do SUS. A investigação deve iniciar a partir dos dados clínicos, testes de triagem neonatal por eletroforese de hemoglobina, análises hematológicas dos parâmetros hematimétricos obtidos em esfregaço sanguíneo ou hemograma, além de ferritina e reticulócitos. Por fim, é realizada a confirmação molecular através de metodologias pensadas com base na hipótese diagnóstica. De modo geral, o fluxograma evidencia uma abordagem racional e escalonada, integrando dados clínicos e laboratoriais para evitar erros diagnósticos, especialmente na distinção entre alfa- talassemia e anemia ferropriva.

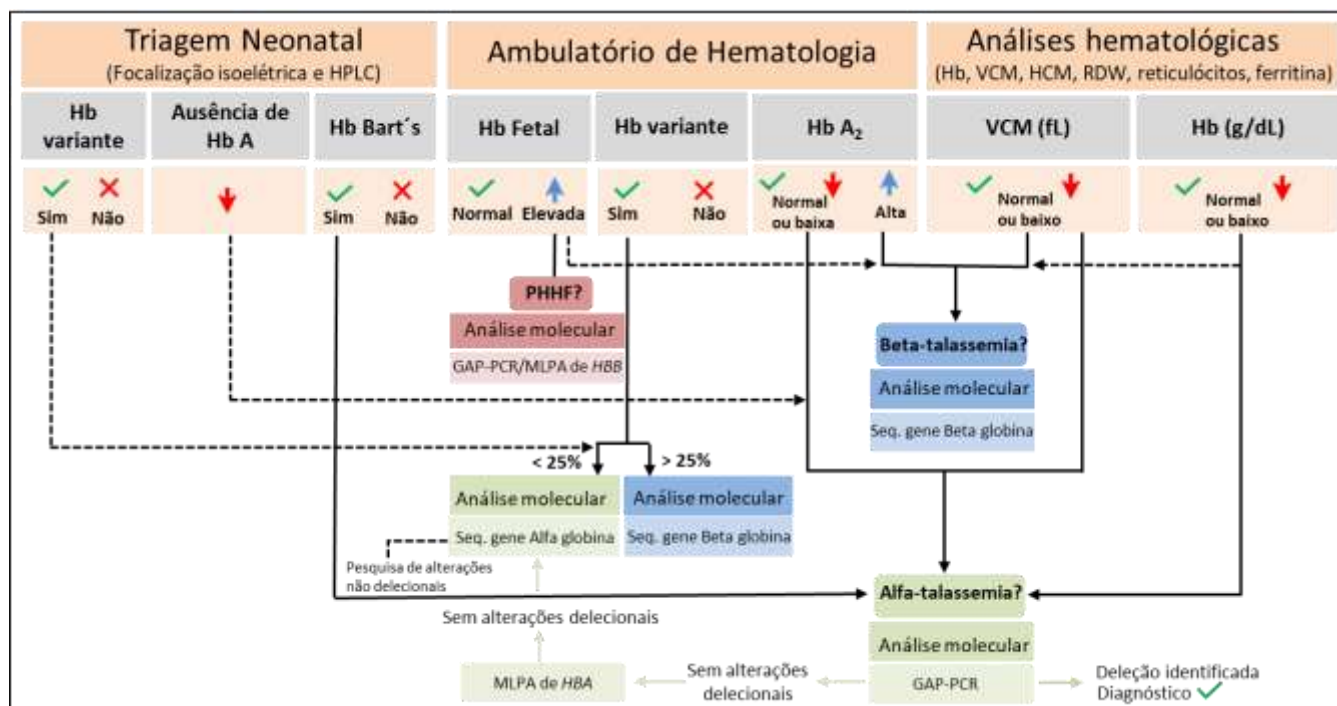


Figura 9. Algoritmo metodológico definido para o rastreo e diagnóstico de hemoglobinopatias no Laboratório de Pesquisa Translacional do Hospital da Criança de Brasília.

Por meio do algoritmo foi possível identificar uma série de hemoglobinas variantes pouco descritas na literatura, mas com relevante significado clínico. Para ilustrar o potencial do algoritmo proposto, será descrito a seguir um caso emblemático de variante estrutural associada a uma variante deletional.

Um paciente do sexo masculino, lactente ao diagnóstico, foi encaminhado com quadro de anemia microcítica e hipocrômica não responsiva ao ferro. Inicialmente, a suspeita clínica apontava para alfa-talassemia. Foi realizado o MLPA, que identificou apenas a deleção clássica de 3,7 kb, compatível com alfa-talassemia silenciosa. No entanto, essa alteração não justificava a anemia microcítica mais exuberante, com hepatoesplenomegalia, palidez marcada e repercussão clínica mais grave, discrepantes com o quadro típico de alfa-talassemia silenciosa. Diante disso, a investigação foi ampliada, com o sequenciamento dos genes codificadores das globinas alfa e beta.

O estudo molecular revelou duas alterações no mesmo gene (*HBA2*): uma variante estrutural correspondente à Hb Taybe, detectada pelo sequenciamento do gene da alfa-globina, associada a deleção de 3,7 kb, já identificada pelo MLPA (figura 10). A Hb Taybe é uma variante da cadeia alfa globina (*HBA2*:c.119_121del p.Thr40del), caracterizada pela deleção de um resíduo de treonina no códon 38 ou

39, decorrente dos genes *HBA2* ou *HBA1*, que resulta em hemoglobina estruturalmente anormal, altamente instável e com fenótipo funcional talassêmico (Galacteros et al., 1994).

Esse caso ilustra como a suspeita inicial de alfa-talassemia, com achados laboratoriais aparentemente concordantes, exigiu abordagem mais ampla e sensível, só possível graças à disponibilidade de técnicas moleculares avançadas, que permitiram o diagnóstico preciso e a elucidação de uma combinação genética rara com significativo impacto clínico.

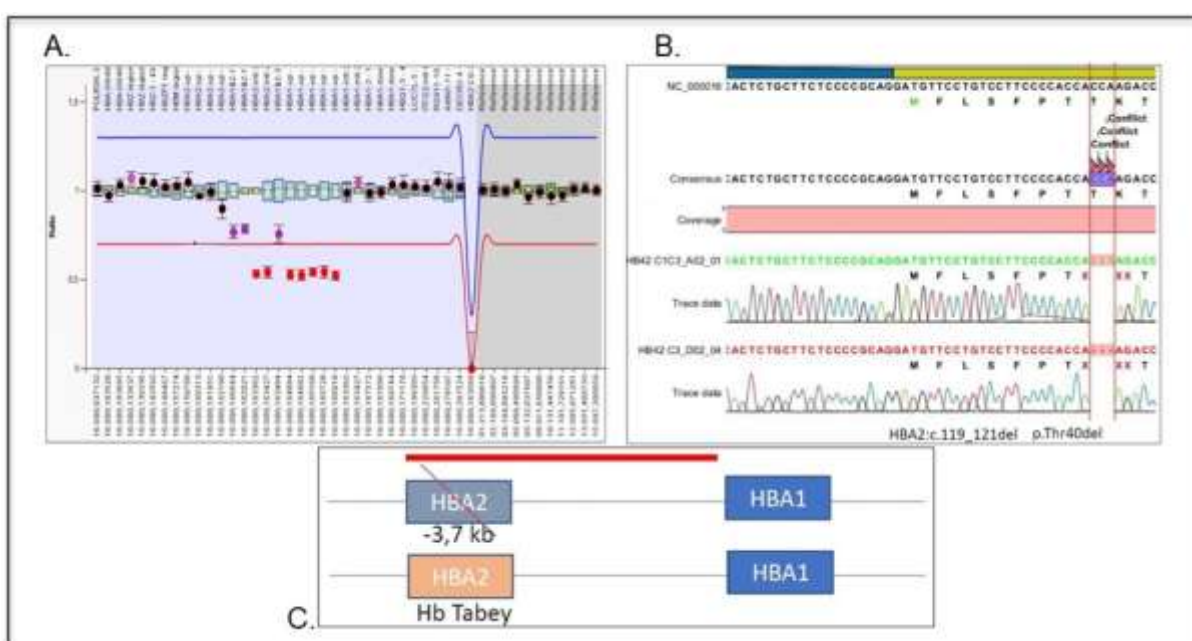


Figura 10. Variante deletional de 3,7kb por MLPA (A), hemoglobina variante Taybe detectada por sequenciamento genético do gene de alfa globina(B), e, ambas alterações no mesmo gene (*HBA2*) do paciente (C).

4.2 Descrição geral e frequência de genótipos de hemoglobinopatias na população estudada

Todos os pacientes admitidos que possuíam alterações com relevância clínica e/ou epidemiológica foram submetidos a estudo molecular para provável definição diagnóstica, com base nas metodologias padronizadas.

No período de dezembro de 2017 a dezembro de 2025, amostras de sangue de 567 indivíduos foram processadas no Laboratório de Pesquisa Translacional do Hospital da Criança de Brasília, sendo 487 pacientes e 80 familiares. As amostras recebidas eram provenientes do Distrito Federal e entorno. Dos casos pediátricos

avaliados, 415 continham alguma alteração molecular característica de hemoglobinopatia. Esses dados mostram que as metodologias moleculares utilizadas foram extremamente úteis para o desfecho diagnóstico da maioria dos casos avaliados (~85%). As amostras de familiares e as negativas para alterações (consideradas “wildtype”), foram excluídas das análises estatísticas (n=152).

De todos os familiares submetidos à análise molecular, a maioria (n=50) continha alterações e no restante (n=13), não foram encontradas alterações moleculares relacionadas a hemoglobinopatias. Esses dados mostram que as metodologias moleculares utilizadas foram extremamente úteis para o desfecho diagnóstico da maioria das famílias avaliadas (~80%).

As hemoglobinopatias encontradas foram agrupadas em 4 classes - alfa talassemia, beta talassemia, Hb variante e Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF). Entretanto, essas classes se sobrepõem, uma vez que em muitos casos foram detectadas, concomitantemente, variantes estruturais e talassêmicas. Dentro da coorte de casos pediátricos confirmados (n=415), 343 pacientes possuíam alguma hemoglobinopatia de forma isolada. Dentre eles, 181 eram portadores de hemoglobina variante, o que representa uma frequência de 43,6% do total avaliado, seguido de 126 casos portadores de α -talassemia (30,4%), 35 com β -talassemia (8,4%) e um paciente com PHHF (0,2%). Em relação aos casos de coherança, 34 (8,2%) possuíam α -talassemia associada à hemoglobina variante de alfa e beta-globina e 33 possuíam β -talassemia associada à variante de beta-globina (8,0%). A PHHF foi encontrada em associação com Hb variante de beta-globina em 4 indivíduos (1,0%), e com β -talassemia em um indivíduo, representando 0,2% do total avaliado.

A maioria dos pacientes analisados era do sexo masculino (56,8%). Quanto à faixa etária, predominou o grupo entre 2 e 6 anos (27,5%), seguido por pacientes entre 6 e 12 anos (23,2%), e aqueles com mais de 12 anos (17,9%). Em 7 casos não foi possível obter a informação do sexo. Os pacientes alterados apresentaram uma média de idade de 4 anos. Os tipos de hemoglobinopatias encontradas em cada classe, isoladas ou associadas, o número de casos, suas respectivas frequências, distribuição segundo sexo e idade, assim como as alterações moleculares relativas a cada genótipo foram detalhadas nas tabelas 1 e 2. As intersecções entre as classes são mostradas no Diagrama de Venn (figura 11).

Tabela 3. Classes de hemoglobinopatias encontradas em pacientes pediátricos, respectivas frequências e distribuição por idade e sexo, atendidos no Hospital da Criança de Brasília.

Classe	Tipo de Hemoglobinopatia	Nº de casos	Frequência (%)	Sexo		Idade					
				Masculino	Feminino	3-6 meses	6 meses-1 ano	1-2 anos	2-6 anos	6-12 anos	>12 anos
1	Alfa-silenciosa	74	17,8	49	25	0	1	8	31	20	14
	Alfa-traço	52	12,5	33	19	1	0	3	22	19	7
	Alfa/Hb variante α	2	0,5	1	1	0	0	1	1	0	0
	Alfa/Hb variante β	32	7,7	18	14	1	1	4	8	15	3
2	Beta-talassemia	35	8,4	22	13	0	1	2	8	12	12
	Beta-talassemia/ Hb variante β	33	8,0	15	18	1	7	3	13	7	2
3	Hb variante	181	43,6	94	80	45	28	21	30	22	35
4	PHHF	1	0,2	1	0	0	1	0	0	0	0
	PHHF/Hb variante β	4	1,0	2	2	0	1	0	1	1	1
	PHHF/Beta-talassemia	1	0,2	1	0	0	0	1	0	0	0
Total		415	100,0	236	172	48	40	43	114	96	74

Tabela 4. Hemoglobinopatias isoladas ou associadas encontradas em pacientes pediátricos atendidos no serviço de saúde pública do Distrito Federal, especificadas por genótipo, número de cópias e variante do tipo HGVS (human genome variation society).

Classe	Tipo de hemoglobinopatia	Alteração molecular isolada/associada	Genótipo/Número de cópias	Nº de casos	Variante HGVS (Human Genome Variation Society)
1	Alfa-talassemia	Alfa-sil	-α3.7/αα	72	NC_000016.9:g.223300_227103del
			-α4.2/αα	1	NC_000016.9:g.219817 (223755_224074)del
			-α/αα	1	HBA2:c.69delC (p.Glu24Serfs*26)
	Alfa-talassemia/Hb variante α	Alfa-traço	-α3.7/-α3.7	52	NC_000016.9:g.223300_227103del
		Alfa-sil/Hb Taybe	(-α3.7/-αα)/Hb Taybe	1	HBA2:c.119_121del (p.Thr40del)
		Alfa-sil/Hb Kurosaki	(-α3.7/-αα)/Hb Kurosaki	1	HBA1:c.22A>G
		Alfa-sil/HbS	(-α3.7/-αα)/HbS	14	HBB:c.20A>T
	Alfa talassemia/Hb variante β	Alfa-sil/HbC	(-α3.7/-αα)/HbC	2	HBB:c.19G>A
		Alfa-sil/HbSC	(-α3.7/-αα)/HbSC	6	HBB:c.20A>T e HBB:c.19G>A
		Alfa-sil/HbSS	(-α3.7/-αα)/HbSS	2	HBB:c.20A>T homozigose
		Alfa-traço/HbS	(-α3.7/-α3.7)/HbS	2	HBB:c.20A>T
		Alfa-traço/HbC	(-α3.7/-α3.7)/HbC	1	HBB:c.19G>A
		Alfa-traço/HbSS	(-α3.7/-α3.7)/HbSS	5	HBB:c.20A>T homozigose
		IVS-I-6 (T>C)	β+ heterozigoto	6	HBB:c.92+6T>C
		IVS-I-5 (G>C)	β+ heterozigoto	1	HBB:c.92+5G>C
		IVS-I-110(G>A)	β+ heterozigoto	1	HBB:c.93-21G>A
		-29 (A>G)	β+ heterozigoto	1	HBB:c.-79A>G
2	Beta-talassemia	HBB:c.*110T>C	β+ heterozigoto	1	HBB:c.*110T>C
		IVS-I-6 (T>C)/IVS-I-6 (T>C)	β+/β+ homozigoto	2	HBB:c.92+6T>C
		IVS-I-6 (T>C)/IVS-I-110(G>A)	β+/β+ homozigoto	2	HBB:c.92+6T>C + HBB:c.93-21G>A
		IVS-I-6 (T>C)/(-88 (C->T))	β+/β+ homozigoto	1	HBB:c.92+6T>C + HBB:c.-138C>T
		IVS-I-5 (G>C)/IVS-I-5 (G>C)	β+/β+ homozigoto	1	HBB:c.92+5G>C
		HbE/HbE	β+/β+ homozigoto	1	HBB:c.79G>A
		Codon 39 (C>T)	β0 heterozigoto	7	HBB:c.118C>T
		Códon 30 A>C [IVSI (-2)	β0 heterozigoto	1	HBB:c.91A>C
		beta 107(+G)	β0 heterozigoto	1	HBB:c.323dupG

3	Beta-talassemia/ Hb variante β	Códon 6 (-A); GAG(Glu)->GG	β^0 heterozigoto	1	HBB:c.20delAfs*
		HBB:c.20del p.Glu7Glyfs*13	β^0 heterozigoto	2	HBB:c.20del p.Glu7Glyfs*13
		Codon 39 (C>T)	β^0 homozigoto	2	HBB:c.118C>T
		IVS-I-6 (T>C)/IVS-I-1 (G->A)	β^0/β^+ heterozigoto composto	2	HBB:c.92+6T>C + HBB:c. 92+1G<A
		IVS-I-6 (T>C)/Codon 39 (C>T)	β^0/β^+ heterozigoto composto	1	HBB:c.92+6T>C + HBB:c.118C>T
		-88 (C->T)/Codon 39 (C>T)	β^0/β^+ heterozigoto composto	1	HBB:c.-138C>T + HBB:c.118C>T
		HbS/ Codon 39 (C>T)	HbS/ β^0 Heterozigoto composto	4	HBB:c.20A>T + HBB:c.118C>T
		HbS/ Códon 15 (G->A); TGG(Trp)->TGA	HbS/ β^0 Heterozigoto composto	1	HBB:c.20A>T + HBB:c.48G>A
		HbS/ Códon 6 (-A); GAG(Glu)->GG	HbS/ β^0 Heterozigoto composto	1	HBB:c.20A>T + HBB:c.20delAfs*
		HbS/ HBB:c.20del p.Glu7Glyfs*13	HbS/ β^0 Heterozigoto composto	1	HBB:c.20A>T + HBB:c.20del p.Glu7Glyfs*13
		HbS/ HBB:c.143dup p.(Asp48Glu>Ter6)	HbS/ β^0 Heterozigoto composto	1	HBB:c.20A>T + HBB: c.143_144insA
		HbS/ IVS-I-6 (T>C)	HbS/ β^+ Heterozigoto composto	6	HBB:c.20A>T + HBB:c.92+6T>C
		HbS/ IVS-I-110(G>A)	HbS/ β^+ Heterozigoto composto	3	HBB:c.20A>T + HBB:c.93-21G>A
		HbS/ -29 (A>G)	HbS/ β^+ Heterozigoto composto	2	HBB:c.20A>T + HBB:c.-79A>G
		HbS/ -88 (C->T)	HbS/ β^+ Heterozigoto composto	2	HBB:c.20A>T + HBB:c.-138C>T
		HbS/ -28 (A->C)	HbS/ β^+ Heterozigoto composto	1	HBB:c.20A>T + HBB:c.-78A>C
		HbS/ HBB c.-151C>T	HbS/ β^+ Heterozigoto composto	1	HBB:c.20A>T + HBB c.-151C>T
		HbS/ IVS-II-745 (C->G)	HbS/ β^+ Heterozigoto composto	1	HBB:c.20A>T + HBB:c.316-106C>G
		HbS/ -92 (C->T)	HbS/ β^+ Heterozigoto composto	1	HBB:c.20A>T + HBB:c.-142C>T
		HbC/ IVS-I-1 (G->A)	HbC/ β^0 Heterozigoto composto	1	HBB:c.19G>A + HBB:c. 92+1G<A
		HbC/ IVS-I-6 (T>C)	HbC/ β^+ Heterozigoto composto	3	HBB:c.19G>A + HBB:c.92+6T>C
		HbC/ IVS-I-110(G>A)	HbC/ β^+ Heterozigoto composto	2	HBB:c.19G>A + HBB:c.93-21G>A
		HbC/ IVS-I-5 (G>C)	HbC/ β^+ Heterozigoto composto	1	HBB:c.19G>A + HBB:c.92+5G>C
		HbC/ -29 (A>G)	HbC/ β^+ Heterozigoto composto	1	HBB:c.19G>A + HBB:c.-79A>G
		Hb Stanleyville-II	Heterozigoto	3	HBA1:c.237C>A
	Hb variante de alfa-globina	Hb G-philadelphia	Heterozigoto	2	HBA1:c.207C>G
		Hb Kurosaki	Heterozigoto	4	HBA1:c.22A>G
		Hb "Brasília"	Heterozigoto	1	HBA1:c.194_205dup p.(Leu67_Ala70dup)

4	Hb variante de beta-globina	HbAS	Heterozigoto - traço falciforme	84	HBB:c.20A>T
		HbSS	Homozigoto - anemia falciforme	18	HBB:c.20A>T
		HbAS/Hb C		9	HBB:c.20A>T + HBB:c.19G>A
		HbAS/Hb D-Los Angeles		2	HBB:c.20A>T + HBB:c.364G>C
		HbAS/Hb Korle Bu		1	HBB:c.20A>T + HBB:c.220G>A
		HbAS/Hb Porto Alegre	Heterozigoto composto - doença falciforme	4	HBB:c.20A>T + HBB:c.29C>G
		HbAS/Hb La Desirade		1	HBB:c.20A>T + HBB:c.389C>T
		HbAS/Hb N-Baltimore		1	HBB:c.20A>T + HBB:c.286A>G
		HbAS/Hb City of Hope		1	HBB:c.20A>T + HBB:c.208G>A
		HbAS/Hb Lepore Boston-Washington		1	HBB:c.20A>T + NG_000007.3:g.63632_71046del
		HbC/Hb Kokura (α)	Heterozigoto composto	1	HBB:c.19G>A + HBA2:c.143A>G
		HbC	Heterozigoto	17	HBB:c.19G>A
		Hb Korle Bu	Heterozigoto	13	HBB:c.220G>A
		Hb D-Los Angeles	Heterozigoto	9	HBB:c.364G>C
		Hb N-Baltimore	Heterozigoto	2	HBB:c.286A>G
		Hb Grange-Blanche	Heterozigoto	2	HBB:c.83C>T
		Hb Porto Alegre	Heterozigoto	1	HBB:c.29C>G
		Hb Haaglanden	Heterozigoto	1	HBB:c.23A>T
		Hb San Bruno	Heterozigoto	1	HBB:c.120G>C
		Hb Deer Lodge	Heterozigoto	1	HBB:c.8A>G
		Hb A2' ou Hb B2	Heterozigoto	1	HBD:c.49G>C
	PHHF PHHF/Beta-talassemia	PHHF tipo 2	δβ0 heterozigoto	1	NC_000011.10:g.5158438_5242749del
		PHHF tipo 1/Codon 39 (C>T)	HbS/δβ0 Heterozigoto composto	1	NC_000011.10:g.5153222_5238138delinsAAAT A
	PHHF/Hb variante β		HbS/δβ0 Heterozigoto composto		HBB:c.20A>T + NC_000011.10:g.5153222_5238138delinsAAAT A
		PHHF tipo 1/HbS	HbS/δβ0 Heterozigoto composto	1	HBB:c.20A>T + NC_000011.10:g.5158438_5242749del
		PHHF tipo 2/HbS	HbS/δβ0 Heterozigoto composto	1	HBB:c.20A>T + NC_000011.10:g.5158438_5242749del
		PHHF tipo 2/HbS	HbS/δβ0 Heterozigoto composto	2	HBB:c.20A>T + NC_000011.10:g.5158438_5242749del
Total				415	

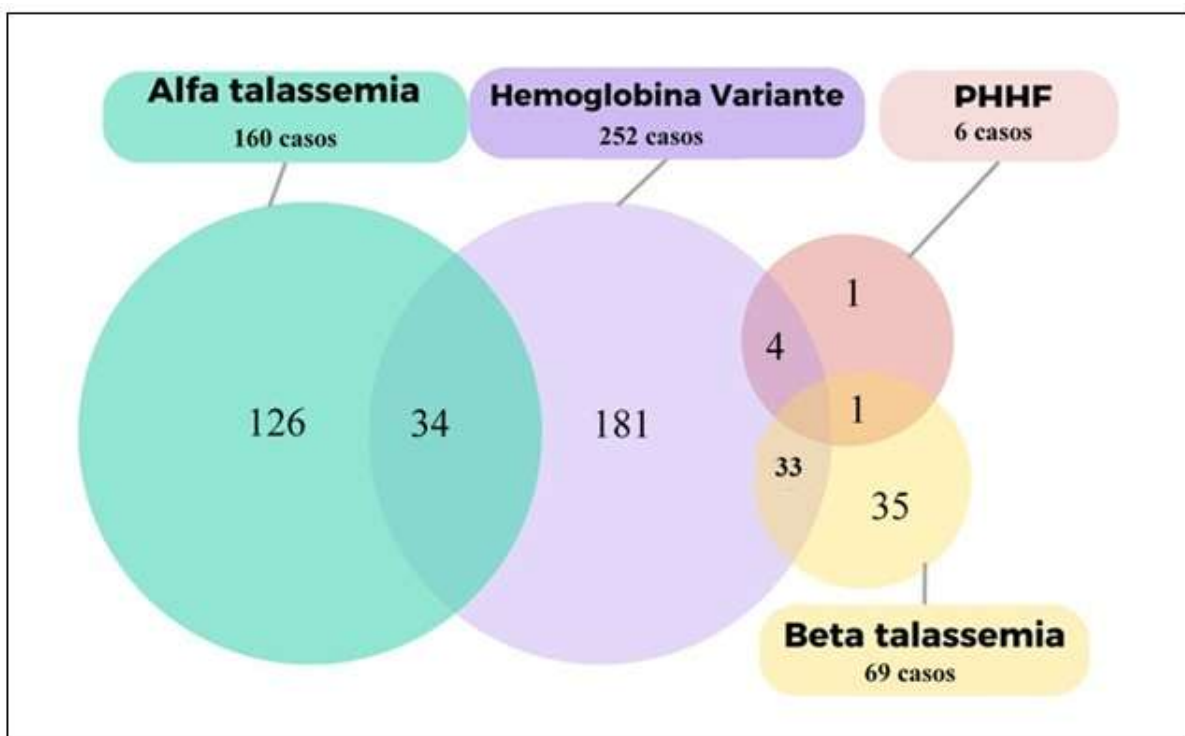


Figura 11. Número de indivíduos caracterizados molecularmente e diagnosticados com α e β -talassemia, Hb variante e Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF), e com co-herança entre eles.

4.3 Alfa-talassemias

A α -talassemia foi confirmada em 160 casos, dos quais 126 possuíam a forma isolada, entre 74 alfa-silenciosas e 52 alfa-traços, distribuídas em 4 genótipos, e 34 possuíam a deleção $-\alpha^{3.7}$ em associação com as hemoglobinas variantes de beta-globina HbS e HbC em heterozigose, com a variante HbS em homozigose, e com as variantes Hb Taybe e Hb Kurosaki de alfa-globina (Tabela 3).

A variante delecional mais comum foi a $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, presente em 72 casos, representando 58,8% do grupo de alfa-talassemias isoladas. Os indivíduos acometidos por essa deleção são considerados portadores silenciosos, sendo geralmente assintomáticos e com poucas alterações hematológicas e/ou laboratoriais. Os parâmetros hematimétricos avaliados nos genótipos de alfa-talassemia encontrados, assim como os valores médios e desvios padrão, são mostrados na tabela 3.

Ao avaliar os valores de referência para cada faixa etária, notou-se que a maioria dos casos positivos possuíam hemoglobina normal (75,7% e média de 12,4 g/dL), além de ferritina, RDW e reticulócitos normais. Já os valores de VCM e HCM

estavam abaixo da normalidade na maior parte dos casos, representando 83,7% e 66,2%, respectivamente. A HbA₂ foi encontrada em dosagens normais em 62,2% dos pacientes, cujo valor médio foi de 2,7%. Ainda que dentro da faixa aceitável de referência (até 3,5%), os valores de HbA₂ tendem a ser menores que 3%, sendo este considerado um parâmetro importante na avaliação de indivíduos com suspeita de α -talassemia.

A deleção $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ foi encontrada em um caso (1,3% do total de casos de alfa-talassemia silenciosa). A variante $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ considerada como α -tal traço, foi detectada em 52 indivíduos, o que corresponde a 41,2% dos casos de alfa-talassemia pura. Parâmetros de RDW, ferritina e reticulócitos foram normais para a maioria dos casos desse grupo. Os pacientes apresentaram anemia em 38,4% dos casos, acentuada microcitose e hipocromia na quase totalidade dos casos. A hemoglobina apresentou um valor médio de 11,4 g/dL, 98% dos pacientes possuíam valores de VCM e HCM abaixo da referência. A deleção em homozigose acarreta em uma acentuada diminuição nos parâmetros de série vermelha. Enquanto o VCM variou entre 58,6 e 83,4 fL nos pacientes heterozigotos para as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$, nos homozigotos variou entre 60,4 e 70,8 fL. Esses resultados mostram que a deleção de dois alelos no gene da α -globina está intimamente relacionada a baixos valores de hemoglobina, VCM e HCM. Muito embora os pacientes sejam normais do ponto de vista clínico, podem se queixar de fraqueza, cansaço, palidez e dores nas pernas (Matos, 2012). Assim como nos portadores silenciosos, a maioria dos pacientes traço α -talassêmicos também apresentou dosagens normais de HbA₂ (48/52), e o valor médio de quantificação foi de 2,7%, um valor considerado baixo, porém dentro do padrão de referência.

O genótipo raro [HBA2:c.69delC p.Glu24SerfsTer26] foi detectado em um indivíduo (1,1%), em heterozigose. Essa microdeleção do tipo frameshift no códon 22 (GGC→GG-) gera um códon prematuro de parada de tradução na posição 48/49, no éxon 2. Acredita-se que o mecanismo de decaimento do mRNA mediado por nonsense (NMD) possa sofrer um efeito negativo com essa variante, uma vez que o códon de parada está localizado mais de 50-54 nucleotídeos a montante da última junção éxon-éxon. Apesar de não afetar o splicing do RNA, o códon prematuro induz uma degradação acelerada de mRNA, levando à produção de uma proteína truncada não funcional (Maquat, 2005). O banco de dados de variantes clínicas a classificou

como patogênica (Varsome Clinical, 2019). Existem poucos relatos na literatura e nos bancos de dados. Um grupo identificou a mesma variante em uma menina hispânica (Luo et al, 2007) e outro avaliou uma menina de origem africana (Francisco et al, 2006), ambas com aspectos clínicos muito parecidos com o nosso caso – 2 anos de idade, leve anemia microcítica e hipocrômica, e nível normal de HbA₂ (Hb 11 g/dL, VCM 66,5 fL, HCM 21,4 pg e HbA₂ 2,6%). Esses fatos sugerem que o nosso estudo tenha sido o primeiro a detectar a variante em questão no Brasil, ou, pelo menos, no Distrito Federal. Nesse caso, a avaliação do núcleo familiar para determinação do padrão de herança e de uma possível variante *de novo* no paciente portador é extremamente importante. Porém, não houve coleta de amostra dos pais para realizar tal investigação.

4.4. Caracterização hematológica e molecular das alfa-talassemias

Uma versão preliminar dos resultados apresentados nesta dissertação resultou em um artigo científico, visto que a caracterização molecular e hematológica das α -talassemias forneceram evidências que fundamentam e enriquecem as discussões apresentadas nesta dissertação.

No grupo de coexistência de alfa-talassemia com variantes estruturais de beta-globina (grupo C), predominou o subgrupo C1 (alfa-sil/HbS), representando 45,2% dos casos (n=14), seguido pelos subgrupos C2 (HbSC/alfa-sil) e C3 (HbSS/alfa-traço), com cinco pacientes cada. As demais associações não foram analisadas estatisticamente devido ao baixo número de casos. Os subgrupos C2 e C3 apresentaram, de forma consistente, microcitose, hipocromia e reticulocitose, sendo observado aumento do RDW em todos os indivíduos do C3. De modo geral, microcitose e hipocromia foram as alterações mais frequentes, presentes em mais de 80% dos pacientes em todos os grupos. Os reticulócitos mantiveram-se normais na maioria dos casos dos grupos A e B, enquanto se mostraram elevados nos subgrupos C2 e C3. O RDW permaneceu, em sua maioria, dentro da normalidade no grupo B, porém elevado em todos os indivíduos do C3. Quanto ao perfil hemoglobínico, os grupos A e B apresentaram níveis médios normais de HbA₂ e HbF. No grupo C, observou-se elevação concomitante dessas frações em 58% dos casos, com variação de HbA₂ entre 2,4% e 5,8% e de HbF entre 0% e 33%. Destaca-se que a presença de HbS pode interferir na quantificação de HbA₂ por HPLC, devendo ser considerada na

interpretação dos resultados. De acordo com as variáveis hematológicas avaliadas observou-se que o diagnóstico de α -talassemia foi significativamente associado à VCM e HCM baixos, e à HbA, HbA₂ e HbF normais.

Para avaliar o impacto da co-herança de alfa-talassemia com variantes estruturais de beta-globina, comparações pareadas foram realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney. O grupo A, composto por indivíduos com alfa-silenciosa isolada, foi comparado com os grupos C1 (alfa-silenciosa/HbS) e C2 (alfa-silenciosa/HbSC). Por sua vez, os grupos C1 e C2 foram comparados com os grupos D1 e D2, que incluem casos de variantes isoladas de beta-globina. Especificamente, as comparações foram entre C1 e D1 (alfa-silenciosa/HbS versus HbS) e C2 e D2 (alfa-silenciosa/HbSC versus HbSC).

Indivíduos com HbSC co-herdada com α -talassemia silenciosa (Grupo C2) apresentaram VCM mediano mais baixo em comparação com aqueles com α -talassemia isolada (Grupo A) ($p = 0,0033$, Figura 12A), sugerindo um perfil microcítico mais pronunciado. Da mesma forma, indivíduos com HbS isolada (Grupo D1) apresentaram valores de VCM mais altos do que aqueles com HbS co-herdada e α -talassemia silenciosa (Grupo C1) ($p = 0,0097$), indicando que a presença de α -talassemia pode estar associada à redução do volume eritrocitário neste contexto. Além das alterações nos índices eritrocitários, o Grupo C2 exibiu contagens de reticulócitos mais altas em comparação com o Grupo A ($p < 0,001$) (Figura 12B), juntamente com aumento do RDW ($p = 0,0098$), refletindo maior atividade eritropoiética e anisocitose (Figura 12C). A análise dos níveis de HbF mostrou que o Grupo C1 apresentou valores medianos mais elevados e maior dispersão em comparação com o Grupo A ($p = 0,0037$) (Figura 12D). No entanto, quando comparados a indivíduos com HbS isolada (Grupo D1), os níveis de HbF foram menores no Grupo C1 ($p = 0,0098$). De modo geral, esses achados sugerem que a co-herança de α -talassemia com variantes de β -globina pode influenciar os parâmetros hematimétricos e as frações de hemoglobina, embora a magnitude e a direção desses efeitos pareçam variar de acordo com as combinações genótípicas específicas.

Para avaliar o impacto da deficiência de ferro (ferritina < 30 ng/mL), os indivíduos foram comparados dentro de cada grupo genotípico. No Grupo A, a deficiência de ferro foi associada a um VCM menor em comparação com indivíduos com reservas normais de ferro ($p = 0,0171$, Figura 13A). Em contraste, no Grupo B,

observou-se apenas uma sutil alteração adicional na distribuição do VCM. No Grupo C1, observou-se maior dispersão dos valores de VCM, sugerindo variabilidade na resposta celular na presença de HbS. Para o HCM (Figura 13B), o Grupo A também apresentou valores mais baixos em indivíduos com deficiência de ferro ($p = 0,0188$), com a mediana diminuindo de aproximadamente 25 pg para 22 pg.

A coexistência da HbS com alfa-talassemia não é incomum, estando presente em aproximadamente 20% da população falcêmica (Neto e Pitombeira, 2003; Tadmouri et al., 2006). Tal associação tem revelado evidências de atenuação do quadro clínico do portador da interação, quando comparado com a anemia falciforme isoladamente (Thomas et al., 1997). Os pacientes com α -tal/HbSS tendem a apresentar melhor prognóstico, pois relatos da literatura sugerem que a alfa-talassemia interfere no curso clínico dos pacientes com Doença Falciforme ao modificar as características clínicas e hematológicas da hemoglobina S, através da inibição da polimerização intracelular, diminuição da intensidade de hemólise e conseqüentemente, a diminuição da anemia hemolítica (Tome-Alves et al., 2000). Algumas alterações laboratoriais foram apontadas em pacientes com essa associação, como aumento do número de hemácias, dos níveis de hemoglobina total e hematócrito, e diminuição dos níveis de VCM, HCM e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Nagel, 1991; Weatherall & Wainscoat, 1985). Com exceção da hemoglobina, os dois pacientes com anemia falciforme e traço α detectados no presente estudo, apresentaram um perfil hematológico parecido com o citado acima, com valores VCM e HCM abaixo da referência e níveis aumentados de HbA2 (maior que 5%) e HbF (maior que 8%). Em estudo realizado em 50 pacientes do Hemocentro regional de Montes Claros, em Minas Gerais, foi encontrada uma prevalência de 30% de α -tal em indivíduos com anemia falciforme. Não foi houve associação estatística entre a presença de α -tal isolada e eventos clínicos como infecção, internação, crise álgica, sequestro esplênico, esplenectomia, transfusão sanguínea e acidente vascular cerebral (AVC). Entretanto, nos pacientes que apresentavam as duas condições, a frequência de crises álgicas, esplenectomia e AVC foi significativamente menor (Soares et al, 2018).

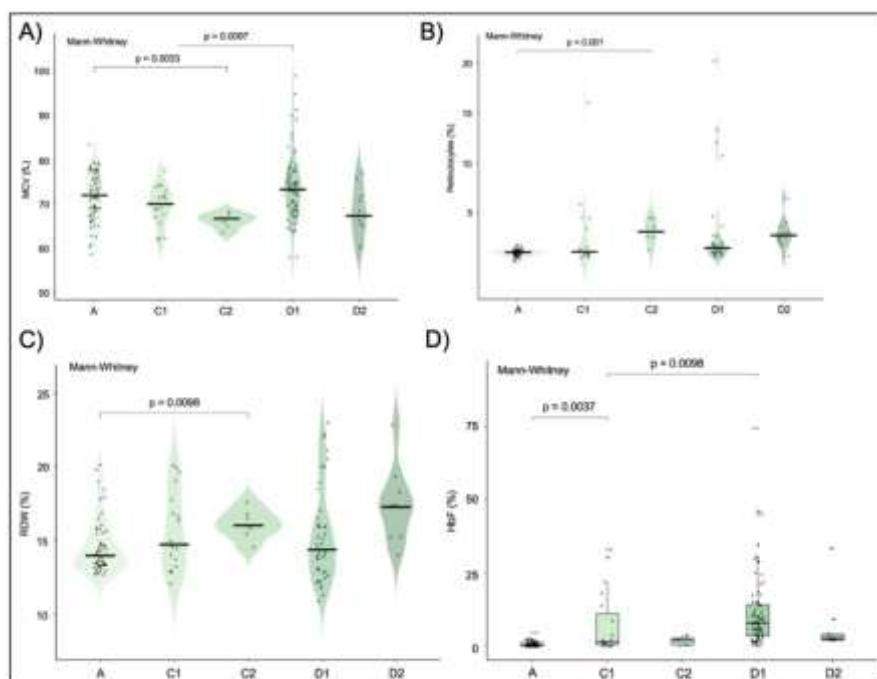


Figura 12. Comparação entre os grupos A, C1, C2, D1 e D2 em relação aos parâmetros hematológicos VCM (12A), reticulócitos (12B), RDW (12C) e HbF (12D), utilizando o teste de Mann-Whitney. O “n” avaliado para cada grupo variou entre os gráficos devido à indisponibilidade de dados quantitativos para certos parâmetros.

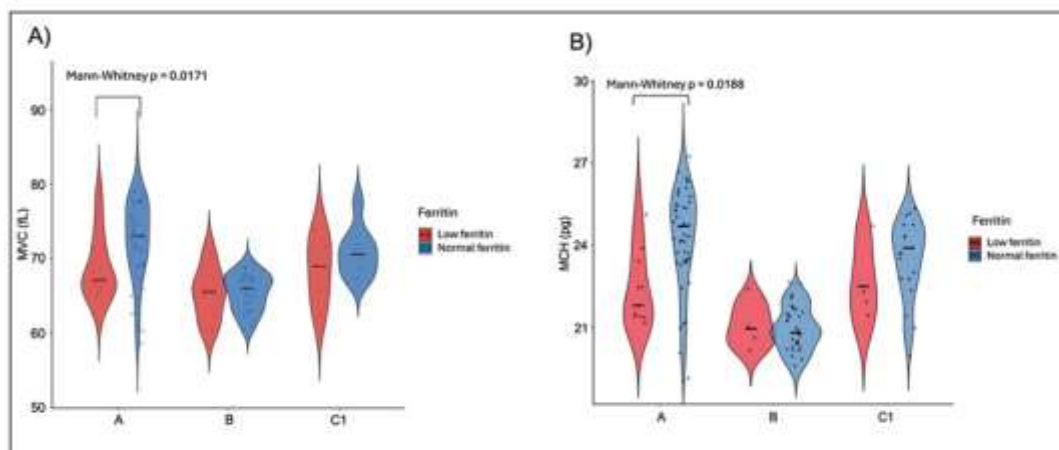


Figura 13. Impacto do estado do ferro (ferritina < 30 ng/mL, vermelho; ≥ 30 ng/mL, azul) no VCM (13A) e no HCM (13B) dos genótipos A (alfa-silencioso), B (traço alfa) e C1 (HbS/alfa-silencioso). As linhas horizontais indicam as medianas. As diferenças estatísticas intragrupo foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney.

Os resultados deste estudo ampliam o conhecimento sobre a α -talassemia em uma coorte pediátrica brasileira ao integrar informações moleculares, hematológicas e relacionadas ao metabolismo do ferro. A predominância da deleção $-\alpha 3.7$, observada em 95,7% dos portadores silenciosos, é consistente com estudos

brasileiros anteriores e reforça sua importante contribuição para a carga da α -talassemia no país, provavelmente refletindo miscigenação histórica e ancestralidade africana doença (Wenning et al., 2000; Wenning et al., 2002; Wagner et al., 2009; Wagner et al., 2012).

Adicionalmente, a identificação da variante rara não deletional *HBA2.69delC* reforça a heterogeneidade molecular da doença e demonstra que abordagens baseadas exclusivamente em métodos fenotípicos podem ser insuficientes. Nesse contexto, a utilização de técnicas moleculares mostra-se fundamental para a caracterização precisa dos casos, especialmente diante de perfis laboratoriais atípicos ou inconclusivos (Hamid et al., 2022). Os achados hematológicos observados foram compatíveis com um gradiente de expressão fenotípica relacionado à perda de genes da α -globina. Indivíduos com traço de α -talassemia apresentaram microcitose e hipocromia mais acentuadas que os portadores silenciosos, reforçando o efeito da dosagem gênica sobre os índices eritrocitários. Além disso, a deficiência de ferro esteve associada a reduções adicionais no VCM e no HCM, especialmente entre os portadores silenciosos, evidenciando a interação entre o estado do ferro e o genótipo. Esses resultados destacam a importância da interpretação integrada dos parâmetros hematimétricos, do metabolismo do ferro e dos achados moleculares para uma caracterização mais precisa da α -talassemia (Wagner et al., 2012).

A análise da co-herança com variantes da β -globina evidenciou interações fenotípicas relevantes. A associação com HbSC apresentou microcitose mais homogênea, aumento do RDW e reticulocitose, compatíveis com hemólise crônica compensada. Além disso, diferenças nos níveis de HbF observadas em indivíduos com HbS sugerem um possível efeito modulador da α -talassemia sobre a composição da hemoglobina, potencialmente contribuindo para a redução da falcização, conforme descrito na literatura (Weatherall et al., 2001).

4.5 Beta-talassemias

Dos 415 casos genotipados, 69 apresentaram variante no gene da beta-globina, dos quais 35 foram diagnosticados com β -talassemia pura, representando 50,7% do total, 33 com β -talassemia associada à hemoglobina variante (47,8%), e um caso associada à PHHF tipo 1 (persistência hereditária da hemoglobina fetal). A variante *HBB:c.92+6T>C* em heterozigose foi a mais frequente, sendo detectada em

7 pacientes (10,2%). De origem Portuguesa, é uma das responsáveis pela quase totalidade dos casos nas regiões Nordeste (Araújo et al, 2003), Sul e Sudeste do Brasil (Wenning & Sonati, 2007; Carrocini et al, 2017). Os indivíduos que possuem essa variante são considerados portadores do traço talassêmico β , cujo genótipo é representado por β^+ , e apresentam características clínicas e laboratoriais leves ou intermediárias (Araújo et al, 2003). A mesma variante foi encontrada em homozigose (β^+/β^+) em 2,9% dos casos (2 indivíduos) e em dupla heterozigose em associação com as variantes HBB:c.93-21G>A (2,9%), HBB:c.92+1G>A (2,9%), HBB:c.-138C>T (1,5%) e HBB:c.118C>T (1,5%). A variante HBB:c.118C>T, característica de β^0 foi a segunda mais frequente, encontrada tanto em heterozigose (6 casos), quanto em homozigose (2 casos). É uma variante do tipo nonsense no códon 39, em que a troca de um nucleotídeo por outro resulta em um stop códon prematuro (CAG>TAG). Estudos moleculares realizados na região Sudeste do Brasil mostraram uma prevalência de 47-54%, levando a um fenótipo grave de talassemia β^0 (Costa et al, 1990; Fonseca et al, 1998). Acredita-se que essa e outras variantes tenham sido introduzidas no Sul e Sudeste devido a imigração massiva de cerca de 5 milhões de europeus, em boa parte italianos, entre os anos de 1870 e 1953 (Ribeiro, 1995). Estudos evidenciaram uma alta prevalência desta variante na Bacia do Mediterrâneo, em lugares como Sardenha, Espanha e Portugal (Rosatelli et al, 1992; Villegas et al, 2001; Faustino et al, 1999).

A alteração em questão foi encontrada também em dupla heterozigose com a variante transcricional HBB:c.-138C>T (um caso) a qual é originária da África Subsaariana e representa, portanto, uma contribuição africana na formação da população estudada. Essa variante já foi identificada no Norte do Brasil, em estudo que avaliou o espectro de variantes de β -talassemia em 37 indivíduos, cuja frequência foi de 16,8% (Silva et al, 2015).

Outra variante frequente no Brasil, e a terceira mais comum nos indivíduos avaliados foi a HBB:c.92+5G>C, que constitui genótipo β^+ e foi detectada em heterozigose em um indivíduo (1,5%), e em homozigose em outro (1,5%). A troca de um “G” por um “T” no nucleotídeo 5 de IVS-I reduz consideravelmente a eficiência de splicing do sítio de splicing 5', e resulta em uma classificação clínica de β -tal minor (HbVar database). Estudo realizado em Pernambuco encontrou uma frequência de 9,3% dessa variante, em 60 pacientes avaliados. Acredita-se que a mesma tenha sido incorporada pelos portugueses do subcontinente indiano, sendo de origem indiana-

asiática (Araújo et al, 2003).

O perfil de variantes mais comuns encontradas na coorte de pacientes atendidos no HCB é parecido com o relatado em outras regiões do Brasil. A diferença está na prevalência, uma vez que a heterogeneidade da distribuição geográfica está relacionada com a ancestralidade. A Figura 14 apresenta a distribuição geográfica das principais variantes associadas às β -talassemias no Brasil, evidenciando diferenças regionais relacionadas à formação histórica e genética da população brasileira.

Enquanto no Sudeste e Sul, a variante nonsense HBB: c.118C > T é a mais prevalente, seguida de HBB: c.93-21G > A, no Nordeste, HBB: c.92 + 6T > C foi considerada a mais comum, seguida de HBB: c.92 + 1G > A. Apesar das populações brasileiras representarem origens genéticas semelhantes (europeu, africano, ameríndio), elas têm proporções de mistura ligeiramente diferentes, o que caracteriza a heterogeneidade das variantes. Sendo assim, a ascendência europeia ocorre em todas as populações urbanas, porém é maior no sul e sudeste, enquanto a ascendência africana é maior no nordeste e centro-oeste. A ascendência ameríndia nativa é maior no norte, sendo mais prevalente que a africana (Rodrigues de Moura et al, 2015).

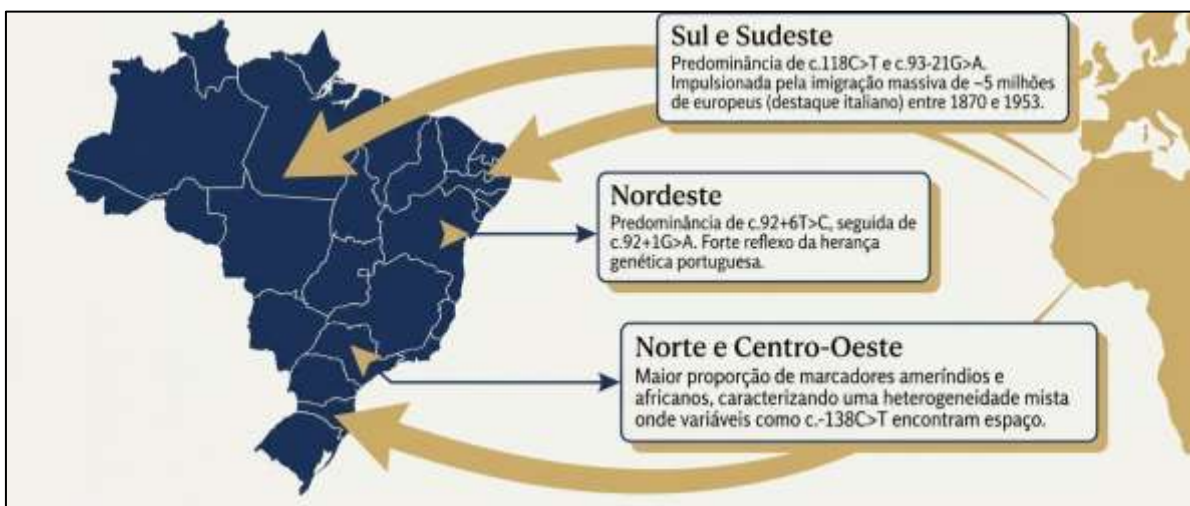


Figura 14. Distribuição regional das principais variantes genéticas associadas às β -talassemias no Brasil, evidenciando a influência dos processos migratórios e da composição étnica da população. Nas regiões Sul e Sudeste, observa-se predominância das variantes c.118C>T e c.93-21G>A, associadas à imigração europeia, especialmente italiana. No Nordeste, destacam-se as variantes c.92+6T>C e c.92+1G>A, refletindo a contribuição genética portuguesa. Já nas regiões Norte e Centro-Oeste, verifica-se maior heterogeneidade genética, decorrente da miscigenação entre populações ameríndias, africanas e europeias.

A variante HBB:c.91A>C é uma forma rara de β -talassemia, causada pela troca de uma única base no códon 30 do éxon 1 (AGG→CGG). Apesar de constar no banco de dados, pode ser considerada uma variante mundialmente rara, uma vez que existem pouquíssimos relatos a seu respeito. Embora essa variante não provoque a mudança de aminoácido (p.Arg30=), altera a sequência imediatamente a montante da junção 5' de splicing do primeiro íntron, partindo da sequência doadora consenso na qual um "A" é geralmente encontrado na posição 2 (Krawczak et al, 1992).

Waye et al, (2002), apresentaram o primeiro relato dessa alteração e o segundo relato de uma variante no sítio de splice de β -talassemia em IVS-I (- 2), detectada em uma paciente canadense com 20 anos de idade e de origem étnica incerta, que apresentava índices consistentes com o traço beta talassêmico e HbA2 elevada, sem a presença de variante associada. O indivíduo identificado em nosso estudo como portador dessa variante pertence ao sexo masculino, possui 16 anos, anemia (11g/L), microcitose (VCM=71fl), hipocromia (HCM=22,7pg) e HbA2 elevada (4,5%), sugerindo uma variante associada a um fenótipo β , apesar da gravidade não ter sido ainda totalmente esclarecida. Outra alteração rara detectada foi a HBB:c.-79A>G, encontrada em uma menina de 8 anos (2,6%), sendo associada a um fenótipo leve de β^+ talassemia. Essa variante é causada por uma variante no promotor do gene, na região 5'UTR proximal altamente conservada ("TATA" box), e estudos funcionais demonstraram uma redução da produção do mRNA da β -globina. Essa variante tem origem africana, assim como a variante HBB:c.-138C>T (Antonarakis et al, 1984).

Dos 33 casos de coerância de β -talassemia com hemoglobina variante, 8 apresentaram variantes combinadas com a hemoglobina C, sendo 7 com genótipo C/ β^+ e 1 com C/ β^0 , e 25 apresentaram variantes associadas à hemoglobina S, sendo 17 com genótipo S/ β^+ e 8 com S/ β^0 . A variante HBB:c.92+6T>C apresentou a maior frequência de associação tanto com a HbC (3 indivíduos), quanto com a HbS (6 indivíduos). Em relação às beta-talassemias associadas à hemoglobina S (genótipo S/ β^0), a HBB:c.118C>T foi encontrada em 4 casos (5,8%), seguida de HBB c.20delAfs* (1,5%), HBB:c.48G>A (1,5%), HBB:c.20del p.Glu7Glyfs*13 (1,5%) e HBB:c.143_144insA (1,5%). Em relação ao genótipo S/ β^+ , a alteração associada mais frequente foi HBB:c.-138C>T, seguida de HBB:c.-151C>T, HBB:c.-79A>G, e HBB:c.-78A>C. O perfil hematológico e de hemoglobinas dos pacientes diagnosticados com β -talassemia foram, em geral, associados à presença de anemia, microcitose, hipocromia, e níveis aumentados de HbA2 (>3,5%) e de HbF. Dos 35 casos de β -

talassemia isolada contendo os genótipos β^0 ou β^+ , 22 eram heterozigotos, 7 eram heterozigoto compostos e 6 eram homozigotos.

Todos os heterozigotos apresentaram Hb normal, porém valores de VCM e HCM consideravelmente abaixo da normalidade. Os pacientes heterozigoto compostos e os homozigotos apresentaram alterações praticamente iguais em relação a níveis baixos de Hb e VCM. Todos continham anemia acentuada, cuja média de Hb foi em torno de 10,4 g/L, e em 80% destes casos foi observada discretas microcitose e hipocromia, com valor médio de 65,5 fL e 21,5 pg, respectivamente. A HbA2 esteve aumentada em todos os casos de beta talassemia pura, variando entre 3,7 e 6,8%. Já a HbF esteve aumentada em mais de 50% dos casos.

Apesar de sua heterogeneidade genética, os portadores de β -talassemia têm uma condição consistente de níveis elevados de HbA2, sendo, portanto, considerado um marcador confiável para triagem e diagnóstico da doença (Joutovsky et al., 2004). O nível de HbA2 pode ser falsamente normal com as manifestações mais leves da doença, como β^+ -talassemia, δ -talassemia e co-herança de β^+ - e δ -talassemia e na presença de anemia ferropriva grave (Cao & Galanello, 2010). As formas de manifestação clínica e gravidade estão relacionadas às diferentes variantes e seus efeitos na zigosidade (número de cópias) que resultam na redução da síntese de cadeias de β globina, em alterações na séria vermelha e nas dosagens das hemoglobinas. Além disso, a idade, o gênero, e fatores ambientais atuam como modificadores importantes do quadro clínico da doença (Shang & Xu, 2017).

4.6 Hemoglobinas variantes

Dos 415 pacientes, 181 apresentaram uma hemoglobina variante ou duas de forma concomitante, representando quase a metade do total avaliado (43,6%), e 71 apresentaram variantes associadas com: α -talassemia (n=34), β -talassemia (n=33) e PHHF (n=4). Em 181 indivíduos foram detectadas 19 hemoglobinas variantes diferentes, sendo 4 de cadeia alfa e 15 de cadeia beta, algumas destas últimas concomitantemente associadas (tabela 2).

A variante mais prevalente foi a HbS em heterozigose, detectada em 84 pacientes, correspondendo a 46% da totalidade de variantes encontradas. A HbS em homozigose, causadora da anemia falciforme, foi detectada em 18 pacientes. A mesma também foi identificada concomitantemente com as variantes estruturais Hb Porto Alegre (n=4), Hb C (n=9), Hb D-Los Angeles (n=2), Hb Korle Bu (n=1), Hb City

of Hope (n=1), Hb N-Baltimore (n=1) , Hb La- Desirade (1 caso), Lepore Boston-Washington (n=1) e Hb de cadeia alfa (Hb Kokura=1). A Figura 15 apresenta a distribuição das hemoglobinas variantes identificadas no estudo e as associações com outras variantes estruturais das cadeias α e β -globínicas.

A coexistência entre a HbS e essas diferentes hemoglobinas variantes resultou em nível aumentado de HbA₂ em 60% dos pacientes (12/20). Por outro lado, foram raros os indivíduos que apresentaram alterações como anemia, microcitose ou hipocromia.

Já era esperado encontrar uma alta prevalência do traço falciforme na população avaliada, em função da HbS ser amplamente distribuída pelo Brasil. Seu estabelecimento na população brasileira ocorreu devido à colonização de escravos portugueses e africanos entre os séculos XVI e XIX, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. A dispersão da HbS é uma consequência da miscigenação racial ocasionada pelos fluxos migratórios, tanto de imigrantes, quanto entre as populações dos diferentes estados brasileiros (Soares et al, 2017). Hoje, o Brasil é o país da América Latina que tem a maior população afro-americana e as maiores estimativas populacionais para anemia falciforme, acometendo 1 em cada 1.000 recém-nascidos (Huttle et al., 2015). As migrações populacionais continuam acontecendo em outros países da América Latina, principalmente vindos da região africana, e o número de portadores de HbS tende a aumentar devido à falta de programas abrangentes de triagem na maioria desses países (Piel et al., 2000). O início da construção de Brasília, em 1956, atraiu milhares de trabalhadores de outras regiões do país, principalmente Nordeste e Goiás. Acredita-se que a HbS tenha sido inserida através do fluxo migratório intenso e contínuo de nordestinos, cuja descendência é essencialmente africana. Análise feita em 2011 pela Companhia de Planejamento do Distrito Federal (Codeplan), de acordo com a Pesquisa Distrital por Amostra de Domicílios do Distrito Federal (PDAD), apontou que 51,8% da população brasiliense era formada por imigrantes e, desses, 51,1% eram oriundos da região Nordeste. Mais de 75% dos brasilienses “nordestinos” são originários de quatro estados: Bahia (21,7%), Piauí (21,2%), Maranhão (18,2%) e Ceará (14,7%). Na sequência, têm os oriundos da Paraíba (10,3%), Pernambuco (7,2%), Rio Grande do Norte (4,7%), Alagoas (1,0%) e Sergipe (0,9%). Esses dados explicam a alta frequência do traço falciforme encontrada no presente estudo. Pesquisa realizada em 2014, também pela Codeplan, por meio da Diretoria de Estudos e Políticas Sociais, avaliou a população negra por

região administrativa, extraído do Censo Demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010). Foi constatado que a população negra do Distrito Federal ultrapassa 56% do total de moradores, que se concentra nas regiões administrativas SCIA/Estrutural, Fercal, São Sebastião e Varjão, locais em que os rendimentos são baixos e as condições de moradia são precárias (Codeplan, 2014). Diante disso, o acesso à informação acerca da gravidade das hemoglobinopatias, dos programas de triagem, tratamento e conscientização sobre estratégias de prevenção tornam-se prejudicados nessas regiões, contribuindo para a alta prevalência de hemoglobinas variantes.

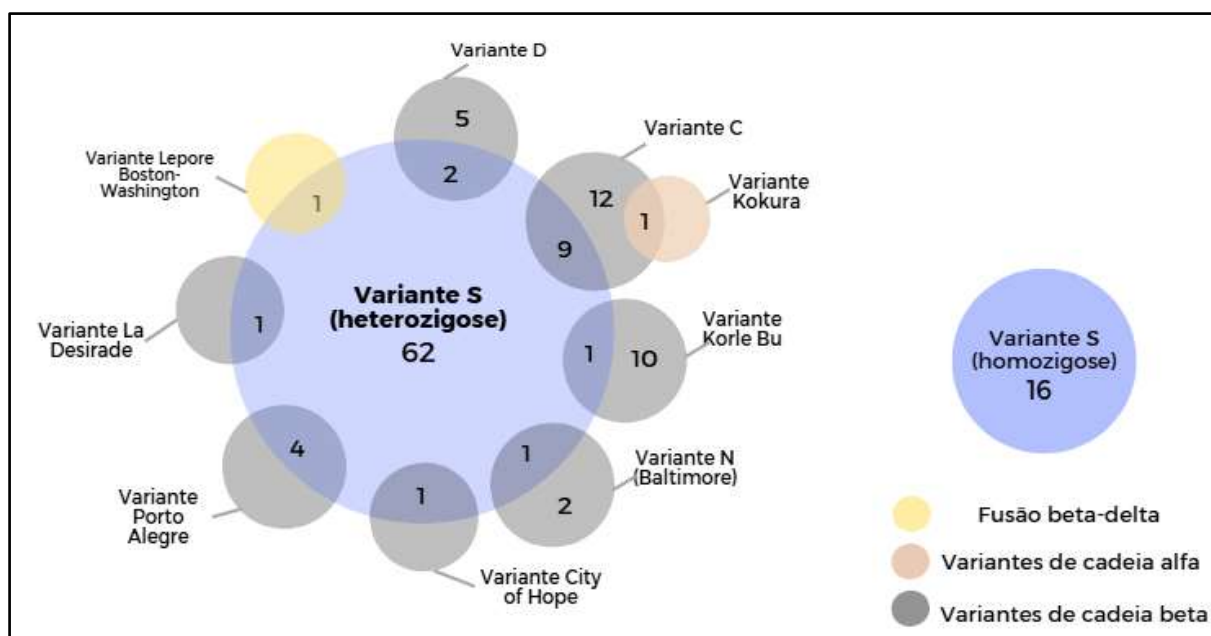


Figura 15. Distribuição das hemoglobinas variantes identificadas na coorte estudada. A variante S em heterozigose foi a alteração mais frequente (n=62), seguida pela variante S em homozigose (n=16). Também foram observadas associações entre a HbS e outras variantes estruturais das cadeias β -globina, incluindo HbC, HbD, Hb Korle-Bu, Hb N-Baltimore, Hb City of Hope, Hb Porto Alegre e Hb La Desirade, além da variante de cadeia α Hb Kokura e da hemoglobina de fusão $\beta\delta$ Hb Lepore Boston-Washington. Os números representam a frequência de cada variante ou associação identificada.

A segunda variante mais prevalente foi a HbC em heterozigose, presente em 17 indivíduos e correspondendo a 9,4% dos casos portadores. De forma similar à HbS, essa variante está presente na cadeia da beta-globina e é provocada pela substituição do ácido glutâmico pela lisina na sexta posição da cadeia. A HbC é a segunda variante de hemoglobina mais estudada, encontrada predominantemente em negros, mas

também relatada em outros grupos raciais e/ou étnicos (Giardine et al., 2014). É considerada benigna e os pacientes acometidos pelo traço (em heterozigose) não sofrem crises graves como na anemia falciforme, já que a falcização não faz parte de sua fisiopatologia. Já os pacientes com a HbC em homozigose podem apresentar anemia hemolítica crônica (Piel et al., 2013). As principais alterações hematológicas observadas nos pacientes identificados pelo presente estudo foram microcitose e HbA2 aumentada.

Em terceiro lugar ficou a Hb Korle Bu em heterozigose, com 13 indivíduos afetados, representando 7,2% dos 181 casos de variantes identificadas. A variante em heterozigose referente à Hb D-Los Angeles foi detectada em 9 pacientes, representado 5,0% dos achados de variantes (tabela 2).

Em relação às variantes de cadeia alfa, a Hb Stanleyville-II, Hb G-Philadelphia e a Hb Kurosaki foram identificadas em heterozigose em 3, 2 e 4 indivíduos, respectivamente. Ademais, a Hb Kokura foi detectada em um paciente, em coerância com a HbC, de cadeia beta. Juntamente com a Kurosaki, constituem variantes de origem asiática, consideradas raras no Brasil (Harano et al., 1995; Ohba et al., 1980). Acredita-se que essa e outras hemoglobinas inusitadas presentes em indivíduos nascidos no Distrito Federal e entorno, sejam um reflexo da grande miscigenação oriunda de migrações populacionais de vários países que contribuíram para a formação de diferentes grupos etiológicos no Distrito Federal, sobretudo os asiáticos (China, Japão, Coreia).

A Hb Kurosaki já foi encontrada no Brasil, em um estudo retrospectivo que descreveu variantes raras no gene da alfa-globina em uma amostra representativa da população do Sudeste brasileiro. Foram detectadas vinte e duas variantes raras em 111 indivíduos de 92 famílias diferentes, e a Hb Kurosaki foi identificada em 3 casos (Kimura et al., 2015). Com exceção da presença de hemoglobina anômala na eletroforese capilar, os portadores dessa variante não apresentaram alterações hematológicas significativas, nem tampouco manifestações clínicas relevantes, tanto no presente estudo, quanto no citado acima. A Hb Kokura resultou em alguns achados hematológicos alterados, como microcitose e dosagem alta de hemoglobina A₂ e fetal, o que pode ser explicado pelo fato de estarem associadas à variante de beta-globina (HbC).

De maneira inédita, foi identificada uma variante em *HBA1* decorrente de uma duplicação em um recém-nascido encaminhado pela triagem neonatal do DF. A

variante é denominada *HBA1:c.198_209dup* (NM_000558.5), predita como p.Leu67_Ala70dup e foi identificada em heterozigose em uma criança do sexo feminino com 5 meses de idade, encaminhada pela triagem neonatal como FAVar, com 10,8% de variante não identificada, sem repercussões clínicas e hematimétricas evidentes até o momento. Como mostrado na figura 16, trata-se de uma duplicação *in-frame* de 12 pares de bases no éxon 2 de *HBA1*, resultando na duplicação de quatro aminoácidos na cadeia alfa-globina, alteração potencialmente capaz de interferir na estabilidade molecular ou na interação entre cadeias globínicas, embora ainda sem demonstração funcional direta. A investigação em bancos de dados mostrou ausência de registro da variante em bases especializadas para hemoglobinopatias, como HbVar e LOVD do Globin Gene Server, embora ela esteja presente em repositórios gerais, como o ClinGen Allele Registry (CA232865), o dbSNP (rs34277525) e o ClinVar, onde corresponde ao Variation ID 143223 e ao acesso VCV000143223.2, sem classificação depositada.



Figura 16. Eletroferograma obtido por sequenciamento de Sanger evidenciando a variante gerada por duplicação de 12 pares de bases no éxon 2 do gene da alfa-globina *HBA1*.

À luz dos critérios ACMG/AMP, essa classificação é sustentada principalmente pelo critério PM2, em razão de sua ausência ou frequência extremamente baixa em bases populacionais amplas, por PM4, por se tratar de uma duplicação *in-frame* com alteração do comprimento proteico em região não repetitiva, e por PP3, considerando a plausibilidade de impacto sobre o produto gênico e o contexto molecular em que a variante foi detectada. Por outro lado, a ausência de estudos funcionais, de dados de segregação familiar e de caracterização bioquímica, morfológica ou clínica detalhada

impede, até o momento, uma reclassificação mais robusta.

Nesse contexto, a caracterização sistemática dessa alteração representa uma perspectiva do nosso grupo de pesquisa, com potencial para esclarecer seu real impacto biológico e clínico, refinar sua interpretação em hemoglobinopatias e, eventualmente, subsidiar sua futura proposição como variante “Brasília”, caso sua relevância e singularidade sejam confirmadas.

Os dados encontrados nesse estudo mostram uma expressiva variabilidade de hemoglobinas e uma grande diversidade racial presente em indivíduos nascidos no Distrito Federal e entorno, sendo considerada uma população heterogênea constituída de indivíduos de diversas regiões brasileiras, com descendência africana, asiática, italiana, ameríndia, espanhola e portuguesa.

5 Conclusões

A implementação de um fluxo diagnóstico estruturado para hemoglobinopatias é essencial para garantir maior precisão, oportunidade diagnóstica e uso racional de recursos ao longo da linha de cuidado. Embora métodos hematimétricos e eletroforéticos sejam fundamentais na triagem, apresentam limitações na identificação de genótipos complexos e variantes raras, tornando necessária a incorporação de técnicas moleculares como etapa confirmatória para definição diagnóstica definitiva.

Neste estudo, o algoritmo proposto, ao integrar de forma escalonada abordagens fenotípicas e moleculares, demonstrou elevada resolutividade diagnóstica, uma vez que possibilitou o esclarecimento definitivo de 85% dos casos avaliados. Essa estratégia não apenas aumentou a acurácia na identificação das alterações genéticas, como também contribuiu para decisões clínicas mais assertivas, considerando a variabilidade de prognóstico entre os diferentes genótipos. Além disso, a adoção de um fluxo racional permitiu evitar exames desnecessários, otimizar recursos laboratoriais e favorecer a integração entre triagem, diagnóstico e acompanhamento clínico.

Em relação à abordagem das alfa-talassemias, de forma geral os resultados evidenciam a complexidade da expressão heterogênea da α -talassemia, sobretudo no Brasil, e reforçam a importância de uma abordagem diagnóstica integrada, que associe parâmetros hematimétricos, avaliação do metabolismo do ferro e análise molecular. Essa estratégia amplia a precisão diagnóstica, reduz o risco de exames redundantes e condutas inadequadas, como a suplementação desnecessária de ferro,

e contribui para um aconselhamento genético mais acurado.

A implementação de protocolos de análise molecular voltados à detecção precoce de hemoglobinopatias, incluindo doença falciforme e talassemias, mostrou-se viável no contexto do SUS. A aplicação dessas estratégias possibilitou a identificação de variantes com impacto clínico relevante, inclusive variantes ainda não descritas, ampliando o conhecimento sobre o perfil genético da população estudada. Assim, os achados reforçam a importância de modelos diagnósticos integrados, capazes de aprimorar a acurácia, apoiar o aconselhamento genético e contribuir para uma melhor compreensão epidemiológica das hemoglobinopatias em populações altamente miscigenadas.

6 Referências Bibliográficas

AGUILAR MARTINEZ, P. et al. Haemoglobinopathies in Europe: health & migration policy perspectives. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 9, p. 1–7, 2014.

AHMED, M. H.; GHATGE, M. S.; SAFO, M. K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcellular Biochemistry*, v. 94, p. 345–382, 2020.

AKINSHEYE, I. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*, v. 118, n. 1, p. 19-27, 2011.

ANSARI, S. H. et al. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for transfusion-dependent β -thalassaemia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 3, CD012064, 16 mar. 2019.

ANTONARAKIS, S. E. et al. b-Thalassemia in American Blacks: Novel mutations in the “TATA” box and an acceptor splice site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 81, n. 4, p. 1154–1158, 1984.

ARAÚJO, A. S. et al. A different molecular pattern of betathalassemia mutations in northeast Brazil. *Hemoglobin*, v. 27, p. 2117, 2003.

ASADOV, C. et al. beta-Thalassemia intermedia: a comprehensive overview and novel approaches. *International Journal of Hematology*, v. 108, n. 1, p. 5-21, 2018.

BACKES, C. E. et al. Triagem neonatal como um problema de saúde pública. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 27, p. 43-47, 2005.

BAIN, B. J. *Haemoglobinopathy Diagnosis*. 2. ed. [S.l.]: Blackwell Publishing, 2001.

BAIN, B. J.; BATES, I.; LAFFAN, M. A. *Dacie and Lewis practical haematology*. 12. ed. Philadelphia: Elsevier, 2017.

BARRETT, A. N.; SAMINATHAN, R.; CHOOLANI, M. *Thalassaemia screening and*

confirmation of carriers in parents. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 39, p. 27–40, nov. 2017.

BRANCALEONI, V. et al. Laboratory diagnosis of thalassemia. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 38, suppl 1, p. 32-40, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença falciforme: condutas básicas para tratamento. 1. ed., 1. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 64 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença falciforme: diretrizes básicas da linha de cuidado. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 82 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Orientações para diagnóstico e tratamento das Talassemias Beta. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas: anemia por deficiência de ferro – relatório técnico. Brasília: Ministério da Saúde, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Consenso brasileiro sobre atividades esportivas e militares e herança falciforme no Brasil – 2007. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009. 36 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias [recurso eletrônico]. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. 124 p.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Thalassemia screening in Brazil: results for 20 years. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, n. 4, p. 288-289, 2004.

CAO, A.; GALANELLO, R. Beta-thalassemia. *Genetics in Medicine*, v. 12, p. 61-76, fev. 2010.

CAPPELLINI, M. D. et al. Guidelines for the Management of Transfusion Dependent

Thalassaemia (TDT). 3. ed. Nicosia (CY): Thalassaemia International Federation, 2014.

CARROCINI, G. C. S. et al. Mutational Profile of Homozygous β -Thalassemia in Rio de Janeiro, Brazil. Hemoglobin, v. 41, n. 1, p. 12-15, 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Data & Statistics on Sickle Cell Disease.

CHIAPPE, G. Talassemias: Aspectos clínicos. Acta bioquímica clínica latinoamericana, La Plata, v. 51, n. 3, p. 281-289, set. 2017.

CLARK, B. E.; THEIN, S. L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clinical and Laboratory Haematology, v. 26, n. 3, p. 159-76, 2004.

CODEPLAN. A população negra no Distrito Federal: analisando as Regiões Administrativas. Brasília: Companhia de Planejamento do Distrito Federal, dez. 2014.

COLAH, R.; GORAKSHAKAR, A.; NADKARNI, A. Global burden, distribution and prevention of β -thalassemias and hemoglobin E disorders. Expert Review of Hematology, v. 3, n. 1, p. 103-17, 2010.

CRAIG, J. E. et al. Rapid Detection of Deletions Causing $\delta\beta$ Thalassemia and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin by Enzymatic Amplification. Blood, v. 83, n. 6, p. 1673-1682, 1994.

DE SOUZA, R. A. et al. Alpha-Thalassemia: Genotypic Profile Associated with Ethnicity and Hematological Differentiation of Iron Deficiency Anemia in the Region of Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Hemoglobin, v. 39, n. 4, p. 264-9, 2015.

NGO; STEINBERG, M. Sickle cell disease. Hematology, v. 19, n. 4, p. 244-245, 2014.

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

FAUSTINO, P. et al. The geographic pattern of b-thalassaemia mutations in the Portuguese population. *British Journal of Haematology*, v. 107, n. 4, p. 903–904, 1999.

FONSECA, S. F. et al. Genetic analysis of b-thalassemia major and b-thalassemia intermedia in Brazil. *Hemoglobin*, v. 22, n. 3, p. 197–207, 1998.

FORGET, B. G.; BUNN, H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 3, 2013.

FOSSEN JOHNSON, S. Methemoglobinemia: Infants at risk. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, v. 49, n. 3, p. 57-67, mar. 2019.

FUCHAROEN, S.; WEATHERALL, D. J. The hemoglobin E thalassemias. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 8, 2012.

GALACTEROS, F.; GIRODON, E.; M'RAD, A. et al. Hb Taybe (a 38 or 39 THR deleted): an α -globin defect, silent in the heterozygous state and producing severe hemolytic anemia in the homozygous. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série III*, v. 317, p. 437–444, 1994.

GALANELLO, R.; CAO, A. Alpha-thalassemia. *Genetics in Medicine*, v. 13, p. 83–88, 2011.

GALANELLO, R.; ORIGA, R. Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 5, p. 11, 2010.

GIARDINE, B. et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Research*, v. 42, Database issue, p. D1063-9, 2014.

GREER, J. P. et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12. ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

HAMID, M. et al. Genotype–phenotype correlation in patients with deletional and nondeletional mutations of Hb H disease in Southwest of Iran. *Scientific Reports*, v. 12, p. 4856, 2022.

HARANO, T. et al. HbKurosaki [alpha 7(A5) Lys – > Glu]: a new alpha chain variant found in a Japanese woman. *Hemoglobin*, v. 19, n. 3–4, p. 197–201, 1995.

HARDISON, R. C. Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 12, a011627, dez. 2012.

HARTEVELD, C. L.; HIGGS, D. R. Alpha-thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 5, p. 13, 2010. DOI: 10.1186/1750-1172-5-13.

HIGGS, D. R. et al. Thalassaemia. *Lancet*, v. 379, p. 373-383, 2012.

HIGGS, D. R. The Molecular Basis of α -Thalassemia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 3, a011718, 2013.

HOFFBRAND, A.; MOSS, P.; PETTIT, J. Fundamentos em Hematologia. 6. ed. Santana: Artmed, 2008.

HOLSTEIN, A. S.; HOHL, R. J. Thalassemia: Pharmacologic Induction of Fetal Hemoglobin. In: *Conn's Current Therapy 2021*. [S.l.]: [s.n.], 2021. p. 483-488.

HUTTLE, A. et al. Sick cell in sickle cell disease in Latin America and the United States. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 62, p. 1131–36, 2015.

KIMURA, E. M. et al. Investigating alpha-globin structural variants: a retrospective review of 135,000 Brazilian individuals. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 37, n. 2, p. 103–108, 2015.

KING, M. W. The medical biochemistry page in *Integrative Medical Biochemistry*.

KOSMACHEVSKAYA, O. V.; TOPUNOV, A. F. Alternate and additional functions of

erythrocyte hemoglobin. *Biochemistry (Moscow)*, v. 83, p. 1575–1593, 2018.

KOUNTOURIS, P. et al. IthaGenes: an interactive database for haemoglobin variations and epidemiology. *PLoS One*, v. 9, e103020, 2014.

KRAWCZAK, M.; REISS, J.; COOPER, D. N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human Genetics*, v. 90, p. 41–54, 1992.

LEVINGS, P. P.; BUNGERT, J. The human β -globin locus control region. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, p. 1589-1599, 2002.

LOUKOPOULOS, D. L. Haemoglobinopathies. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2002.

LUO, H. Y. et al. Two New α -Thalassemia Frameshift Mutations. *Hemoglobin*, v. 31, n. 2, p. 135–139, 2007.

MAIA, R. G. Max Perutz. *Revista de Ciência Elementar*, v. 7, n. 3, p. 60, 2019.

MANCA, L.; MASALA, B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. *IUBMB Life*, v. 60, n. 2, p. 94-111, 2008.

MANSOORI, H. et al. Delta beta thalassemia: a rare hemoglobin variant. *Blood Research*, v. 51, n. 3, p. 213–214, set. 2016.

MAQUAT, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *Journal of Cell Science*, v. 118, Pt. 9, p. 1773–1776, 2005.

MATOS, J. F. Avaliação do desempenho de um novo índice na diferenciação entre anemia ferropriva e talassemias menores. 2012. 154 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MATTA, B. N. et al. A killer revealed: 10-year experience with beta-thalassemia intermedia. *Hematology*, v. 19, n. 4, p. 196-8, jun. 2014.

MENSAH, C.; SHETH, S. Optimal strategies for carrier screening and prenatal diagnosis of α - and β -thalassemia. *Hematology, American Society of Hematology Education Program*, v. 2021, n. 1, p. 607-613, 2021.

MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 86, p. 480–487, 2008.

MOTIANI, A.; ZUBAIR, M.; SONAGRA, A. D. Laboratory evaluation of alpha thalassemia. In: *STATPEARLS*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.

MOUSINHO-RIBEIRO, R. C. et al. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 30, n. 2, p. 136-141, 2008.

MUNKONGDEE, T.; CHEN, P.; WINICHAGOON, P.; FUCHAROEN, S.; PAIBOONSUKWONG, K. Update in laboratory diagnosis of thalassemia. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 7, p. 74, 2020.

NAGEL, R. L. Severity, pathobiology, epistatic effects, and genetic markers in sickle cell anemia. *Seminars in Hematology*, v. 28, n. 3, p. 180-201, jul. 1991.

NAOUM, P. C. Doenças dos eritrócitos. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia, 2014.

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

OHBA, Y. et al. Unstable hemoglobins in Japan. *Hemoglobin*, v. 4, n. 3–4, p. 307–12, 1980.

ORIGA, R. Beta-thalassemia. *Genetics in Medicine*, v. 19, p. 609-19, 2017.

PALIS, J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Frontiers in Physiology*, v. 5, p. 3, 2014.

PATRINOS, G. P.; ANTONARAKIS, S. E. Human hemoglobin. In: Vogel and Motulsky's Human Genetics. Bergal Berlin Heidelberg: Springer, 2010. p. 365–401.

PEÑUELA, O. A. Hemoglobina una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica*, v. 36, p. 215-225, jul.-set. 2005.

PEREIRA, F. J. C. et al. Human $\alpha 2$ -globin nonsense-mediated mRNA decay induced by a novel α -thalassaemia frameshift mutation at codon 22. *British Journal of Haematology*, v. 133, n. 1, p. 98–102, 2006.

PIEL, F. B. The Present and Future Global Burden of the Inherited Disorders of Hemoglobin. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 30, n. 2, p. 327-41, 2016.

PIEL, F. B. et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet*, v. 381, p. 142–151, 2013.

PIEL, F. B. et al. Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *Lancet Global Health*, v. 2, p. e80–89, 2014.

PIEL, F. B. et al. The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. *Scientific Reports*, v. 3, p. 1671, 2013.

PIEL, F. B.; WEATHERALL, D. J. The alpha-thalasseмии. *New England Journal of Medicine*, v. 371, p. 1908–1916, 2014.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; PAIVA-E-SILVA, R. B. A Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, p. 1195-9, 2003.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; SILVA, R. B. P. A Portaria MS n.º 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 24, p. 244-50, 2002.

RAPPAPORT, V. J. et al. Hemoglobinopathies in pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, v. 31, n. 2, p. 287-317, jun. 2004.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. *The Lancet*, p. 2018–31, 2010.

RIBEIRO, D. O Povo Brasileiro: a Formação e o Sentido do Brasil. São Paulo: Companhia das Letras, 1995. p. 193–207.

RIBEIRO, D. M.; SONATI, M. F. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 4, p. 1045-53, 2008.

RODRIGUES DE MOURA, R. et al. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *American Journal of Human Biology*, 2015.

ROSATELLI, M. C. et al. Molecular screening and fetal diagnosis of b-thalassemia in the Italian population. *Human Genetics*, v. 89, n. 6, p. 585–589, 1992.

ROSENBERG, L. E.; ROSENBERG, D. D. Disorders of Variable Genomic Architecture. In: *Human Genes and Genomes*. [S.l.]: [s.n.], 2012. p. 227-239.

ROSENFELD, L. G. et al. Prevalência de hemoglobinopatias na população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde 2014–2015. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 22, supl. 2, p. E190007.SUPL.2, 2019. DOI: 10.1590/1980-549720190007.supl.2.

SABATH, D. E. Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies: An ACLPS Critical Review. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 148, n. 1, p. 6-15,

2017.

SAHLI, C. A. et al. $\delta\beta$ -Thalassemia in cis of β Knossos globin gene: first homozygous description in thalassemia intermedia Libyans and first combination with codon 39 (C→T) in thalassemia intermedia Tunisian patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 50, n. 10, p. 1743-8, out. 2012.

SALEH-GOHARI, N. et al. Effects of α -thalassaemia mutations on the haematological parameters of β -thalassaemia carriers. *Journal of Clinical Pathology*, v. 68, p. 562-566, 2015.

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

SOARES, B. P. et al. Estudo da associação entre talassemia alfa e doença falciforme em pacientes do hemocentro regional de Montes Claros. *Revista Médica de Minas Gerais*, v. 28, e-1959, 2018.

SOARES, L. F. et al. Prevalência de hemoglobinas variantes em comunidades quilombolas no estado do Piauí, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 22, p. 3773-80, 2017.

SONATI, M. F.; COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *Jornal de Pediatria (Rio J.)*, v. 84, n. 4, Suppl, p. S40-51, 2008.

STEINBERG, M. H. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *The Scientific World Journal*, v. 8, p. 1295–1324, 2008.

STEINBERG, M. H. et al. Disorders of hemoglobin genetics pathophysiology and clinical management. Cambridge, RU: Cambridge University Press, 2009.

TAHER, A. T.; WEATHERALL, D. J.; CAPPELLINI, M. D. Thalassaemia. *Lancet*, v.

391, n. 10116, p. 155–67, 2018.

TAYLOR, S. M. et al. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*, v. 12, p. 457–68, 2012.

THEIN, S. L. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*, v. 90, n. 5, p. 649–60, 2005.

THEIN, S. L. The molecular basis of beta-thalassemia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 3, n. 5, a011700, 2013.

TRAEGER-SYNODINOS, J.; HARTEVELD, C. L. Preconception carrier screening and prenatal diagnosis in thalassemia and hemoglobinopathies: challenges and future perspectives. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 17, p. 281–291, 2017.

TURGEON, M. L. Clinical hematology theory and procedures. 5. ed. [S.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

URBINATI, F. et al. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: thalassaemias. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 8, p. 1–26, 2006.

VAR SOME: the human genomic variant search engine. Kopanos, C. et al. *Bioinformatics*, v. 35, n. 11, p. 1978–1980, jun. 2019.

VICHINSKY, E. Non-transfusion-dependent thalassemia and thalassemia intermedia: epidemiology, complications, and management. *Current Medical Research and Opinion*, v. 32, n. 1, p. 191–204, 2016.

WAGNER, S. C. et al. α -Thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region. *Genetics and Molecular Research*, v. 8, n. 4, p. 1291–1295, 2009.

WAGNER, S. C. et al. Prevalence of α -thalassemia 3.7 kb deletion in the adult population of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 35, n. 2, p. 505-509, 2012.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. *The thalassaemia syndromes*. 4. ed. Oxford: Blackwell Science, 2001.

WEATHERALL, D. J. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Reviews Genetics*, v. 2, p. 245–55, 2001.

WEATHERALL, D. J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*, v. 115, p. 4331–36, 2010.

WEATHERALL, D. J.; WAINSCOT, J. S. The molecular pathology of thalassemia. In: HOFFBRAND, A. V. (ed.). *Recent advances in haematology*. Oxford: Churchill Livingstone, 1985. p. 63-88.

WENNING, M. R.; SONATI, M. F. Hemoglobinopatias hereditárias. In: LOPES, A. C. (ed.). *Diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Manole, 2007. p. 3104.

WENNING, M. R. S. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; SAAD, S. T. O. Hemoglobin H disease resulting from the association of the $-\alpha 3.7$ rightward deletion and a novel frameshift mutation in the Brazilian population. *European Journal of Haematology*, v. 69, n. 5-6, p. 370-372, 2002.

WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 9, p. a011692, 2012.

WONG, P. et al. Bone Disease in Thalassemia: A Molecular and Clinical Overview. *Endocrine Reviews*, v. 37, n. 4, p. 320-46, 2016.

WU, M. Y. et al. A novel selective deletion of the major α -globin regulatory element (MCS-R2) causing α -thalassaemia. *British Journal of Haematology*, v. 176, n. 6, p. 984-6, 2017.

XU, Y. W. et al. Preimplantation genetic diagnosis for alphathalassaemia in China. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, v. 26, n. 7, p. 399-403, jul. 2009.

ZAIDI, A. U.; HEENEY, M. M. A Scientific Renaissance: Novel Drugs in Sickle Cell Disease. Pediatric Clinics of North America, v. 65, n. 3, p. 445-464, jun. 2018.

ZHOU, Y. Q. et al. Evaluation of clinical application of gap-PCR as a routine method for alpha-thalassemia carrier detection. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, v. 22, n. 5, p. 434-6, mai. 2002.