

Camila Cruz de Martino

**Prevalência de beta-talasseмии em pacientes com anemia
falciforme em quatro estados do Brasil**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

Coorientadora: Dra. Cecilia Salette Alencar da Silva

São Paulo

2020

Camila Cruz de Martino

**Prevalência de beta-talasseмии em pacientes com anemia
falciforme em quatro estados do Brasil**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

Coorientadora: Dra. Cecilia Salete Alencar da Silva

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Martino, Camila Cruz de

Prevalência de beta-talassemias em pacientes com anemia falciforme em quatro estados do Brasil / Camila Cruz de Martino. -- São Paulo, 2019.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Medicina Tropical. Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Ester Cerdeira Sabino.

Coorientadora: Cecília Salete Alencar da Silva

Descritores: 1.Anemia falciforme 2.Sequenciamento genético
3.Hemoglobinas 4. Talassemia 5.Anemia 6. Biologia molecular

USP/FM/DBD-075/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

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

A Deus, pela inspiração e força de vontade de realizar este trabalho.

Aos meus pais Decio e Luciette e irmão Gabriel por todo apoio e paciência que tiveram comigo durante a realização deste trabalho me dando a força necessária para que conseguisse alcançar meus objetivos, obrigada por acreditarem no meu potencial.

Ao meu noivo Matheus Burger por estar sempre ao meu lado tendo paciência, pela força nos momentos difíceis, colaboração, incentivos e compreensão durante essa etapa da minha vida.

A minha orientadora Dra. Cecilia Salette Alencar, pela atenção, ensinamentos, paciência, dedicação e apoio na elaboração do presente trabalho e por confiar no meu potencial.

A Dra. Ester Sabino, meu respeito e gratidão e agradecimento por me proporcionar a chance de ser sua aluna de mestrado.

A Biomédica e amiga Priscila Tempaku, pela amizade, colaboração, dedicação, incentivos, paciência, confiança e conselhos durante a construção desta pesquisa.

A minha amiga Priscila Tempaku pela amizade, pela força nos momentos difíceis, conselhos, paciência e por acreditar no meu potencial.

Aos colaboradores do Instituto de Medicina Tropical e Fundação Pró-Sangue, por todo acolhimento, paciência, troca de experiências e ensinamentos.

RESUMO

Martino CC. *Prevalência de beta-talassemias em pacientes com anemia falciforme em quatro estados do Brasil* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

O diagnóstico da doença falciforme (DF) é feito por ensaios de hemoglobina (Hb), como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foco isoelétrico e eletroforese em acetato de celulose ou ágar citrato. Esses ensaios são de fácil execução e utilizados em exames de recém-nascidos em larga escala em muitos países. No entanto, esses testes podem não diferenciar facilmente a talassemia S β 0 da SS ou identificar outras variantes da hemoglobina e, nesse caso, o sequenciamento genético do gene da beta globina (HBB) pode ser necessário. Com o objetivo de desenvolver um ensaio confirmatório com base no ácido desoxirribonucleico (DNA) de alta produtividade para DF e detectar mutações no gene HBB. Métodos: Desenvolveu-se uma técnica de pyrosequenciamento automático (Pyro) de acordo com a tecnologia Qiagen (Hilden, Alemanha) para detectar mutações homozigotas ou heterozigotas da hemoglobina S (HbS), bem como mutações na hemoglobina C (HbC). A técnica foi testada em 2.748 amostras de pacientes inscritos em uma coorte multicêntrica da DF no Brasil. Os pacientes foram previamente testados usando HPLC para diagnosticar DF como parte dos cuidados clínicos de rotina. Quaisquer indivíduos com resultados discrepantes entre HPLC e Pyro ou com hemoglobina S (HbS) heterozigótica detectada realizaram sequenciamento de Sanger do gene HBB. Resultados: Foram identificadas 168 amostras com resultados discrepantes entre HPLC e Pyro e 100 com Pyro concordante = S heterozigótico e HPLC, o que sugeriria talassemia S β ou outras variantes S heterozigóticas. O ensaio Pyro identificou corretamente 1.906 (98,7%) das HbSS de 1.930 amostras e 628 (98,7%) das 636 amostras de Hemoglobinopatia SC (HbSC). Das 179 amostras restantes, o Pyro indicou corretamente heterozigose S em 165 (92,2%). Das 165 amostras heterozigotas de S confirmadas por Sanger como consistentes com o genótipo de talassemia S β , 84 amostras foram classificadas como talassemia S β 0 e 81 como talassemia S β +. As mutações beta talassêmicas mais frequentes de S β 0 e S β + foram HBB:c.118C>T (Gln40Stop) e HBB:c.92+6T>C, respectivamente. Discussão: O Pyro provou ser satisfatório para testes confirmatórios em larga escala da mutação da hemoglobina. Além disso, este estudo possibilitou a descrição das mutações β + e β 0 mais comuns em pacientes com DF com S-talassemia em uma grande coorte multi-institucional de DF no Brasil.

Descritores: Anemia falciforme; Sequenciamento genético; Hemoglobinas; Talassemia; Anemia; Biologia molecular.

ABSTRACT

Martino CC. *Prevalence of beta-thalassemias in patients with sickle cell disease in four states of Brazil* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

The diagnosis of sickle cell disease (SCD) is made by hemoglobin assays such as high-performance liquid chromatography (HPLC), isoelectric focusing and cellulose acetate or citrate agar electrophoresis. These assays are easy to perform and used in large-scale newborn screening in many countries. These tests however may not easily differentiate S β 0 thalassemia from SS or identify other hemoglobin variants, and in this case, hemoglobin (HBB) gene sequencing may be necessary. With objectives to develop a high throughput DNA based confirmatory assay for SCD and to detect mutations in the HBB gene Methods: We developed an automated pyrosequencing technique (Pyro) based on QIAGEN technology (Hilden, Germany) to detect homozygous or heterozygous hemoglobin S mutations as well as hemoglobin C mutations. The technique was tested on 2,748 samples from patients enrolled in a multi-center SCD cohort in Brazil. Patients were previously tested using HPLC to diagnose SCD as part of routine clinical care. Any subjects with discrepant results between HPLC and Pyro or with heterozygous hemoglobin S detected had Sanger sequencing of the HBB gene. Results: We identified 168 samples with discrepant results between HPLC and Pyro and 100 with concordant Pyro= heterozygous S and HPLC, which would suggest S β -thalassemia or other heterozygous S variants. The Pyro assay correctly identified 1906 (98.7%) of the 1,930 HbSS and 628 (98.7%) of the 636 HbSC samples. Of the 179 remaining samples, Pyro correctly indicated S heterozygosis in 165 (92.2%). Of the 165 heterozygous S samples confirmed by Sanger as consistent with S β thalassemia genotype, 84 samples were classified as S β 0 thalassemia and 81 as S β + thalassemia. The most frequent beta thalassemia mutations of S β 0 and S β + were HBB:c.118C>T (Gln40Stop) and HBB:c.92+6T>C, respectively. Discussion: The Pyro proved to be satisfactory for large-scale confirmatory testing of hemoglobin mutation. Moreover, this study made it possible to describe the most common β + and β 0 mutations in SCD patients with S β -thalassemia in a large multi-institutional SCD cohort in Brazil.

Descriptors: Sickle cell; Genetic sequencing; Hemoglobins; Thalassemia; Anemia; Molecular biology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Molécula de hemoglobina	10
Figura 2 -	Comparação da hemácia normal com a hemácia falcizada	14
Figura 3 -	Representação das globinas na talassemia	17
Figura 4 -	Representação esquemática da reação do pyrosequenciamento	28
Figura 5 -	Representação do sequenciamento de Sanger	30
Figura 6 -	Pyrograma observado para a classificação do genótipo SS	39
Figura 7 -	Pyrograma observado para a classificação do genótipo SC	39
Figura 8 -	Pyrograma observado para a classificação do genótipo AS	40
Figura 9 -	Mutação de β^+ talassemia (HBB:c.92+6T>C)	45
Figura10 -	Mutação de β^0 talassemia (HBB:c.92+1G>A)	45
Figura 11-	Distribuição dos pacientes com DF de acordo com diferentes testes, estudo de coorte REDS-III Brasil SCD.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados provenientes dos centros usando HPLC	36
Quadro 1 -	Desenho dos <i>primers</i> utilizados para reação de PCR	38
Quadro 2 -	Desenho do <i>primer</i> de sequenciamento	38
Quadro 3 -	Desenho dos primers usados no sequenciamento	40
Tabela 2 -	Comparação dos resultados do pyrosequenciamento com a classificação final da DF, estudo de coorte REDS-III Brasil.....	44
Tabela 3 -	Classificação das mutações de beta-talassemia.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Hemoglobinopatias	10
1.2	Doenças Falciformes	12
1.3	Anemia Falciforme (SS) e Traço Falciforme (AS)	13
1.4	Hemoglobinopatia SC	16
1.5	Talassemias	17
1.5.1	Beta-Talassemia	18
1.6	Testes Clássicos para o Diagnóstico das Hemoglobinopatias	21
1.6.1	Resistência Globular Osmótica Eritrocitária em Solução de NaCl a 0,36%	23
1.6.2	Análise da Morfologia Eritrocitária	24
1.6.3	Eletroforese de Hemoglobinas em pH Alcalino	24
1.6.4	Eletroforese de Hemoglobinas em pH Ácido	24
1.6.5	Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	25
1.6.6	Teste de Falcização	25
1.6.7	Teste de Solubilidade	26
1.6.8	Focalização Isoelétrica (IEF)	26
1.6.9	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	26
1.6.10	Sequenciamento de nova geração	27
1.7	Pyrosequenciamento	28
1.8	Sequenciamento Clássico Sanger	29
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVO	32
3.1	Objetivos Secundários	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Recrutamento.....	33
4.1.1	Randomização	34
4.2	Casuística	35
4.3	Critério de Inclusão	36
4.4	Critério de Exclusão	37
4.5	Extração de DNA	37
4.6	Pyrosequenciamento	37
4.7	Sequenciamento de Sanger	40

4.8	Programa de Medicina Personalizada (Topmed).....	41
5	RESULTADOS	43
6	DISCUSSÃO	49
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXOS.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobinopatias

No decorrer da vida, as globinas produzem vários tipos de hemoglobina (Hb), sendo seu fenótipo determinado definitivamente no primeiro ano de vida: hemoglobina A (HbA- $\alpha_2\beta_2$, 97%), hemoglobina A2 (HbA2- $\alpha_2\delta_2$, 2%) e hemoglobina Fetal (HbF- $\alpha_2\gamma_2$, 1%). A hemoglobina tem a função de transportar as moléculas de oxigênio do sangue para os tecidos e vice-versa (Sanctis *et al.*¹, Goonasekera *et al.*²).

A HbA, presente em maior quantidade na vida adulta (Figura 1), é formada por um heterotetrâmero proteico, composto por subunidades de globinas, constituídas por duas porções: a fração proteica, que consiste em duas proteínas de globina, sendo duas alfa globinas (α -globinas) e duas beta globinas (β -globinas); e a fração prostética (grupo heme), que contém o ferro (Iyer *et al.*³, Kato *et al.*⁴).

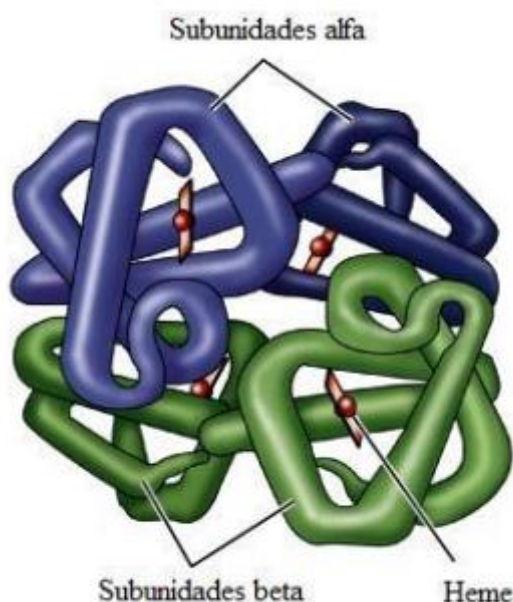


Figura 1 – Molécula de hemoglobina

Fonte: Adaptado de Beiguelman⁵

O grupo heterogêneo de doenças hereditárias que afetam a hemoglobina é denominado hemoglobinopatias, sendo sua origem em grande maioria de caráter autossômico recessivo, com mais de mil diferentes alelos mutantes descritos. As hemoglobinopatias são classificadas em três categorias: defeitos quantitativos (talassemias), defeitos estruturais qualitativos das globinas (doenças falciformes) e a persistência hereditária da Hb fetal (HPFH) que é clinicamente caracterizada pela HbF elevada mesmo na vida adulta (Iyer *et al.*³, Kato *et al.*⁴, Gileles-Hillel *et al.*⁶, Piel *et al.*⁷).

As hemoglobinopatias são as principais causas de mortalidade e morbidade do mundo (Voskou *et al.*⁸). Os países que apresentam maior incidência são aqueles com alta frequência de migração e casamentos consanguíneos (Warghade *et al.*⁹).

Nascem por ano cerca de 300 mil a 500 mil crianças com alterações na beta globina (Voskou *et al.*⁸). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) [do inglês, *World Health Organization (WHO)*], aproximadamente 5% da população mundial é portadora de distúrbios genéticos da hemoglobina. Entre as hemoglobinopatias mais frequentes, destacam-se a anemia falciforme (SS) (83%) e as talassemias (17%) (Goonasekera *et al.*², Warghade *et al.*⁹)

Por essa razão, foram criados programas de rastreio das hemoglobinopatias com objetivo de oferecer aconselhamento pré-marital e diagnóstico pré-natal, levando em conta prevalência, variabilidade genética e custo efetivo. Esses programas visam aspectos culturais, éticos e sociais da população em questão, para que as campanhas de conscientização tenham sucesso (Goonasekera *et al.*²).

1.2 Doenças Falciformes

As doenças falciformes decorrem de mutações nos genes da globina, resultando em hemoglobinas variantes. São caracterizadas por heterozigose, quando apenas um gene é afetado. Pode-se citar como exemplos o gene HbS atuando como portador do traço falciforme (AS); a homozigose, quando ambos os genes são afetados, por exemplo, a anemia falciforme (SS), ou a heterozigose dupla, quando o gene da HbS é combinado com outras hemoglobinas variantes hereditárias (Kato *et al.*⁴, Simões *et al.*¹⁰, Soares *et al.*¹¹).

As hemoglobinas variantes HbE, HbC e HbD e HbS- β -talassemia nos estados heterozigotos ou homozigotos apresentam frequência e significância clínica altas. Entretanto, o genótipo da anemia falciforme costuma ser clinicamente mais grave entre os genótipos das doenças falciformes (DF) (Goonasekera *et al.*², Piel *et al.*⁷).

Pauling *et al.*¹² em publicação histórica no ano de 1949, realizaram diversos experimentos com hemácias em estados oxigenado e desoxigenado, por padrões de mobilidade eletroforéticas, e observaram mudanças no formato das hemácias. Identificada como a primeira doença hereditária conhecida como doença *molecular*, as doenças falciformes contêm uma proteína disfuncional com várias manifestações clínicas e mortalidade precoce (Naik e Haywood¹⁴).

As DFs abrangem, sobretudo, a África, a Europa e regiões extensas da Ásia^{5,10}. (Gileles-Hillel *et al.*⁶, Simões *et al.*¹⁰). O espectro amplo de regiões afetadas deve-se principalmente pela imigração de africanos escravizados para a Península Arábica, o sul da Itália, a Índia e as Américas (Soares *et al.*¹¹).

No Brasil, as DFs são consideradas um problema de saúde pública por ser este um país bastante miscigenado, com sua composição genética formada por ameríndios, europeus e africanos que representam vários grupos étnicos (Soares *et al.*¹¹, Ferraz e Murao¹⁴, Arduini *et al.*¹⁵).

A distribuição dos haplótipos na população brasileira está relacionada fortemente ao histórico de migração, decorrente do tráfico de escravos pela América, apresentando como haplótipo mais frequente o CAR (origem de Bantu, Centro-Sul e a África Oriental) nos estados do Rio Grande do Sul (RS), Pará (PA), Pernambuco (PE), São Paulo (SP) e Rio Grande do Norte (RN). Seguido do haplótipo BEN (proveniente de Benin no Centro-Oeste da África) nos estados do Rio de Janeiro (RJ), Bahia (BA) e Ceará (CE) (Lindenau *et al.*¹⁶).

As frequências de haplótipos podem mudar ao longo dos tempos devido ao número crescente de migrações, sendo importante realizar estratégias para rastreamento, aconselhamento genético e terapia para doenças falciformes através de implementações e investimentos em programas de saúde pública, não só para a população brasileira, mas também para os imigrantes (Lindenau *et al.*¹⁶).

1.3 Anemia Falciforme (SS) e Traço Falciforme (AS)

A anemia falciforme (SS), também denominada de hemoglobinopatia S, é o resultado da substituição de um aminoácido (ácido glutâmico) por outro aminoácido (valina) devido à mutação pontual no cromossomo 11 na sexta posição da cadeia β -globina, o que resulta em alteração estrutural da hemoglobina (Arduini *et al.*¹⁵, Kowar *et al.*¹⁷).

Os indivíduos com anemia falciforme durante os dois primeiros meses de vida não apresentam manifestações clínicas, por conta dos níveis altos de HbF dentro do eritrócito. Após esses quatro meses, os sinais e sintomas da doença começam a surgir em razão da substituição gradativa da HbF pela HbS (Piel *et al.*⁷).

As moléculas de HbS apresentam menor afinidade com o oxigênio quando comparadas às de HbA, ocorrendo polimerização em estado desoxigenado, resultando uma alteração na estrutura dos eritrócitos, os quais assumem formato de foice, denominado drepanócito. A ocorrência repetitiva desse fenômeno (Figura 2) acarreta lesão da

membrana, e encurtamento da vida útil desses eritrócitos, provocando anemia hemolítica (Kato *et al.*⁴, Piel *et al.*⁷, Soares *et al.*¹¹, Kavar *et al.*¹⁷).



Figura 2 – Comparação da hemácia normal com a hemácia falcizada

Fonte: Kaulitzki¹⁸

As células em forma de foice aderem-se ao endotélio dos vasos, bloqueando o fluxo sanguíneo, fenômeno denominado vaso-oclusão, o qual é responsável pelas principais manifestações clínicas da doença, como isquemia, infarto e lesão de isquemia-reperfusão em múltiplos órgãos e tecidos. Como resultado, há produção de resposta inflamatória crônica, disfunção e dor intensa (Kato *et al.*⁴, Kavar *et al.*¹⁷).

A gravidade da anemia falciforme está relacionada à variabilidade genética, como nível de hemoglobina fetal e co-hereditariedade com α -talassemia. Não se pode descartar a possibilidade de estar relacionada a fatores que influenciam no processo de desoxigenação, como esforço físico excessivo, baixa concentração de oxigênio, altas temperatura, diminuição do potencial de hidrogênio (pH), desidratação e estresse (Kato *et al.*⁴, Piel *et al.*⁷, Soares *et al.*¹¹, Kavar *et al.*¹⁷).

Os indivíduos portadores da doença apresentam a forma heterozigótica, que se manifesta como um traço falciforme (AS) da doença por ser assintomática. Em

contrapartida, os indivíduos que possuem SS apresentam estado de homozigose da hemoglobina S (SS), isto é, a forma mais grave da doença (Kawar *et al.*¹⁷).

A anemia falciforme é considerada um problema de saúde pública pela OMS e Organização das Nações Unidas (ONU) com maior frequência nos seguintes locais: Nigéria, República Democrática do Congo, Índia, Arábia Saudita, sub-África do Saara, América Central, Mediterrâneo e Caribe (Piel *et al.*⁷, Kawar *et al.*¹⁷).

No Brasil, a presença da hemoglobina S vem aumentando cada vez mais devido a grandes episódios de migração, demonstrando um crescimento da doença em caucasianos ao longo do tempo. A anemia falciforme atinge de 0,1% a 0,3% dos negros no país. As regiões de maior frequência são Norte e Nordeste, entre 6% e 10%. Em estados como o da Bahia, a predominância é de ascendência africana, com índice de 1 para 650 novos nascidos, enquanto que, nas regiões do Sul e Sudeste, a frequência é de 2% a 3% (Soares *et al.*¹¹, Arduini *et al.*¹⁵).

A incidência da doença na população brasileira, em 2014, foi de 1 para 650 na Bahia, de 1 para 1.300 no Rio de Janeiro e de 1 para 13.500 no estado de Santa Catarina. Em 2016, foram identificados 1.071 com anemia falciforme e mais de 60 mil com traço falciforme (Kato *et al.*⁴).

Em países desenvolvidos, o aumento da expectativa de vida entre as pessoas afetadas com a doença melhorou significativamente nos últimos 40 anos em decorrência de intervenções profiláticas, prevenção primária e tratamento mais adequado da doença, aumentando a sobrevida até aproximadamente 60 anos de idade (Piel *et al.*⁷).

No entanto, em países subdesenvolvidos como a África, a mortalidade entre as crianças menores de 5 anos pode chegar até 90%, em decorrência de falta de infraestrutura básica de saúde, pobreza, desnutrição e malária. Com isso, gestão e prevenção da anemia falciforme através da triagem neonatal ainda representam desafios importantes (Piel *et al.*⁷).

1.4 Hemoglobinopatia SC

A hemoglobinopatia SC (HbSC) surge a partir da co-herança dos genes das hemoglobina S (HbS) e hemoglobina C (HbC), apresentando o estado heterozigótico em níveis semelhantes aos de HbS e HbC (Rezende *et al.*¹⁹, Colella *et al.*²⁰), doença apresenta como causa a substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6, dando origem à HbS, e a substituição do ácido do glutâmico pela lisina, em decorrência de uma mutação no sexto códon da betaglobina, dando origem à HbC (Pecker *et al.*²¹).

A HbSC é a segunda variante mais frequente das doenças falciformes em todo o mundo, só perdendo para a anemia falciforme (SS). É responsável por aproximadamente 30% das DFs nos Estados Unidos e no Reino Unido e por, aproximadamente, 50% na África Ocidental. Essa variante se espalhou através das atividades migratórias pela Europa e Américas (Pecker *et al.*²¹, Elmariah *et al.*²²).

Em situações de hipóxia dos eritrócitos, a fisiopatologia da doença tem como principal característica a formação de cristais, em decorrência da concentração da HbC (Rezende *et al.*¹⁹, Colella *et al.*²⁰) e a polimerização, em decorrência da concentração de HbS, o que resulta em hemácias mais densas, microcíticas, hiperocrômicas e em aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média, obstruindo a microcirculação (Pecker *et al.*²¹).

Os níveis de hemoglobina dos pacientes com HbSC são maiores quando comparados com os de indivíduos com anemia falciforme. A leucocitose é discreta ou ausente com ou sem plaquetopenia (Pecker *et al.*²¹, American Society for Clinical Pathology Annual Meeting²³).

Mesmo sendo a HbSC uma variante com poucas manifestações clínicas de relevância, alguns casos podem evoluir para complicações, como priapismo, hiperesplenismo e crises dolorosas. É necessário aprofundar os estudos em razão de ainda

não se conhecer o mecanismo da doença e para que seja definido o tratamento mais adequado, com maior segurança e boas práticas de conduta (Pecker *et al.*²¹).

1.5 Talassemias

A talassemia caracteriza-se por apresentar defeitos moleculares quantitativos que levam à produção reduzida ou ausente de uma das cadeias de globina, resultando no excesso da outra globina (Mettananda e Higgs²⁴). A Figura 3 mostra que a ausência (β^0) ou diminuição (β^+) das cadeias de β -globina resulta em β -talassemia, enquanto a deleção parcial (α^+) ou total (α^0) da α -globina tem como resultado a α -talassemia (Rund²⁵).

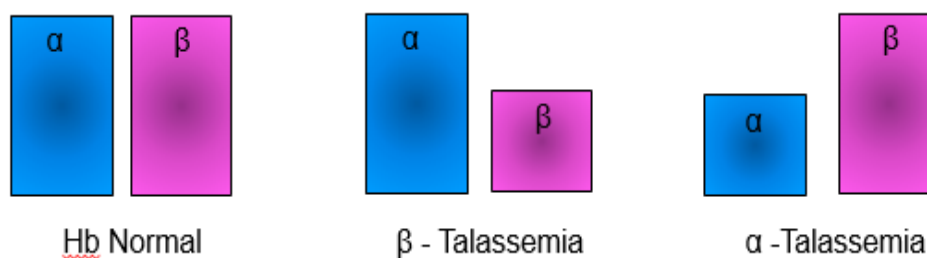


Figura 3 – Representação das globinas na talassemia

Fonte: Autoria própria.

A talassemia é uma doença de caráter monogênico mais comum no mundo, apresentando mais de 1.200 mutações que alteram a estrutura dos genes das globinas, sendo a maioria dessas mutações relacionada às deleções totais ou parciais do gene das globinas. A gravidade da doença e sua classificação são determinadas de acordo com a posição da mutação do gene na subunidade HBB. As α -talassemias são menos frequentes, porém possuem manifestações clínicas mais graves, enquanto as β -talassemias são mais frequentes, embora apresentem, em sua maioria, pequena inserção ou deleção de um

polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (Sanctis *et al.*¹, Vrettou *et al.*²⁶, Sayani e Kwiatkowski²⁷).

Estima-se que por ano nasçam 70 mil crianças com algum tipo de talassemia, e a grande maioria é proveniente da região do mediterrâneo, África Subsaariana, Sul do Oriente Médio e Sudeste Asiático (Mettananda e Higgs²⁴).

Pressupõe-se que novas variantes e mutações raras de talassemias possam ser o resultado da incidência de malária, distribuição geográfica, guerras, história de migrações e consanguinidade (Sanctis *et al.*¹).

Pacientes com formas mais leves de talassemia, assintomáticos, podem apresentar microcitose e hipocromia no hemograma. Nesses casos, existe a necessidade de analisar as hemoglobinas por técnicas de eletroforese de hemoglobina, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e testes moleculares para determinar a talassemia (Sayani e Kwiatkowski²⁷).

O diagnóstico através de aconselhamento genético em portadores é de grande importância, pois estes podem se relacionar com outros portadores, havendo risco de conceber crianças com formas mais graves da doença (Sayani e Kwiatkowski²⁷).

A prevenção e tratamento da talassemia tornaram-se um problema mundial, devido à grande atividade migratória de indivíduos de regiões de maior prevalência para áreas onde a incidência é menor (Rund²⁵).

1.5.1 Beta-Talassemia

Uma das hemoglobinopatias de maior significância clínica no mundo, isto é, a β -talassemia, trata-se de um grupo de doenças heterogêneas, caracterizado por defeitos no gene presentes no cromossomo 11, resultando diminuição (β^+) ou ausência (β^0) de produção da β -globina (Mettananda e Higgs²⁴, Sayani e Kwiatkowski²⁷).

Atualmente, há a descrição de mais de 250 mutações que envolvem o gene da β -globina e a maioria delas é causada principalmente por mutações pontuais e por deleções que comprometem processos transcricionais e pós-transcricionais (Mettananda e Higgs²⁴).

A produção insuficiente da β -globina tem como consequência o excesso de α -globinas que se precipitam, causando eritropoiese ineficaz e, também, hemólise, causando anemia grave (Sanctis *et al.*¹, Voskou *et al.*⁸, Sayani e Kwiatkowski²⁷).

De acordo com sua gravidade, a doença pode ser assim classificada: talassemia menor, intermediária ou maior (Sanctis *et al.*¹, Voskou *et al.*⁸, Sayani e Kwiatkowski²⁷).

A talassemia maior, também conhecida como *anemia de Cooley's* ou *anemia do Mediterrâneo*, caracteriza-se por ser a forma mais grave da β -talassemia. Os indivíduos apresentam anemia severa, eritropoiese ineficaz e hemólise. Nesses casos, é fundamental adotar terapias regulares de transfusão de sangue e quelação de ferro. Em casos de tratamento inadequado, o resultado pode causar deformidades ósseas, diminuição de crescimento, icterícia, hepatoesplenomegalia, massas eritropoiéticas e úlceras nos membros inferiores, as quais podem surgir ao longo do primeiro ano de vida (American Society for Clinical Pathology Annual Meeting²³, Sayani e Kwiatkowski²⁷, Origa²⁸).

Os pacientes com talassemia intermediária podem desenvolver um quadro clínico bastante variável com anemia de grave a moderada, necessitando ou não de transfusões de sangue regulares. Em alguns casos, podem apresentar eritropoiese ineficaz, o que expõe a necessidade de avaliar se há sobrecarga de ferro (Sayani e Kwiatkowski²⁷). Por esse motivo, a Federação Internacional de Talassemia (TIF) criou uma nova classificação clínica da talassemia, uma vez a avaliação deve ser cautelosa, com base em vários parâmetros clínicos e hematológicos (Viprakasit e Ekwattanakit²⁹).

Indivíduos, que apresentam estado heterozigoto com anemia leve assintomática são classificados como talassemia menor, também conhecida como traço talassêmico, não necessitando de tratamento. Em mulheres grávidas a anemia pode ser mais acentuada, deixando de ser assintomática, sendo necessário em alguns casos suplementação de ácido

fólico e terapia transfusional (Sayani e Kwiatkowski²⁷, Viprakasit e Ekwattanakit²⁹, Chinelato³⁰).

A β -talassemia difundiu-se pelo mundo com a migração; acredita-se que aproximadamente 1,5% da população mundial sejam portadoras de β talassemia (Origa²⁸, Viprakasit e Ekwattanakit²⁹). As mutações de β talassemia variam de acordo com os grupos étnicos com mais frequência no Mediterrâneo, Oriente Médio, subcontinente indiano e sudeste Asiático até as ilhas do pacífico (Sanctis *et al.*¹).

A associação de traço falciforme com β talassemia é denominado HbS/ β -talassemia, ou seja, heterozigosidade dupla; quando o alelo β -talassêmico coexistente causa a completa inativação do gene β , a doença falciforme resultante é S/ β 0-Talassemia (S/ β 0-Tal), considerada a forma mais grave da doença, entretanto, quando o alelo β -talassêmico coexistente causa apenas a diminuição da transcrição do gene β , a doença resultante é S/ β +Talassemia (S/ β +Tal), a gravidade clínica está relacionada com o nível de comprometimento da produção de cadeias beta.

Indivíduos com ambas as condições revelam quadro clínico semelhante ao dos que têm anemia falciforme, porém, em alguns casos, os pacientes apresentam evolução mais grave, contribuindo para um diagnóstico diferencial por se desconhecer a presença de β -talassemia ao se diagnosticar a doença.

Entre os defeitos moleculares encontrados, 95,11% deles referem-se a mutações das beta-talassemias, em que a presença de HbS ocorre em 72,1% das variantes (Kato *et al.*⁴, Lobo *et al.*³¹).

Na Índia, a frequência de portadores de β -talassemia é de 0,3% a 15%; no continente africano, de 1% a 13%; na Europa, de 0,12% a 15%; e nos Estados Unidos, a proporção é de 1 para cada 55 mil nascidos vivos (Sanctis *et al.*¹, Chan *et al.*³²).

Atualmente, existem 2,7 milhões de brasileiros portadores de traço talassêmico, sendo 90% dos pacientes classificados com talassemia menor (Abrasta³³).

Não existe tratamento específico para β -talassemia. Por esse motivo, é de extrema importância investigar as mutações e identificar os indivíduos portadores da doença para obtenção do diagnóstico correto (Viprakasit e Ekwattanakit²⁹, Uludağ *et al.*³⁴).

1.6 Testes Clássicos para o Diagnóstico das Hemoglobinopatias

Os métodos diagnósticos variam de acordo com a idade dos indivíduos e estão divididos em quatro períodos: i pré-concepção, ii pré-natal, iii neonatal e iv pós-neonatal. Para o diagnóstico de *pré-concepção*, são usados métodos básicos que separam as proteínas nos progenitores, por exemplo, eletroforese de Hb, técnica de HPLC e focalização isoelétrica (Kato *et al.*⁴, Ferraz & Murao¹⁴).

O objetivo do diagnóstico *pré-natal* é identificar as mutações ainda no início da gravidez. Nele, a amostra de ácido DNA é extraída pela coleta de sangue fetal na nona semana de gestação para análise de proteínas. Foram desenvolvidas novas técnicas não invasivas, as quais detectam o DNA fetal na circulação materna a partir da quarta semana de gestação (Kato *et al.*⁴, Vrettou *et al.*²⁶).

Na triagem *neonatal*, logo após o nascimento, são realizadas: a triagem direcionada ou seletiva em recém-nascidos de pais com suscetibilidade genética para a doença falciforme e a triagem universal, realizada geralmente com 21 meses de idade mediante técnicas de análise de proteínas (Kato *et al.*⁴).

O diagnóstico precoce possibilita a utilização de medidas profiláticas, como tratamento com penicilina e educação familiar, reduzindo a mortalidade infantil nos primeiros cinco anos de vida de 25% para menos de 3% (Kato *et al.*⁴).

Com o crescimento populacional, atividades migratórias, aprimoramento das técnicas de diagnóstico da doença e aumento da sobrevivência dos indivíduos contribuíram com a disseminação das hemoglobinopatias. Com isso, a aderência aos programas de

intervenção, educação, orientação e triagem das hemoglobinopatias aumenta cada vez mais (Piel e Weatherall³⁵).

Dessa forma, em 2006 a Organização Mundial da Saúde implementou programas de abrangência nacional para melhorar o gerenciamento e a prevenção das hemoglobinopatias. Em 2007, a Federação Internacional de Talassemia, em reunião com a OMS, demonstrou a importância de promover o rastreamento populacional de hemoglobinopatias (Goonasekera *et al.*²).

Em 2014, estudos sobre o grande impacto das hemoglobinopatias na Europa incluíram em suas recomendações sobre políticas de saúde pública a importância da conscientização e de programas para triagem das hemoglobinopatias (Goonasekera *et al.*²).

Um marco na história brasileira foi o reconhecimento da doença como problema de saúde pública em 2001, com a inclusão da triagem das hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) pelo Sistema Único de Saúde (SUS), utilizando a técnica de eletroforese de hemoglobinas. Em 16 de agosto de 2005, foi publicada a Portaria nº 1.391, consolidando uma fase dessa iniciativa, e estabelecendo, no âmbito do SUS, as diretrizes para a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias (Cançado e Jesus³⁶).

Entre os testes clássicos utilizados para triagem dos pacientes com hemoglobinopatias, estão resistência globular osmótica eritrocitária em solução de NaCl a 0,36%, análise da morfologia eritrocitária, eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino, eletroforese de hemoglobinas em pH ácido, cromatografia líquida de alta performance, teste de falcização e teste de solubilidade e focalização isoelétrica, porém, através desses testes, não é possível detectar mutações de β -globina (Chinelato³⁰).

No Brasil, atualmente, é preconizado pela PNTN realizar as técnicas de focalização isoelétrica e de HPLC na primeira semana de vida. Muitos laboratórios têm adotado uma nova plataforma de eletroforese capilar, realizada a partir dos quatro meses de vida, especialmente nas regiões de prevalência alta de HbE e α -talassemias para melhor

detecção de estados heterozigotos e quantificação das HbBart, HbH, HbCS e HbQ-Tailândia (Viprakasit e Ekwattanakit²⁹, Brasil³⁷).

No entanto, essas técnicas de triagem não fornecem um diagnóstico definitivo. Por esse motivo, é necessário adotar outro método para confirmação do diagnóstico, identificação de portadores e detecção de novas e raras mutações decorrentes da imensa variabilidade genética em diferentes populações (Traeger-Synodinos e Hartevelde³⁸).

A caracterização molecular fornece o diagnóstico definitivo. Atualmente, utilizam-se várias técnicas moleculares para analisar o genoma completo, detectar mutação específica e triar portadores, como as de sequenciamento, responsáveis por estabelecer um diagnóstico mais preciso através da análise sequencial de DNA, sendo as mais comuns o Sanger e o pyrosequenciamento (Viprakasit e Ekwattanakit²⁹, Harrington *et al.*³⁹).

1.6.1 Resistência Globular Osmótica Eritrocitária em Solução de NaCl a 0,36%

A técnica de resistência globular osmótica eritrocitária em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,36% utiliza diferentes concentrações dessa solução para verificar a resistência dos eritrócitos à hemólise. Isso permite a visualização dos eritrócitos microcíticos que se tornam resistentes em comparação com hemácias normais, uma vez que, em solução de NaCl, há o aumento da resistência osmótica. O grau de hemólise é classificado por meio visual ou por medição fotométrica (Viprakasit e Ekwattanakit²⁹). Entretanto, essa técnica não é um teste específico para classificar hemoglobinopatias e gerar resultados positivos para algumas outras doenças, como a anemia ferropriva (Chinelato³⁰, Oliveira e Poli Neto⁴⁰).

1.6.2 Análise da Morfologia Eritrocitária

Os índices hematimétricos são obtidos de forma precisa e exata através de contadores automáticos sendo possível analisar aspectos em relação ao tamanho, à forma e à contagem de hemoglobina em eritrócitos nos esfregaços sanguíneos. A associação da morfologia eritrocitária com o teste de resistência osmótica mostra-se uma forma acessível e prática para triagem inicial das β -talassemias. Devido aos baixos níveis de hemoglobina S e altos níveis de hemoglobina fetal não é indicado para recém-nascidos (Ferraz e Murao¹⁴, Chinelato³⁰, Oliveira e Poli Neto⁴⁰).

1.6.3 Eletroforese de Hemoglobinas em pH Alcalino

Trata-se de técnica quantitativa e qualitativa que consiste na separação dos componentes de um sistema por meio de campo elétrico, com a possibilidade de analisar hemoglobinas normais e grande parte das hemoglobinas anormais, pois estas se mostram diferentes em relação a mobilidades eletroforéticas (American Society for Clinical Pathology Annual Meeting²³, Chinelato³⁰).

1.6.4 Eletroforese de Hemoglobinas em pH Ácido

É um método bastante eficaz para a confirmação de HbS, HbC e HbE, mas é uma técnica trabalhosa e de baixa sensibilidade e especificidade. Utiliza-se em caso de hemoglobinas que migram em posições semelhantes e, em caracterização de hemoglobina fetal na eletroforese em pH alcalino, é realizada para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas (American Society for Clinical Pathology Annual Meeting²³, Chinelato³⁰).

1.6.5 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

A técnica consiste na troca iônica por meio de um sistema fechado. Nesta ocorre a separação das hemoglobinas variantes com base na diferença de carga, e a força iônica do tampão de eluição supera a tração para a coluna e, dessa forma, a hemoglobina variante sai da coluna em um tempo de retenção (Chinelato³⁰). As substituições de aminoácidos que estão presentes na variante de hemoglobina irão alterar o tempo de retenção relativo ao da HbA (American Society for Clinical Pathology Annual Meeting²³). No entanto, algumas variantes da hemoglobina apresentam tempos e perfis de retenção muito semelhantes, obtendo uma identificação de variantes presuntiva, o que demanda testes moleculares para a confirmação do diagnóstico (Traeger-Synodinos e Harteveld³⁸, Colah *et al.* ⁴¹).

1.6.6 Teste de Falcização

As hemácias que possuem hemoglobina S em estado desoxigenado passam a ter formato de foice. Essa técnica, portanto, tem como objetivo acentuar o processo de desoxigenação com adição de substâncias redutoras, como o metabissulfito. Contudo, esse teste não distingue a hemoglobinopatia em questão, tampouco é indicado para recém-nascidos devido aos baixos níveis de hemoglobina S e aos altos níveis de hemoglobina fetal, podendo apresentar resultado falso-negativo (Ferraz e Murao¹⁴, Oliveira e Poli Neto⁴⁰).

1.6.7 Teste de Solubilidade

Esse teste é usado para detectar a presença de hemoglobina S. Seu princípio é a insolubilidade da HbS em estado reduzido, para que a hemoglobina S entre em estado desoxigenado e forme polímeros insolúveis em solução de alta molaridade. Esse teste não distingue traço falciforme S de homozigotos ou HbS em combinação com outras variantes de hemoglobina e não é indicado para recém-nascidos, devido aos baixos níveis de hemoglobina S e aos altos níveis de hemoglobina fetal, podendo apresentar resultado falso-negativo (Ferraz e Murao¹⁴, Oliveira e Poli Neto⁴⁰).

1.6.8 Focalização Isoelétrica (IEF)

Essa técnica se baseia na separação das hemoglobinas por meio de uma solução com vários anfólitos. A amostra é aplicada em um gel com essa solução e, sob a ação da corrente elétrica, esses anfólitos formam um gradiente de pH no gel e, assim, cada hemoglobina migra até o ponto do meio que tenha o ponto isoelétrico igual ao seu. A análise qualitativa da corrida pode ser feita visualmente, e a quantitativa, por sistema de computadores (Chinelato³⁰, Oliveira e Poli Neto⁴⁰). O IEF é um método trabalhoso e demorado e exige profissionais treinados para a interpretação dos resultados (Traeger-Synodinos e Hartevelde³⁸).

1.6.9 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A técnica consiste na amplificação enzimática das sequências genômicas da β -globina, como o local da restrição, para obter o diagnóstico da anemia falciforme. As

sequências de DNA são amplificadas através de ciclos de temperatura, gerando grande número de cópias identificadas para análise posterior (Kubista *et al.*⁴²).

O aparelho qPCR consiste em um termociclador com uma fonte de luz de excitação integrada, sendo adicionado corante intercalante ou sonda marcada com fluoróforo à mistura de reação para detectar fluorescência e, simultaneamente, o *software* exibe os dados de uma curva de amplificação de DNA, o qual fica marcado com fluorescência (Kubista *et al.*⁴²).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é simples, rápida e facilmente executável para a triagem das hemoglobinopatias, mas pode apresentar resultados ambíguos, havendo a necessidade de confirmar o diagnóstico por meio de outras técnicas (Singh *et al.*⁴³).

1.6.10 Sequenciamento de nova geração

Trata-se de um sequenciamento de alto desempenho que possui plataformas que sequenciam direta e individualmente as moléculas de DNA. Isso permite aumentar a escala das análises genômicas, genotipando e sequenciando milhares de regiões e genomas de interesse, o que gera grande aumento na qualidade dos dados produzidos, assim como no tamanho de sequências (*reads*), em grande velocidade. Mesmo em populações de organismos com informações genéticas desconhecidas, esses avanços permitem diversas análises genômicas, contribuindo para o entendimento e o estudo da variação genética, através da descoberta de marcadores moleculares e genes de importância (Turchetto-Zolet, *et al.*⁴⁴).

1.7 Pyrosequenciamento

O pyrosequenciamento foi descrito pela primeira vez em 1985. Trata-se de um método quantitativo e automatizado. Suas principais aplicações são: genotipagem de microrganismos, detecção de mutações desconhecidas, análise de SNPs, identificação de frequências de alelos, DNAs de difícil obtenção, análise de metilação e mapeamento alélico (Ronaghi⁴⁵, Ahmadian *et al.*⁴⁶).

O princípio da técnica consiste em um sequenciamento por síntese através da incorporação de nucleotídeos em tempo real, por meio da luminescência (Ronaghi⁴⁵).

Os nucleotídeos são adicionados à reação e, caso sejam complementares à base da fita molde, serão incorporados pela polimerase. Cada nucleotídeo incorporado é acompanhado por liberação de pirofosfato (PPi) que é convertido rapidamente em ATP pela enzima sulfúrilase. Essa reação fornece energia para a enzima luciferase converter luciferina em oxiluciferina, gerando luz visível (Ronaghi⁴⁵, Ahmadian *et al.*⁴⁶).

A luz é detectada através de dispositivo de carga acoplado à câmera fotográfica (CCD). Cada sinal de luz é visto como um pico no pyrograma e corresponde a um nucleotídeo incorporado (Figura 4) (Ronaghi⁴⁵).

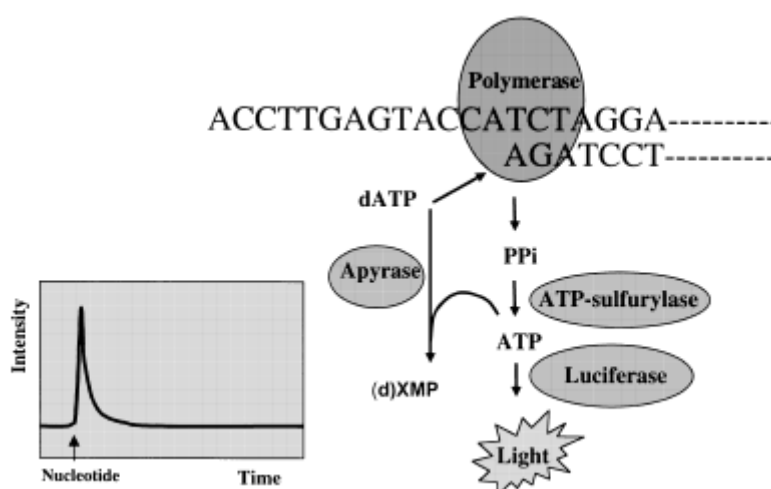


Figura 4 – Representação esquemática da reação do pyrosequenciamento

Fonte: Ronaghi⁴⁵

Os nucleotídeos não incorporados são degradados pela enzima *apirase*, iniciando o ciclo novamente. Conforme o processo continua, a sequência complementar à fita de DNA é construída e demonstrada em picos no programa. Ao final da reação, os resultados serão analisados no *software* disponibilizado pelo fabricante, denominado Pyrograma (PQ24 Software) (Ronaghi⁴⁵).

O pyrosequenciamento mostrou ser um método bastante confiável para o sequenciamento de regiões relativamente pequenas dentro dos genes da globina, tendo como vantagens ser uma técnica bastante rápida, flexível, precisa e confiável. Além disso, gera resultados mais rápidos e tem menor custo de funcionamento quando comparado a outros sequenciadores (Ronaghi⁴⁵).

1.8 Sequenciamento Clássico Sanger

A técnica tem como princípio básico a marcação fluorescente e o método de detecção do sinal através de um sistema de eletroforese capilar para a separação de fragmentos de DNA (Sanger *et al.*⁴⁷, BIOSYSTEMS⁴⁸).

A DNA polimerase sintetizará uma fita complementar, a partir de uma molécula de fita simples de DNA, a qual será formada através da adição de deoxinucleotídeos até que seja inserido um dideoxinucleotídeo conhecido como *nucleotídeo de terminação*, que finaliza o processo de formação de fragmentos de DNA entre a extremidade 5' do *primer* e o nucleotídeo de terminação (BIOSYSTEMS⁴⁸).

A marcação utilizada é feita por fluoróforos que são capazes de emitir fluorescência quando excitadas por uma luz ou laser. O sistema de sequenciamento utiliza quatro fluorocromos diferentes, possuindo vários comprimentos de ondas que correspondem às cores azul, vermelho, amarelo e verde (Figura 5) (Sutton *et al.*⁴⁹).

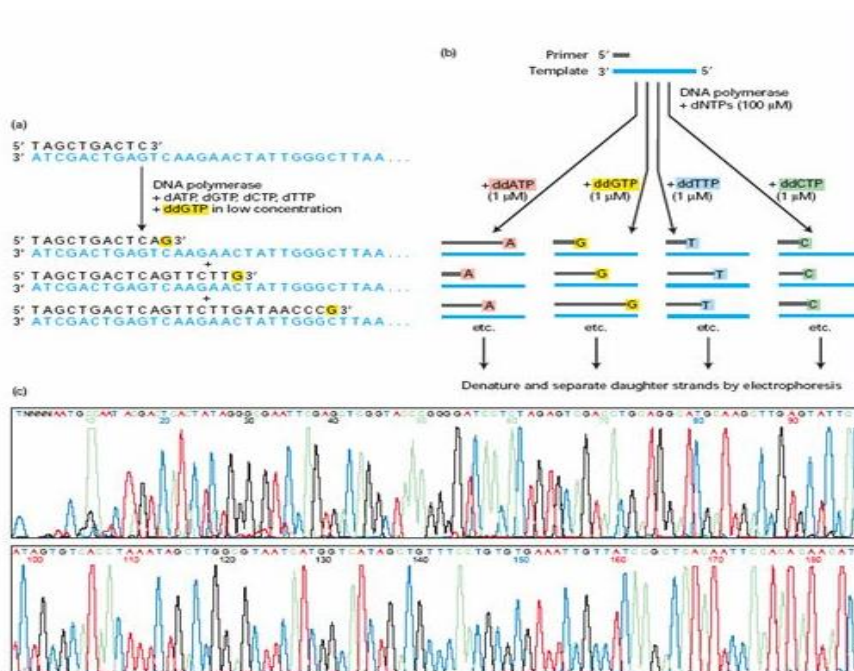


Figura 5 – Representação do sequenciamento de Sanger.

Fonte: BIOSYSTEMS⁴⁸

O resultado do sequenciamento de Sanger consiste na determinação da sequência de todos os nucleotídeos das duas fitas de DNA para um determinado fragmento, que varia de 200 a 1.000 pares de bases (BIOSYSTEMS⁴⁸).

Esse sistema é realizado através do *Big Dye*, e os sequenciamentos utilizam a técnica de *Cycle Sequencing* nas reações, que engloba uma técnica de PCR bases (BIOSYSTEMS⁴⁸).

O sequenciamento Sanger é considerado hoje padrão-ouro para a definição das mutações do gene da β -globina para a classificação das β -talassemias bases (BIOSYSTEMS⁴⁸).

2 JUSTIFICATIVA

Os métodos de triagem usados para identificar hemoglobinopatias não oferecem um diagnóstico preciso, uma vez que não conseguem diferenciar facilmente o genótipo S/ β -talassemia do genótipo SS. Perante essa dificuldade, faz-se necessário um teste confirmatório rápido em larga escala e com baixo custo.

3 OBJETIVO

Desenvolver um teste diagnóstico de alto rendimento para confirmação das doenças falciformes.

3.1 Objetivos Secundários

Descrever as mutações de S/ β -talassemias mais comuns em pacientes com Doenças Falciformes no Brasil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Recrutamento

Proveniente de um projeto de estudo norte-americano, o *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI), a coorte retrospectiva do projeto Estudo Longitudinal Multicêntrico da Doença Falciforme no Brasil, REDS-III, tem como foco a segurança transfusional em receptores de países, como Estados Unidos, Brasil, China e África do Sul (Kleinman *et al.*⁵⁰) através de caracterização epidemiológica, uso de hemoderivados (Karafin *et al.*⁵¹), risco do vírus da imunodeficiência humana (HIV) entre outras infecções transmitidas pelo sangue.

O REDS-III é o único programa que estabelece uma coorte da DF com objetivo de caracterizar os desfechos de saúde em pacientes portadores de doença falciforme (incluindo transfusionais) com colaboração de pesquisadores norte-americanos do Instituto de Pesquisa de Sistemas Sanguíneos, em São Francisco, na Califórnia, e de pesquisadores brasileiros de quatro hemocentros brasileiros: Fundação Hemominas; em três cidades mineiras: Belo Horizonte (HBH), Juiz de Fora (JFO) e Montes Claros (MOC); Fundação Hemorio, na cidade do Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro; Fundação Hemope em Recife, no estado de Pernambuco; e Instituto da Criança, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em São Paulo, no estado de São Paulo.

Esse projeto contou com financiamento das seguintes instituições: Instituto Nacional de Coração, Pulmões e Sangue (NHLBI) e Instituto Triangular de Pesquisa (RTI). E, também, obteve aprovação do Comitê Brasileiro Nacional de Ética para Pesquisa (Conep), de comitês de ética locais de cada centro participante e do *Institute Review Board na University of California, San Francisco* (UCSF).

4.1.1 Randomização

Pacientes com pelo menos um encontro clínico nos últimos três anos resultou em 4.956 inscritos, a fim de alcançar uma meta de recrutamento de 3 mil participantes.

A randomização foi realizada em relação à idade (crianças definidas como menores de 18 anos ou adultos definidos com idade ≥ 18 anos), gênero e distribuição de genótipo da DF de cada hemocentro.

Os pacientes elegíveis foram recrutados em visitas clínicas onde foi realizada entrevista, abstração de registro médico e coleta de sangue. Também foram obtidas informações, como história de transfusão e esclarecimentos do banco de sangue, incluindo fenótipo de glóbulos vermelhos e dados de anticorpos provenientes de cada centro.

Nas entrevistas, foram coletados dados demográficos abrangentes, sinais vitais, cor da pele de acordo com padrões do censo brasileiro. Os registros médicos foram revisados para resumir dados clínicos, utilizando definições das manifestações fenotípicas da DF (Ballas *et al.*⁵²). A abstração incluiu qualquer documentação no registro do paciente de eventos de complicações da DF que ocorreram durante a vida dos pacientes, como acidente necrose avascular, priapismo, úlceras nas pernas, bacteremia e outras relacionadas a hospitalizações, transfusões, exames laboratoriais e exames de triagem que ocorreram no ano anterior à inscrição também foram abstraídos.

Foi criado um abrangente banco de dados eletrônico para unir todas as informações clínicas, laboratoriais e transfusionais recolhidas durante as visitas de inscrição entre o período de 2013 a 2015.

O sangue foi coletado em tubos EDTA, separados em componentes celulares, plasmáticos e alíquotas para armazenamento em um Biobanco na Universidade de São Paulo.

4.2 Casuística

O presente estudo trata-se de descrição transversal com uma coorte retrospectiva pertencente ao projeto Estudo Longitudinal Multicêntrico da Doença Falciforme no Brasil, REDS-III, que foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Médica (LIM 46) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMTUSP).

O estudo de coorte sobre a DF brasileira do REDS-III envolveu 2.793 pacientes entre 2013 e 2015. Um total de 2.748 amostras foi obtido a partir da primeira visita dos pacientes inscritos, os quais já haviam sido previamente diagnosticados com hemoglobinopatias pela técnica de HPLC, provenientes de quatro centros brasileiros: 93 amostras do Instituto de Tratamento do Câncer Infantil (ITACI), de São Paulo; 716 amostras do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio), do Rio de Janeiro; 1.400 amostras da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Minas Gerais (Hemominas - Minas Gerais); e 539 amostras da Fundação de Hematologia e Hemoterapia (Hemope – Pernambuco).

A Tabela 1 apresenta os dados referentes à classificação do genótipo da DF em participantes da coorte brasileira da DF, o REDS-III. Esses dados são provenientes de cada centro, usando cromatografia líquida de alta performance. Cada local utilizou uma forma diferente de classificação: o do Rio de Janeiro combinou os resultados de SS e S β 0, o de Minas Gerais combinou S β 0 e S β +, os de São Paulo e Pernambuco forneceram resultados HbSS, S β 0 e S β +, separadamente.

Tabela 1 – Resultados provenientes dos centros usando HPLC

	Rio de Janeiro	São Paulo	Minas Gerais	Pernambuco	Total
HbSS		67 (72,0%)	909 (64,9%)	460 (85,3%)	1.436 (52,2%)
HbSC	112 (15,6%)	15 (16,1%)	452 (32,3%)	46 (8,5%)	625 (22,7%)
HbSβ0		9 (9,7%)		10 (1,9%)	19 (0,7%)
HbSβ+ ou HbSβ0			39 (2,8%)		39 (1,4%)
HbSS ou HbSβ0	567 (79,2%)				567 (20,6%)
HbSβ +	37 (5,2%)	2 (2,2%)		23 (4,3%)	62 (2,3%)
Total	716	93	1.400	539	2.748

Legenda: HbSS: anemia falciforme; HbSC: Hemoglobinopatia SC; HbS β +: S β + talassemia; HbS β 0: S β 0 talassemia

Como não é viável solicitar termo de consentimento de forma retrospectiva a esses pacientes, obteve-se a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMTUSP) e aprovação na Plataforma Brasil (CAAE: 64207817.3.0000.0065) (ANEXO A), para o uso dessas amostras, uma vez que será mantido o anonimato dos pacientes, trabalhando-se apenas com o número de identificação das amostras.

4.3 Critério de Inclusão

Todos os indivíduos com diagnóstico de hemoglobinopatia e que foram elegíveis ao projeto de pesquisa REDS-III no período de 2013 a 2015 e que possuíam alíquotas de glóbulos vermelhos.

4.4 Critério de Exclusão

Todos os indivíduos elegíveis ao projeto de pesquisa REDS-III com amostras com baixo volume ou diagnóstico confirmado, como HbAA (ausência de hemoglobinopatias).

4.5 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada por automação, utilizando-se o aparelho QIASymphony (Qiagen, Alemanha) com o *kit* QIASymphonyDNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), cuja tecnologia de *beads* magnéticas está de acordo com instruções e protocolo do fabricante.

A cada ciclo de extração foram utilizadas como controles amostras já sabidamente positivas e negativas, para verificar possíveis contaminações e inibidores, além da reprodutibilidade do ensaio.

O volume inicial para extração foi de 500 μ L eluído em 50 μ L e, posteriormente, acondicionado em *freezer* -20 °C até sua utilização.

4.6 Pyrosequenciamento

O DNA das amostras, controles positivos e negativos, foram submetidos à PCR convencional, utilizando-se *primers* desenhados especificamente para este ensaio. Para o desenho dos *primers*, foi utilizado o *PyroMark™ Assay Design Software* (ADSW), visando amplificar um fragmento de 17 pb na mesma região proposta por Sutton *et al.*⁴⁹ (Quadro 1), de acordo com o seguinte protocolo: *PyroMark Master Mix* 2x 12,5 μ L; *Coral Load™ Concentrate* 10X2,5 μ L; *Primer* 1 μ L; H₂O 4 μ L e 5 μ L de DNA para uma reação com volume final de 25 μ L. Para cada reação, foram utilizadas como controles amostras já sabidamente

positivas e negativas, para verificar possíveis contaminações e inibidores e a reprodutibilidade do ensaio.

Primer	Sequência 5'-3'
<i>Forward</i>	ATTGCTTACATTTGCTTCTGACAC
<i>Reverse</i>	Biotin - ACCAACTTCATCCACGTTTCAC

Quadro 1 – Desenho dos primers utilizados para reação de PCR

A reação de amplificação foi realizada no aparelho *Veriti® ThermalCycler* de acordo com o seguinte protocolo: uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 1 minuto, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Previamente à reação de pyrosequenciamento, foi adicionado 2 µL de grânulos de estreptavidina (GE *Healthcare*) revestida de *sepharose* para a imobilização dos fragmentos amplificados biotinizados; 40 µL de *Buffer* de ligação; 1 µL *Primer Sequencing* (Quadro 2); 12 µL de H₂O com o produto PCR biotinizado para cada poço da placa *PyroMark Q96 ID* de PCR sofrendo constantemente agitação por 10 minutos a 1.400 rpm. Em seguida foram feitas lavagens e foi realizada a desnaturação dos fragmentos em cadeias simples de DNA no vácuo *PyroMark™ Q24 Prep*.

Primer	Sequência 5'-3'
<i>Sequencing</i>	CATGGTGCATCTGACT

Quadro 2 – Desenho do primer de sequenciamento

A placa foi incubada no TB2 *Thermoblock* (Biometra) a 80 °C durante 2 minutos, posteriormente, as amostras foram esfriadas em temperatura ambiente (15 °C a 25 °C) por pelo menos 5 minutos. As enzimas, substratos e nucleotídeos (kit *PyroMark Q24 Gold Kit*

(Qiagen, Alemanha) necessários à reação foram dispensados em um cartucho e introduzidos no aparelho *PyroMark Q24* juntamente com a placa.

Os resultados foram interpretados e analisados no *software* disponibilizado pelo fabricante, denominado *Pyrograma (PQ24 Software)*, versão 2.1, no qual, para cada perfil genotípico (Figuras 6, 7 e 8), são encontrados padrões de picos, respectivamente, para HbSS, HbSC ou HbAS.

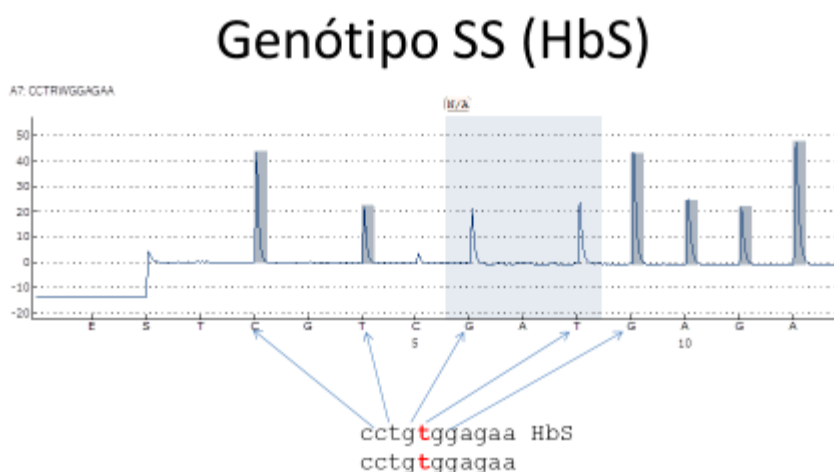


Figura 6 – Pyrograma observado para a classificação do Genótipo SS

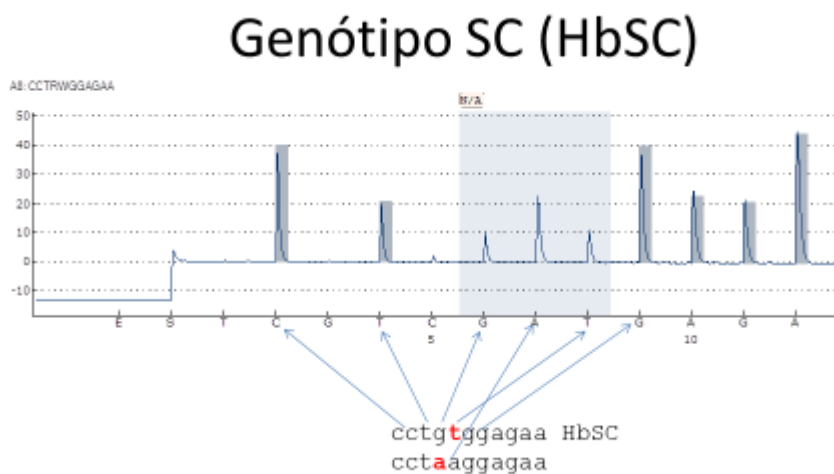


Figura 7 – Pyrograma observado para a classificação do genótipo SC

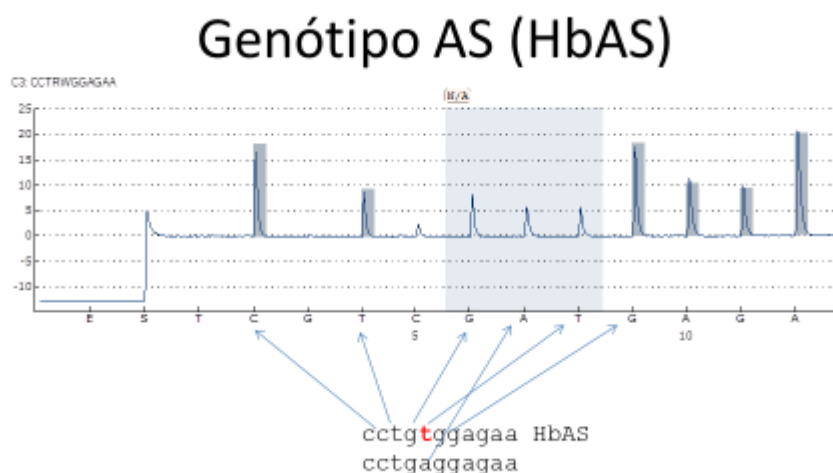


Figura 8 – Pyrograma observado para a classificação do genótipo AS

4.7 Sequenciamento de Sanger

Todas as amostras de pacientes diagnosticados como heterozigose S (HbAS) pela técnica de pyrosequenciamento ou com resultados discrepantes entre HPLC e pyrosequenciamento foram submetidas ao sequenciamento de Sanger.

Primeiramente, foi realizada uma PCR convencional para amplificação do gene da β -globina, utilizando o seguinte protocolo: tampão 10 μ L x 4,5 μ L (*Invitrogen*), magnésio 24 mM (*Invitrogen*), dNTP 10 mM (*Invitrogen*), taq Platinum 5 U/ μ L (*Invitrogen*); DNA 5 μ L *primer* P1 10 pmoles/ μ L e *primer* P5 10 pmoles/ μ L, descritos no Quadro 3; para uma reação com final de 50 μ L. Para cada reação, foram utilizadas como controles amostras sabidamente positivas e negativas, para verificar as possíveis contaminações, os inibidores e a reprodutibilidade do ensaio.

Primers	Sequência 5'- 3'
<i>Forward</i> (P1)	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG
<i>Reverse</i> (P5)	TCATTCGTCTGTTTCCATTC

Quadro 3 – Desenho dos *primers* usados no sequenciamento
Fonte: Sutton et al.⁴⁹

A reação de amplificação foi realizada no aparelho *Veriti® Thermal Cycler*, conforme o seguinte protocolo: uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 16 segundos, anelamento a 55 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e uma etapa de extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Posteriormente, o produto da PCR foi purificado através do *QIAquick 96 PCR Purification Kit®* (Qiagen, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. Foram adicionados de 15 ng a 45 ng de DNA à reação de sequenciamento, seguindo o protocolo do fabricante do Kit ABI 3500 sequenciador com o *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)* e 5 pmoles/ μ L dos *primers*. A reação foi realizada em termociclador automático com 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos.

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com a adição de 80 μ L de isopropanol 80% e, posteriormente, adicionado ao precipitado seco 10 μ L de formamida e levado ao sequenciador automático (*ABI3500 Sequencer, ABI; AppliedBiosystems*).

As sequências obtidas foram editadas e analisadas através do software *Sequencher (Gene Codes Corporation)* e classificadas de acordo com *HbVar database*.

4.8 Programa de Medicina Personalizada (TOPMED)

A coorte brasileira da DF divulgada no projeto REDS-III foi selecionada para participar do Programa de Medicina Personalizada (TOPMed) do NHLBI, que gera o sequenciamento do genoma completo e outros dados em larga escala de coortes fenotipadas. O programa integra dados em larga escala *-omics* com dados moleculares, comportamentais, imagéticos, ambientais e clínicos para melhorar a prevenção e o tratamento de doenças relacionadas ao sangue, entre outras (Carneiro-Proietti⁵³).

O sequenciamento do genoma completo foi realizado em amostras da coorte brasileira da DF do REDS-III em centros de sequenciamento com uma profundidade média de 39 vezes, usando DNA proveniente do sangue. Foi construído uma biblioteca livre de PCR, e a tecnologia aplicada foi a plataforma Illumina HiSeq X (nhlbiwgs.org). Essas sequências foram utilizadas na presente pesquisa como um meio de confirmação final do genótipo da DF em combinação com sequências de Sanger. Os resultados do ensaio de pyrosequenciamento foram comparados com a classificação final do genótipo da DF.

5 RESULTADOS

O estudo de coorte brasileira da DF do REDS-III envolveu 2.793 pacientes entre 2013 e 2015. Um total de 2.748 amostras foi obtido desde a primeira visita dos pacientes inscritos.

Todas as amostras com resultados heterozigotos de S (n=100) ou discrepantes entre HPLC e Pyro (n=168) foram submetidas ao sequenciamento de Sanger do gene HBB para atribuir um resultado final de genótipo. Quando o sequenciamento completo do genoma dos pacientes da coorte ficou disponível pelo projeto TOPMed, todos os resultados foram comparados. Vinte amostras com resultados discrepantes entre a classificação final do REDS-III e a classificação TOPMed foram repetidas usando o sequenciamento de Sanger e um genótipo final foi então designado.

A comparação dos resultados de Pyro com a classificação confirmada final do genótipo da DF é mostrada na Tabela 2. O ensaio de Pyro identificou corretamente 1.906 (98,7%) das HbSS de 1.930 amostras e 628 (98,7) das 636 amostras de HbSC. Das 179 amostras restantes, o Pyro indicou corretamente heterozigose S em 165 (92,2%).

Tabela 2 – Comparação dos resultados do pyrosequenciamento com a classificação final da DF, estudo de coorte REDS-III Brasil

Classificação final da DF	Pyrosequenciamento			Total
	HbSS	HbSC	HbAS	
HbSS	1903	12	15	1930
HbSC	8	628		636
HbS β +	9		72	81
HbS β 0	4		80	84
HbSD	1		6	7
HbS/HPFH	3			3
HbSJ			2	2
S/Quebec-Chori			1	1
S/K-Woolwich			1	1
S/Korle-Bu			1	1
S/Porto Alegre			1	1
S/Deer Lodge			1	1
Total	1934	640	180	2748

Legenda: HbSS: anemia falciforme; HbSC: Hemoglobinopatia SC; HbAS: traço falciforme; S β +: β + talassemia; S β 0: β 0 talassemia, HbSD hemoglobinopatia SD; HbSJ: hemoglobinopatia SJ; S/HPLC: persistência hereditária da hemoglobina fetal; S/Quebec-Chori: hemoglobinopatia Quebec Chori; S/K-Woolwich: hemoglobinopatia K-Woolwich; S/Korle-Bu: hemoglobinopatia Korle-Bu; S/Porto Alegre: hemoglobinopatia Porto Alegre.

O sequenciamento de Sanger permitiu-nos definir as mutações da β -talassemia na população estudada. A distribuição das mutações variou de acordo com as regiões estudadas (Tabela 3). A mutação mais comum foi a mutação β 0, HBB:c.118CT (Gln40Stop) [códon 39 (C>T)], em todos os locais, com exceção de Pernambuco. Estado estado, cuja mutação β + HBB:c.92+5G>C [IVS-I-5 (G>C)] foi a mais comum. No estado do Rio de

Janeiro, identificou-se uma mutação rara do HBB:HBB:c.75T>A [codão 24 (T>A)], uma variante que leva à talassemia leve de S β +.

Nas Figuras 9 e 10, visualizam-se exemplos de mutações da β -globina para as classificações em S β + e S β 0 talassemia, obtidas pelo programa *Sequencher*.

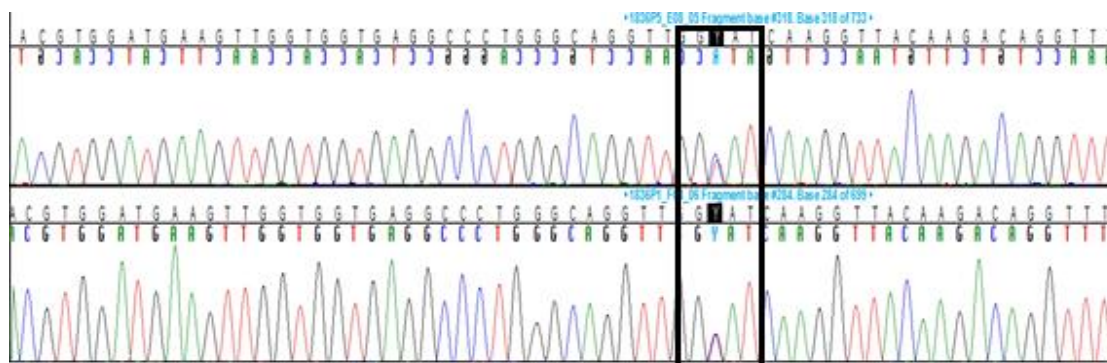


Figura 9 – Mutação de β + talassemia (HBB:c.92+6T>C)

Fonte: Autoria Própria.

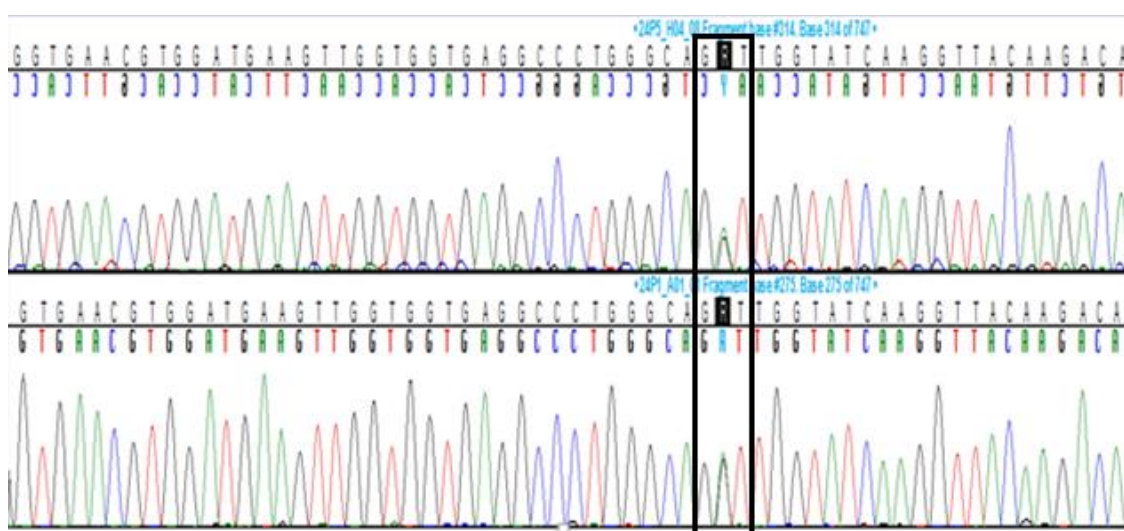


Figura 10 – Mutação de β 0 talassemia (HBB:c.92+1G>A)

Fonte: Autoria Própria.

Um resumo geral (Figura 11) apresenta a classificação original feita por HPLC nos locais participantes, as amostras submetidas ao sequenciamento de Sanger e a classificação final do genótipo da DF, REDS-III, considerando os resultados obtidos neste trabalho, os quais foram comparados ao sequenciamento genômico completo gerado pelo TOPMed.

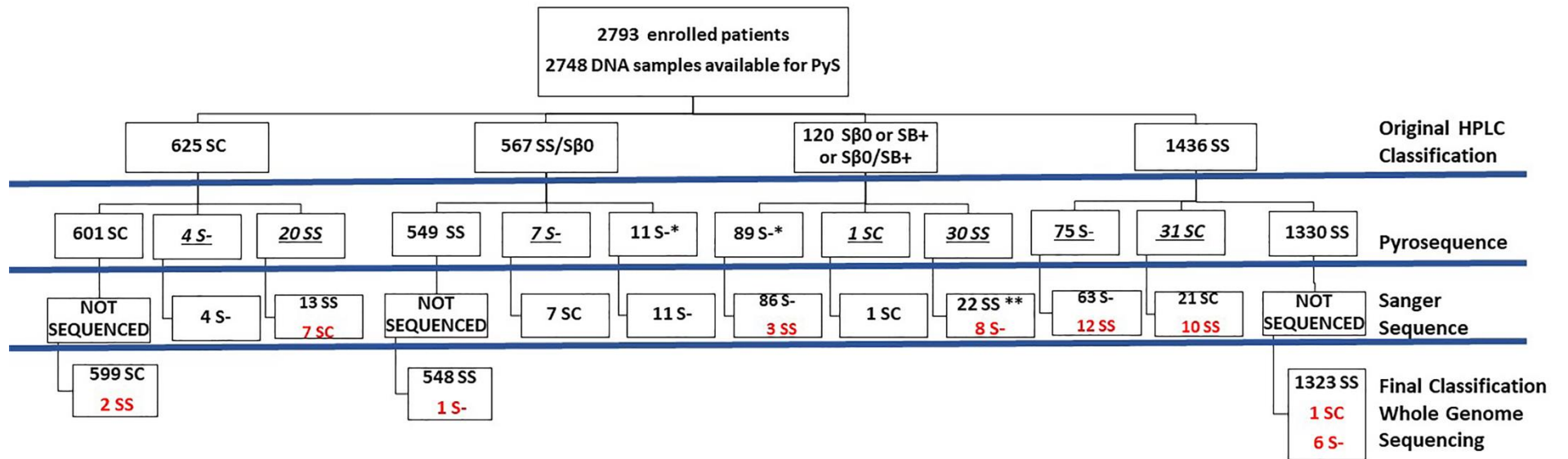


Figura 11 - Distribuição dos pacientes com DF de acordo com diferentes testes, estudo de coorte REDS-III Brasil SCD.

Tabela 3 – Classificação das mutações de beta-talassemia

Mutações	B-Talas.	MG	PE	RJ	SP	n (%)
HBB:c.118C>T(Gln40Stop)[codon 39 (C>T)]	SB0	26(38,8)	6(14,0)	10(23,3)	5(41,7)	47 (28,5)
HBB:c.92+6T>C [IVS- I-6 (T>C)]	SB+	6(8,9)	10(23,3)	7(16,3)	2(16,7)	25 (15,2)
HBB:c.92+1G>A [IVS-I-1 (G>A)]	SB0	11(16,4)	4(9,3)	5(11,6)	1(8,3)	21 (12,7)
HBB:c.93-21G>A [IVS-I-110 (G>A)]	SB+	7(10,4)	3(7,0)	5(11,6)	2(16,7)	17 (10,3)
HBB:c.92+5G>C [IVS-I-5 (G>C)]	SB+	1(1,5)	11(25,6)	2(4,7)	1(8,3)	15 (9,1)
HBB:c.-79A>G(-29AG) [(-29A>G)]	SB+	3(4,5)		6(14)		9 (5,5)
HBB:c.92+5G>A [IVS-I-5 (G>A)]	SB+	2(3,0)	1(2,3)	3(7)	1(8,3)	7 (4,2)
HBB:c.315+1G>A [IVS-II-1 (G>A)]	SB0	4(6,0)		2(4,6)		6 (3,6)
Htz IVS-II-849 (A>G)	SB0	1(1,5)	2(4,6)			3 (1,8)
Htz PolyA, AATAAA>AACAAA	SB+	2(3,0)				2 (1,2)
Htz -88 (C>T)	SB+		2(4,6)			2 (1,2)
HBB:c.-138C>T	SB+		1(2,3)			1 (0,6)
Htz IVSII-839(T>C) Htz IVSII-844 (C>A)	SB+			1(2,3)		1 (0,6)
DELEÇÃO 572het_delG	SB0	1(1,5)				1 (0,6)
HBB:c.321_322insG Htz Cod 106/107(+G)	SB0		1(2,3)			1 (0,6)
HBB:c.92+2T>C Htz IVSI-2 (T>C)	SB0	1(1,5)				1 (0,6)
HBB:c.75T>TA	SB+			1(2,3)		1 (0,6)
p.Glu7Glyfs	SB0			1(2,3)		1 (0,6)
HBB:c.92+2T>G	SB0		1(2,3)			1 (0,6)
Htz Stop+4 (C>T)	SB+	1(1,5)				1 (0,6)
Nenhuma mutação encontrada nos éxons 1 e 2*	SB+/SB0	1(1,5)	1 (2,3)			2 (1,8)
Total		67	43	43	12	165

* Sem DNA disponível para outras seqüências.

6 DISCUSSÃO

No contexto do diagnóstico das hemoglobinopatias, o desenvolvimento e implantação de métodos rápidos e precisos são de extrema importância, especialmente em situações em que os testes convencionais podem não ser possíveis ou confiáveis. No presente trabalho, por exemplo, amostras disponíveis foram mantidas refrigeradas e, assim, os testes baseados em hemoglobina configuram-se menos confiáveis, pois, podem perder estabilidade. A capacidade de diferenciar SS da talassemia S β 0 também nem sempre é possível usando ensaios à base de hemoglobina, pois quase toda hemoglobina detectada é hemoglobina S sem hemoglobina A presente. Na ausência de informações sobre mutações da hemoglobina nos pais ou em outros testes clínicos e laboratoriais, é necessário o teste baseado em DNA para confirmar o genótipo da DF. No entanto, esperava-se que a grande maioria dos casos fosse homocigoto SS e, dessa forma, seria possível realizar o sequenciamento de um número significativo de amostras, sendo trabalhoso e dispendioso diferenciá-los. O pyrosequenciamento é uma técnica relativamente rápida e simples e que permite uma abordagem em larga escala, fornecendo, assim, um diagnóstico eficiente. No presente estudo, foi utilizada a técnica de pyrosequenciamento para classificar o diagnóstico de hemoglobinopatia dos participantes de um grande estudo de coorte multicêntrico de DF, por meio da diferenciação dos indivíduos em HbSS, HbSC e heterocigoto S. Isso permitiu o sequenciamento direcionado de Sanger apenas em participantes com resultados não concordantes com os do diagnóstico clínico atribuído no centro de tratamento (n=165) e em amostras heterocigotas de S (n=100) para identificação de mutações na hemoglobina. O ensaio de pyrosequenciamento identificou corretamente 2.699 (98,2%) das amostras e provou ser uma técnica satisfatória para testes em larga escala.

O pyrosequenciamento é uma ferramenta altamente confiável para a determinação de pequenas regiões dentro dos genes da globina e tem a vantagem de ser uma técnica relativamente simples. Além disso, o pyrosequenciamento é mais rápido e está associado a um menor custo de operação quando comparado a outras metodologias de sequenciamento

(Ronaghi⁴⁵). Foram identificadas 49 amostras classificadas incorretamente pelo Pyro, principalmente devido ao baixo nível dos picos no pirograma, o qual poderia ser melhorado pela padronização dos níveis do pico abaixo dos quais o lote deveria ser repetido.

Neste estudo, também, foram descritas as mutações mais comuns da talassemia $\beta +$ e $\beta 0$ entre os participantes da coorte de talassemia $S\beta$ em quatro estados do Brasil. Das amostras heterozigotas de S confirmadas por Sanger, 84 foram classificadas como talassemia $S\beta 0$ e 81 como talassemia $S\beta +$.

Os tipos de mutações de para diferenciá-los β -talassemia demonstrados nesta coorte refletem a diversidade genética da população estudada, uma vez que a amostra brasileira é o resultado da miscigenação de diferentes grupos em vários períodos de tempo. Os espanhóis colonizadores misturaram-se às populações indígenas e aos escravos africanos durante três séculos. Mais tarde, houve a imigração de indivíduos da Espanha, da Itália e de Portugal, contribuindo ainda mais para a diversidade da população brasileira atual (Bravo-Urquiola *et al.*⁵⁴).

A mutação mais frequente em nossos indivíduos, a HBB:c.118C>T (Gln40Stop), códon 39 (C>T), também é a mutação mais frequente da talassemia por $S\beta$ no Mediterrâneo. Acredita-se que o códon 39 (C>T) seja de origem romana e tenha alta prevalência nas regiões da Sardenha, Itália continental, Espanha, Portugal e Tunísia (Sanctis *et al.*¹). Diferentes estudos também identificam que essa mutação é frequente na Venezuela (Bravo-Urquiola *et al.*⁵⁴), Norte da Grécia (Kalleas *et al.*⁵⁵), Síria (Murad *et al.*⁵⁶) e a confirmam na Tunísia (Quali *et al.*⁵⁷) e na Itália (Monni *et al.*⁵⁸).

A segunda mutação de $\beta 0$ talassemia mais comum em nossa coorte, a IVS-I-1, apresenta uma distribuição geográfica restrita nos países do Mediterrâneo Oriental (Síria, Líbano, Jordânia, Palestina e Egito) (Murad *et al.*⁵⁶).

A presença da mutação IVS-I- 6, a mutação $\beta +$ mais comum em nossa coorte, parece ser uma contribuição dos portugueses para a constituição genética da população, pois corresponde a 29,4% dos alelos nas mutações $\beta +$ em Portugal (Bravo-Urquiola *et al.*⁵⁴, Rocha e Freitas⁵⁹).

Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores em populações brasileiras Rocha e Freitas⁵⁹, Fernandes *et al.*⁶⁰, Reichert *et al.*⁶¹, Carrocini *et al.*⁶²). Como esperado, considerando a atividade migratória da população brasileira e a ancestralidade, o padrão observado é semelhante ao das populações mediterrâneas. De maneira interessante, um estudo que identificou mutações em 31 pacientes com talassemia S β no estado do Rio Grande do Norte, identificaram 15 pacientes (48,4%) com a mutação IVS-I-1, 13 (41,9%) com a mutação IVS-I-6, 2 (6,5%) com a mutação IVS-I-110 e 1 (3,2%) com a mutação IVS-I-5 mas não identificou a mutação do códon 39 (C>T), a qual foi comum em nosso estudo e em outros no Brasil (Cabral *et al.*⁶³).

Diferentemente dos outros estados deste estudo, a mutação mais comum no estado de Pernambuco foi a IVS-I-5 (G>C). Essa mutação é muito comum na Ásia, especialmente na Malásia e Indonésia e em várias regiões da Índia (Silveira *et al.*⁶⁴). Nos estudos realizados por Khan *et al.*, entre 2011 e 2013, em quatro províncias do Paquistão, a mutação mais frequente detectada em um total de 63 amostras de β -talassemia foi a IVS-I-5 (G>C) (33,9%) (Khan *et al.*⁶⁵). Na Índia, mais de 90% das mutações de β -talassemia envolvem a IVS1-5 (G>C) (Warghade *et al.*⁹, Patel *et al.*⁶⁶). Semelhante aos achados deste estudo, as pesquisas de Silva⁶⁷ e Araujo⁶⁸ também identificam essa mutação na população de Recife (PE). No século XVII, a cidade de Recife era um importante porto comercial e, assim, e possivelmente pessoas do subcontinente indiano (Goa) tenham sido trazidas como escravas pelos portugueses para aquela área (Araujo⁶⁸).

A heterogeneidade racial da população imigrante em um país não endêmico aumenta significativamente o espectro de mutações das hemoglobinopatias e suas combinações encontradas em indivíduos, tornando mais desafiadora a prestação de um serviço de diagnóstico molecular para diagnóstico pré-natal. Com o algoritmo de teste descrito, foi possível determinar o espectro das mutações na talassemia S β e suas combinações em uma população brasileira de DF. É importante determinar as mutações corretas para o aconselhamento genético e para a identificação de pacientes potencialmente

elegíveis para novos medicamentos ou ensaios de terapia genética que possam estar disponíveis para populações-alvo (Uludağ *et al.*³⁴).

Em conclusão, a técnica de pyrosequenciamento é uma ferramenta altamente confiável para a classificação das DFs e é adequada para testes em larga escala para identificar a hemoglobina S (portadores homocigotos ou heterocigotos) e mutações C. Isso permite o sequenciamento direcionado da hemoglobina em um número limitado de pacientes, facilitando o diagnóstico adequado quando as técnicas convencionais podem ter capacidade limitada e garantindo o diagnóstico adequado da hemoglobinopatia, essencialmente para a triagem correta e para estratégias de tratamento para pacientes com DF.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O pyrosequenciamento demonstrou ser rápido, preciso e de alto rendimento para a confirmação das doenças falciformes. Com esses recursos atraentes, esse método poderia ser usado para a identificação rotineira das doenças falciformes e para determinar o espectro de mutações da talassemia S/ β -talassemia na população brasileira, com o objetivo de melhorar a compreensão da doença e heterogeneidade racial da população imigrante do Brasil. É extremamente fundamental determinar as mutações mais frequentes para avanços significativos e efetivos na terapia medicamentosa, prevenção da talassemia com inovações e descobertas em pesquisas científicas.

REFERÊNCIAS

1. Sanctis V, Kattamis C, Canatan D, Soliman AT, Elsedfy H, Karimi M, *et al.* β -thalassemia distribution in the old world: An ancient disease seen from a historical standpoint. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017;9(1):e2017018.
2. Goonasekera HW, Paththinige CS, Dissanayake VHW. Population Screening for Hemoglobinopathies. *Annual Review of Genomics and Human Genetics.* 2018;19:355-80.
3. Iyer S, Sakhare S, Sengupta C, Velumani A. Hemoglobinopathy in India. *Clin Chim Acta.* 2015;229-33.
4. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, *et al.* Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4:1-22.
5. Beiguelman B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 460p.
6. Gileles-Hillel A, Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Hemoglobinopathies and sleep - The road less traveled. *Sleep Med Rev.* 2015;24:57-70.
7. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2017;376:1561-73.
8. Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides M, Kleanthous M. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biol.* 2015;6:226-39.
9. Warghade S, Britto J, Haryan R, Dalvi T, Bendre R, Chheda P, *et al.* Prevalence of hemoglobin variants and hemoglobinopathies using cation-exchange high-performance liquid chromatography in central reference laboratory of India: A report of 65779 cases. *J Lab Physicians.* 2018;10(1):73-9.
10. Simões BP, Pieroni F, Barros GMN, Machado CL, Cançado RD, Salvino MA, *et al.* Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(1):46-53.
11. Soares LF, Lima EM, Silva JA, Fernandes SS, Silva KMC, Lins SP, *et al.* Prevalência

- de hemoglobinas variantes em comunidades quilombolas no estado do Piauí, Brasil. *Cien Saude Colet.* 2017;22(11):3773–80.
12. Pauling I, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 110.2865 (1949): 543-548.
 13. Naik RP, Haywood CJ. Sickle cell trait diagnosis: clinical and social implications. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2015;1(1):160-7.
 14. Ferraz MHC, Murao M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida Laboratorial diagnosis of sickle cell disease in the neonate and after the sixth month of life. *Rev bras hematol hemoter.* 2007;29(3):218-22.
 15. Arduini GAO, Rodrigues LP, Trovó de Marqui AB. Mortality by sickle cell disease in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2017;39(1):52-6.
 16. Lindenau JD, Wagner SC, Castro SM, Hutz MH. The effects of old and recent migration waves in the distribution of HBB*S globin gene haplotypes. *Genet Mol Biol.* 2016;39(4):515-23.
 17. Kavar N, Alrayyes S, Compton A-A, Aljewari H, Baghdan D, Yang B, et al. Sickle cell disease; An overview of the disease and its systemic effects. *Dis Mon.* 2018;0(0):1-7.
 18. Kaulitzki, S. Ministério da Saúde, Blog da Saúde [internet]. 2014 Set 14. [citado em 2020 Fev 27]. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/index.php/34406-pessoas-com-doenca-falciforme-contam-suas-historias-ao-blog-da-saude>
 19. Rezende P V., Santos M V., Campos GF, Vieira LLM, Souza MB, Belisário AR, et al. Perfil clínico e hematológico em uma coorte neonatal com hemoglobina SC. *J Pediatr (Rio J).* 2018;94(6):666-672.
 20. Colella MP, de Paula E V., Machado-Neto JA, Conran N, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, et al. Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. *Haematologica.* 2015;100(4):466-71.
 21. Pecker LH, Schaefer BA, Luchtman-Jones L. Knowledge insufficient: the management of haemoglobin SC disease. *Br J Haematol.* 2017;515-26.
 22. Elmariah H, Garrett ME, e Castro LM, Jonassaint JC, Ataga KI, Eckman JR, et al.

- Factors associated with survival in a contemporary adult sickle cell disease cohort. *Am J Hematol.* 2014;89(5):530-5.
23. American Society for Clinical Pathology (ASCP) 2011 Annual Meeting; 2011 Oct 19-22; Las Vegas, Nevada, United States of America. American Society for Clinical Pathology; 2011.
24. Mettananda S, Higgs DR. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018;32(2):237-45.
25. Rund DT. Modern medicine battles an ancient disease. *Am J Hematol.* 2016;91(1):15-21.
26. Vrettou C, Kakourou G, Mamas T, Traeger-Synodinos J. Prenatal and preimplantation diagnosis of hemoglobinopathies. *Int J Lab Hematol.* 2018;74-82.
27. Sayani FA, Kwiatkowski JL. Increasing prevalence of thalassemia in America: Implications for primary care. *Ann Med.* 2015;592-604.
28. Origa R. β -Thalassemia. *Genet Med.* 2017;19(6):609-19.
29. Viprakasit V, Ekwattanakit S. Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018;32(2):237-45.
30. Chinelato IS. Polimorfismo X_{mnI} e haplótipos do gene beta globina e suas relações com os níveis de hemoglobina Fetal em β talassemia [dissertação]. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2014.
31. Lobo CL de C, Ballas SK, Domingos ACB, Moura PG, do Nascimento EM, Cardoso GP, *et al.* Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61:34-9.
32. Chan OTM, Westover KD, Dietz L, Zehnder JL, Schrijver I. Comprehensive and efficient HBB mutation analysis for detection of β -hemoglobinopathies in a pan-ethnic population. *Am J Clin Pathol.* 2010;133(5):700-7.
33. Abrasta - Associação Brasileira de Talassemia. Disponível em: <http://www.abrasta.org.br/estatisticas-talassemia>.
34. Uludağ A, Uysal A, Ertekin YH, Tekin M, Kütük B, Silan F., *et al.* Prevalence and

- mutations of β -thalassemia trait and abnormal hemoglobins in premarital screening in C₁ anakkale province, Turkey. *Balk J Med Genet.* 2016;19(1):29-34
35. Piel FB, Weatherall DJ. The α -Thalasseмииs. *N Engl J Med.* 2014;371(20):1908-16.
36. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):204-6.
37. Brasil. Ministério da Saúde. Doença falciforme: Condutas Básicas para Tratamento Básicas para Tratamento. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_condutas_basicas.pdf
38. Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL. Advances in technologies for screening and diagnosis of hemoglobinopathies. *Biomark Med.* 2014;8(1):119-31.
39. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(9):1296-303.
40. Oliveira RAG, Poli Neto A. Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnósticos por técnicas laboratoriais. Roca. Sao Paulo; 2004.
41. Colah RB, Surve R, Sawant P, D'Souza E, Italia K, Phanasgaonkar S, *et al.* HPLC studies in hemoglobinopathies. *Indian J Pediatr.* 2007;74:657-62.
42. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, *et al.* The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27:95-125.
43. Singh PJ, Shrivastava AC, Shrikhande A V. Prenatal Diagnosis of Sickle Cell Disease by the Technique of PCR. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2015;31(2):233-41.
44. Turchetto-Zolet AC, Turchetto C, Zanella CM, Passaia G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.
45. Ronaghi M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome.* 2018;11:3-11.
46. Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clin Chim Acta.* 2006;363:83-94.
47. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

- Proc Natl Acad Sci. 1977;74(12):5463-7.
48. BIOSYSTEMS. Aplicações de análises genéticas nas plataformas 3130/3130xl. Applied.; 2010.
49. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol.* 1989;32(1):66-9.
50. Kleinman S, Busch MP, Murphy EL, Shan H, Ness P, Glynn SA. The National Heart, Lung, and Blood Institute Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III): a research program striving to improve blood donor and transfusion recipient outcomes. *Transfusion.* 2014;54(3pt2):942-955.
51. Karafin MS, Bruhn R, Westlake M, Sullivan MT, Bialkowski W, Edgren G, *et al.* Demographic and epidemiologic characterization of transfusion recipients from four US regions: evidence from the REDS-III recipient database. *Transfusion.* 2017;57(12):2903-2913.
52. Ballas SK, Lief S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, *et al.* Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2010;85(1):6-13.
53. Carneiro-Proietti AB, Kelly S, Miranda Teixeira C, Sabino EC, Alencar CS, Capuani L, *et al.* Clinical and genetic ancestry profile of a large multi-centre sickle cell disease cohort in Brazil. *Br J Haematol.* 2018;182(6): 895-908.
54. Bravo-Urquiola M, Arends A, Go´mez G, Montilla S, Gerard N, Chacin M, *et al.* Molecular spectrum of β -Thalassemia mutations in the admixed venezuelan population, and their linkage to β -Globin Gene Haplotypes. *Hemoglobin.* 2012;36(3):209-18.
55. Kalleas C, Anagnostopoulos K, Sinopoulou K, Delaki E, Margaritis D, Bourikas G, *et al.* Phenotype and genotype frequency of β -thalassemia and sickle cell disease carriers in Halkidiki, Northern Greece. *Hemoglobin.* 2012;36(1):64-72.
56. Murad H, Moassas F, Jarjour R, Mukhalalaty Y, Al-Achkar W. Prenatal molecular

- diagnosis of β -thalassemia and sickle cell anemia in the Syrian population. *Hemoglobin*. 2014;38(6):390-3.
57. Ouali F, Siala H, Bibi A, Hadj Fredj S, Dakhlaoui B, Othmani R, *et al.* Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Tunisia: An 18 years of experience. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(3):223-32.
58. Monni G, Peddes C, Iuculano A, Ibba RM. From Prenatal to Preimplantation Genetic Diagnosis of β -Thalassemia. Prevention Model in 8748 Cases: 40 Years of Single Center Experience. *J Clin Med*. 2018;7(2):35.
59. Rocha LB da SM, Freitas M. Distribuição das mutações da β -talassemia em Fortaleza, Ceará. *J Bras Patol Med Lab*. 2010;46(6):437-41.
60. Fernandes AC, Azevedo Shimmoto MM, Furuzawa GK, Vicari P, Figueiredo MS. Molecular analysis of β -thalassemia patients: First identification of mutations HBB:c.93-2A>G and HBB:c.114G>A in Brazil. *Hemoglobin*. 2011;35(4):358-66.
61. Reichert VCD, Castro SM, Wagner SC, Albuquerque DM, Hutz MH, Leistner-Segal S. Identification of β thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann Hematol*. 2008;87(5):381-4.
62. Carrocini GCS, Venancio LPR, Pessoa VLR, Lobo CLC, Bonini-Domingos CR. Mutational Profile of Homozygous β -Thalassemia in Rio de Janeiro, Brazil. *Hemoglobin*. 2017;41(1):12-5.
63. Cabral CHK, Serafim ESS, de Medeiros WRDB, de Medeiros Fernandes TAA, Kimura EM, Costa FF, *et al.* Determination of β haplotypes in patients with sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genet Mol Biol*. 2011;34(3):421-4.
64. Silveira ZML, Barbosa M das V, Fernandes TAA de M, Kimura EM, Costa FF, Sonati M de F, *et al.* Characterization of beta-thalassemia mutations in patients from the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genet Mol Biol*. 2011;34(3):425-8.
65. Khan J, Ahmad N, Siraj S, Hoti N. Genetic determinants of β -thalassemia intermedia in Pakistan. *Hemoglobin*. 2015;39(2):95-101.
66. Patel AP, Patel RB, Patel SA, Vaniawala SN, Patel DS, Shrivastava NS, *et al.* β -

- thalassemia mutations in Western India: Outcome of prenatal diagnosis in a hemoglobinopathies project. *Hemoglobin*. 2014;38(5):329-34.
67. Silva FR. O Tráfico de Escravos para O Portugal Setecentista: Uma Visão A Partir do “Despacho dos Negros Da Índia, De Cacheo e de Angola” Na casa da Índia de Lisboa. *Revista de História*. 2013;47-73.
68. Araújo AS, Silva WA, Leão SAC, Bandeira FCGM, Petrou M, Modell B, *et al.* A Different Molecular Pattern of β -Thalassemia Mutations in Northeast Brazil. *Hemoglobin*. 2003;27(4):211-7.

ANEXO A – Carta de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da
FMUSP (CEP nº 01.246-903).

22

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da Prevalência das β Talassemias em Pacientes com Anemia Falciforme de 4 estados do Brasil.

Pesquisador: Ester cerdeira Sabino

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64207817.3.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Capes Coordenação Aperf Pessoal Nível Superior

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.912.900

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo de corte transversal com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O projeto foi bem fundamentado com bases em dados atualizados da literatura. O texto é apresentado de forma sucinta, clara e objetiva.

Objetivo da Pesquisa:

Análise da frequência das talassemias por sequenciamento de Sanger em pacientes com traço falciforme obtidos pela técnica de pyrosequenciamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos.

Benefícios: A identificação de mutações na globina em amostras de pacientes diagnosticados com traço falciforme proporcionará um diagnóstico mais acurado, bem como, aconselhamento pré-marital e pré-natal e, um tratamento mais adequado, resultando assim na melhoria da qualidade de vida destes pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo de corte transversal que será realizado no período de setembro de 2016 a setembro de 2018. Este projeto utilizará parte dos dados de um estudo já aprovado com o número

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.912.900

CAAE: 02790812.0.2004.0068 para a realização da dissertação de mestrado da aluna Camila Cruz de Martino. Serão analisados dados de 2770 pacientes com Hemoglobinopatias obtidos anteriormente no Estudo longitudinal multicêntrico da doença falciforme no Brasil: REDSIII. As análises do estudo serão realizadas no Laboratório de Parasitologia Médica (LIM 46).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram apresentados de forma satisfatória. O TCLE será dispensado pois serão utilizadas amostras coletadas para um estudo prévio com aprovação no comitê de ética com o número CAAE: 02790812.0.2004.0068.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_856726.pdf	31/01/2017 08:08:13		Aceito
Outros	DocCepFmusp_cadastro_online.pdf	31/01/2017 08:07:51	Ester cerdeira Sabino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado_Camila_Cruz.pdf	26/01/2017 11:38:33	Ester cerdeira Sabino	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_projeto.pdf	24/01/2017 14:34:29	Ester cerdeira Sabino	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1387912_E5.pdf	24/01/2017 11:56:41	Ester cerdeira Sabino	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1328070_E5.pdf	24/01/2017 11:56:11	Ester cerdeira Sabino	Aceito
Outros	documento_camila.pdf	24/01/2017 11:36:32	Ester cerdeira Sabino	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep_fm@usp.br



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 05 de Dezembro de 2016

Ilmo(a)
Dr(a). Ester Cerdeira Sabino
(aos cuidados de Camila Cruz de Martino)

A Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, tomou ciência do projeto classificado sob o número CPE-IMT 000320 e intitulado '**Estudo da Prevalência das _ Talassemias em Pacientes com Anemia Falciforme de 4 estados do Brasil.**' O projeto deverá ser enviado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para aprovação final.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

ANEXO B - Artigo científico publicado a partir de parte dessa dissertação.

RESEARCH ARTICLE

Use of an automated pyrosequencing technique for confirmation of sickle cell disease

Camila Cruz de Martino¹, Cecilia Salete Alencar², Paula Loureiro³, Anna Barbara de Freitas Carneiro-Proietti⁴, Claudia de Alvarenga Máximo⁵, Rosimere Afonso Mota⁶, Daniela Oliveira Werneck Rodrigues⁷, Nelson Gaburo Junior¹, Shannon Kelly^{8,9}, Ester Cerdeira Sabino^{1*}, for the International Component of the NHLBI Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III)[†]

1 Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Parasitologia, LIM 46, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Laboratório de Investigação Médica, LIM 03, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Hemope, Recife, Pernambuco, Brazil, **4** Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **5** Hemorio, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **6** Hemominas, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil, **7** Hemominas, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, **8** Vitalant Research Institute, San Francisco, California, United States of America, **9** UCSF Benioff Children's Hospital Oakland, Oakland, California, United States of America

[†] Membership of the International Component of the NHLBI Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) is provided in the Acknowledgments.

* sabinoec@gmail.com



 OPEN ACCESS

Citation: de Martino CC, Alencar CS, Loureiro P, Carneiro-Proietti ABdF, Máximo CdA, Mota RA, et al. (2019) Use of an automated pyrosequencing technique for confirmation of sickle cell disease. PLoS ONE 14(12): e0216020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216020>

Editor: Jumana Yousuf Al-Aama, King Abdulaziz University Hospital, SAUDI ARABIA

Received: April 11, 2019

Accepted: October 26, 2019

Published: December 12, 2019

Copyright: © 2019 de Martino et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are available from https://figshare.com/articles/Table_1/7913660.

Funding: This work was supported by the NHLBI, NIH (contract HHSN268201100007) to the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study-III). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

The diagnosis of sickle cell disease (SCD) is made by hemoglobin assays such as high-performance liquid chromatography (HPLC), isoelectric focusing and cellulose acetate or citrate agar electrophoresis. These assays are easy to perform and used in large-scale newborn screening in many countries. These tests however may not easily differentiate $S\beta^0$ thalassemia from SS or identify other hemoglobin variants, and in this case, hemoglobin (HBB) gene sequencing may be necessary.

Objectives

To develop a high throughput DNA based confirmatory assay for SCD and to detect mutations in the HBB gene

Methods

We developed an automated pyrosequencing technique (PyS) based on QIAGEN technology (Hilden, Germany) to detect homozygous or heterozygous hemoglobin S mutations as well as hemoglobin C mutations. The technique was tested on 2,748 samples from patients enrolled in a multi-center SCD cohort in Brazil. Patients were previously tested using HPLC to diagnose SCD as part of routine clinical care. Any subjects with discrepant results between HPLC and PyS or with heterozygous hemoglobin S detected had Sanger sequencing of the HBB gene.