REVISTA CONEXÃO ELETRÔNICA

APLICAÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DE ANEMIA FALCIFORME

Laís Munique Martins Souza[1], Camilla Prudencio Fontes[1]; Erli de Souza Bento[2]*

[1] Graduanda em Biomedicina, Faculdades Integradas de Três Lagoas – FITL/AEMS; [2] Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas – UNESP, Bióloga – UFMS, Docente das Faculdades Integradas de Três Lagoas – FITL/AEMS
* autor correspondente: erly_sb@yahoo.com.br

RESUMO
A anemia falciforme, relatada pela primeira vez em 1910 por James Bryan Herrick, se trata de uma doença genética caracterizada pela presença predominante de um tipo hemoglobina S, em condições de hipóxia esta irá se polimerizar, levando os eritrócitos a assumirem o formato característico de foice. Essas células defeituosas obstruem o fluxo de sangue dos capilares e acabam sofrendo destruição precoce. Apesar de sua alta prevalência e impacto significativo na saúde pública brasileira, a anemia falciforme continua sendo uma doença negligenciada, com escassez de recursos terapêuticos. No entanto, desde 2001, a obrigatoriedade do diagnóstico através do Programa Nacional de Triagem Neonatal tem sido crucial para aumentar o reconhecimento da doença. A detecção precoce é fundamental para aumentar o bem-estar dos pacientes, e a biologia molecular desempenha um papel crucial na obtenção de diagnósticos precisos. Portanto, é imperativo realizar estudos contínuos para desenvolver e aprimorar métodos diagnósticos que possam identificar a anemia falciforme de maneira eficaz e eficiente. Este artigo destaca e aborda a relevância da biologia molecular com suas técnicas inovadoras, eficazes e ágeis visando a importância de uma identificação precoce e pesquisa contínua para enfrentar os desafios impostos pela anemia falciforme, doença que continua a afetar muitas pessoas globalmente.

PALAVRAS-CHAVE: anemia falciforme; biologia molecular; diagnóstico.

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é uma condição de cunho genético hereditário, descrita pela primeira vez em 1910, pelo cardiologista inglês James Bryan Herrick, em um paciente com caso clínico de dispneia, palpitações, cardiomegalia, sopro sistólico e pulsos cheios, cujo exame sanguíneo detecta hemácias em formato de foice (CAMPOS, 2012).

Na doença, os eritrócitos que têm predominantemente hemoglobina S, devido à sua polimerização, passam a apresentar a forma peculiar de foice em condições de hipóxia. As hemácias defeituosas não têm capacidade de circular adequadamente, acarretam uma obstrução dos capilares e depois sua destruição prematura (NUZZO, 2004).

Apesar da patologia citada atingir muitas pessoas, a mesma ainda pode ser considerada uma doença negligenciada, e a falta de recursos terapêuticos

REVISTA CONEXÃO ELETRÔNICA

para o tratamento é um reflexo disso (SANTOS; CHIN, 2012). No Brasil, a alta prevalência da doença leva à obrigatoriedade do diagnóstico no país, desde junho de 2001, com a criação do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). Esse passo é de extrema importância para o reconhecimento da doença e sua dimensão na saúde pública brasileira (FERRAZ; MIRÃO, 2007).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no Brasil, ~ 1.900 crianças nascem com a enfermidade. Conforme dados do Ministério da Saúde, 2-6% da população brasileira é afetada, com residência em diferentes regiões do país e a maioria dos casos ocorre em indivíduos afrodescendente. Entre 6-10% dessa etnia apresenta essa alteração genética. No Nordeste, especificamente em Pernambuco, a prevalência é de 3% na população e 3,5% entre os pernambucanos, o que destaca a significativa relevância da doença em várias áreas de estudo devido à sua elevada mortalidade (GUIMARÃES, 2009).

É inegável a necessidade de uma maior urgência nas tentativas de diagnosticar a condição médica, visando o bem-estar dos portadores da patologia. Através de suas técnicas a biologia molecular é de grande utilidade na obtenção de uma análise precisa, logo é fundamental que haja estudos para compreender, analisar e avaliar os melhores métodos para reconhecimento da enfermidade (SILVA et al, 2017).

No Brasil, devido à grande mistura racial, o transtorno citado neste artigo é uma condição genética bastante prevalente, representando um desafio significativo em termos de saúde coletiva. É fundamental diagnosticar essa condição o mais cedo possível para implementar medidas preventivas que façam com que os pacientes possam viver de forma digna, e contribuir assim para o sucesso do tratamento. A biologia molecular está constantemente avançando e desenvolvendo novas técnicas específicas e sensíveis para alcançar diagnósticos rápidos e precisos. Portanto, é importante realizar estudos para analisar e entender essas técnicas, identificando o método mais apropriado para diagnosticar o distúrbio tratado nesse estudo.

O presente trabalho tem como objetivo descrever a aplicação da biologia molecular no diagnóstico da anemia falciforme, destacando os principais métodos moleculares utilizados na identificação da mutação no gene da beta-globina. Além disso, busca evidenciar a importância dessas técnicas para o diagnóstico precoce e preciso da doença, contribuindo para o prognóstico, manejo clínico e aconselhamento genético dos indivíduos portadores dessa alteração genética.

O presente estudo caracteriza-se como uma revisão de literatura de natureza descritiva, com abordagem qualitativa, fundamentada na análise de publicações científicas relacionadas à aplicação da biologia molecular no diagnóstico da anemia falciforme.

O levantamento bibliográfico foi realizado por meio da consulta a artigos científicos, livros, manuais técnicos, dissertações e documentos oficiais disponíveis em bases de dados eletrônicas, como Scientific Electronic Library Online (SciELO), PubMed e Google Acadêmico, além de publicações do Ministério da Saúde e outras fontes institucionais relevantes. Foram selecionados materiais publicados em língua portuguesa e inglesa, que abordassem os aspectos genéticos e moleculares da anemia falciforme, seus mecanismos fisiopatológicos e os principais métodos laboratoriais utilizados no diagnóstico, com ênfase nas técnicas de biologia molecular.

Após a seleção, os materiais foram submetidos à leitura exploratória, seletiva e analítica, com o objetivo de identificar e reunir as informações mais relevantes sobre o tema. Posteriormente, realizou-se a organização e interpretação dos dados, possibilitando a síntese do

REVISTA CONEXÃO ELETRÔNICA

conhecimento científico acerca da importância da biologia molecular como ferramenta essencial no diagnóstico da anemia falciforme.

2 MECANISMO MOLECULAR

A principal alteração molecular na anemia falciforme é representada pela alteração de uma base no códon 6 do gene da globina β, uma timina (T) é substituída por uma adenina (A) (GAG → GTC). Isto leva à substituição de resíduo glutamil na posição β 6 por um resíduo valil (β6Glu → Val), acarreta a polimerização das moléculas dessa hemoglobina defeituosa (HbS) quando desoxigenada e alteração da morfologia da hemácia para foiceforme. A polimerização da HbS desoxigenada pode acontecer devido a algumas variáveis, como densidade de oxigênio, pH, quantidade de hemoglobina S, temperatura, pressão, força iônica e quantidade de hemoglobinas normais (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013).

Em algumas situações, a membrana do eritrócito pode ser lesada e levar à hemólise. A redução do número desses eritrócitos causa o quadro de anemia visto nos falcêmicos. Durante a hemólise, ocorre o extravasamento do conteúdo citoplasmático da hemácia, incluindo hemoglobina e arginase, enzima responsável pela conversão da arginina em ornitina e ureia. Isto leva à diminuição da concentração plasmática de arginina e por consequência, a do óxido nítrico (NO). A deficiência de NO contribui para a instalação do processo vaso-oclusivo da anemia falciforme, que é a principal característica da doença. Geralmente, o paciente falciforme apresenta um quadro inflamatório crônico devido aos agregados celulares e células falciformes no endotélio vascular (SANTOS; CHIN, 2012).

A vaso oclusão é a principal responsável pela grande maioria dos sinais e sintomas da doença, tais como crises álgicas, crises hemolíticas, úlceras de membros inferiores, síndrome torácica aguda, sequestro esplênico, priapismo, necrose asséptica de fêmur, retinopatia, entre outros (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico preciso é crucial para o manejo adequado da anemia falciforme, e as técnicas de biologia molecular desempenham um papel vital neste processo em que a precocidade é de suma importância. Reconhecer esta doença genética é um desafio, logo deve-se detectá-la precocemente para garantir um tratamento abrangente. Métodos diagnósticos comuns incluem exames como hemograma, PCR, teste de falcização, teste de solubilidade, eletroforese, focalização isoelétrica, imunoensaios, diagnóstico neonatal e avaliação dos níveis de hemoglobina fetal e hemoglobina A2 (NOGUEIRA, 2013).

Muitas pessoas apresentam sinais de anemia falciforme, mas são saudáveis porque têm apenas um gene defeituoso herdado de um de seus pais. Porém, se essa pessoa decidir ter um filho com outro portador que tenha essas mesmas características, seus descendentes correm o risco de desenvolver a doença devido à grande probabilidade de transmissão do gene mutado (AAFESP, 2007).

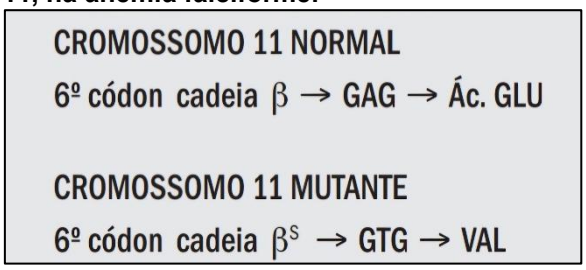
As diversas manifestações clínicas dos pacientes com anemia falciforme ao redor do mundo, que podem variar desde formas leves e quase assintomáticas até formas debilitantes ou com elevada letalidade, têm sido objeto de estudo de pesquisa há muito tempo. Como a Figura 1 mostra, a substituição da timina (T) pela adenina (A) causa a mudança do aminoácido ácido glutâmico para valina na sexta posição da cadeia β, leva à formação da hemoglobina S (HbS) e à deformação das hemácias. A mudança no funcionamento normal dos

REVISTA CONEXÃO ELETRÔNICA

glóbulos vermelhos resulta em seu extermínio prematuro e na obstrução da circulação sanguínea nos vasos pequenos, o que causa sérias enfermidades como vaso-oclusão, necrose da medula óssea, síndrome torácica aguda, complicações no baço, hemólise, entre outros. No entanto, nos primeiros seis meses de vida, não há manifestação de sintomas no indivíduo, pois ele ainda possui níveis elevados de HbF (BRUNETTA et al., 2010).

As diferentes abordagens utilizadas para identificar a existência de HbS apresentam particularidades, que são fundamentais para embasar de forma confiável a identificação da anemia falciforme (SILVA et al., 2017).

Figura 1. Mutação genética no cromossomo 11, na anemia falciforme.



Fonte: Extraído de Neto e Pitombeira, 2003.

3.1 Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite sintetizar fragmentos específicos de DNA pela ação da DNA polimerase que copia assim o material genético. A sequência complementar de DNA a ser formada depende do iniciador, que é responsável pela especificidade da reação ao selecionar um sítio específico para iniciar a síntese que resulta na amplificação de bilhões de cópias de uma sequência específica de DNA (VALONES, 2009).

No caso da anemia falciforme, a PCR pode ser usada para amplificar a região do gene da β-globina na qual ocorrem as mutações que causam a HbS. Após a amplificação, o DNA pode ser analisado para detectar a presença de mutações específicas (SANTOS, 2016).

3.2 Processo de falcização

A falcização envolve a exposição dos glóbulos vermelhos a um ambiente com baixo teor de oxigênio, pelo uso de uma solução de metabissulfito de sódio (2%) para criar o formato característico de foice (Figura 2). Nesse caso, os eritrócitos contendo hemoglobina S começam a se deformar em até 24 horas (ZANATA, 2009). Este teste não fornece informações sobre o genótipo, ou seja, não diferencia doença falciforme de traço falciforme, pois todos os glóbulos vermelhos se tornam falciformes nessas condições (HENRIQUE, 2008).

O teste de falcização não é adequado para recém-nascidos porque os níveis de hemoglobina fetal são mais elevados e os de hemoglobina S são mais baixos durante este período, o que pode resultar em falsos negativos (FIGUEIREDO et al., 2014).

Figura 2. Teste positivo para hemácias em forma de foice (flechas).

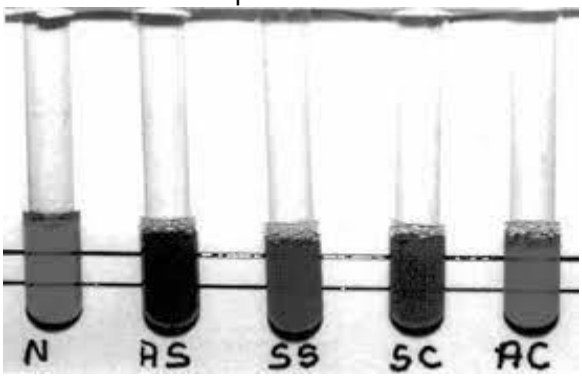
Fonte: Adaptado de Melo e Silveira, 2014.

3.3 Ensaio de solubilidade

A análise de solubilidade visa reduzir a Hb S, que diferente de outras hemoglobinas é insolúvel em tampão inorgânico; baseia-se no fato de que sob condições de baixo nível de oxigênio, a Hb S se torna até 100× menos solúvel. No teste, utiliza-se uma mistura de ditionito de sódio para provocar a morte dos eritrócitos e liberar hemoglobina desoxigenada, com isso a cadeia beta de cada molécula se desloca lateralmente, e

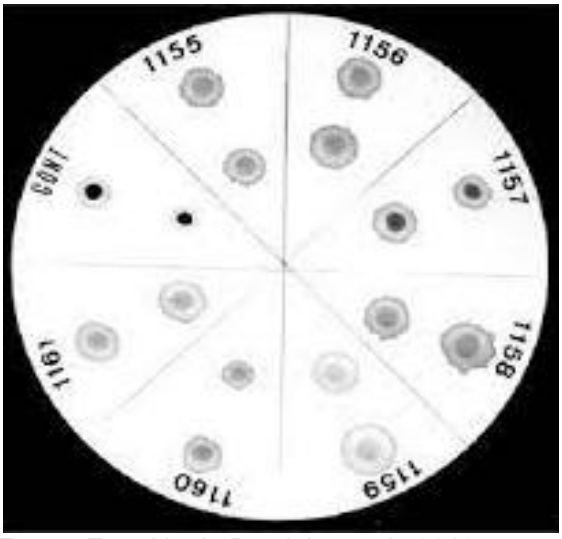
causa uma “opacidade” na leitura (Figura 3). Quando feito em microplacas, os casos em que os resultados são positivos, as hemoglobinas S se precipitam, não difundem, e ficam com o formato de um botão (Figura 4). Apesar de apresentar boa sensibilidade, o teste citado, frequentemente, resulta em um falso negativo na fase neonatal devido à grande quantidade de Hb F que tem um efeito diluidor (PRUDÊNCIO, 2000).

Figura 3. Prova de solubilidade. Amostra clara N (normal), AS, SS, SC, AC exibem opacidade, indicando um teste positivo.



Fonte: Extraído de Prudencio et al., 2000.

Figura 4. Prova de solubilidade em microplaca. Amostras como CONT e 1157 são reativas colocando em evidência o botão de hemácias.



Fonte: Extraído de Bandeira et al., 2013.

3.4 Método de cromatografia líquida de alta eficiência

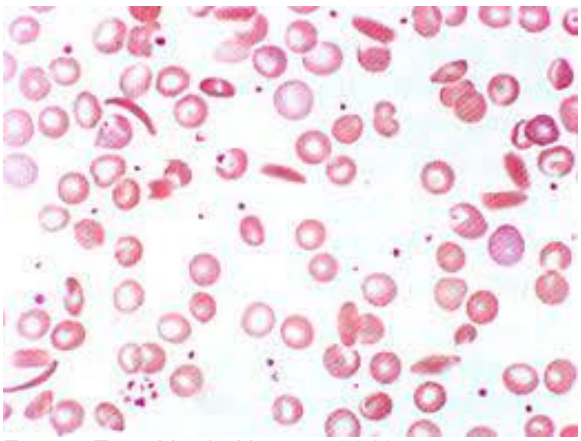
A O método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) possibilita identificar e excluir anormalidades da hemoglobina rapidamente e é adequada para a distinção de espécies iônicas e macromoléculas através QW-4042-104,0. A HPLC é usada para quantificar Hb A2, Hb F, Hb A, Hb S, Hb C e a triagem de variante (FERREIRA et al., 2015)

A investigação de hemoglobina mediante essa técnica tem como benefício identificar variantes de hemoglobina. Portanto, a HPLC é um teste de alta performance para se aplicar nesse tipo de hemoglobinopatias e talassemias (ZANATTA; MANFREDINI, 2009).

3.5 Hemograma

As variações no hemograma incluem anemia normocítica-normocrômica grave, que pode progredir para anemia macrocítica com alta anisocitose e eritrocitose atípica elevada, com concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) normal. O aumento dos glóbulos brancos é devido à crise hemolítica ou infecção e o aumento das plaquetas é devido à atrofia esplênica (SANTOS, 2016).

Figura 5. Amostra de sangue periférico com a doença controlada. Paciente com anemia falciforme em estado estável demonstrando predominância de eritrócitos discoides em comparação aos falcizados.



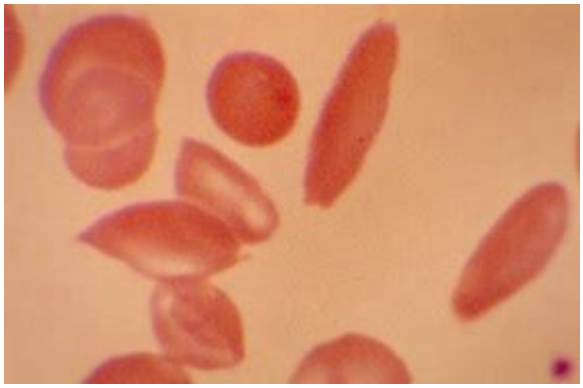
Fonte: Extraído de Naoum, 2012.

Os eritrócitos com hemoglobina S,

REVISTA CONEXÃO ELETRÔNICA

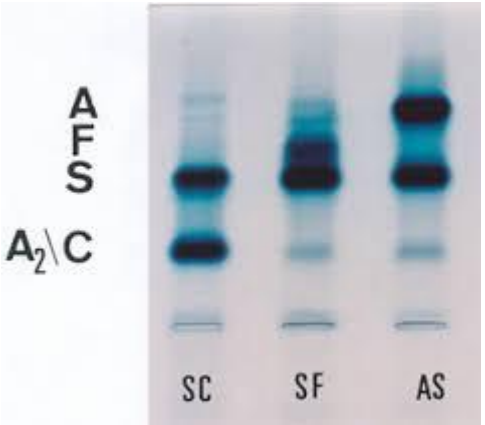
quando adicionado oxigênio, aparecem normais ou com formato de disco no sangue, com poucos glóbulos vermelhos em aparência de foice (Figura 5). No entanto, quando o aglomerado de desoxi-hemoglobina S está prestes a aparecer, o processo de falcização é intenso (Figura 6).

Figura 6. Amostra de sangue periférico com a doença ativa. Paciente com anemia falciforme, coletado durante crise, exibindo glóbulos vermelhos em forma de disco com equinocitose, e diversos eritrócitos com formato falciforme.



Fonte: Extraído de Naoum, 2012.

Figura 7. Eletroforese alcalina de hemoglobina em gel de agarose. Variação na mobilidade eletroforética dos genótipos SC, SF e AS.



Fonte: Extraído de Naoum, 2012.

3.6 Eletroforese

A hemoglobina é uma proteína com carga elétrica negativa, então, a eletroforese qualitativa em acetato de celulose é realizada em pH alcalino (8,4-8,6), para que ela migre em direção ao polo positivo, ânodo (Figura 7). Assim, é possível a identificação das hemoglobinas normais e parte das variantes (ZANATTA; MANFREDINI, 2009).

O método de eletroforese em acetato de celulose é amplamente utilizado pelos laboratórios, visto que se trata de um processo não muito oneroso e que sua realização pode ser rápida, e geralmente é adotado como o primeiro procedimento na triagem especialmente no primeiro semestre de vida do indivíduo (FERREIRA, 2015).

3.7 Determinação de hemoglobina fetal

A hemoglobina fetal é consideravelmente resistente à desnaturação em soluções alcalinas comparadas às outras formas de hemoglobina. A medição da hemoglobina fetal pode ser executada por duas técnicas, o método de Singer (adequado para elevadas concentrações de hemoglobina fetal) e o método de Betke (indicado para concentrações baixas). Aferir a quantidade de hemoglobina fetal é crucial em dois cenários específicos, anemia falciforme e Hb S/talassemia beta (NAOUM, 2012; ZANATTA; MANFREDINI, 2009).

O conhecimento da concentração de hemoglobina fetal é importante na anemia falciforme devido ao seu papel na modificação da expressão clínica da doença. Geralmente, pacientes com níveis elevados de hemoglobina fetal apresentam menos complicações, uma vez que a hemoglobina fetal interfere na polimerização da hemoglobina S e reduzi a falcização dos eritrócitos. Por outro lado, pacientes com níveis reduzidos de hemoglobina fetal podem desenvolver esplenomegalia e aumento do risco de infecções graves (MOUSINHO-RIBEIRO et al., 2008).

3.8 Diagnóstico pré-natal e pré-implantacional

Atualmente, o DNA é coletado a partir de amostras de filamentos coriônicos ou unidades celulares do líquido amniótico. A partir disso, um dos métodos utilizados é a PCR, que utiliza sondas

REVISTA CONEXÃO ELETRÔNICA

padronizadas para amplificar no DNA, os alelos. Posteriormente, é realizada uma digestão limitada para identificar um alelo específico, sendo que a enzima DdeI é capaz de detectar alterações nas bases A-T (SILVA et al., 2017).

Em 2001, surge o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), estipulado pelo Ministério da Saúde que incluiu a triagem para HbS, bem como para fenilcetonúria e hipotireoidismo. Isso se deve ao fato de que as enfermidades falciformes não apresentam sintomas clínicos evidentes, inicialmente. Portanto, a triagem neonatal para HbS, vulgarmente apelidada de "teste do pezinho", tem como meta determinar o quanto mais cedo as doenças falciformes, que geralmente no início vida não manifestam sinais ou sintomas. Realizar esses testes durante o período neonatal é de suma importância para possibilitar a intervenção necessária (ALMEIDA et al., 2006).

A técnica de PCR gap, que emprega marcadores fluorescentes e analisa fragmentos em um sequenciador automático de base capilar, pode identificar mutações reduzidas e deleções pontuais. Outra abordagem, conhecida como diagnóstico genético pré-implantacional, sugere uma probabilidade elevada de afetar os próximos filhos após o nascimento do primeiro filho afetado. Nesse método, não há necessidade de interromper a gestação, pois é realizado antes da fertilização *in vitro*, em que duas células são retiradas do blastômero no terceiro dia de desenvolvimento e analisadas por PCR para identificação de mutações. Em seguida, são designados blastômeros sem mutações para implantação. No entanto, é crucial considerar cuidadosamente as questões éticas ao implementar esse protocolo (HOFFBRAND, 2013).

4 IMPACTO CLÍNICO E SOCIAL

A enfermidade falciforme é constantemente negligenciada, e seu diagnóstico muitas vezes é tardio, fazendo com que os indivíduos portadores sofram com a falta de um tratamento efetivo. Pode-se citar também o preconceito e a discriminação racial para com os portadores da doença, dado que vem sendo associada a pessoas negras. Além da cronicidade da doença, seu caráter estigmatizante faz com que seus portadores possam ser marginalizados e tenham uma perda significativa da qualidade de vida (FIGUEIRÓ; RIBEIRO, 2017).

A biologia molecular tem tido um impacto significativo na determinação da afecção, em perspectiva clínica e social. Do ponto de vista clínico, tem permitido diagnósticos mais precoces e precisos. Com a utilização de testes de DNA, como a PCR, é possível identificar mutações no gene da beta-globina (HBB), responsáveis pela doença, antes mesmo do nascimento (diagnóstico pré-natal) ou logo depois do nascimento (teste do pezinho). O diagnóstico molecular por meio do sequenciamento oferece uma precisão muito maior em comparação a métodos tradicionais, como a eletroforese de hemoglobina (BRASIL, 2007; NETO, 2003).

Do ponto de vista social, a biologia molecular tem sido fundamental no aconselhamento genético e planejamento familiar. A informação genética fornecida permite aconselhamento genético preciso, permite que indivíduos portadores da mutação ou com histórico familiar da doença façam escolhas informadas sobre reprodução. Programas educacionais baseados em dados genéticos aumentam a conscientização sobre a anemia falciforme e suas implicações e ajuda a reduzir o estigma associado à doença (BRASIL, 2007).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que os progressos na área do tratamento e diagnóstico estão incessantemente evoluindo, buscando identificar precocemente os portadores

da mutação genética e os condicionar a uma melhor qualidade de vida. Os métodos citados são demasiadamente eficazes na detecção da doença, realizando uma análise detalhada do quadro clínico e prognósticos precisos. Explorar novas possibilidades de pesquisa sobre a anemia falciforme representa um dos grandes obstáculos no cuidado desses enfermos, que dependem do apoio dos profissionais de saúde para conservar o seu conforto e bem-estar social.

REFERÊNCIAS

AAFESP – Associação de Anemia Falciforme do Estado de São Paulo. O que é anemia falciforme. 2007. Disponível em: https://aafesp.org.br/anemia-falciforme/. Acesso em: 11 maio 2024.

ALMEIDA, A. M. et al. Avaliação do programa de triagem neonatal na Bahia no ano de 2003. Rev. Brasil. Saúde Materna. Infantil, v. 6, n. 1, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde: Manual da anemia falciforme para a população. Brasília – DF, 2007.

BRUNETTA, M. D. et al. Manejo das complicações agudas da doença falciforme. Rev. Medicina, Ribeirão Preto, v. 43, n. 3, p. 231-237, 2010.

CAMPOS, P. A. C. Anemia falciforme: aspectos moleculares e fisiopatológicos. Cadernos UniFOA, Volta Redonda, v. 7, n. 1 Esp. p. 81, 2012. doi: 10.47385/cadunifoa.v7.n1 Esp.1782. Disponível em: https://revistas.unifoa.edu.br/cadernos/article/view/1782. Acesso em: 17 mar. 2024.

COSTA, F. F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K. Y. Anemia falciforme. In: ZAGO, MA, FALCÃO, RP, PASQUINI, R. Tratado de Hematologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 205-223, 2013.

FERRAZ, M. H. C.; MURÃO, M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. Rev. bras. Hematologia Hemoterapia, v. 29, n. 3, p. 218-222, 2007.

FERREIRA, A. M. et al. Aplicações da biologia molecular no diagnóstico da anemia falciforme. Revista ciência e cultura, v.1, 2015.

FIGUEIREDO, A. K. B.; et al. Anemia Falciforme: Abordagem Diagnóstica Laboratorial. Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança - Jun. 2014. Disponível em: http://www.facene.com.br/wp-content/uploads/2010/11/Revista-completa-2014-v.- 12-n.1.pdf. Acesso em: 14 jun. 2024.

FIGUEIRÓ, A. V. M.; RIBEIRO, R. L. R. Vivência do preconceito racial e de classe na doença falciforme. Saúde Soc. São Paulo, v. 26, n. 1, p. 88-99, 2017.

HENRY, J. B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 20 ed. Barueri: Ed. Manole, 2008.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. Fundamentos em Hematologia. 6.ed. Porto Alegre, p. 100-107, 2013.

MELO, M. A. W. de; SILVEIRA, C. M. da. Laboratório de hematologia: Teorias, técnicas e atlas. 1. ed., Rio de Janeiro, Ed. Rubio, 280 p., 2014.

MOUSINHO-RIBEIRO, R. C. et al. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. Rev. bras. hematol. hemoter., v. 30, n. 2, p. 136-141, 2008.

NAOUM, P. C. Eletroforeses: hemoglobinopatias, proteínas séricas, lipoproteínas, DNA/ Paulo Cesar Naoum. – Ed. Santos, São Paulo, pg.75-85, 2012.

NETO, G. C. G.; PITOMBEIRA, S. M.

Aspectos moleculares da anemia falciforme. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

NUZZO, D. V. P., FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. J Pediatria, Rio de Janeiro, v. 80, n. 5. p. 347-54, 2004.

PRUDÊNCIO, B. C. A. B. et al. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de Hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. v. 22, n. 2, p. 99-109, 2000.

SANTOS, J. L.; CHIN, C. M. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara-SP, 2012.

SANTOS, V. M. L. N. Diagnóstico laboratorial da anemia falciforme. Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, 2016.

SILVA, N. C. H. da et al. 2017. Principais técnicas para o diagnóstico da anemia falciforme: Uma revisão de literatura. Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT - PERNAMBUCO. 3, 2 (dez. 2017), 33.

VALONES, M. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields : a review. Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, p. 1-11, 2009.

ZANATTA, T.; MANFREDINI V. Comparação entre métodos laboratoriais de diagnóstico de Doenças Falciformes. News Lab., 94 ed., 2009.