

C355p Castro, Frank Sousa.  
Pesquisa de hemoglobinopatias e talassemias em  
pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico  
[manuscrito] / Frank Sousa Castro. – 2005.  
76 f. : il.

Datilografado.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás,  
Programa de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde,  
2005.  
“Orientador: Prof. Dr. Nilzio Antonio da Silva”.

1. Lúpus eritematoso sistêmico - hemoglobinopatias -  
talassemias. 2. Anemia. I. Título.

CDU: 616.155.194-002.77  
616.5-002.52

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**

**Programa de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde**

**PESQUISA DE HEMOGLOBINOPATIAS E  
TALASSEMIAS EM PACIENTES PORTADORES DE  
LÚPUS ERITEMATOSO.**

**FRANK SOUSA CASTRO**

**Goiânia – Goiás**

**Dezembro de 2005**

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**

**Programa de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde**

**PESQUISA DE HEMOGLOBINOPATIAS E  
TALASSEMIAS EM PACIENTES PORTADORES DE  
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.**

**FRANK SOUSA CASTRO**

ORIENTADOR: PROF. DR. NILZIO ANTONIO DA SILVA

CO-ORIENTADOR: PROF. MS. PAULO ROBERTO DE MELO REIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde

**Goiânia – Goiás**

**Dezembro de 2005**

## HOMENAGENS

Faço as honras ao meu Pai, Francisco de Assis Alves de Castro (*in memoriam*). Um homem que sempre dedicou sua vida à sua família e nunca mediu esforços para ajudar o próximo.

Oração de São Francisco de Assis

**Senhor,**

**Fazei de mim um instrumento de vossa paz !**

**Onde houver ódio, que eu leve o amor,**

**Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.**

**Onde houver discórdia, que eu leve a união.**

**Onde houver dúvida, que eu leve a fé.**

**Onde houver erro, que eu leve a verdade.**

**Onde houver desespero, que eu leve a esperança.**

**Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.**

**Onde houver trevas, que eu leve a luz !**

**Ó Mestre,**

**fazei que eu procure mais.**

**Consolar, que ser consolado.**

**Compreender, que ser compreendido.**

**Amar, que ser amado.**

**Pois é dando, que se recebe.**

**Perdoando, que se é perdoado e  
é morrendo, que se vive para a vida eterna !**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos primeiramente a Deus, que fez com que trilhássemos esse caminho para que pudéssemos descobrir que quando queremos, somos capazes de tudo.

À Universidade Católica de Goiás, através da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPE) na pessoa do Prof. Dr. José Nicolau Heck pelo apoio e incentivo.

À Coordenação do Mestrado de Ciências Ambientais e Saúde, representado pelo Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior.

O meu orientador Dr. Nilzio Antonio da Silva, que deu incentivo para a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador e grande amigo Dr. Paulo Roberto de Melo Reis que sempre se prontificou a me ajudar.

Agradeço Prof. Dr. David Barqueti Jendiroba, que aceitou participar da banca de defesa deste trabalho.

Aos professores do mestrado de Ciências Ambientais e Saúde, pelo grande conhecimento compartilhado durante esta caminhada, pois na verdade a nossa formação acadêmica é um reflexo dos nossos mestres.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Biomedicina e do Laboratório da Área de Saúde (LAS-CBB).

A todos os colegas, por tudo que passamos juntos e pela grande trajetória.

Aos colegas de profissão e amigos, Daniela Carneiro Vaz, Isabel Cristina Carvalho Francescantonio, Lúcia Kioko Hasimoto, Mauro Meira de Mesquita, Karlla Greick Batista Dias Penna, Luis Murilo Martins de Araújo, Ary

Henrique, Pedro Ludovico de Goiás e Silva, Alcí Nahas de Gouveia, Claudia Duque.

As eternas amigas, Cristiane Martinez Yano, Maisa Maria da Silva, pelo trabalho em equipe, pela dedicação, pela amizade e pelo apoio constante, que de alguma forma contribuíram para o meu sucesso.

Em especial aos Grandes amigos e incentivadores Prof. Paulo Luiz Carvalho Francescantonio e Prof. Sergio Antonio Machado.

Minha gratidão eterna ao Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum.

Agradeço especialmente meu amigo, irmão, colega, Jairo Figueiredo Júnior por tornar esse sonho uma realidade em minha vida.

Aos bolsistas de iniciação científica Natália A. Alves Brandão, Rosane Maria Cantero, Tatiana Dela Sávia Ferreira, pela dedicação durante este trabalho.

A todos aqueles que, embora não mencionados aqui, contribuíram de maneira direta ou indireta para a concretização deste projeto, meus agradecimentos.

## DEDICATÓRIA

Aos meus Pais,

Francisco de Assis Alves de Castro (*in memorian*)

Jucelen de Sousa Castro

Aos meus irmãos

Jorivê Sousa Castro

Frederico Sousa Castro (*in memorian*)

Aos meus sobrinhos

Gabriel Daher Vaz Castro

Isabela Daher Vaz Castro

A minha namorada

Fernanda da Veiga Jardim Gurgel e Silva que me acompanha em todos os momentos dando incentivo e amor.

## SUMÁRIO

HOMENAGENS

AGRADECIMENTOS

DEDICATÓRIA

ÍNDICE

LISTA DE FIGURA

LISTA DE TABELAS

SUMÁRIO

RESUMO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	1
1.2. Hemoglobinopatias e talassemias.....	6
2. OBJETIVO.....	17
2.1 – Objetivo geral.....	17
2.2– Objetivos específicos.....	17
3.CRITÉRIOS E AMOSTRAGEM.....	18
3.1–Critérios.....	18
3.1.1 – Critérios para seleção dos participantes no trabalho.....	18
3.1.2 – Critério para exclusão do participante.....	18
3.2.3 -Identificação do participante.....	18
3.2- Amostragem.....	19
3.2.1 – Amostra Analisada e Ética Profissional.....	19
4– MÉTODOLOGIA.....	21
4.1- MÉTODOS.....	21
4.1.1 – Eritrograma.....	22
4.1.2 – Teste de fragilidade osmótica à salina 0,36%.....	22
4.1.3 – Teste de falcização com solução de metabissulfito de sódio a 2%.....	23



4.1.4 – Pesquisa intra-eritrocitária de HB H.....	24
4.1.5- Pesquisa intra-eritrocitária de Hb Fetal.....	24
4.1.6 – Eletroforese de hemoglobina.....	25
4.1.6.1 – pH alcalino.....	25
4.1.6.1.1 –Preparo do hemolisado.....	25
4.1.6.1.2 – Tampão usado.....	25
4.1.6.1.3 – Eletroforese em acetato de celulose.....	26
4.1.6.2 – PH ácido.....	28
4.1.6.2.1 – Preparo do hemolisado.....	28
4.1.6.2.2 – Tampão usado.....	28
4.1.6.2.3 – Eletroforese em agar.....	28
4.1.7 – Cromatografia de alta performance HPLC.....	29
4.2 – Dados obtidos.....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1 – Descrição da amostra populacional.....	31
5.2 – Quadros hematimétricos dos pacientes pesquisados.....	33
5.3- Tipos de hemoglobinas identificadas.....	34
5.4 -Caracterização laboratorial da hemoglobina H.....	37
5.5 - Caracterização laboratorial da hemoglobina S.....	43
5.6- Caracterização laboratorial da hemoglobina C.....	47
6- DISCUSSÃO.....	49
7- CONCLUSÕES.....	54
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
9- ANEXOS.....	64
10-ARTIGO.....	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa mostrando resumidamente a origem das migrações para o Brasil.....	7
Figura 2 – Regiões da África com a origem dos negros que vieram para o Brasil. ....	8
Figura 3 – Cadeias Alfa e Beta da estrutura molecular da hemoglobina.....	11
Figura 4 – Representação da substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia Beta. ....	13
Figura 5 – Teste de resistência globular a salina 0,36%. ....	23
Figura 6 – Teste de falcização. ....	23
Figura 7 – Agregados de hemoglobina.....	24
Figura 8 – Mistura de glóbulos vermelhos adultos normais e glóbulos contendo Hb F.....	25
Figura 9– Eletroforese de hemoglobinas em gel de agarose alcalina.....	26
Figura 10 – Eletroforese de hemoglobina pH=8,6. ....	27
Figura 11- Visualização da Hemoglobina H.....	27
Foto 12- Eletroforese em pH alcalino demonstrando na amostra 6 a necessidade de se utilizar a eletroforese em pH ácido.....	29
Figura 13 - Distribuição das hemoglobinas normais e anormais por sexo.....	35
Figura 14 - Distribuição dos genótipos encontrados em 80 pacientes.....	36
Figura 15 – Distribuição em formato de pizza dos genótipos totais identificados em 80 pacientes.....	37
Figura 16 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e A2 encontradas para a paciente com 19 anos.....	39

Figura 17 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e A2 encontradas para a paciente com 27 anos.....	40
Figura 18 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e A2 encontradas para a paciente com 29 anos.....	41
Figura 19 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e A2 encontradas para a paciente 38 anos.....	42
Figura 20 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e S encontradas para a paciente 46 anos.....	45
Figura 21 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e S encontradas para o paciente 56 anos.....	46
Figura 22 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e C encontradas para a paciente 61 anos.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Desembarque estimado de escravos africanos no Brasil, por procedência regional períodos de 1701-1710 a 1801-1810.....	9
Tabela 2 – População residente, por cor ou raça no estado de Goiás.....	10
Tabela 3- Distribuição das amostras analisadas em função do sexo.....	31
Tabela 4 – Distribuição da população por idade e sexo.....	32
Tabela 5 – Idade média dos pacientes portadores de LES.....	33
Tabela 6 – Índices Hematimétricos normais.....	33
Tabela 7 – Índices Hematimétricos médios observados nos 80 pacientes com LES.....	34
Tabela 8 – Índices Hematimétricos médios de acordo com sexo.....	34
Tabela 9 – Distribuição das hemoglobinas normais e anormais por sexo.....	35
Tabela 10 – Distribuição das hemoglobinas normais e anormais em 80 amostras.....	36
Tabela 11 – Dados do eritrograma para as pacientes com Hb H.....	38
Tabela 12 – Média dos Índices Hematimétricos para pacientes com Hb H.....	39
Tabela 13 – Dados do eritrograma para as pacientes com Hb S (Traço falciforme).....	44
Tabela 14 – Dados do eritrograma para a paciente com Hb C.....	47

## RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico é uma doença tipicamente multigênica e multifatorial, com grande complexidade clínica e fisiopatológica. As causas do LES não são totalmente conhecidas, mas sabe-se que fatores ambientais e genéticos estão envolvidos. As manifestações clínicas observadas em pacientes acometidos pelo LES são diversificadas como fadiga, mal-estar, emagrecimento, artrite, febre, nefrite, vasculite e anemias. Dentre as várias manifestações clínicas observadas em pacientes com Lúpus, as anemias nos chamam a atenção principalmente quando se observa em nosso estudo uma prevalência 52,5% dos pacientes com índices hematimétricos sugestivo de anemias. Esse quadro de anemia normalmente se observa em pacientes com doença lúpica, mas sobre as anemias hereditárias, em especial as hemoglobinopatias e talassemias, que são as mais comuns das alterações genéticas humanas de freqüência muito variável na população brasileira, têm poucos estudos realizados de prevalência nas populações acometidas por LES. O objetivo desse trabalho foi o de avaliar a prevalência das hemoglobinopatias e talassemia em pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistemica. Para isso foram estudadas 80 amostras de sangue de pacientes com doença Lúpica atendidos no ambulatório do Hospital das Clinicas de Goiânia. Foram utilizados testes laboratoriais não moleculares. A freqüência das alterações da hemoglobina foi de 8,75%, encontradas em 7 pacientes. Dessas alterações a mais prevalente foi a talassemia alfa, encontrada em 4 pacientes, correspondendo a uma freqüência de 5,0% da população estudada. A segunda alteração mais freqüente foi o heterozigoto para a hemoglobina S, encontrada em 2 pacientes, correspondendo a 2,5% da

população. A terceira alteração foi o heterozigoto para a hemoglobina C, encontrada em 1 paciente, correspondendo a 1,25%. Nenhum caso de homozigose foi encontrado no presente estudo. Este trabalho demonstra a necessidade de avaliações mais cautelosas nos distúrbios das anemias em pacientes com Lúpus, sugerindo a implantação de serviços hematológicos de esclarecimento a essa população com o intuito de esclarecer a verdadeira causa da anemia presente nos indivíduos afetados com LES.

## SUMMARY

Systemic Lupus Erythematosus is a quintessential multigenic and multifactorial disease, with remarkable clinical and pathogenic complexities. The causes of the SLE total are not known, but it knows that ambient and genetic factors are involved. The observed clinical manifestations in patients to take hold of the SLE are diversified as fatigue, indisposition, slimming, arthritis, fever, nephritis, vasculitis, and anemias. Amongst them you various observed clinical manifestations in lupus patients, the anemias in them call the attention mainly when prevalence 52.5% of the patients with RBC index suggestive of anemias is observed in our study. This picture of anemia normally is observed in lupus patients, but the hereditary anemias, especially the hemoglobinopathies and thalassemias, are the most common of the human genetic alterations and its frequency in the Brazilian population is very variable, have few carried through studies of prevalence in the populations attacks for SLE. In an attempt to evaluate the prevalence of the hemoglobinopathies and thalassemia in the population with systemic lupus erythematosus. We studied 80 blood samples of patients with systemic lupus erythematosus in the Hospital das Clinicas de Goiânia-Brazil had been studied. Laboratories tests had been used but not molecular tests. The frequency of the alterations of the hemoglobin was 8.75%, found in 7 patient. Of those alterations, the more prevalent was the thalassemia alpha, found in 4 patient, corresponding to a frequency of 5.0% of the studied population. The second more frequent alteration was the heterozigous for the hemoglobin S, found in 2 patients, corresponding to 2.5% of the population. The third alteration was the heterozigous for the hemoglobin C, found in 1 patient 1.25%. No case of homozigose was found in the present study. This study

demonstrates hemoglobinopathies and thalassemia be include between several cause of anemia in SLE.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Lupus Eritematoso Sistêmico (LES)

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença auto-imune, de etiologia desconhecida, provavelmente multifatorial, que acomete o tecido conectivo de vários órgãos. Sua evolução apresenta períodos de atividade e remissão, que podem ser desencadeados por fatores genéticos, infecciosos, hormonais, ambientais e mesmo psicológicos. É considerada uma enfermidade crônica, que atinge vários sistemas do organismo humano, simultânea ou sucessivamente, muitas vezes levando à falência de órgãos vitais ou comprometendo definitivamente suas funções (Antolín & Américo, 1996). Considerado uma das enfermidades do colágeno (Gahan 1992), o Lúpus é uma doença auto-imune com várias manifestações clínicas, que podem ser mucocutâneas e estar ou não acompanhadas de manifestações sistêmicas (McMurray & May 2003).

O LES foi classificado como uma doença cutânea por Bielt em 1828, tendo sido assim denominado por Cazenave, em 1850, para distingui-lo do Lúpus vulgar (Cossermelli et al 1978, Holubar & Fatovic-Ferencic 2001). A palavra latina *lupus* significa lobo e estabelece uma analogia entre as erupções faciais da doença e as marcas observadas na face de alguns lobos (Parham 2001). O termo auto-imune refere-se à produção de auto-anticorpos dirigidos a um constituinte próprio do organismo ou reatividade de linfócitos a um antígeno também próprio. O aparecimento de vários auto-anticorpos, associados a uma falha na supressão de sua formação levam a formação de muito complexo antígeno-anticorpos, que se depositam em diversos órgãos e respondem, pelo menos parcialmente, pelo estado clínico do paciente (Cossermelli et al 1978).

No Lúpus Eritematoso Sistêmico, os auto-anticorpos ligam-se aos componentes da superfície celular, do citoplasma e do núcleo, inclusive aos ácidos nucléicos e às partículas de nucleoproteínas. Após essa ligação molecular, inicia-se reação inflamatória que leva à destruição das células e dos tecidos (Parham 2001).

Em estudos norte-americanos, a incidência estimada de LES na população é de 5,7 a 7,6 casos por ano para cada 100 mil habitantes. Acomete predominantemente indivíduos jovens, do sexo feminino, na proporção de cerca de dez mulheres para cada homem. Prystowsky SD, (1976) relata que o LES tem uma maior freqüência, em mulheres entre 20 e 40 anos e que é uma doença rara na infância ou em indivíduos com mais de 70 anos de idade.

Segundo (Peakman, 1997) o LES afeta 40 em 100.000 indivíduos da Europa setentrional ou caucasiano americanos. A incidência parece ser maior na população negra e ainda maior em orientais.

O desequilíbrio imunológico no LES caracteriza-se pela perda da tolerância imunológica, desenvolvimento de auto-anticorpos e resposta citotóxica contra auto-antígenos, desencadeando fenômenos inflamatórios que levam à lesão tecidual e/ou a destruição celular (Cervera & Ingelmo, 1996; Gómez-Reino, 1996).

No LES são descritos como sinais e sintomas mais freqüentes: fadiga, anemia, febre, perda ponderal, artralgia, artrite, erupção tipo borboleta, fotossensibilidade, alopecia, linfadenopatia, pleurite, pericardite, diarreia, anemia, vasculite, síndrome nefrítica, doenças do sistema nervoso central, distúrbios da personalidade.

Para uniformizar a definição de LES em estudos científicos, em 1982, Tan *et al* e cols, estabeleceram os critérios de classificação para LES. Recentemente, esse critérios foram revisados (Hochberg, 1997). Os critérios, citados a seguir são em numero de onze, e a classificação como LES corresponde a presença de quatro desses. Embora raros, há pacientes com LES que não apresentam quatro dos onze critérios (Sato, 2002)

1) Eritema malar: lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.

2) Lesão discóide: lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.

3) Fotossensibilidade: exantema cutâneo, como reação não usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou conforme observado pelo médico.

4) Úlceras orais/nasais: úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.

5) Artrite: artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.

6) Serosite: pleuris (caracterizada por história convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).

7) Comprometimento renal: proteinúria persistente ( $> 0,5\text{g}/\text{dia}$  ou 3+) ou cilindrúria anormal.

8) Alterações neurológicas: convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).

9) Alterações hematológicas: anemia hemolítica ou leucopenia (menor que 4.000 leucócitos/ml em duas ou mais ocasiões), linfopenia (menor que 1.500 linfócitos/ml em duas

ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que 100.000 plaquetas/ml na ausência de outra causa).

10) Alterações imunológicas: anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm, ou presença de anticorpo antifosfolípide baseado em: a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; b) teste positivo para anticoagulante lúpico ou teste falso-positivo para sífilis, por no mínimo seis meses.

11) Anticorpos antinucleares: título anormal de anticorpo anti-nuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

Dentre os onze critérios referidos acima, as alterações hematológicas são as que nos chamam mais a atenção, principalmente as alterações na série eritrócítica que acometem a maioria dos pacientes com Lúpus. Hochberg, (1997) em trabalhos publicados relata que 40% dos pacientes com doença lúpica apresentam algum quadro de anemia. Contudo, na maioria dos casos, essa alteração não se deve apenas a anemia hemolítica auto-imune.

Considera-se que existe anemia se a concentração de hemoglobina ou o hematócrito estão abaixo do limite. As causas de anemia pertencem a três grandes categorias fisiopatológicas: produção deficiente das células vermelhas, perda de sangue ou destruição acelerada (hemólise) maior que a capacidade

da medula óssea em repor essas perdas. As anemias também podem ser classificadas pela morfologia das células vermelhas como macrocíticas, normocíticas ou microcíticas e como também pelo seu conteúdo hemoglobínico hipocrômicas e hiperocrômicas (Henry, 1995)

No hemograma de pacientes com Lúpus frequentemente observamos, anemia leve ou moderada, valores de hematócrito até 30% abaixo do normal (Carbotte, 1986). Geralmente estes pacientes se queixam de fadiga fácil, dispnéia por exercícios, e as vezes desmaios, palpitações e dores de cabeça. Esses achados físicos e laboratoriais são comumente observados em pacientes com LES.

Constata-se frequentemente em pacientes com LES, anemias hemolíticas que se caracterizam pela presença de um anticorpo dirigido contra os glóbulos vermelhos do paciente. Em consequência, uma porção da célula vermelha, ou toda ela, é fagocitada (Verrastro *et al* 1996). Este paciente geralmente apresenta um quadro hematimétrico sugestivo de anemia microcítica e hipocrômica.

Outros tipos de anemias também são observados em pacientes com doença Lúpica como as anemias provocadas por perda de sangue, por deficiência de ferro, por produção deficiente (megaloblástica), anemia aplástica e anemias hereditárias (hemoglobinopatias e talassemias). Este grupo de anemias hereditárias traz uma preocupação especial, pelo fato de muito das vezes não serem diagnosticadas, já que o quadro hematológico das hemoglobinopatias e talassemias possam coincidir com o quadro clínico e laboratorial hematológico provocados pelo Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Historicamente existe uma coincidência nos componentes geográficos e étnicos entre as duas doenças, LES e anemias hereditárias, segundo (Peakman, 1997) existe uma maior incidência de LES na população negra e oriental. Já Naoum, (1987) relata a grande participação da população africana (negra) distribuindo os genes das hemoglobinopatias e posteriormente a imigração de europeus e asiáticos para o Brasil trazendo os genes das talassemias. Desse modo entende-se que há a necessidade de realizar estudos mais específicos e detalhados das hemoglobinas dos pacientes portadores de doença lúpica.

## **1.2. Hemoglobinopatias e talassemias**

O Brasil se caracteriza por significativa mistura racial onde o processo de colonização teve grande influência na dispersão dos genes anormais, principalmente talassemias e falcemias. Assim, a distribuição das hemoglobinas anormais, provenientes de formas variantes e talassemias, estão relacionadas com as etnias que compõem nossa população. Dentre as hemoglobinas variantes, as mais freqüentes na população brasileira são a hemoglobina S (HbS) e C (HbC), ambas de origem africana, mostrando a intensa participação do negro na composição populacional brasileira (Naoum, *et al* 1979). As talassemias são mais freqüentes em regiões que tiveram maior participação da colonização italiana. Outras variantes raras como as hemoglobinas D, J, I, N, G, são encontradas em diferentes localidades (Naoum, *et al* 1987a).

Observa-se que a formação étnica da população brasileira está associada ao processo de colonização ao qual fomos submetidos. Inicialmente,

portugueses-índios, negros africanos e posteriormente devido às necessidades de povoação, outros povos imigraram para o Brasil como: italianos, japoneses, tailandeses, gregos, chineses, filipinos, malasianos, cipriotas-gregos, árabes-jordanianos, indonésios, espanhóis, canadenses e outros povos africanos. Esses povos apresentam originalmente genes para as hemoglobinas anormais com frequências variadas (Naoum 1982 b, Viana 1999).

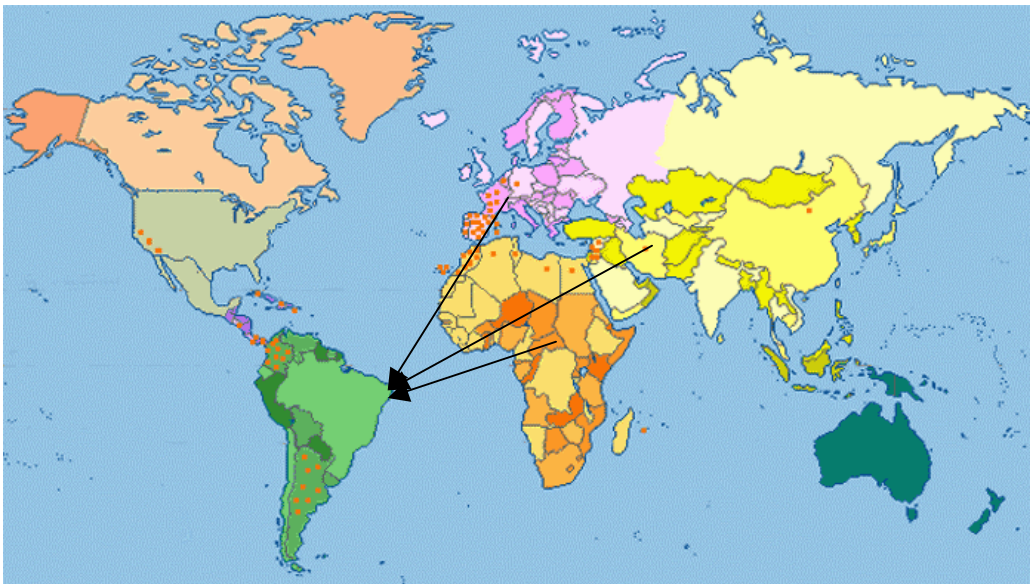


Figura 1 – Mapa mostrando resumidamente a origem das migrações para o Brasil.

Conforme Naoum & Domingos (1997b), a introdução da Hb S no Brasil, se deu com maior intensidade durante o tráfico de escravos africanos. A procedência dos escravos africanos para o Brasil era basicamente de duas regiões: Costa da Mina e de Angola, sendo que deste vieram dois terços dos escravos que entraram pelos portos do Rio de Janeiro e Pernambuco. O terço restante recebido pelo porto da Bahia, provinha da Costa da Mina. Uma parcela menor também veio de outras regiões africanas como Cacheu, Cabo Verde, Moçambique e Madagascar. Os escravos aqui aportados eram originários dos grupos Sudaneses e Bantos (Salles 1992). Esses grupos, segundo Naoum

(1982), são os que apresentam maior incidência de hemoglobinas variantes. Particularizando para o Estado de Goiás, os africanos sudaneses provavelmente predominam em Goiás, pois era o grupo que aportava na Bahia. Outro grande grupo africano, os “Bantus”, procedente do Rio de Janeiro, Alagoas, Pernambuco, Maranhão e Pará. (Naoum 1982 b) também se deslocaram para o estado. (Figura 2)

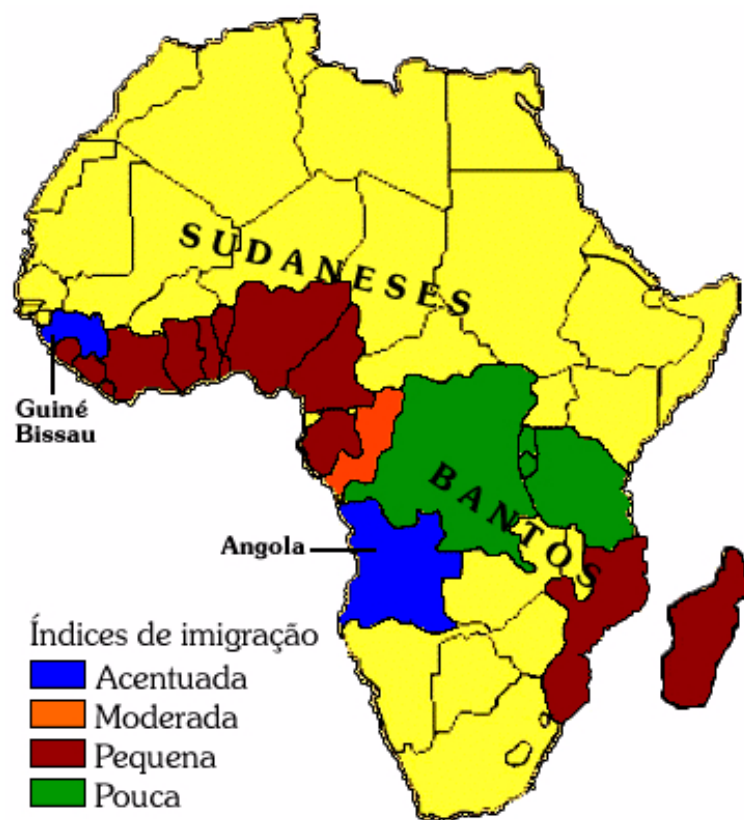


Figura 2 – Regiões da África com a origem dos negros que vieram para o Brasil. A legenda mostra a intensidade das correntes migratórias (Adaptado de Naoum, 1982).



O tráfico de escravos trouxe para o Brasil negros africanos oriundos de diversas regiões da África. Conforme Tabela 1 observa-se que no período de 1701-1710 a 1801-1810 a procedência regional de negros para o Brasil.

<b>Tabela 1-Desembarque estimado de escravos africanos no Brasil, por procedência regional períodos de 1701-1710 a 1801-1810</b>			
Períodos	Desembarque estimado de escravos africanos		
	Total	Procedência regional	
		Costa do Marfim	Angola
1701-1710	153700	83700	70000
1711-1720	139000	83700	55300
1721-1730	146300	79200	67100
1731-1740	166100	56800	109300
1741-1750	185100	55000	130100
1751-1760	169400	45900	123500
1761-1770	164600	38700	125900
1771-1780	161300	29800	131500
1781-1790	178100	24200	153900
1791-1800	221600	53600	16800
1801-1810	206200	54900	151300
<b>Total</b>	<b>1891400</b>	<b>605500</b>	<b>1285900</b>

Fonte: Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro: IBGE, 2000.

Segundo dados do Censo Demográfico do IBGE (2000), a população de Goiás é de 5.003.228 habitantes e está distribuída em 242 municípios, sendo 2.510.790 (50,2 %) constituída por mulheres e 2.492.438 (49,8%) por homens. Da população total, 4.396.645 (87,9%) são de domicílio urbano e 606.583 (12,1%) de domicílio rural. Goiânia é o município que apresenta maior número de habitantes, ou seja, 1.093.007 (21,84%). A Tabela 2 mostra a População residente, por cor ou raça em Goiás, segundo classificação do IBGE.

**Tabela 2 – População residente, por cor ou raça no estado de Goiás.**

Cor ou raça	População	%
Branca	2.538.412	50,73
Parda	2.176.260	43,49
Negra	226.963	4,54
Amarela	12.052	0,24
Indígena	14.110	0,28
Sem declaração	36.399	0,73
<b>TOTAL</b>	<b>5.004.197</b>	<b>100,00</b>

Fonte: IBGE, Censo Demográfico 2000.

Segundo (Palacín *et al.* 2001) a mestiçagem em Goiás foi grande, principalmente entre o branco e o negro. Um das causas para isso foi devido ao pequeno número de mulheres brancas. No senso de 1804, os pardos (denominação da época para designarem mulatos) representavam mais da metade da população livre de Goiás. Desse modo observa-se, que a população Goiânia, tem uma significativa mistura racial. Seu processo de colonização teve grande responsabilidade na dispersão dos genes anormais das talassemias e falcemias.

Assim, a distribuição das hemoglobinas anormais, provenientes de formas variantes e talassemias, estão relacionadas com as etnias que compõem nossa população (Naoum, 1984).

A hemoglobina é formada por quatro subunidades, composta de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, conhecidas por cadeia alfa e beta. As informações para a síntese dessa proteína estão contidas nos genes dos cromossomos 16 e 11, respectivamente. No adulto, os genes do cromossomo 11 são responsáveis pela síntese das cadeias beta, delta e gama. Já os genes do cromossomo 16 são responsáveis pela síntese das cadeias alfa, as quais possuem uma seqüência de 141 aminoácidos, enquanto que as cadeias beta, 146 aminoácidos. As combinações entre as diversas cadeias de proteínas dão origem às diferentes hemoglobinas presentes nos eritrócitos. (Naoum 1982 b, 1997,1999, Naoum *et al.* 1987b, Dacie 1995, Lorenzi 1999, Silva & Hashimoto 1999, Bernard *et al* 2000). A partir do sexto mês de vida, segundo Naoum (1997) são encontradas normalmente as hemoglobinas: “A” formada por duas cadeias alfa e duas beta (95 a 98 %), “A<sub>2</sub>“ formada por duas cadeias alfa e duas delta (2,0 a 3,5 %) e a Fetal “F” formada por duas cadeias alfa e duas gama (até 1,0 %).

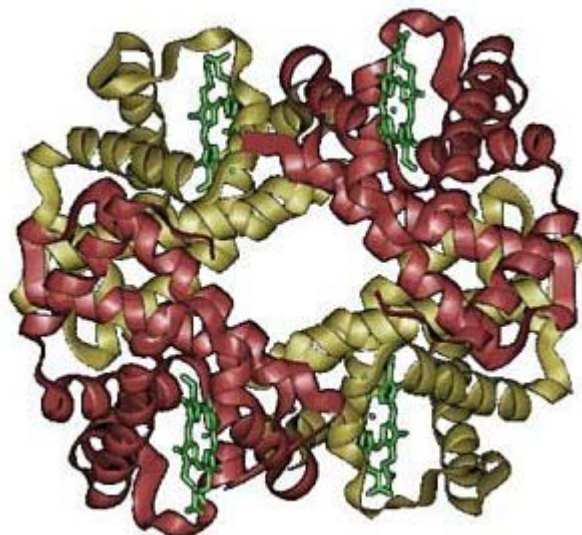


Figura 3 – Cadeias Alfa e Beta da estrutura molecular da hemoglobina.

As hemoglobinas diferentes das três acima citadas são conhecidas por hemoglobinas variantes. Incluem as hemoglobinopatias e as talassemias. Nas primeiras ocorre troca de aminoácidos na seqüência das cadeias globínicas da hemoglobina. Nas segundas, há alteração quantitativa das cadeias alfa ou beta de globinas, que são sintetizadas em quantidade inferior à da hemácia normal. (Naoum *et al.* 1987b, Naoum 1997, Naoum & Domingos 1997, Siqueira *et al.* 2002, Neto & Pitombeira 2003).

As hemoglobinopatias constituem uma das principais e mais freqüentes doenças genéticas que acometem seres humanos; e, dentre elas, a anemia falciforme é a doença hereditária mais prevalente no Brasil (Naoum, 1984), chegando a acometer 1 a 3% da população negra, com tendência a atingir parcela cada vez mais significativa da população, devido ao alto grau de miscigenação em nosso país. Já o portador do traço falcêmico, em condições normais, não apresenta manifestações clínicas ou laboratoriais. Contudo, a morbidade desta anomalia depende de fatores ambientais, sendo relatado na literatura, desde pequenos danos à saúde até manifestações clínicas graves, inclusive a morte dos indivíduos portadores desta condição (Ramalho, 1979).

Naoum, (1982b,1997) cita que as hemoglobinopatias são designações destinadas às hemoglobinas variantes e talassemias que causam hemólise, policitemia, cianose, anemia ou falcização. São exemplos de hemoglobinopatias: Anemia falciforme, Hemoglobinopatias C, D, E, e associações entre Hemoglobina S e C. (Dacie 1995, Lorenzi 1999, Naoum 1997, 1999).

Segundo Naoum (1982 a, 1987, 1997, 1999), Naoum *et al* (1987b),Silva & Hashimoto (1999) e Neto & Pitombeira (2003) na anemia falciforme há

mutação no sexto aminoácido da cadeia beta, onde a base nitrogenada adenina (A) é substituída por timina (T), ocasionando a substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina. Esta substituição altera a carga elétrica da hemoglobina, causando alterações da morfologia dos eritrócitos quando em baixas tensões de oxigênio.



Figura 4 – Representação da substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia Beta.

Já na hemoglobina C (Hb C) é uma variante originada pela substituição do ácido glutâmico por lisina na posição 6 da cadeia beta, causando um leve distúrbio hemolítico. Possui prevalência entre 15% a 30% nos povos de origem africana, e sua frequência é bastante variável na população brasileira, dependendo da região analisada. A troca do aminoácido confere características estruturais e funcionais próprias à molécula, facilitando a sua identificação por metodologias de rotina diagnóstica ( Old, 1966).

O estado heterozigótico hemoglobina AC é assintomático, sem anemia e pode estar presente uma hipocromia leve com presença de células em alvo no esfregaço sangüíneo. Na eletroforese de hemoglobinas segundo (Lorenzi, 1999) encontramos a hemoglobina C para o portador heterozigoto menos que 50%.

Conforme Naoum (1982 a, 1997, 1999) as talassemias constituem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias caracterizadas pela deficiência

total ou parcial da síntese de globina. As talassemias são classificadas de acordo com a globina afetada. Quando a produção afetada é a globina de cadeias do tipo alfa, têm-se as alfas talassemias, quando ocorre nas cadeias do tipo beta, tem-se as beta talassemias (Naoum 1997, 1999, Silva & Hashimoto 1999).

As talassemias alfa se devem à deficiência parcial ou completa da síntese da globina a nas hemácias de indivíduos afetados. (Weatherall and Clegg, 1981). As cadeias globínicas  $\alpha$  são necessárias para a síntese de hemoglobinas presentes na fase fetal e na fase adulta, exercendo importante papel na manutenção da estabilidade destas moléculas de hemoglobina. Assim, os defeitos que interferem na sua síntese têm repercussão clínica em ambas as fases, diferente das cadeias b, que estão presentes apenas no componente hemoglobínico adulto maior, a hemoglobina A (Hb A) (Waye JS, Chui DHK, 2001).

No feto, a deficiência de globinas  $\alpha$  produz um excesso de cadeias gama ( $\delta$ ) e, após o sexto mês de vida, o excesso se deve à globina  $\beta$ , que se torna livre. Essas cadeias livres formam tetrâmeros denominados de Hb Bart's ( $\gamma_4$ ) e Hb H ( $\beta_4$ ). A fisiopatologia da talassemia alfa é condicionada, justamente, pela formação desses tetrâmeros, que são instáveis e termolábeis (Weatherall, 2001). As talassemias alfa se devem principalmente por defeitos herdados na expressão dos genes do cromossomo 16 que codificam as globinas a atingindo de um a quatro destes genes, embora, defeitos de síntese também podem ocorrer de forma adquirida (Liebhaber, 1989). Por essa razão é possível classificar as talassemias alfa em quatro categorias, de acordo com o nível de expressão dos genes a:

(1) uma forma assintomática ou portador silencioso, com perda de um único gene (-a /aa);

(2) o traço alfa talassêmico, no qual há perda de dois genes alfa de um único cromossomo (--/aa) ou de um gene a de ambos os cromossomos (-a /-a);

(3) a doença da hemoglobina H, na qual apenas um gene alfa é funcional (--/- a);

(4) a hidropsia fetal, caracterizada pela ausência dos quatro genes alfa (- /--).

Devemos destacar a talassemia mínima que geralmente é do tipo alfa (Tal. Alfa) com um ou dois genes parcialmente reduzidos na sua expressão. Sendo que o paciente é assintomático, o eritrograma pode apresentar valores numéricos normais, porém com discreta alteração na morfologia eritrocitária em tamanho, hemácias microcíticas.

Devido à grande variedade de interações genéticas possíveis, geradas por processos de deleção, não deleção e hemoglobinas variantes, entre outros, pode ocorrer uma sobreposição entre os grupos acima, dificultando a sua caracterização. ( Weatherall, *et al* 1978). A anemia presente nas talassemias alfa se deve à diminuição do tempo de sobrevivência dos eritrócitos que contêm corpos de inclusão e são, por isto, retirados pela microvasculatura esplênica. Além disso, pelo defeito na síntese de quantidades normais de hemoglobina, os eritrócitos apresentam-se microcíticos e hipocrômicos. (Weatherall, 2001). Estes dados são de relevância clínica, uma vez que estas alterações hematológicas são seguidamente interpretadas como indicadores de deficiência de ferro ou características de anemia de doenças crônicas. (Brittenham, 2000)

Referindo-se às talassemias beta Naoum (1982 a, 1983, 1997, 1999), Papassotiriou *et al.* (1998) e Silva & Hashimoto (1999) citam que estas são mais heterogêneas do que as do tipo alfa. Caracterizam-se pela mutação nos genes do cromossoma 11, afetando a expressão e regulação do gene, que alteram quantitativamente a síntese de globinas beta. Como há aumento das cadeias alfa livres dentro dos eritrócitos elas precipitam. Esse precipitado altera a membrana celular e a célula assim alterada é fagocitada precocemente pelo sistema reticuloendotelial, provocando anemia. Podemos reconhecer dois tipos principais de beta-talassemia: 1º-beta-talassemia (Beta<sup>0</sup>) na qual não se demonstra síntese de cadeias beta; 2º beta-talassemia(Beta<sup>+</sup>) na qual a síntese de cadeias é reduzida para 5% a 30% do normal (Verrastro *et al* 1996).

Os sintomas gerais em qualquer tipo de anemia segundo (Verrastro *et al* 1996) são: palidez cutaneomucosa, fadiga, polipnéia, astenia, cansaço fácil, dores musculares, unhas quebradiças, irritabilidade, taquicardia aos esforços, sonolência, náuseas, perda do libido e impotência. Em estados mais grave, constata-se uma polipnéia permanente, com taquicardia, edema de membros inferiores e sinais de anorexia cerebral.

A Organização Mundial de Saúde, Academia de Ciências do Terceiro Mundo e a Organização Panamericana de Saúde recomendam o levantamento populacional da prevalência das anemias hereditárias nas populações, pois as anemias hereditárias são causas de morbidade e de mortalidade na população (Who Working Group 1982, Silva & Ramalho 1997).



## **2. OBJETIVO**

### **2.1– OBJETIVO GERAL**

Verificar a prevalência de Hemoglobinopatias hereditárias e Talassemias em pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico em tratamento no Hospital das Clínicas de Goiânia.

### **2.2– OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Comparar a possível ocorrência de hemoglobinopatias e talassemias em associação com o Lupus Eritematoso Sistêmico.
2. Correlacionar essas anomalias hereditárias com faixa etária, sexo.
3. Orientar, informar e esclarecer os afetados a respeito da condição da alteração da hemoglobina.

### **3. CRITÉRIOS E AMOSTRAGEM**

#### **3.1 – Critérios**

##### **3.1.1 – Critérios para seleção dos participantes no trabalho**

Os critérios de inclusão para que os pacientes façam parte da pesquisa serão:

1. Pacientes que voluntariamente concordam em participar e assinar o Termo de consentimento livre esclarecido, ou do responsável no caso de crianças (anexo 1).
2. Pacientes que preencham pelo menos 4 dos 11 critérios de classificação para LES do Colégio Americano de Reumatologia.
3. Pacientes de ambos os sexos
4. Não existirá limite de idade para ser efetuada a pesquisa.

##### **3.1.2 – Critérios de exclusão dos participantes no trabalho**

Os Critérios de exclusão dos pacientes a serem pesquisados serão:

1. Pacientes que não assinarem o Termo de consentimento livre esclarecido e não concordarem com a pesquisa ou que retirarem o seu consentimento.
2. Os pacientes que não preencherem os critérios de classificação para a doença Lúpus Eritematoso Sistêmico.

##### **3.1.3 – Identificação do participante**

A identificação do participante foi realizada mediante a obtenção dos seguintes dados: nome completo, data de nascimento, idade, sexo, naturalidade, endereço completo, telefone, numero do prontuário no hospital das clinicas de Goiânia. Além dessa identificação, todos os participantes receberam número de registro em ordem crescente (anexo 2).

### **3.2 – Amostragem**

O material utilizado para o estudo da prevalência das hemoglobinopatias e talassemias em pacientes portadores de Lupus eritematoso sistêmico no Hospital das Clínicas de Goiânia foi o sangue, obtido por punção venosa de veias periféricas do paciente e coletado diretamente em frascos tipo “penicilina” contendo solução comercial de anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) a 10 g/dl, 1 gota para cada 5 ml de sangue. Cada amostra foi identificada de acordo com a ficha cadastral modelo (anexo 2). Todas as amostras foram analisadas e estudadas no Laboratório de Estudo e Pesquisa de Anemias Hereditárias – LEPAH, Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum, do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás, no período de maio a setembro de 2005.

Foi coletado um total de 80 amostras de pacientes portadores de doença lúpica, correspondendo a aproximadamente 20% dos pacientes com LES atendidos no ambulatório do Hospital das Clínicas de Goiânia.

#### **3.2.1 – Amostra analisada e ética profissional**

O sigilo de todas as informações foi assegurado aos participantes pela equipe de trabalho como também em relação aos resultados, os procedimentos metodológicos realizados durante toda a pesquisa. Cumprindo com a Constituição Federal de 1988, que no inciso X, do seu artigo 5º, determina: "X - são invioláveis a intimidade, a vida privada a honra e a imagem das pessoas, assegurado o direito à indenização pelo dano material ou moral decorrente de sua violação;". A "intimidade", pois, do paciente nunca pode ser violada - nunca pode ser tornada pública. Portanto, como diz, em um de seus "Considerando",

a Resolução nº 1605/2000, do Conselho Federal de Medicina - CFM, "o sigilo médico é instituído em favor do paciente".

O presente trabalho foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás (Anexo 3), obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

## 4. MÉTODOLOGIA

### 4.1 – MÉTODOS

Todos os procedimentos laboratoriais praticados estão de acordo com as indicações de (Naoum, 1997) para a identificação das hemoglobinas normais e anormais.

Todas as amostras de sangue foram submetidas inicialmente aos seguintes procedimentos:

- 1) Eritrograma. Neste exame foi avaliada, a morfologia das hemácias, a determinação do número de hemácias, dosagem de hemoglobina e determinação do hematócrito. Serão calculados os índices hematimétricos, isto é, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina celular média (HCM) e concentração da hemoglobina celular média (CHCM). Os resultados da hematimetria associados à análise da morfologia eritrocitária são importantes para compor as informações técnicas necessárias para se chegar ao diagnóstico laboratorial das anemias ( NAOUM, 1977).
- 2) Teste de fragilidade osmótica a salina 0,36%. É um teste auxiliar que indica deficiência de hemoglobinizacão.
- 3) Teste de falcizacão. Quando positivo indica a presença de hemoglobina S.
- 4) Pesquisa intra-eritrocitária de Hb H.
- 5) Pesquisa intra-eritrocitária de Hb Fetal.
- 6) Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e ácido. São técnicas de identificacão da maioria das hemoglobinas anormais.
- 7) Cromatografia de alta performance: HPLC

Precaucão: devido à instabilidade da Hb H, todas as amostras de sangue foram analisadas no mesmo dia da coleta, evitando desse modo, resultado falso negativo (Ribeiro & Araújo 1992).

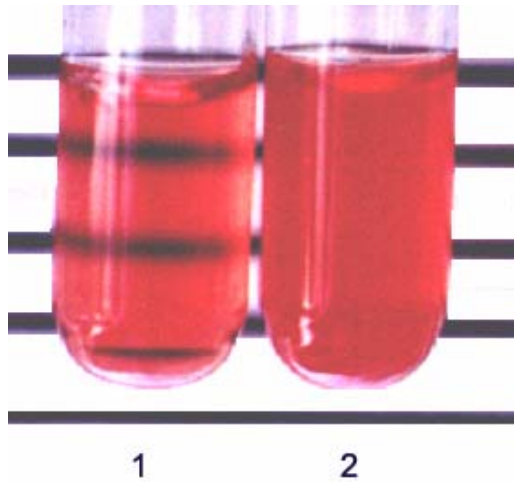
Os itens 4.1.1 até 4.1.7 explicam cada um dos procedimentos laboratoriais utilizados para a triagem e confirmação.

#### **4.1.1– Eritrograma**

Foi realizado em aparelho automatizado Cobas Micro Roche®. Neste exame, observou-se o número de hemácias, dosagem de hemoglobina, valor do hematócrito e o índice de anisocitose (RDW). Os índices hematimétricos, isto é, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina celular média (HCM) e concentração da hemoglobina celular média (CHCM) foram calculados pelo próprio equipamento. Os resultados da hematimetria associados à análise da morfologia eritrocitária são importantes para compor as informações necessárias para se chegar ao diagnóstico laboratorial das anemias (Naoum, 1977).

#### **4.1.2– Teste de fragilidade osmótica a salina 0,36%**

Em presença de solução de cloreto de sódio a 0,36%, os glóbulos vermelhos de pacientes portadores de anemias microcíticas e hipocrômicas apresentam maior resistência globular quanto colocadas nesta solução. Entretanto, as hemácias normocíticas e normocrômicas não apresentam resistência, sendo lisadas. Além das hemácias microcíticas e hipocrômicas podem apresentar positividade nesta solução as hemoglobinas AS, AC, SS e SC. (Naoum, 1997). A Figura 5 demonstra o teste negativo e positivo.



Interpretação:

- 1) – Teste negativo. Solução transparente. Vê-se os traços no fundo. Eritrócitos hemolisados.
- 2) – Teste positivo. Solução turva . Não se vê os traços no fundo. Eritrócitos resistentes.

Figura 5 – Teste de resistência globular a salina 0,36%. Fotografia obtida por equipamento digital. LEPAH-CBB-UCG cedida cordialmente pelo Dr. Paulo Roberto de Melo Reis.

#### **4.1.3– Teste de falcização com solução de metabissulfito de sódio a 2%**

(Método de Daland & Castle, 1946)

Entre lâmina e lamínula e em presença de um agente redutor (Metabissulfito de sódio), as hemácias que contem Hb S se cristalizam e adquirem a configuração peculiar de foice, enquanto hemácias normais não falcizam (Figura 6). A falcização se explica pela polimerização de desoxihemoglobina S. Um teste positivo é necessário para confirmar se uma hemoglobina que migra ao nível da S, por eletroforese, é realmente esta hemoglobina (Carvalho, 1988).



Figura 6 – Teste de falcização. Fotografia obtida por equipamento digital. Obtida no site, [http://www.studiolevi.com/pfizer/anemia\\_falciforme.htm](http://www.studiolevi.com/pfizer/anemia_falciforme.htm) em 20/10/2005.

#### 4.1.4– Pesquisa intra-eritrocitária de Hb H (Carvalho, 1998)

A hemoglobina H ( HbH) pode ser encontrada na alfa-talassemia. É uma hemoglobina composta por 4 cadeias beta.

Este teste permite reconhecer a presença intra-eritrocitária de Hb H. Os eritrócitos submetidos à coloração vital com azul de cresil brilhante, os corpúsculos apresentam-se dispostos homogeneamente no interior dos eritrócitos, como pequenos pontos azulados, dando a aparência de bolas de golfe. Figura 7 mostra vários exemplos de agregados de hemoglobina H.



Figura 7 – Agregados de hemoglobina. Fotomicrografia obtida de esfregaço preparado com azul de cresil brilhante em equipamentos do LEPAH.

#### 4.1.5- Pesquisa intra-eritrocitária de Hb Fetal (Carvalho, 1998)

A hemoglobina A e a maior parte das hemoglobinas anormais são facilmente eluídas por uma solução de pH ácido, enquanto a hemoglobina F precipita dentro dos eritrócitos. A Hb F é ácido resistente e, por isso, não é eluída dos eritrócitos, corando-se facilmente com a eosina. Outros tipos de hemoglobinas por serem eluídas não fixam o corante. Após coloração pela



eosina, os eritrócitos que contêm a Hb F aparecem vermelhos, enquanto que os eritrócitos sem Hb F aparecem como “fantasmas” completamente descorados. (Carvalho, Maria das Graças, 1988). Figura 8 mostra vários exemplos de hemoglobina F e Hemoglobina A.

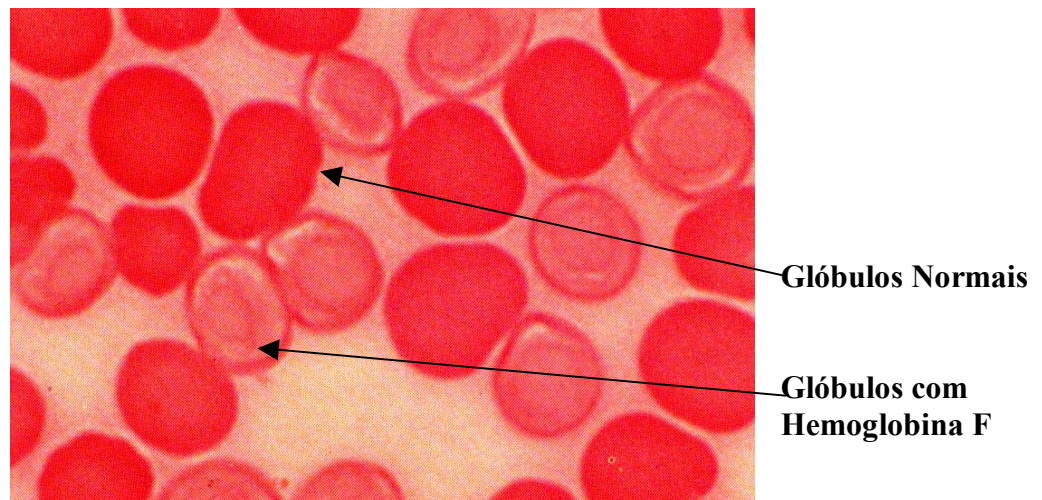


Figura 8 – Mistura de glóbulos vermelhos adultos normais e glóbulos contendo Hb F. Fotomicrografia obtida de equipamento fotográfico LEPAH.

#### **4.1.6- Eletroforese de hemoglobina (Naoum, 1997).**

##### **4.1.6.1– pH alcalino**

###### **4.1.6.1.1 – Preparo do hemolisado (Naoum, 1999).**

O hemolisado foi preparado com solução de saponina a 1%, colocando 50  $\mu$ l de sangue total 100  $\mu$ l da saponina em um dos compartimentos da placa de kline, e homogeneizando.

###### **4.1.6.1.2 – Tampão usado**

O tampão utilizado foi o TEB [Tris (hidroximetil) aminometano, EDTA, Borato pH=8,5 (Naoum,P.C .1999).

#### 4.1.6.1.3 – Eletroforese em acetato de celulose

A eletroforese de hemoglobina baseia-se no fato de que a molécula hemoglobínica, cujo ponto isoelétrico é igual a 6,8, tem carga negativa em meio alcalino, migrando no sistema eletroforético para o pólo positivo. A velocidade com que uma partícula se move através do campo elétrico vai depender da densidade de carga livre que possui. Portanto, as hemoglobinas, diferem pela velocidade com que migram, ou melhor, pela mobilidade eletroforética. Esta diferença na velocidade de migração permite identificar as hemoglobinas, comparando-se a distância percorrida pela hemoglobina em estudo com a de padrões conhecidos. Figura 9 mostra as algumas disposições das mobilidades eletroforética das hemoglobinas variantes.

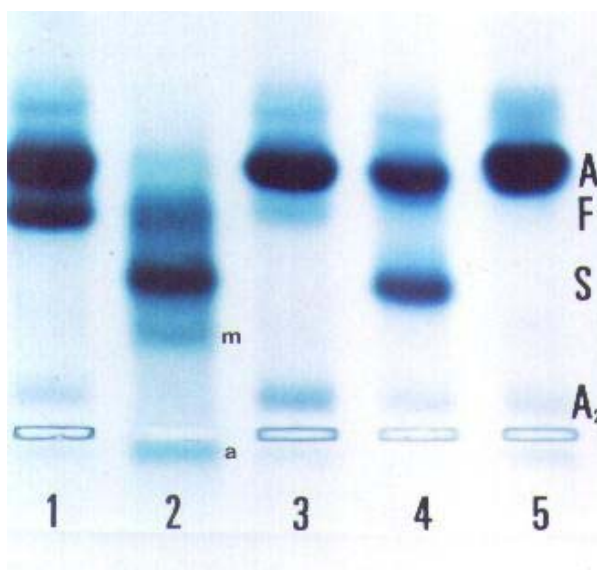


Figura 9: Eletroforese de hemoglobinas em gel de agarose alcalina: (1) Hb AF de talassemia beta maior; (2) Hb S/beta talassemia ou SF, onde m indica o fracionamento da metaemoglobina S e a globina alfa livre; (3) Hb AA<sub>2</sub> e Fetal em tal. beta menor; (4) Hb AS (traço falciforme); (5) Hb AA (normal). Foto cedida cordialmente pela Academia de Ciência e Tecnologia de São Jose do rio Preto

Para visualização de Hb H é aconselhável à macro aplicação da amostra, o que facilita sua visualização nos primeiros minutos de eletroforese. As fitas de acetato de celulose foram conservadas no próprio tampão TEB. Para a identificação da Hemoglobina H que é instável e se desnatura facilmente, toda a atenção foi dada no início da migração das frações, pois, ela apresenta-se mais rápida que a hemoglobina A e desaparece por volta do 10-15 minutos após o início da corrida. Nas Figuras 10 e 11 mostra a fração de hemoglobina H.

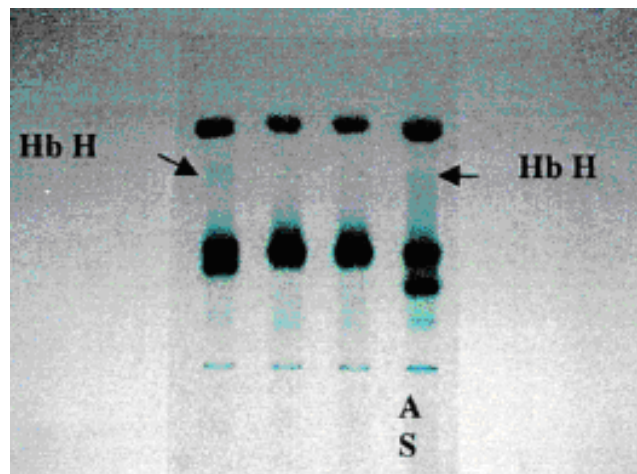


Figura 10 – Eletroforese de hemoglobina pH=8,6.

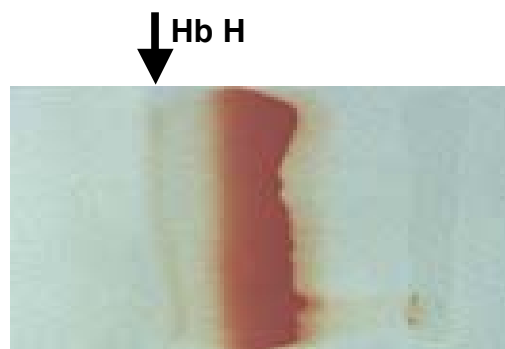


Figura 11- Visualização da Hemoglobina H. Foto cedida gentilmente pelo LEPAH-UCG

#### **4.1.6.2 – pH ácido**

##### **4.1.6.2.1 – Preparo do hemolisado** (Naoum, 1999).

O hemolisado também foi preparado com solução de saponina a 1%, colocando-se 50 µl de sangue total 100 µl da saponina em um dos compartimentos da placa de kline, e homogeneizando.

##### **4.1.6.2.2– Tampão usado** (Naoum, 1999).

O tampão utilizado foi o tampão fosfato pH=6,2

##### **4.1.6.2.3– Eletroforese em agar** (Naoum, 1999).

Essa eletroforese permite diferenciar algumas hemoglobinas que tem mobilidade semelhante em pH alcalino, por exemplo, Hemoglobina S e D, Hemoglobina C e E. Em pH ácido, a Hb D se separa da Hb S migrando na mesma posição que a Hb A, permitindo assim confirmar o diagnóstico de Hb SD. Cabe ressaltar que é extremamente rara a presença de Hb D em nossa população, cuja heterozigose ( Hb AD ) é prevalente numa relação de 1 caso para cada 5 mil pessoas analisadas, e a Hb SD na ordem de 1 caso para cada milhão. Assim em geral, a ausência da eletroforese em pH ácido não traz dificuldades no diagnóstico da grande maioria dos casos de doença falciforme, já que o teste de falcização demonstra hemácias que contem Hb S com a configuração de foice enquanto que na presença de Hb D as hemácias não se encontram nesta configuração de foice. Na figura 12 observamos na posição 6 a necessidade do emprego da eletroforese em pH ácido.

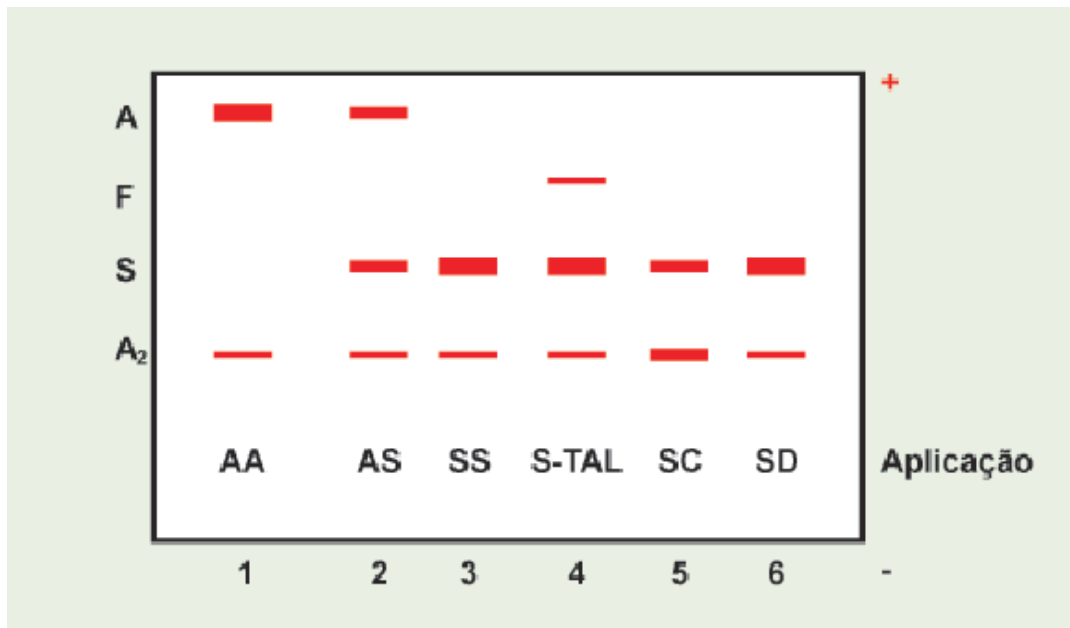


Foto 12- Eletroforese em pH alcalino demonstrando na amostra 6 a necessidade de se utilizar a eletroforese em pH ácido.

#### 4.1.7 – Cromatografia de alta performance: HPLC

Foi utilizado uma das tecnologias mais avançadas e muito sensível, que permite o fracionamento por meio da cromatografia das diferentes frações hemoglobínicas, fazendo uma avaliação tanto quantitativa quanto qualitativa das hemoglobinas. Para este estudo foi usado o *kit* beta-talassemia no equipamento Varianat da Bio-Rad. Entretanto, com esse método não é possível detectar a hemoglobina H.

## 4.2 – Dados Obtidos

Os dados obtidos nas 80 amostras analisadas de pacientes com doença lúpica foram, anotados na ficha de resultado (anexo 4) com todos os procedimentos acima descritos. Posteriormente, esses dados foram transcritos para a planilha de cálculo do Microsoft-Excel®.

Obtivemos uma representatividade na pesquisa de 20% da população em estudo, já que o número total é de 400 pacientes com LES assistidos no ambulatório do hospital.

As prevalências foram calculadas nas categorias (Hemoglobinas normais e anormais, índices hematimétricos, sexo), sendo os intervalos de confiança 95%. O coeficiente de prevalência é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{Coeficiente de prevalência} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de casos conhecidos de uma doença}}{\text{População}}$$

Todos esses valores podem ser expressos em porcentagem, multiplicando-se por 100.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 - Descrição da amostra populacional.

Foram estudados 80 pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico atendidos no Hospital de Clínicas de Goiânia (HC), provenientes deste mesmo município e de outras regiões do estado de Goiás, sendo que, do total, 74 (92,5%) eram do sexo feminino e 6 (7,5%) eram do sexo masculino, uniformemente distribuídos conforme (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição das amostras analisadas em função do sexo.

<b>Sexo</b>	<b>Amostras</b>	<b>Percentual</b>
<b>Feminino</b>	74	92,5
<b>Masculino</b>	6	7,5

A Tabela 4 mostra a distribuição dos pacientes portadores de Lupus eritematoso sistêmico por idade e sexo. A menor idade foi de 17 anos em uma mulher. Já a maior idade foi de 75 anos também em uma mulher. Média das idades dos pacientes homens e mulheres foi de 36,8 anos, sendo que a idade media dos homens foi de 38,2 anos e das mulheres de 36,7, conforme tabela 5.

**Tabela 4 – Distribuição da população por idade e sexo.**

<b>IDADE</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>TOTAL</b>
17	1	0	1
19	1	0	1
20	1	0	1
21	0	1	1
22	3	0	3
23	1	0	1
25	2	0	2
26	4	0	4
27	3	0	3
28	3	0	3
29	6	0	6
30	3	0	3
31	1	0	1
32	1	0	1
33	2	1	3
34	3	0	3
35	2	0	2
36	4	1	5
38	3	0	3
39	1	0	1
40	3	0	3
41	1	1	2
42	3	1	4
43	5	0	5
44	1	0	1
45	1	0	1
46	3	0	3
49	2	0	2
50	3	0	3
51	2	0	2
56	2	1	3
60	1	0	1
61	1	0	1
75	1	0	1
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>6</b>	<b>80</b>



**Tabela 5 – Idade media dos pacientes portadores de LES**

	Idade Media
<b>Homens (6)</b>	38,2
<b>Mulheres</b>	
<b>(74)</b>	36,8
<b>Total (80)</b>	<b>36,7</b>

Observamos na tabela 5 que ambos os sexos são afetados, mas atinge predominantemente o sexo feminino, numa proporção de doze mulheres para um homem, principalmente em idade reprodutiva conforme dados postulas acima.

## **5.2 – Quadros hematimétricos dos pacientes pesquisados.**

Constatou-se no presente trabalho que 52,5 % (42 amostras) dos pacientes analisados apresentavam quadros hematimétricos sugestivos de anemia. Observa-se na tabela 6 os índices normais para população adulta, segundo Wintrobe, 1976.

**Tabela 6 – Índices Hematimétricos normais**

<b>Adultos</b>	<b>HM</b>	<b>HG</b>	<b>HCT</b>	<b>VCM</b>	<b>HCM</b>	<b>CHCM</b>
<b>Feminino</b>	3,9 a 5,9 M/ $\mu$ l	12,0 a 16,0 g/dl	35,6 a 48,6 %	82,0 a 92,0 fl	27,0 a 31,0 pg	32,9 a 36,0 g/dl
<b>Masculino</b>	4,5 a 6,7 M/ $\mu$ l	14,0 a 18,0 g/dl	41,5 a 54,7 %	82,0 a 92,0 fl	27,0 a 31,0 pg	32,9 a 36,0 g/dl

HM; Eritrócitos, HG; Hemoglobina, HCT; Hematócrito; VCM; Volume Corpuscular médio, HCM; Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM; Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Observando os índices médios dos pacientes pesquisados notou-se quadro hematológico compatível com anemias microcíticas e hipocrômicas como seguem abaixo. (tabela 7).

**Tabela 7– Índices Hematimétricos médios observados nos 80 pacientes com LES**

<b>HM</b>	<b>HG</b>	<b>HCT</b>	<b>VCM</b>	<b>HCM</b>	<b>CHCM</b>
4,18	11,83	35,89	85,90	28,45	32,98

HM; Eritrócitos, HG; Hemoglobina, HCT; Hematócrito; VCM; Volume Corpuscular médio, HCM; Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM; Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Quando realizamos os índices hematimétricos médios de acordo com o sexo, observou-se que os homens apresentavam quadro hematológico médio mais sugestivo de anemias do que o quadro hematológico feminino. (tabela 8).

**Tabela 8 – Índices Hematimétricos médios de acordo com sexo**

<b>Total (80)</b>	<b>HM</b>	<b>HG</b>	<b>HCT</b>	<b>VCM</b>	<b>HCM</b>	<b>CHCM</b>
<b>Feminino (74)</b>	4,13	11,7	35,6	86,1	28,6	33,1
<b>Masculino(6)</b>	4,78	12,8	39,8	83,3	26,8	32,1

HM; Eritrócitos, HG; Hemoglobina, HCT; Hematócrito; VCM; Volume Corpuscular médio, HCM; Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM; Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

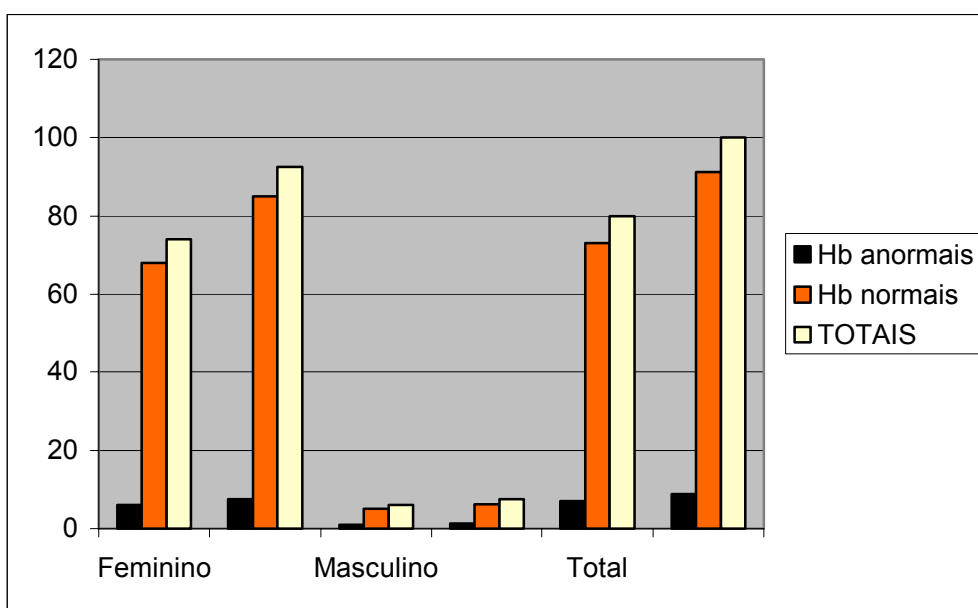
### **5.3 – Tipos de hemoglobinas identificadas.**

Do total de 80 amostras, 7 (8,75%) apresentaram hemoglobinas com alterações qualitativas ou quantitativas, sendo que 6 (7,5%) eram do sexo feminino e 1 (1,25%) do sexo masculino. Portanto, a prevalência de hemoglobinas anormais nos pacientes portadores de Lupus eritematoso

sistêmico foi de 7 casos o que equivale a 8,75%. A Tabela 9 e a Figura 13 distribuição das hemoglobinas normais e anormais por sexo.

**Tabela 9 – Distribuição das hemoglobinas normais e anormais por sexo.**

	Feminino	%	Masculino	%	Total	Total %
<b>Hb anormais</b>	6	7,5	1	1,25	7	8,75
<b>Hb normais</b>	68	85	5	6,25	73	91,25
<b>TOTAIS</b>	<b>74</b>	<b>92,5</b>	<b>96</b>	<b>7,5</b>	<b>80</b>	<b>100,0</b>

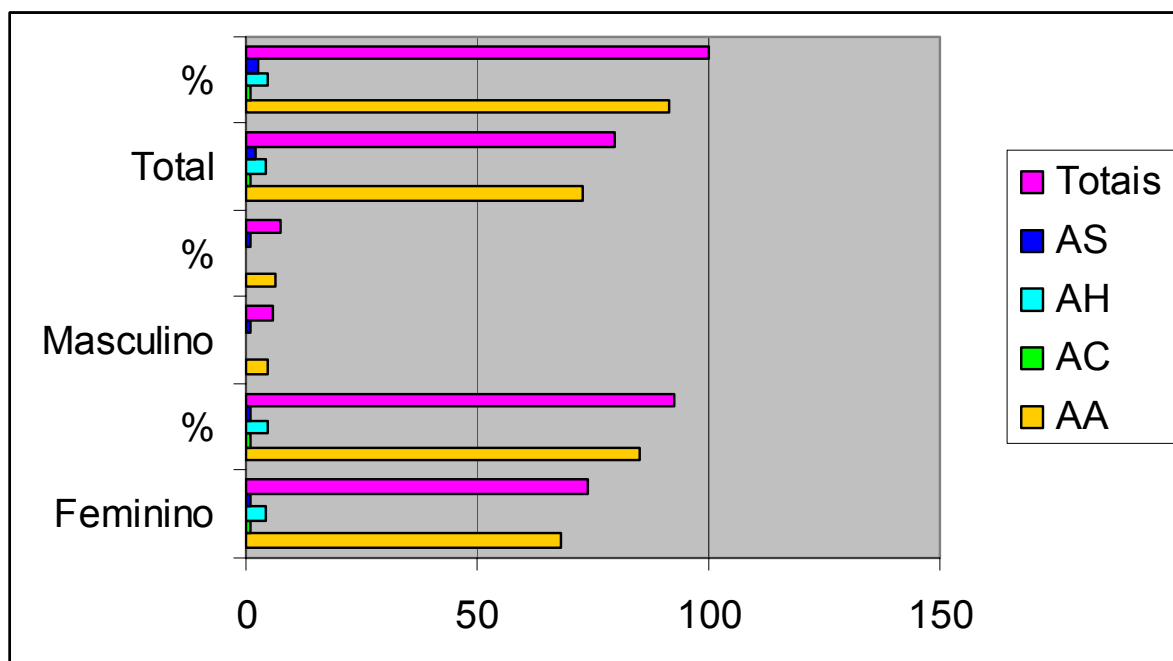


**Figura 13 - Distribuição das hemoglobinas normais e anormais por sexo.**

As metodologias empregadas nesta pesquisa permitiram a identificação de três genótipos das hemoglobinas variantes, sendo que todos eles foram de heterozigotos. Não se encontrou nenhum homozigoto para as hemoglobinas variantes. A Tabela 10 e Figura 14 ilustram os diferentes tipos de hemoglobinopatias identificadas durante a realização da pesquisa.

**Tabela 10 – Distribuição das hemoglobinas normais e anormais em 80 amostras**

Genótipo	Feminino	%	Masculino	%	Totais	%
AA	68	85	5	6,25	73	91,25
AC	1	1,25	0	0	1	1,25
AH	4	5,0	0	0	4	5
AS	1	1,25	1	1,25	2	2,5
<b>Totais</b>	<b>74</b>	<b>92,5</b>	<b>6</b>	<b>7,5</b>	<b>80</b>	<b>100,0</b>

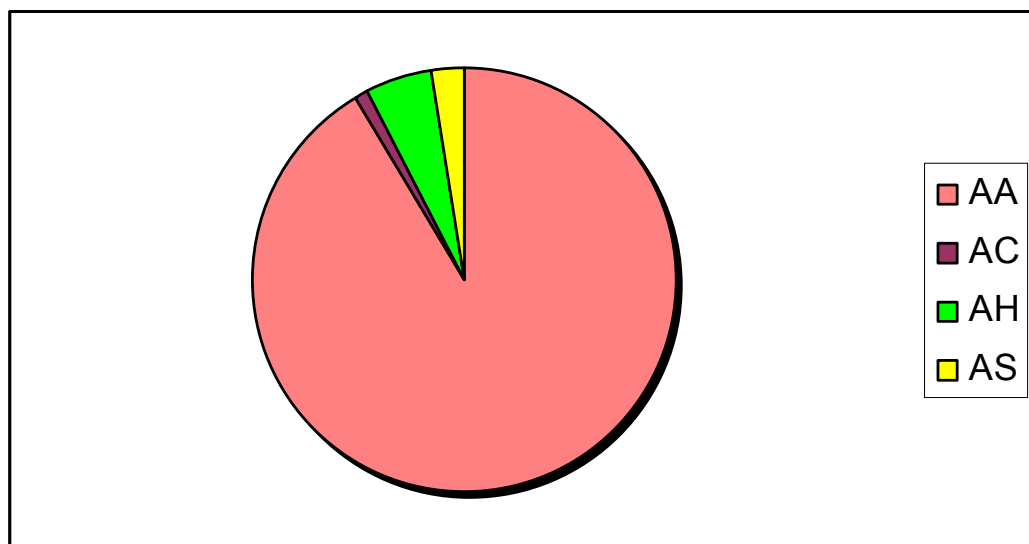


**Figura 14 - Distribuição dos genótipos encontrados em 80 pacientes.**

A talassemia alfa (genótipo AH) foi a mais prevalente de todas, sendo que os 4 casos encontrados foram detectados por eletroforese de hemoglobina em pH alcalino e posteriormente realizada a pesquisa intra-eritrocitária de agregados de Hb H constatando uma prevalência de 5%. Foi determinado o

valor das frações e todos os indivíduos encontrados são portadores de talassemia alfa mínima. Neste caso, a eletroforese de hemoglobina em pH ácido não tem especificidade e nem sensibilidade para detectá-la, o que também ocorre com a HPLC.

Para os genótipos AC e AS detecção de hemoglobina C e Hemoglobina S foram realizadas, além da eletroforese alcalina, a ácida. Sendo que para o genótipo AS encontramos uma prevalência de 2,5 % e genótipo AC 1,25 % Todas essas amostras foram remetidas para análise em HPLC. Na Figura 15 visualizamos os genótipos identificados nas 80 amostras.



**Figura 15 – Distribuição em formato de pizza dos genótipos totais identificados em 80 pacientes.**

#### **5.4 – Caracterização laboratorial da Hemoglobina H (Talassemia mínima).**

O diagnóstico laboratorial foi realizado por meio de eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose, pH alcalino, que revelou traços de Hb H em quatro amostras das oitenta analisadas, sendo que não houve a

confirmação pelo HPLC. A pesquisa intraeritrocitária de Hb H mostrou eritrócitos com precipitados de Hb H, confirmando a presença de alfa talassemia mínima.

Muitos autores alertam que este diagnóstico exige procedimentos de execuções atenciosas recomendadas por Naoum (1982, 1997) e Ribeiro & Araújo (1992).

Devido a este fator operacional ocorreu uma preparação prévia da equipe que participou desse trabalho, lembrando que essa forma de talassemia é diagnosticada pelo encontro de hemoglobina H que, por sua vez, é instável e se desnatura com facilidade, necessitando de atenção e procedimentos especiais, como por exemplo: preparo do hemolisado com saponina. A dosagem de hemoglobina H foi realizada pelo método de eluição e, dessa forma, quatro pacientes (5,0%) foram agrupados como portadores de talassemia alfa mínima. Na Tabela 11 é apresentado o resultado do eritrograma dos pacientes e na Tabela 12, a média dos índices hematimétricos com os indicadores de alteração, sendo que os valores obtidos correspondem ao quadro de anemia microcítica. As figuras 14, 15,16 e 17 mostram em detalhe os resultados das pacientes no cromatograma por HPLC, no qual não é possível observar a hemoglobina H por esta metodologia.

**Tabela 11 – Dados do eritrograma para as pacientes com Hb H**

<b>IDADE</b>	<b>SEXO</b>	<b>Hm</b>	<b>Hb</b>	<b>Ht</b>	<b>VCM</b>	<b>HCM</b>	<b>CHCM</b>	<b>RDW(%)</b>
<b>19</b>	F	4,72	11,2	35,6	75,4	23,7	31,5	14,0
<b>27</b>	F	3,49	8,7	26,6	76,2	24,9	32,7	15,1
<b>29</b>	F	4,41	11,0	33,4	75,7	24,9	32,9	13,9
<b>38</b>	F	4,21	10,2	32,4	77,0	24,2	31,5	15,6

<b>Referência</b>	F	4,0 – 5,5	12-16	42±5	87±5	30±2	34±2	12±2
-------------------	---	-----------	-------	------	------	------	------	------

Fonte: Lorenzi, 1999.

**Tabela 12 – Média dos Índices Hematimétricos para pacientes com Hb H**

	SEXO	Hm	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	RDW(%)
Média(4)	F	4,20	10,27	32	76,0	24,42	32,15	14,65
Referência	F	4,0 – 5,5	12-16	42±5	87±5	30±2	34±2	12±2

Fonte: Lorenzi, 1999.

\*\*\*\* Beta\_Thal Short: 30100-A \*\*\*\*  
DATE:15/06/05 TIME:02:59:10

TECH ID# 10  
VIAL# 58  
SAMPLE ID# 00000000000000000013

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
P2	7.8	1.32	142302
P3	8.7	1.70	158875
Ao	80.6	2.54	1469230
A2	2.8	3.64	46388
TOTAL AREA			1816795
F	0.0%	A2	2.8%

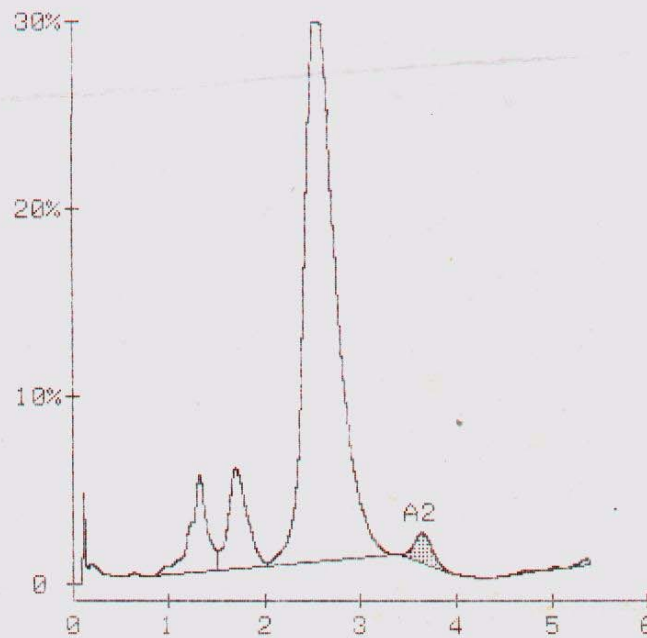


Figura 16 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e A2 encontradas para a paciente com 19 anos.



\*\*\*\* Beta Thal Short 30100-A \*\*\*\*  
DATE:15/06/05 TIME:03:51:11

TECH ID# 10  
VIAL# 66  
SAMPLE ID# 00000000000000000021

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
P2	6.0	1.30	285999
P3	5.9	1.68	280580
Ao	84.9	2.38	4060769
A2	3.1	3.67	134820
TOTAL AREA			4762168
F	0.0%	A2	3.1%

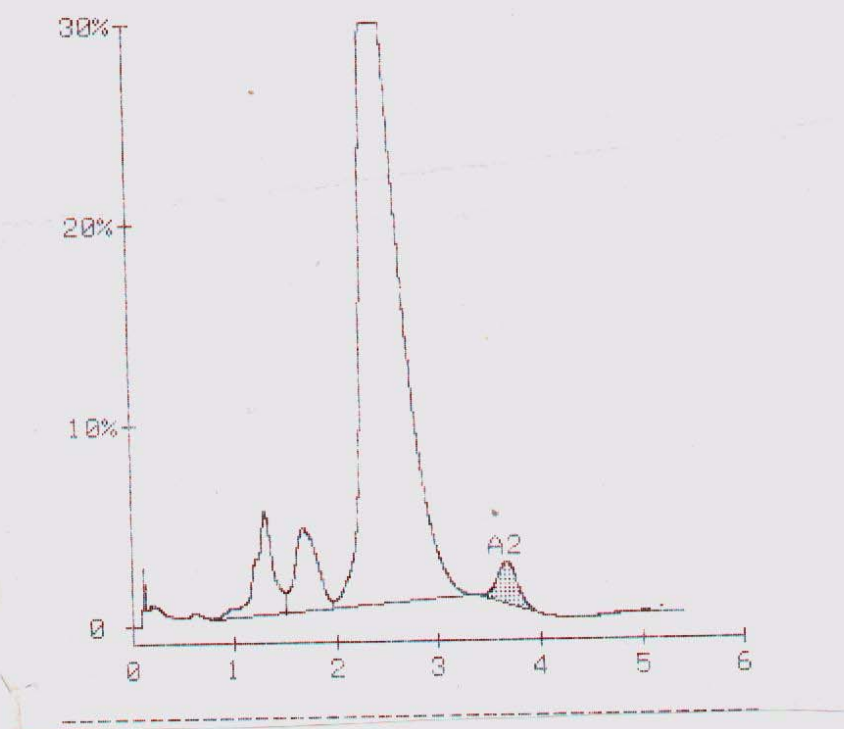


Figura 17 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e A2 encontradas para a paciente com 27 anos.

\*\*\*\* Beta Thal Short 30100-A \*\*\*\*  
DATE:30/08/05 TIME:20:59:03

TECH ID# 10  
VIAL# 54  
SAMPLE ID# 0000000000000000056

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
P2	5.9	1.30	167138
P3	6.4	1.68	183389
Ao	84.7	2.44	2410557
A2	2.8	3.61	73272
TOTAL AREA			2834356
F	0.0%	A2	2.8%

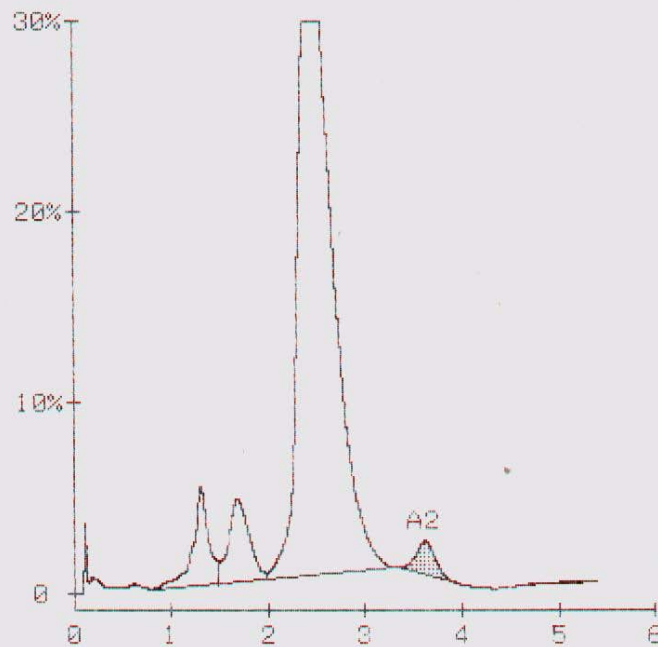


Figura 18 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e A2 encontradas para a paciente com 29 anos.

\*\*\*\* Beta Thal Short 30100-B \*\*\*\*  
DATE:25/10/05 TIME:18:49:02

TECH ID# 10  
VIAL# 64  
SAMPLE ID# 00000000000000000081

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
P2	8.1	1.30	210632
P3	11.4	1.66	296283
Ao	75.9	2.36	1976975
A2	2.9	3.58	71545
Unknown 1	0.7	4.82	17949
Unknown 2	0.8	5.31	20858
TOTAL AREA			2594242
F	0.0%	A2	2.9%

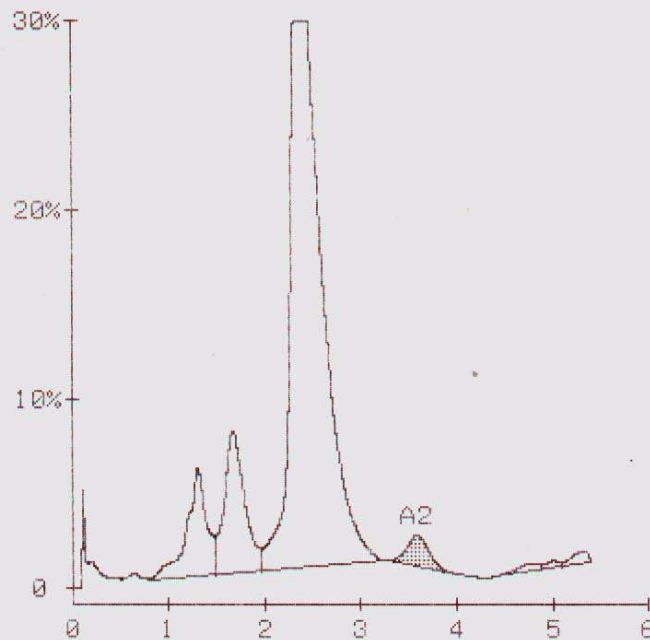


Figura 19 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e A2 encontradas para a paciente 38 anos.

## **5.5 – Caracterização laboratorial da Hemoglobina S (Traço Falciforme).**

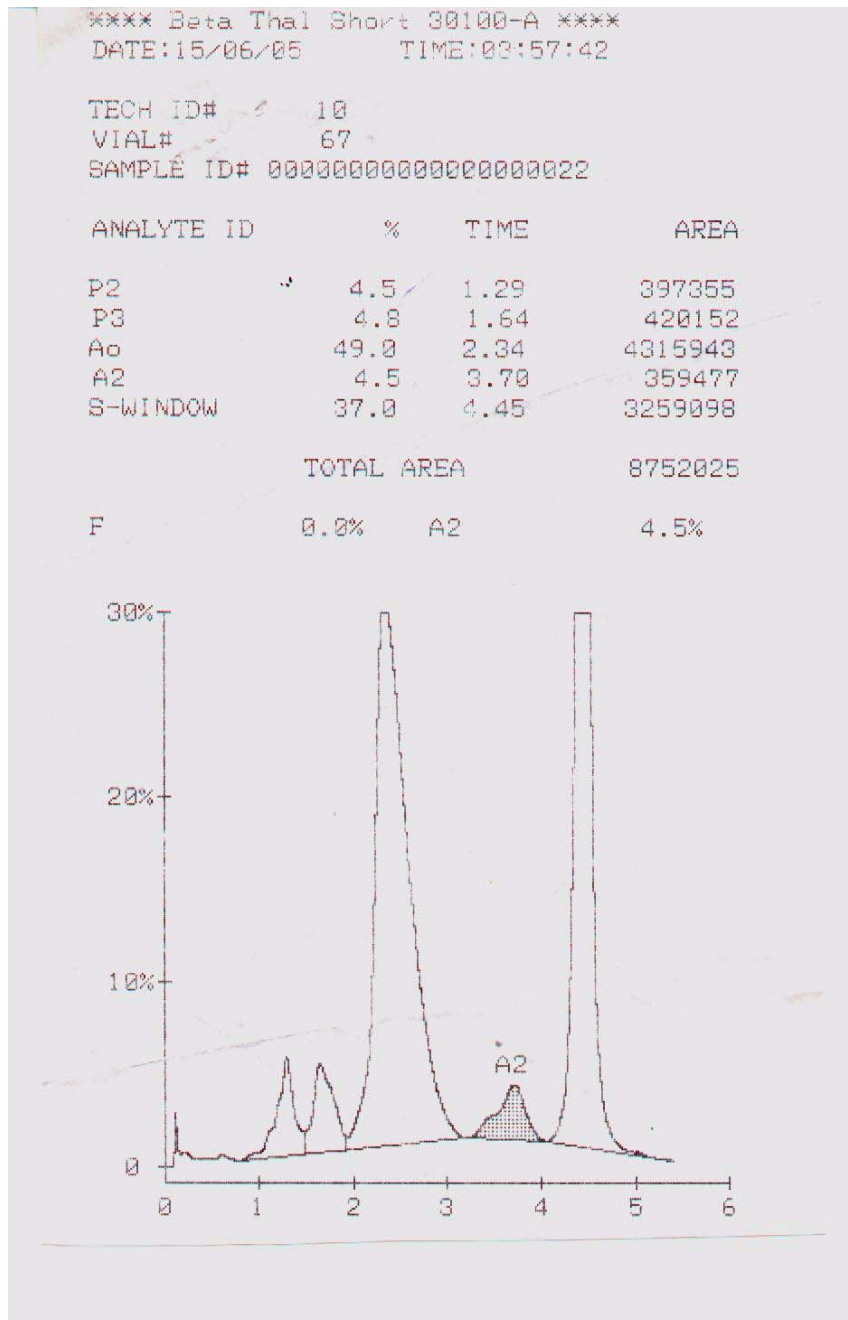
Para a caracterização do traço falcêmico pode-se utilizar de um exames como teste de falcização, eletroforese de hemoglobina, como também o hemograma, que normalmente revela na maioria das vezes hemácias normocrômica e normocítica (podendo ser hipocrômica e eventualmente macrocítica). Nos pacientes pesquisados observamos dois casos de traço falciforme, um no sexo masculino e outro no sexo feminino, no qual os índices hematimétricos ponderaram no limite da normalidade (tabela 13) se fazendo necessário o emprego das metodologias como resistência globular osmótica em solução de cloreto de sódio a 0,36%, teste de falcização com solução de metabissulfito de sódio a 2% que positivaram nas duas amostras, eletroforese em pH alcalino e ácido em acetato de celulose, análise da morfologia eritrocitária à fresco e a confirmação pela metodologia de HPLC que revelou concentrações de hemoglobina S para a paciente de 37,0% e para o paciente 34,4 % ambos com genótipo AS. As figuras 18 e 19 ilustram em detalhes os resultados dos pacientes no cromatograma por HPLC.

Devido à maior prevalência de hemoglobina S em nosso país, o emprego destas metodologias permite o esclarecimento e "aconselhamento" para portadores assintomáticos, não só para orientação de reprodução, mas também como orientação, uma vez que várias profissões ou esportes têm fator de risco aumentando para Hb S, como vôo em avião não pressurizado, pára-quedismo, esforço físico em grandes altitudes, ou mesmo em altitude normal, ou após excesso de esforço físico.

**Tabela 13 – Dados do eritrograma para as pacientes com Hb S (Traço falciforme)**

<b>IDADE</b>	<b>SEXO</b>	<b>Hm</b>	<b>Hb</b>	<b>Ht</b>	<b>VCM</b>	<b>HCM</b>	<b>CHCM</b>	<b>RDW(%)</b>
<b>46</b>	F	4,45	12,3	35,5	79,8	27,6	34,6	13,3
<b>56</b>	M	4,48	12,7	38,8	86,6	28,3	32,7	16,1
<b>Referência</b>	F	4,0 – 5,5	12-16	42±5	87±5	30±2	34±2	12±2
<b>Referência</b>	M	4,5 – 5,5	13-18	46±6	87±5	30±2	34±2	12±2

Fonte: Lorenzi, 1999.



**Figura 20 – Cromatograma . Concentrações de hemoglobina A e S encontradas para a paciente 46 anos.**

\*\*\*\* Beta Thal Short S0100-A \*\*\*\*  
DATE:17/05/05 TIME:14:58:08

TECH ID# 10  
VIAL# 53  
SAMPLE ID# 00000000000000000004

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	0.7	1.12	16073
P2	4.5	1.33	87295
P3	3.2	1.71	63368
Ao	53.5	2.47	1045716
A2	3.5	3.62	60626
S-WINDOW	34.4	4.41	673351
TOTAL AREA			1946429
F	0.7%	A2	3.5%

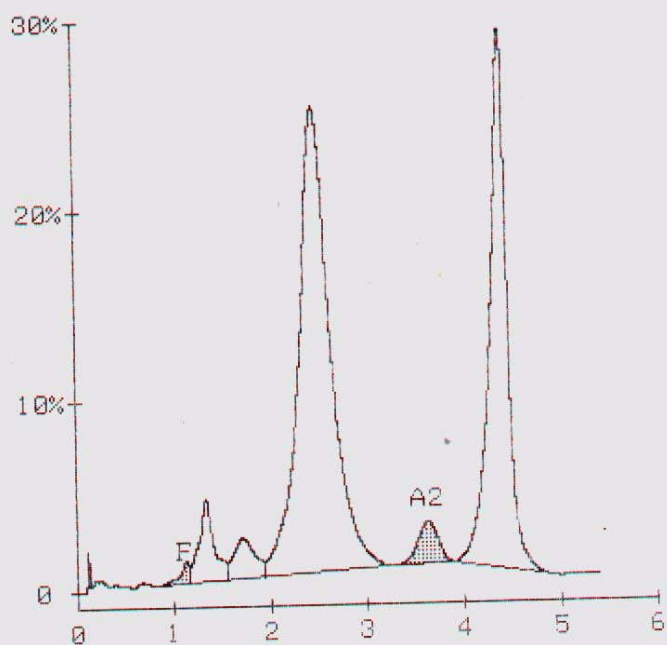


Figura 21 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e S encontradas para o paciente 56 anos.

## 5.6 – Caracterização laboratorial da Hemoglobina C.

A presença de hemoglobina C heterozigoto foi constatado em apenas 1 caso. Para a detecção desse genótipo C foi realizada, além da eletroforese alcalina, a amostra foi submetida para análise em HPLC.

Para confirmar a presença do genótipo C realizamos a eletroforese de hemoglobinas em pH ácido para poder diferenciá-la do genótipo para hemoglobina E, muito raro em nossa região. Na tabela 14 podemos observar o eritrograma da paciente com genótipo AC para hemoglobina com as alterações indicativas e nas figura 20 o cromatograma da paciente que revelou uma concentração de 37,5% de hemoglobina C.

**Tabela 14 – Dados do eritrograma para a paciente com Hb C**

<b>IDADE</b>	<b>SEXO</b>	<b>Hm</b>	<b>Hb</b>	<b>Ht</b>	<b>VCM</b>	<b>HCM</b>	<b>CHCM</b>	<b>RDW(%)</b>
<b>61</b>	F	4,43	11,7	34	76,7	26,4	34,4	13,4
<b>Referência</b>	F	4,0 – 5,5	12-16	42±5	87±5	30±2	34±2	12±2

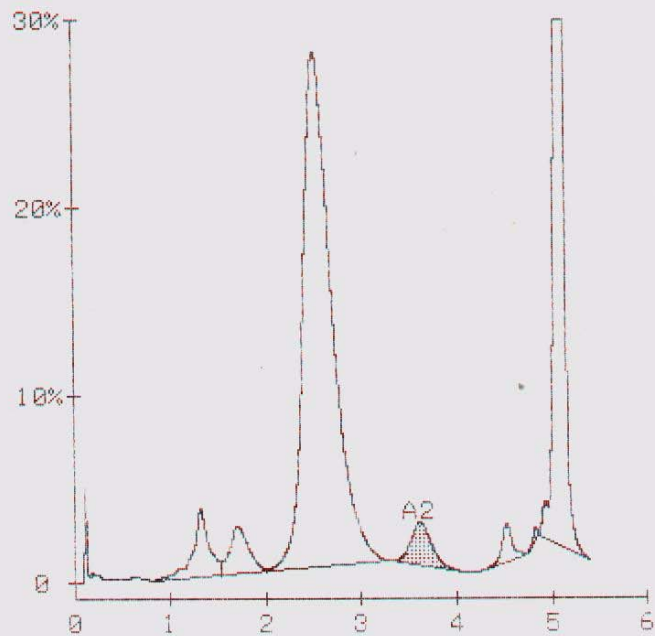
Fonte: Lorenzi, 1999.



\*\*\*\* Beta Thal Short 03190-A \*\*\*\*  
DATE:30/08/05 TIME:21:57:35

TECH ID# 10  
VIAL# 63  
SAMPLE ID# 00000000000000000065

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
P2	3.8	1.32	65793
P3	3.1	1.70	54103
Ao	50.8	2.52	888178
A2	3.3	3.61	53623
S-WINDOW	1.3	4.52	23452
C-WINDOW	37.5	5.11	656442
TOTAL AREA			1741591
F	0.0%	A2	3.3%



**Figura 22 – Cromatograma. Concentrações de hemoglobina A e C encontradas para a paciente 61 anos.**

## 6. DISCUSSÃO

As hemoglobinas anormais apresentam distribuição variada nas diferentes populações analisadas no mundo todo, que resultam em mais de 1100 variantes de hemoglobinas descritas e mais de uma centena de tipos de talassemias, fornecendo dados importantes sobre o papel da seleção natural e das migrações humanas (Naoum, 1984).

A população brasileira caracteriza-se por apresentar grande heterogeneidade genética, derivada da contribuição dos seus grupos raciais formadores, por si também já muito diversificados, e dos diferentes graus com que eles se inter cruzaram nas várias regiões do país. A miscigenação da população brasileira é resultante das imigrações que ocorreram no período da colonização compreendido entre os séculos XVI e XIX, nos quais o Brasil recebeu milhões de imigrantes africanos, europeus e asiáticos. A frequência das anemias hereditárias reflete a diversidade de origens raciais e os diferentes graus de mistura entre brasileiros de cada região do país.

A prevalência de 8,75% das hemoglobinopatias e talassemias encontradas em 80 pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico, está próxima aos valores encontrados em outros estudos, em populações não lúpicas. Por exemplo, (Viana-Baracioli *et al*, 2002) encontraram uma prevalência de 10,7% em gestantes em São Paulo, enquanto que (Naoum *et al*, 1986) encontraram um valor de 10.%, analisando 61.000 casos em pacientes não portadores de LES. Entretanto, apesar da proximidade das prevalências, neste trabalho não foram encontrados homozigotos para nenhuma das hemoglobinas anormais.

A média de idade das pacientes estudadas e a prevalência de 92,5%(74) de amostras analisadas serem de mulheres, coincidem com dados epidemiológicos de prevalência mundial estabelecidos por (Cervera & Ingelmo, 1996; Gómez-Reino, 1996). Sendo a idade media de nossas pacientes pesquisadas de 36 anos.

Constatou-se no estudo que a talassemia alfa mínima teve maior prevalência entre os achados correspondendo a 5% das 80 amostras analisadas. (Naoum & Domingos, 1997), relatam que as talassemias alfa constituem-se como as mais comuns e prevalentes alterações hereditárias do homem. Em trabalhos de avaliação da prevalência de hemoglobinopatias e talassemias em Goiás, realizado por (Reis, 2004) com alunos da Universidade Católica de Goiás, apresentou prevalência de 5,2 % de talassemia alfa mínima nesta população estudantil.

Nas quatro amostras positivas para hemoglobina H observou-se alterações na morfologia em tamanho e forma dos eritrócitos, microcitose e hipocromia, respectivamente, e também alterações na hematimetria, compatíveis com as observações em esfregaço corado, estas alterações morfológicas das hemácias em pacientes com talassemia alfa mínima foram também observações por (Tomé-Alves *et al*, (2000).

A hematimetria media dos pacientes com presença de hemoglobina H, foi de volume corpuscular médio de 76,0 e de hemoglobina corpuscular media de 24,4g/dl, caracterizando segundo (Lorenzi, 1999) anemia microcítica e hipocromica. Conseqüentemente observa-se também valores insatisfatórios de Hemoglobina total e Hematócrito nestes pacientes.

Para genótipo AS observou-se prevalência de 2,5% de amostras positivas, um caso detectado no sexo masculino e outro no feminino. Observa-se em estudo realizado por (Reis, 2004) prevalência de 2,2% em população estudantil, muito próxima a que constamos neste grupo portador de Lupus Eritematoso Sistêmico. A hematimetria dos pacientes analisados mostrou-se relativamente normal, caso baseássemos apenas nestes parâmetros cometeríamos erro de diagnóstico para anemias. Como realizamos os testes de eletroforese de hemoglobina em pH ácido e alcalino, vislumbramos o aparecimento de uma fração que possui uma mobilidade eletroforetica idêntica ao controle para genótipo S. Posteriormente confirmamos o achado através da metodologia de HPLC, no qual encontramos em termos percentuais 37% de hemoglobina S para a mulher e 34,4% para o de sexo masculino.

Em nosso estudo encontramos apenas um caso para o genótipo AC, com uma prevalência de 1,25%. A confirmação deste genótipo foi obtida pela metodologia de HPLC que constatou a concentração de 37,5% de hemoglobina C compatível com dados de (Lorenzi, 1999) para portador heterozigoto. Na hematimetria observamos quadro de anemia microcítica hipocromica leve, sendo que no esfregaço sangüíneo corado pela técnica do Leishman, observamos algumas células em alvo.

O presente trabalho se propôs a realizar esta pesquisa com pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico devido o quadro persistente na maioria dos hemogramas analisados de anemia leve ou moderada, valores de hematócrito abaixo do normal. Nas 80 amostras analisadas encontramos percentual de 47,5 % (38) das amostras com dosagem de hemoglobina abaixo do recomendado por (Lorenzi, 1999), obtendo uma media entre as 38 amostras

de 11,3 g/dl de hemoglobina na hematimetria. No valor do hematócrito observou-se que das 80 amostras 52,5% (42 amostras) o hematócrito não atingia valores satisfatórios prevalecendo uma média entre estes pacientes 32,4% de hematócrito na hematimetria.

Segundo (Rothfield, 1989), quase todos os pacientes lúpicos apresentam, no curso da doença uma ou mais alterações hematológicas. Este quadro hematológico preeminente característico de anemia hemolítica provocada por auto-anticorpos ou às vezes não provocada pela doença auto imune, obscurece a investigação mais detalhada de uma possível hemoglobinopatia ou talassemia associada à doença de base.

Em relatos de (Castellino *et al.* 2005), faz-se uma observação importante sobre a falta de estudos científicos correlacionando a possibilidade de uma associação entre hemoglobinopatias e Lupus Eritematoso Sistêmico. Os dados até hoje apresentados não estabelecem uma correlação direta entre as duas patologias.

Nosso intuito é alertar a possibilidade de associação de hemoglobinopatias e talassemias com quadros hematológicos de anemias verificados nos pacientes com doença lúpica, tornando-se necessário o emprego de técnicas laboratoriais mais específicas para uma melhor avaliação deste supostos quadros hematológicos.

A utilização de técnicas simples com eletroforese de hemoglobina auxilia a detectar possíveis alterações nas hemoglobinas, colaborando para a conscientização dos pacientes no caso de nosso estudo todos os heterozigotos, fornecendo informações para que possam decidir responsabilmente sobre o futuro de seus descendentes; favorece o

direcionamento clínico nos casos mais brandos e indica o acompanhamento adequado aos portadores das formas graves da doença. É importante o emprego de uma nova tecnologia adequada para o diagnóstico, utilizando vários testes laboratoriais seletivos e de confirmação como em nossos estudo empregamos a cromatografia de alta performance HPLC, como também e imprescindível os dados clínicos e estudo familiar, bem como a formação de pessoal capacitado para o diagnóstico laboratorial correto.

A prevalência de hemoglobinas anormais em 8,75 % da população estudada reflete uma preocupação e um problema para a saúde pública, pois, exceto pelos trabalhos de (Castellino *et al.* 2005) e alguns relatos de caso de associação de anemia falciforme e LES por (Katsanis *et al.* 1987) e (Shetty *et al.* 1998) estudados em populações de outros países, não há referência científica e nem bibliográfica da frequência dessas alterações hereditárias no Brasil para pacientes portadores de Lúpus.

## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo procurou mostrar a importância do diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias e talassemias, bem como as atividades de prevenção que permitem o aconselhamento genético, o tratamento precoce e sugerir a realização de uma triagem mais específica em pacientes portadores de doença lúpica.

1. Observou-se quadros de hematimetria sugestiva de anemia microcítica hipocrômica em exames realizados nos pacientes portadores de Lupus Eritematoso Sistêmico.

2. Detectou-se hemoglobinopatias e talassemias em cerca de 8,75% de pacientes pesquisados totalizando 80 casos, com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Este percentual se mostra compatível com quadro da população brasileira, mas que merece destaque por ser diagnosticado em pacientes portadores de doença auto-imune.

3. O intuito deste trabalho é dar subsídios para que novas pesquisas sejam realizadas em pacientes portadores de doença auto-imune, colaborando cada vez mais para um melhor tratamento destes portadores.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvares Filho, F., Naoum, P.C., Moreira, H.W., Ângulo, I.L., 1988 Variabilidade polimórfica das hemoglobinas humanas anormais em indivíduos das cidades de Barretos e Colina, SP, Brasil. Rev. Bras. Patol. Clin., v.24, n.2, p.32,

Antolín, J. & Amérigo, M. J. 1996. Antecedentes históricos y conceptos actuales. Em J. Font, M. Khamashta & M. Vilardele (Orgs.), Lúpus eritematoso sistêmico (pp. 1-8). Barcelona: Menarini.

Bombadier C, Gladman , Urowitz M, Caron D, Chang CH. 1992. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. Committee on prognosis studies in SLE. Arthritis Rheum; 35:630-40.

Bernard, J., J. P. Lévy, B. Varet. J. P. Clauvel. J. D. Rain & Y. Sultan. 2000. Hematologia. 9<sup>a</sup> Ed. Medsi. Rio de Janeiro, RJ. 368 p.

Brittenham G. 2000 Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. In: Hoffman R, Benz Jr E, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE et al, Hematology - Basic Principles and Practice. New York: Churchill Livingstone; p. 397-426.

Carbotte R, Denburg S, Denburg J. 1986 Prevalence of cognitive impairment in systemic lupus erythematosus. J Nerv Ment Dis 174: 357-64.

Carvalho, 1998 Hematologia: Técnicas Laboratoriais e Interpretação, Belo Horizonte.



Castellino *et al.* 2005.  $\beta$  Thalassaemic trait and systemic lupus erythematosus; *Ann Rheum Dis*; 64: 653-654.

Castilho, E. M., P. C. Naoum, R. A. S. Graciano & R. A. Silva. 1987. Prevalência de Talassemia alfa em pacientes com anemia e em pessoas sem anemia. *Rev. Bras. Pat. Clín.*, 23 (5):131-34.

Cervera, R. & Ingelmo, M. 1996. Epidemiologia. Em J. Font, M. Khamashta & M. Vilardele (Orgs.), *Lúpus eritematoso sistêmico* (pp. 9-15). Barcelona: Menarini.

Compri, M. B., Polimeno, N. C., Stella, M. B. & Ramalho, A. S. 1996. Programa comunitário de hemoglobinopatias hereditárias em população estudantil brasileira. *Revista de Saúde Pública*. [online]. 30 (2): 1-13. Disponível em <<http://www.scielo.br/scielo>.

Cossermelli, W.; Sampaio, S.A.P. Manzione, A. 1978. *Lúpus eritematoso*. São Paulo: Moreira Jr, 181p.

Costa, V. A, Acedo, M. J., Polimeno, N. C. & Bertuzzo, C. S. 2002. Contribuição para a estimativa da frequência populacional da Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal no Brasil. *Cad. Saúde Pública*. [online]. 18 (5): 1469-1471. Disponível [Http://www.scielo.br/scielo.php](http://www.scielo.br/scielo.php).

Dacie, J. V. & S. M. Lemis. 1995. *Practical Hematology*. 8<sup>a</sup> Ed. Churchill Livingstone. London. 609 p.

Gahan, E. 1992 *Lupus erythematosus*. Clinical observations in 443 cases . *Arch Dermatol Syph* , v.45, p.685,

Hochberg MC, 1997: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the Classification of systemic lupus erythematosus. Letter. Arthritis Rheum 40: 1725.

Globin Gene Server Home Page. <http://globin.cse.psu.edu/> (acessado em 13/Jan/2005).

Henry, J. B. 1995. Diagnósticos Clínicos & Tratamento, por Métodos Laboratoriais. 18º Ed. Manole. São Paulo. SP. 729p.

Holubar, K.; Fatovic-Ferencic, S. Cazenave.2001., Kaposi and lupus erythematosus: a centennial and sesquicentennial. Dermatology , v.203, n.2, p.118-120.

Katsanis E, Hsu E, Luke KH, McKee JÁ, 1987; Systemic lupus erythematosus and sickle hemoglobinopathies: a report of two cases and review of the literature. Am J Hematol. Jun;25(2):211-4

Liebhaber S.1989. Thalassemia. Hemoglobin;13:685-731.

Lorenzi, T. F. 1999. Manual de Hematologia. Propedêutica e Clínica. 2ª Ed. Medsi. São Paulo, SP. 641 p.

Mc Murray, R.W.; May, W.2003. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. Arthritis Rheum , v.48, n.8, p.2100-2110.

Naoum, P.C., Machado, P.E.A., Michelin, O.C., Cury, R.R., Pio da Silva, M.1979b. Concentration of haemoglobin A<sub>2</sub> and Fetal in Brazilian Indians

relationship between these haemoglobins and malaria. *Cienc. Cult.*, v.31, p.188-190.

Naoum, P. C. 1982a. Diagnóstico Laboratorial das Hemoglobinopatias. *Rev. Bras. Pat. Clín.*, 18(1): 18-20.

Naoum, P. C. 1982b. Hemoglobinopatias no Estado de São Paulo. Métodos de Estudos, Prevalência, Distribuição Geográfica, e Relações Históricas e Antropológicas. São José do Rio Preto - SP. Tese de Livre-Docência. Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 279 p.

Naoum, P.C.1984. Anemias imigrantes: a origem das anemias hereditárias no Brasil *Ciência Hoje*, v.3, n.14, p.59-64.

Naoum, P. C., C. R. B. Domingos, P. A. Mazziero, E. M. Castilho & C. T.Gomes. 1986. "Hemoglobinas no Brasil. *Boletim*, 141: 180-8.

Naoum, P. C., F. A. Filho, C. R. Domingos & F. Ferrari. 1987. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. *Rev. Bras. Patol. Clin.* , 23: 68-78.

Naoum, P.C., Álvares Filho, F., Domingos, C.R. B.6, Ferrari, F. Moreira, H.W., Sampaio, Z.A., Maziero, P.A., Castilho, E. M.1987a. Hemoglobinas anormais no Brasil: prevalência e distribuição geográfica. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v.23, n.3, p.68-72.

Naoum, P. C., C. R. B. Domingos, P. A. Mazziero, E. M. Castilho & C. T. Gomes. 1987b. "Você tem anemia Hereditária?" Resultados do programa de conscientização e detecção de hemoglobinas anormais em escolares de São José do Rio Preto, SP., Brasil). Boletim, 143: 20-29.

Naoum, P. C. & C. R. B. Domingos 1997. Talassemias Alfa. Laes & Haes, XVIII (107): 70-98.

Naoum, P. C. 1997. Hemoglobinopatias e Talassemias. Sarvier Ed. Livros Médicos. São Paulo, SP. 171 p.

Naoum, P.C. 1999. Eletroforese. Técnicas e Diagnósticos. 2ª Ed. Livraria Santos Editora. São Paulo, SP. 154 p.

Neto, G. C. G. & M. S. Pitombeira. 2003. Aspectos moleculares da anemia falciforme. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 39 (1):51-56.

Old J. Haemoglobinopathies. Prenatal Diagnosis 1966; 16:1181-1186.

Palacin, L., L. F. Garcia & J. Amado. 2001. História de Goiás em documentos. Editora da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO. 222 p.

Palacín, L., & M. A. S. Moraes. 2001. História de Goiás. 6ª Ed. Editora da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO. 124 p.

Papassotiriou, I., J. Traeger-Synodinos, E. Kanavakis, M. Karagiorga, A. Stamoulakatou & C. Kattamis. 1998. Erythroid Marrow Activity and Hemoglobin H Levels in Hemoglobin H Disease. Journal of Pediatric Hematology/Oncology, 20(6): 539-44.

Parham, P. 2001. Imunidade mediada por células B e anticorpos. In: O sistema imune. Porto Alegre: Artes Médicas, Cap.7, p. 191-192.

Peakman, M & Vergani Diego.1997. Imunologia Básica e Clínica, 1ª Ed Guanabara. Rio de Janeiro, RJ. 159 p.

Prystowsky SD, Herndon Jh, Gilliam Jn.1976. Chronic cutaneous lupus erythematosus (DLE): a clinical and laboratory investigation of 80 patients. Medicine. 55:183-91.

Ramalho, A. S. 1979. Avaliação da morbidade do traço siclêmico em Campinas, S.P., Ciênc. Cult. ; 31(supl.) : 607.

Ramalho, A.S.1986. A talassemia minor como causa de anemia no estado de São Paulo. Rev. Bras. Patol. Clin., v.22, p.32-38.

Reis, P. R. M. 2004. Avaliação da prevalência de hemoglobinopatias e talassemias em Goiás: Métodos de identificação laboratorial e distribuição geográfica, tese de mestrado p 50.

Ribeiro, V. S. & J. T. Araújo. 1992. Hemoglobina H. Identificação Laboratorial. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. USP., 47 (4): 176-79.

Rothfield Nf.1989. Systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory aspects. In Mc Carty D 9ed): Arthritis and Allied Conditions, 11 th ed Philadelphia, Lea & Febiger p.1022-1047.

Salles, G. V. F. 1992. Economia e Escravidão na Capitania de Goiás. Centro Editoria e Gráfico da UFG, Goiânia, GO. 369 p.

Sato, Emilia Inoue ; Bonfá, Eloísa Dutra ; Costalad, Lilian Tereza Lavras ; Silva, N. A. ; Brenol, João Carlos Tavares ; Santiago, Mittermayer Barreto ; Szajubok, José Carlos Mansur ; Rachid Filho, Acir ; Barros, Rui Toledo ; Vasconcelos, Mônica.2002. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico ( LES ). Revista Brasileira de Reumatologia, São Paulo - SP, v. 42, n. 6, p. 362-370.

Shetty AK, Baliga Mr, Gedalia A, Warriar Rp, 1998. Systemic lupus erythematosus and sickle cell disease. Indian J Pediatr. Jul-Aug;65(4):618-21.

Silva, P. H. & Y. Hashimoto. 1999. Interpretação Laboratorial do Eritrograma. Lovise. São Paulo, SP. 197 p.

Silva, R. B. P. & A. S. Ramalho. 1997. Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. Cad. Saúde Pública. [online]. abr./jun. 1997, vol.13, no.2 [citado 01 Maio 2003], p.285-294.Disponível em [http: www.scielo.br/scielo](http://www.scielo.br/scielo)

Siqueira, A. M. F., A C. Fett-Conte, L. N. B. Borin & C. R. Bonini-Domingos. 2002. Diagnóstico de hemoglobinopatias em recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto–SP. Revista Brás. hematol. hemoter., 24 (4):302-05.

Tan , Cohen A, Fries J, Masi A, McShane D, Rothfield N. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25:1271-7.

Toloi, M.R.T. & C. R. Pazzianoto. 1990. Hemoglobinopatias em crianças com alterações eritrocitárias. Revista Bras. Pat. Clín., 26 (1):2-5.

Tomé-Alves, R., D. P. Marchi-Salvador, G.M. Orlando, L.A. Palbarini, R. E. Imperial, P. C. Naoum & C.R. Bonine-Domingos. 2000. Hemoglobinas AS/Alfa talassemia – importância diagnóstica. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., 22(3);388-394.

Verrastro, T, Lorenzi. F.T, Neto.W.S.1996. Hematologia e Hemoterapia. Atheneu 42 p, 59-60p.

Viana-Baracioli, L. M. S., Bonini-Domingos C.R., Pagliusi, R.A. e Naoum, P.C. 2001. Prevenção de hemoglobinopatias a partir do estudo em gestantes. Rev. bras. hematol. hemoter., 23 (1):31-39.

Viana, L. M. S. 1999. Contribuição à prevenção de hemoglobinopatias, a partir do estudo em gestantes.Rev. bras. hematol. hemoter., 21 (1):40-41.

Zar, J. H. 1998. Bioestatística Analysis. 3ª. ed. Prentice-Hall, NY

Waye JS, Chui DHK.2001. The-globin gene cluster: genetics and disorders. Clin Invest Med ;24:103-9.

Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassaemias. In: Weatherall DJ, Clegg JB.1981. The thalassaemia syndromes. London: Blackwell Scientific Publications; p. 508-612.

Weatherall Dj. The thalasseмии. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps TJ, Seligsohn U, editores. Williams Hematology, 2001. 6 ed. New York: McGraw-Hill; p. 547-78.

Weatherall DJ, Old J, Longley J *et al.* 1978. Acquired haemoglobin H disease in leukaemia: pathophysiology and molecular basis. *Br J Haematol*; 38:305-22.

Wintrobe, M.M. Clinical hematology. 5ed, Philadelphia: Lea e Febiger, 1976.

Who Working Group. 1982. Hereditary anemia: genetics basic, clinical features, diagnosis and treatment. WHO, 60: 643-60.



## 9. ANEXOS

### 9.1- Anexo 1

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO**

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você poder procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás pelos telefones 227-1071.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

Título do Projeto:” **PESQUISA DE HEMOGLOBINOPATIAS E TALASSEMIAS EM PACIENTES PORTADORES DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE GOIÂNIA**”.

Pesquisador Responsável: Frank Sousa Castro  
Telefone para contato: 227-1195 ou 225-5377

Pesquisadores participantes: Nílzio Antonio da Silva, Paulo Roberto de Melo Reis, Karlla Greick Batista Dias Penna, Natália Alves Brandão, Rosane Maria Cantero, Tatiana Dela-Sávia Ferreira, Caroline Steglich , Rogério Negrii  
Telefones para contato: 227-1195

**ESCLARECIMENTOS SOBRE O ESTUDO:**

Pesquisar a presença de Hemoglobinopatias e Talassemias em pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico em tratamento no Hospital das Clinicas de Goiânia e dar subsídios estatísticos para trabalhos futuros.

Será dada a oportunidade aos afetados de conhecer a moléstia que o atinge e também os esclarecimentos necessários a respeito da anemia hereditária. Isto se processará através de informações coletadas na pesquisa e transmitidas ao medico assistente.

Todos os dados coletados na pesquisa estarão disponibilizados para publicações em periódicos, revistas e jornais da área científica, sendo que será resguarda a integridade dos nomes de todos os participantes desta pesquisa.

Será colhida a sua amostra de sangue para realização dos exames.

O objetivo da pesquisa é acompanhar a saúde das pessoas que são portadoras de Lupus Eritematoso Sistêmico. Não existe nenhum risco, apenas o desconforto da coleta de sangue. Os resultados serão encaminhados para o médico que lhe acompanha no Ambulatório do Hospital das Clinicas de Goiânia.

- Todos os dados são sigilosos e você tem o direito de retirar o consentimento a qualquer momento

Nome do pesquisador: Frank Sousa Castro

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Data:     /     / 2005

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_ CPF nº \_\_\_\_\_ n° de prontuário \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo " **PESQUISA DE HEMOGLOBINOPATIAS E TALASSEMIAS EM PACIENTES PORTADORES DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**". como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem e que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data \_\_\_\_\_

Nome do sujeito ou responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito ou responsável: \_\_\_\_\_

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar**

Testemunhas (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Observações complementares:**

## 9.2- Anexo 2

### Ficha cadastral

#### Coleta de dados

Nome: \_\_\_\_\_

Nº de Registro LAS: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) F ( ) M

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Estado: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Mãe: \_\_\_\_\_

Pai: \_\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_

(quando menor de idade)

**Autorizo a utilização do sangue do paciente acima identificado na pesquisa intitulada “PESQUISA DE HEMOGLOBINOPATIAS E TALASSEMIAS EM PACIENTES PORTADORES DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.”**

Goiânia, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou responsável

### 9.3- Anexo 3

<b>CAAE:</b>	<b>0024.0.168.000-05</b>
<b>Título do Projeto:</b>	<b>PESQUISA DE HEMOGLOBINOPATIAS E TALASSEMIAS EM PACIENTES PORTADORES DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.</b>
<b>Instituição Sediadora:</b>	<b>Sociedade Goiana de Cultura/Universidade Católica de Goiás</b>
<b>Comitê de Ética:</b>	<b>Sociedade Goiana de Cultura/Universidade Católica de Goiás</b>
<b>Pesquisador Responsável:</b>	<b>Frank Sousa Castro</b>
<b>Data da Aprovação:</b>	<b>19/04/2005 17:43:59</b>

## 9.4- Anexo 4

### FICHA DE RESULTADO

1) ERITROGRAMA:	Valor de referência
Hemácias: _____ / mm <sup>3</sup>	-
Hematócrito: _____ %	-
Hemoglobina: _____ g/dl	-
VCM: _____ fl	-
HCM: _____ pg	-
CHCM: _____ %	-
RDW: _____ %	-

2) Análises morfológicas das hemácias:

---

---

3) Teste de resistência osmótica ( ) Resistente ( ) Não resistente

1) Dosagem de Hemoglobina Fetal: \_\_\_\_\_

2) Dosagem de Hemoglobina A2: \_\_\_\_\_

3) Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina H: ( ) Presente ( ) Ausente

4) Pesquisa intraeritrocitária de hemoglobina Fetal: ( ) Presente ( ) Ausente

5) Pesquisa de corpos de Heinz: ( ) Presente ( ) Ausente

6) Eletroforese de Hemoglobina:

a) pH alcalino – Perfil: \_\_\_\_\_

pH ácido – Perfil : \_\_\_\_\_

## 10- ARTIGO

### **Pesquisa de Hemoglobinopatias e Talassemias em Pacientes Portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico.**

Research of hemoglobinopathys and Talassemias in Patients Systemic Lupus Erythematosus.

#### **Autores:**

Frank Sousa Castro<sup>1</sup>, Nilzio Antonio da Silva<sup>2</sup>, Paulo Roberto de Melo Reis<sup>3</sup>, Karlla Greick Batista Dias-Penna<sup>4</sup>, Natália A. Alves Brandão<sup>5</sup>, Rosane Maria Cantero<sup>6</sup>, Tatiana Dela Sávia Ferreira<sup>7</sup>.

1 – Mestre em Ciências Ambientais e Saúde, professor e pesquisador associado ao Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás. 2 – Doutor em Reumatologia, professor da Universidade Federal de Goiás. Professor Adjunto, Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biomedicina. 3 – Mestre em Ciências Ambientais e Saúde, professor do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás. 4 – Mestre em Biologia, professora do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás. 5,6,7 – Aluna e pesquisador voluntário do LEPAH – Laboratório de Estudos e Pesquisa em Anemia Hereditária – Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum - do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás.

#### ***Autor Responsável: Frank Sousa Castro***

Endereço eletrônico: [knarfcastro@hotmail.com](mailto:knarfcastro@hotmail.com)

Endereço para correspondência: Universidade Católica de Goiás - Departamento de Biomedicina - (LEPAH-LAS-CBB) – Área IV – Bloco H – Sala 209 - Av. Universitária 1069 – Setor Universitário. CEP 74605-010 – Goiânia-Go.

Fone: (62) 3227-1195

Trabalho realizado no LEPAH – Laboratório de Estudos e Pesquisa em Anemia Hereditária – Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum - do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás.

## Resumo

O Lúpus Eritematoso Sistêmico é uma doença tipicamente multigênica e multifatorial, com grande complexidade clínica e fisiopatológica. As causas do LES não são totalmente conhecidas, mas sabe-se que fatores ambientais e genéticos estão envolvidos. As manifestações clínicas observadas em pacientes acometidos pelo LES são diversificadas como fadiga, mal-estar, emagrecimento, artrite, febre, nefrite, vasculite e anemias. Dentre as varias manifestações clínicas observadas em pacientes com Lúpus, as anemias nos chamam a atenção principalmente quando se observa em nosso estudo uma prevalência 52,5% dos pacientes com índices hematimétricos sugestivo de anemias. Esse quadro de anemia normalmente se observa em pacientes com LES, mas as anemias hereditárias, em especial as hemoglobinopatias e talassemias, que são as mais comuns das alterações genéticas humanas de frequência muito variável na população brasileira, têm poucos estudos realizados de prevalência nas populações acometidas por LES. O objetivo desse trabalho foi o de avaliar a prevalência das hemoglobinopatias e talassemia em pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmica. Para isso foram estudadas 80 amostras de sangue de pacientes com portadores de Lúpus atendidos no ambulatório do Hospital das Clinicas de Goiânia. Foram utilizados testes laboratoriais não moleculares. A frequência das alterações da hemoglobina foi de 8,75%, encontradas em 7 pacientes. Dessas alterações a mais prevalente foi a talassemia alfa, encontrada em 4 pacientes, correspondendo a uma frequência de 5,0% da população estudada. A segunda alteração mais frequente foi o heterozigoto para a hemoglobina S, encontrada em 2 pacientes, correspondendo a 2,5% da população. A terceira alteração foi o heterozigoto para a hemoglobina C, encontrada em 1 paciente, correspondendo a 1,25%. Nenhum caso de homozigose foi encontrado no presente estudo. Este trabalho demonstra a necessidade de avaliações mais cautelosas nos distúrbios das anemias em pacientes com Lúpus, sugerindo a implantação de serviços hematológicos de esclarecimento a essa população com o intuito de esclarecer a verdadeira causa da anemia presente nos indivíduos afetados com LES

Unitermos: Talassemia Alfa, Hemoglobina A, Hemoglobinopatias, Lupus Eritematoso Sistêmico, Diagnóstico laboratorial, HPLC.

## Abstract

Systemic Lupus Erythematosus is a quintessential multigenic and multifactorial disease, with remarkable clinical and pathogenic complexities. The causes of the LES total are not known, but it knows that ambient and genetic factors are involved. The observed clinical manifestations in patients to take hold of the LES are diversified as fatigue, indisposition, slimming, arthritis, fever, nephritis, vasculitis, and anemias. Amongst them you various observed clinical manifestations in lupus patients, the anemias in them call the attention mainly when prevalence 52.5% of the patients with RBC index suggestive of anemias is observed in our study. This picture of anemia normally is observed in lupus patients, but the hereditary anemias, especially the hemoglobinopathies and thalassemias, are the most common of the human genetic alterations and its frequency in the Brazilian population is very variable, have few carried through studies of prevalence in the populations attacks for LES. In an attempt to evaluate the prevalence of the hemoglobinopathies and thalassemia in the population with systemic lupus erythematosus. we studied 80 blood samples of patients with systemic lupus erythematosus in the Clinic Hospital in Goiânia-Brazil had been studied.

Laboratory tests had been used but not molecular tests. The frequency of the alterations of the hemoglobin was of 8.75%, found in 7 patients. Of those alterations, the more prevalent was the thalassemia alpha, found in 4 patients, corresponding to a frequency of 5.0% of the studied population. The second most frequent alteration was the heterozygous for the hemoglobin S, found in 2 patients, corresponding to 2.5% of the population. The third alteration was the heterozygous for the hemoglobin C, found in 1 patient 1.25%. No case of homozygosity was found in the present study. This work demonstrates the necessity of more cautious evaluations in the anemias disorders in patients with systemic lupus erythematosus, suggesting the implantation of hematologist service of clarification to this population with intention to demonstrate the true cause of the present anemia in the individuals affected with SLE.

Key words: Thalassemia alpha, Hemoglobin A, hemoglobinopathies, Systemic Lupus Erythematosus, Laboratory diagnoses, HPLC.

## Introdução

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença auto-imune, de etiologia desconhecida, provavelmente multifatorial, que acomete o tecido conectivo de vários órgãos. Sua evolução apresenta períodos de atividade e remissão, que podem ser desencadeados por fatores genéticos, infecciosos, hormonais, ambientais e mesmo psicológicos. É considerada uma enfermidade crônica, que atinge vários sistemas do organismo humano, simultânea ou sucessivamente, muitas vezes levando à falência de órgãos vitais ou comprometendo definitivamente suas funções<sup>1</sup>. Considerado uma das enfermidades do colágeno<sup>4</sup>, o Lúpus é uma doença auto-imune com várias manifestações clínicas, que podem ser mucocutâneas e estar ou não acompanhadas de manifestações sistêmicas<sup>7</sup>. O termo auto-imune refere-se à produção de auto-anticorpos dirigidos a um constituinte próprio do organismo ou reatividade de linfócitos a um antígeno também próprio. O aparecimento de vários auto-anticorpos, associados a uma falha na supressão de sua formação levam a formação de muito complexo antígeno-anticorpos, que se depositam em diversos órgãos e respondem, pelo menos parcialmente, pelo estado clínico do paciente<sup>3</sup>.

É considerada doença lúpica quando o paciente apresenta quatro ou mais dos critérios referidos pela então Associação Americana de Reumatismo<sup>13</sup>: Esses critérios recentemente, sofreram revisão por Hochberg, passando a utilizar os critérios de classificação propostos pelo American College of Rheumatology (ACR), que se baseia na presença de pelo menos quatro critérios dos onze citados a seguir<sup>5</sup>: 1) Eritema malar, Lesão discóide, Fotossensibilidade, Úlceras orais/nasais, Artrite, Serosite, Comprometimento renal, Alterações neurológicas, Alterações hematológicas, Alterações imunológicas, Anticorpos antinucleares.

Dentre os onze critérios referidos acima as alterações hematológicas e a que nos chamam mais a atenção, principalmente as alterações na série eritrócítica que acometem a maioria dos pacientes com doença Lúpica. Hochberg, em trabalhos publicados relata que 40% dos pacientes com doença lúpica apresentam algum quadro de anemia<sup>5</sup>. No hemograma de pacientes com doença Lúpica geralmente observamos, anemia leve ou moderada, valores de hematócrito até 30% abaixo do normal<sup>2</sup>. Geralmente estes pacientes se queixam de fadiga fácil, dispnéia por exercícios, e as vezes desmaios,



palpitações e dores de cabeça. Esses achados físicos e laboratoriais são comumente observados em pacientes com LES. Dentre o grupo das anemias devemos pesquisar as hereditárias, pelo fato de muitas das vezes não serem diagnosticadas, já que o quadro hematológico das hemoglobinopatias e talassemias possa coincidir com os quadros laboratoriais hematológicos provocados pela doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi Verificar a prevalência de Hemoglobinopatias hereditárias e Talassemias em pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico em tratamento no Hospital das Clínicas de Goiânia.

## Material de métodos

Foram analisadas 80 amostras de sangue, obtidas por punção venosa, utilizando solução comercial de anticoagulante EDTA (10 g/dl), 1 gota para cada 5 ml de sangue, após consentimento livre e esclarecido. As amostras foram provenientes de estudantes da Universidade Católica de Goiás da cidade de Goiânia, saudáveis, de ambos os sexos, de várias faixas etárias. Os eritogramas foram realizados no aparelho ABXPentra® 60. Além deste exame foram realizados outros testes de auxílio diagnóstico: teste de resistência osmótica a salina 0,36%<sup>12</sup>; eletroforese alcalina de hemoglobina cujo hemolisado foi preparado com solução de saponina à 1%<sup>9</sup>. A quantificação das hemoglobinas H e F foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) de troca iônica utilizando o Sistema Variant (Bio-Rad®). Todas as etapas do trabalho foram realizadas no LEPAH – Laboratório de Estudos e Pesquisa em Anemia Hereditária – Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum - do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás, no período de maio a setembro de 2005.

## Resultados

Foram estudados 80 pacientes portadores de Lupus Eritematoso Sistêmico atendidos no Hospital de Clínicas de Goiânia (HC), provenientes deste mesmo município e de outras regiões do estado de Goiás, sendo que, do total, 74 (92,5%) eram do sexo feminino e 6 (7,5%) eram do sexo masculino, uniformemente distribuídos conforme (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das amostras analisadas em função do sexo.

<b>Sexo</b>	<b>Amostras</b>	<b>Percentual</b>
<b>Feminino</b>	74	92,5
<b>Masculino</b>	6	7,5

Constatou-se no presente trabalho que 52,5 % (42 amostras) dos pacientes analisados apresentavam quadros hematimétricos sugestivos de anemia.

Do total de 80 amostras, 7 (8,75%) apresentaram hemoglobinas com alterações qualitativas ou quantitativas, sendo que 6 (7,5%) eram do sexo feminino e 1 (1,25%) do sexo masculino. Portanto, a prevalência de hemoglobinas anormais nos pacientes portadores de Lupus eritematoso sistêmico foi de 7 casos o que equivale a 8,75%. A Tabela 2, distribuição das hemoglobinas normais e anormais por sexo.

**Tabela 2 – Distribuição das hemoglobinas normais e anormais por sexo.**

	Feminino	%	Masculino	%	Total	Total %
<b>Hb anormais</b>	6	7,5	1	1,25	7	8,75
<b>Hb normais</b>	68	85	5	6,25	73	91,25
<b>TOTAIS</b>	<b>74</b>	<b>92,5</b>	<b>96</b>	<b>7,5</b>	<b>80</b>	<b>100,0</b>

As metodologias empregadas nesta pesquisa permitiram a identificação de três genótipos das hemoglobinas variantes, sendo que todos eles foram de heterozigotos. Não se encontrou nenhum homozigoto para as hemoglobinas variantes. A Tabela 3 ilustra os diferentes tipos de hemoglobinopatias identificadas durante a realização da pesquisa.

**Tabela 3 – Distribuição das hemoglobinas normais e anormais em 80 amostras**

Genótipo	Feminino	%	Masculino	%	Totais	%
<b>AA</b>	68	85	5	6,25	73	91,25
<b>AC</b>	1	1,25	0	0	1	1,25
<b>AH</b>	4	5,0	0	0	4	5
<b>AS</b>	1	1,25	1	1,25	2	2,5
<b>Totais</b>	<b>74</b>	<b>92,5</b>	<b>6</b>	<b>7,5</b>	<b>80</b>	<b>100,0</b>

### Discussão

As hemoglobinas anormais apresentam distribuição variada nas diferentes populações analisadas no mundo todo, que resultam em mais de 1100 variantes de hemoglobinas descritas e mais de uma centena de tipos de talassemias, fornecendo dados importantes sobre o papel da seleção natural e das migrações humanas<sup>8</sup>.

A prevalência de 8,75% das hemoglobinopatias e talassemias encontradas em 80 pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico, está próxima aos valores encontrados em outros estudos, em populações não lúpicas. Por exemplo, Viana-Baracioli *et al*, encontraram uma prevalência de 10,7% em gestantes em São Paulo<sup>14</sup>, enquanto que (Naoum *et al*, encontraram um valor de 10,%, analisando 61.000 casos em pacientes não portadores de LES<sup>9</sup>. Entretanto, apesar da proximidade das prevalências, neste trabalho não foram encontrados homozigotos para nenhuma das hemoglobinas anormais.

Constatou-se no estudo que a talassemia alfa mínima teve maior prevalência entre os achados correspondendo a 5% das 80 amostras analisadas. Em alguns relatos observamos que as talassemias alfa constituem-se como as mais comuns e prevalentes alterações hereditárias do homem<sup>10</sup>. Em trabalhos de avaliação da prevalência de

hemoglobinopatias e talassemias em Goiás, realizado por Reis, com alunos da Universidade Católica de Goiás, apresentou uma prevalência de 5,2 % de talassemia alfa mínima nesta população estudantil<sup>11</sup>.

Para genótipo AS observou-se uma prevalência de 2,5% de amostras positivas, um caso detectado no sexo masculino e outro no feminino. Observa-se em estudo realizado por Reis, uma prevalência de 2,2% em população estudantil, muito próxima a que constamos neste grupo portador de Lupus Eritematoso Sistêmico<sup>11</sup>.

Em nosso estudo encontramos apenas um caso para o genótipo AC, com uma prevalência de 1,25%. A confirmação deste genótipo foi obtida pela metodologia de HPLC que constatou 37,5% de hemoglobina C compatível com dados de Lorenzi, para portador heterozigoto<sup>6</sup>.

O presente trabalho se propôs a realizar esta pesquisa com pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico devido o quadro persistente na maioria dos hemogramas analisados de anemia leve ou moderada, valores de hematócrito abaixo do normal. Nas 80 amostras analisadas encontramos um percentual de 47,5 % (38) das amostras com dosagem de hemoglobina abaixo do recomendado por Lorenzi<sup>6</sup>. Já o valor do hematócrito observou-se que das 80 amostras 52,5% (42 amostras) o hematócrito não atingia valores satisfatórios na hematimetria.

Segundo Rothfield, quase todos os pacientes lúpicos apresentam, no curso da doença uma ou mais alterações hematológicas<sup>12</sup>. Este quadro hematológico preeminente característico de anemia hemolítica provocada por auto-anticorpos, obscurece a investigação mais detalhada de uma possível hemoglobinopatia ou talassemia associada a doença de base.

Nosso intuito é alertar da possibilidade de associação de hemoglobinopatias e talassemias com quadros hematológicos de anemias verificados nos pacientes com doença lúpica, tornando-se necessário o emprego de técnicas laboratoriais mais específicas para uma melhor avaliação deste supostos quadros hematológicos.

## **Conclusão**

O presente estudo procurou mostrar a importância do diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias e talassemias, bem como as atividades de prevenção que permitem o aconselhamento genético, o tratamento precoce e sugerir a realização de uma triagem mais específica em pacientes portadores de doença lúpica. Observou-se quadros de hematimetria sugestivos de anemias microcíticas hipocrômicas em exames realizados nos pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico, estes resultados encontrados sugerem a implantação de serviços hematológicos de esclarecimento à essa população com o intuito de fornecer o tratamento de suporte aos indivíduos afetados. Detectou-se hemoglobinopatias e talassemias em cerca de 8,75% de pacientes pesquisados totalizando 80 casos, com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Este percentual se mostra compatível com quadro da população brasileira, mas que merece destaque por ser diagnosticado em pacientes portadores de doença auto-imune.

## **Bibliografia**

- 1- Antolín, J. & Américo, M. J. 1996. Antecedentes históricos y conceptos actuales. Em J. Font, M. Khamashta & M. Vilardele (Orgs.), Lúpus eritematoso sistêmico (pp. 1-8). Barcelona: Menarini.
- 2- Carbotte R, Denburg S, Denburg J. 1986 Prevalence of cognitive impairment in systemic lupus erythematosus. *J Nerv Ment Dis* 174: 357-64.
- 3- Cossermelli, W.; Sampaio, S.A.P. Manzione, A.1978. Lúpus eritematoso. São Paulo: Moreira Jr, 181p.
- 4- Gahan, E.1992 Lupus erythematosus. Clinical observations in 443 cases . *Arch Dermatol Syph* , v.45, p.685.
- 5- Hochberg MC, 1997: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the Classification of systemic lupus erythematosus. *Letter. Arthritis Rheum* 40: 1725.
- 6- Lorenzi, T. F. 1999. Manual de Hematologia. Propedêutica e Clínica. 2ª Ed. Medsi. São Paulo, SP. 641 p.
- 7- Mc Murray, R.W.; May, W.2003. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* , v.48, n.8, p.2100-2110.
- 8- Naoum, P.C.1984. Anemias imigrantes: a origem das anemias hereditárias no Brasil *Ciência Hoje*, v.3, n.14, p.59-64.
- 9- Naoum, P. C., C. R. B. Domingos, P. A . Mazziere, E. M. Castilho & C. T.Gomes. 1986. “Hemoglobinas no Brasil. *Boletim*, 141: 180-8.
- 10- Naoum, P. C., F. A. Filho, C. R. Domingos & F. Ferrari. 1987. Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. *Rev. Bras. Patol. Clin.* , 23: 68-78.
- 11- Reis, P. R. M. 2004. Avaliação da prevalência de hemoglobinopatias e talassemias em Goiás: Métodos de identificação laboratorial e distribuição geográfica, tese de mestrado p 50.
- 12- Rothfield NF.1989. Systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory aspects. In *Mc Carty D 9ed): Arthritis and Allied Conditions*, 11 th ed Philadelphia, Lea & Febiger p.1022-1047.
- 13- Tan , Cohen A, Fries J, Masi A, McShane D, Rothfield N. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.
- 14- Viana-Baracioli, L. M. S., Bonini-Domingos C.R., Pagliusi, R.A. e Naoum, P.C. 2002. Prevenção de hemoglobinopatias a partir do estudo em gestantes. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, 23 (1):31-39.