

**Dirceu Dalpino**

Atividade da NADH-redutase de metemoglobina em hemolisado e membranas eritrocitárias de pacientes hansenianos sob tratamento sulfônico.

**Tese de doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Medicina, área de Medicina Interna da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Medicina, na área de Medicina Interna.**

**ORIENTADOR : PROF. DOUTOR LUÍS ALBERTO MAGNA**

CAMPINAS, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 1997.

---

**Banca examinadora da tese de Doutorado**

---

---

**Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Magna**

---

---

---

**Membros:**

---

1.

---

3.

---

5.

---

7.

---

5.

---

Curso de pós-graduação em Medicina, área Medicina Interna da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 11 / 08 / 1997

---

À  
**VERA**, minha querida esposa  
**PATRÍCIA**, minha filha  
**FÁBIO**, meu filho  
muito obrigado pelo incentivo.  
A vocês dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTO**

Especial ao **Professor Doutor Luís Alberto Magna**, meu orientador, pela sua valiosa colaboração e atenção à nossa pessoa durante a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

**Prof. Dr. Bernardo Beiguelman** - Universidade de Campinas

**Dr Osvaldo Cruz** - Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru

**Dr Diltor Vladimir Araujo Opromolla**- Instituto Lauro Souza Lima - Bauru

**Dr Claudio Sampaio Tonello** - Instituto Lauro de Souza Lima- Bauru

**Dr Somey Ura** - Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru

**Francisco Jose Canhos** - Farmacêutico Bioquímico

**Josina Pereira Alves**- Lab. An. Clin. Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru

**Valdemar Evangelista** - Lab. An. Clin. Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru

**Zélia Nakano** - Enfermeira - Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru

**Prof. Holmes Campanelli Costa** - "in memoriam"

A **todos os funcionários da Biblioteca** do Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru

A **todos** que, de uma forma direta ou indireta, colaboraram com este trabalho e que, involuntariamente, não foram citados.

Em especial aos **72 pacientes** que, voluntariamente, participaram e colaboraram, o meu **muito obrigado**.

"Para ser grande, sê inteiro Nada teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes. Assim, em cada lago, a lua toda brilha, porque alta vive."

- **Fernando Pessoa**

## SUMÁRIO

Resumo	1
I- Introdução	3
II- Objetivo	9
III- Revisão da literatura	10
IV- Casuística, Material e Método	17
W.1- Casuística	17
IV.2- Material	17
IV.2.1- Aparelhos	17
IV.2.2- Acessórios	18
IV.2.3- Reagentes	18
IV.3- Método	19
IV.3.1- Série vermelha	19
IV.3.2- Contagem de reticulócitos	19
IV.3.3- Dosagem de sulfona	19
IV.3.4- Determinação da atividade da NADH-redutase no hemolisado	19
IV.3.5- Preparo das membranas eritrocitárias ( <i>ghost cells</i> )	20
IV.3.6- Atividade enzimática na membrana eritrocitária	20
IV.3.7- Determinação da metemoglobina	20
V- Resultados	21
VI- Discussão	24
VII- Conclusão	27
Summary	28
Referências bibliográficas	30

## LISTA DE ANEXOS E GRÁFICOS

- ANEXO 1 e 1 a - Resultados dos pacientes hansenianos
- ANEXO 2 e 2 a - Resultados do grupo controle
- ANEXO 3 - média, desvio padrão, C.V., máximo e mínimo das variantes dos pacientes hansenianos
- ANEXO 4 - média, desvio padrão, C.V., máximo e mínimo das variantes do grupo controle.
- ANEXO 5 - Análise comparativa das variáveis dos pacientes e do grupo controle.
- ANEXO 6 - Técnicas utilizadas.
- ANEXO 7 - Dados espectrofotométricos obtidos na membrana eritrocitária dos hansenianos.
- ANEXO 8 - Dados espectrofotométricos obtidos no hemolisado dos hansenianos.
- ANEXO 9 - Dados espectrofotométricos obtidos na membrana eritrocitária do grupo controle.
- ANEXO 10- Dados espectrofotométricos obtidos no hemolisado do grupo controle.
- ANEXO 11- Análise de correlação das variáveis dos hansenianos.
- ANEXO 12- Análise de correlação das variáveis do grupo controle.



## **GRÁFICOS**

GRÁFICO 1 - Idade.

GRÁFICO 2 - Metemoglobina.

GRÁFICO 3- Hemoglobina.

GRÁFICO 4- Hematócrito.

GRÁFICO 5- CHCM.

GRÁFICO 6- Reticulócitos.

GRÁFICO 7- Sulfona nos hansenianos.

GRÁFICO 8- Atividade da NADH-redutase no hemolisado.

GRÁFICO 9- Proteína na membrana eritrocitária.

GRÁFICO 10- Atividade da NADH-redutase na membrana eritrocitária.

Obs: Os gráficos representam uma comparação da distribuição das variáveis dos pacientes hansenianos e do grupo controle, com exceção ao gráfico 7.

## RESUMO

Nós efetuamos determinações da série vermelha, dosagem da sulfonemia, dosagem de metemoglobina, contagem de reticulócitos e dosagem da atividade enzimática da NADH-diaforase no hemolisado e nas membranas dos eritrócitos livres de hemoglobina em 72 pacientes portadores de hanseníase com idade variando entre 22 e 89 anos, todos ingerindo doses diárias de 100 mg de D.D.S.

Estes paciente encontravam-se internados no Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru, S.P., ou atendidos no serviço de ambulatório do mesmo Instituto.

Para compor o grupo controle foram selecionados, aleatoriamente, 72 pessoas normais, não ingerindo medicamentos, com idade variando entre 20 e 90 anos.

Foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas variáveis da série vermelha, dosagem de metemoglobina, contagem de reticulócitos e na atividade enzimática da NADH-redutase nas membranas eritrocitárias entre os dois grupos. A atividade enzimática da NADH-redutase no hemolisado não apresentou diferença estatística significativa quando feita a correção pela taxa de hemoglobina.

O nível de metemoglobina foi superior nos portadores de hanseníase em relação ao grupo controle, provavelmente devido à ação oxidante da sulfona.

O balanço entre a oxidação e a redução do ferro ligado ao heme determina o nível de metemoglobina no eritrócito. A NADH citocromo *b<sub>5</sub>* redutase eritrocitária reduz o citocromo *b<sub>5</sub>* férrico, gerado a partir de uma redução não enzimática da metemoglobina pelo citocromo *b<sub>5</sub>* reduzido<sup>72,83</sup>.

Neste trabalho, nós medimos a atividade da NADH-redutase no hemolisado e nas membranas eritrocitárias intactas, dos pacientes portadores de hanseníase ingerindo sulfona na dose de 100 mg ao dia. A atividade foi determinada de acordo com a técnica descrita por Scott<sup>73</sup>, com algumas modificações. Nós incubamos os eritrócitos por um tempo de 60 minutos com uma solução de NaNO<sub>2</sub> a 1%<sup>67</sup>.

As membranas eritrocitárias (*ghost cells*) foram preparadas de acordo com a técnica descrita por Dodge e colaboradores<sup>21</sup>. A média enzimática no hemolisado dos pacientes e do grupo controle não apresentou diferença estatística significativa quando corrigida pela hemoglobina. A atividade enzimática nas membranas eritrocitárias foi inferior e estatisticamente significativa com relação ao grupo controle. Isto pode ter ocorrido pelo aumento do nível da fração solúvel da enzima e diminuição da fração ligada à membrana eritrocitária, devido à constante ação oxidante da sulfona.

O consumo de NADH-redutase é aumentado e como os eritrócitos não possuem capacidade de produzir mais enzima devido não possuírem organelas citoplasmáticas, existe uma tendência à diminuição desta atividade.

O citocromo  $b_5$  e a NADH-citocromo  $b_5$  redutase ou NADH redutase, que constituem o sistema de redução da metemoglobina no eritrócito maduro, originam-se do retículo endoplasmático dos precursores nucleados dos eritrócitos. O agente solubilizante possivelmente seja uma protease produzida pelo lisosomas das células imaturas<sup>72</sup>.

Provavelmente, nos hansenianos, a atividade da NADH-redutase ligado à superfície interna da membrana eritrocitária esteja diminuída pelo aumento da atividade da fração solúvel da enzima.

A enzima ligada à membrana é uma forma precursora da enzima solúvel no citoplasma e ambas são reguladas similarmente por um mecanismo de controle genético<sup>43</sup>.

A sulfona promove um aumento da atividade enzimática no sobrenadante de membrana eritrocitárias após o tratamento das mesmas com a droga, sendo dose dependente<sup>4</sup>, contudo a atividade enzimática no hemolisado de pacientes portadores de hanseníase, medicados com sulfona, apresentou níveis semelhantes aos do grupo controle<sup>50</sup>.

Tendo em vista termos encontrado níveis menores de atividade enzimática nas membranas eritrocitárias dos hansenianos e níveis coincidentes no hemolisado em comparação com um grupo controle, podemos afirmar que provavelmente isto deve-se ao deslocamento enzimático da membrana celular para o citoplasma, com o objetivo de manter o eritrócito em equilíbrio hemoglobínico constante, apesar da ação oxidante da sulfona.

## I - INTRODUÇÃO

O glóbulo vermelho possui um diâmetro de 7 a 8 micra, com uma área superficial de 140 micra cúbicas, sendo esta área de muita importância quando levamos em consideração que o mesmo necessita atravessar capilares e sinusóides com diâmetro de 3 micra ou menos<sup>69</sup>.

O glóbulo vermelho é uma célula anucleada, possui uma membrana cuja estrutura é semelhante às das outras células, com dupla camada de fosfolipídeos sendo estabilizada pelo colesterol e nesta membrana encontram-se proteínas intercaladas. Ele é composto por água, hemoglobina, ions potássio, enzimas e glicose. A hemoglobina é seu maior constituinte com cerca de 300 milhões de moléculas para cada célula e representa um terço do seu peso. Não se conseguem distinguir organelas em seu interior. O reticulócito, que é um eritrócito mais jovem, possui algumas organelas em seu interior tais como mitocôndrias e polirribossomas<sup>6</sup>.

O eritrócito necessita manter sempre em equilíbrio os mecanismos capazes de evitar a oxidação de seus constituintes, principalmente o ferro e a globina. Da mesma forma deve evitar a hiperidratação através da retirada de sódio ( $\text{Na}^+$ ) de seu interior. Esta célula é desprovida de mitocôndrias e a energia necessária à sua manutenção provém da glicólise que, pela ação da hexoquinase, transforma-se em glicose-6-fosfato sendo catalisada por duas vias, a de Embden-Meyerhof e a da hexose monofosfato<sup>6</sup>.

A primeira, através de reações anaeróbicas (via de Embden-Meyerhof), onde em uma primeira fase a glicose-6-fosfato origina dois trios fosfatos e na segunda fase temos a formação de ácido pirúvico e a eliminação como ácido láctico. Uma das enzimas importantes nesta segunda fase é a piruvato-quinase. A energia é gerada sob a forma de adenosina trifosfato (ATP) a partir do ADP e duas moléculas de NADH reduzido a partir do  $\text{NAD}^{34}$ .

A segunda, através da via da hexose monofosfato, a glicose é transformada em triose fosfato através de pentoses (açucares compostos de C5) sendo a única fonte de origem do NADPH reduzido. A enzima mais importante desta via é a glicose-6-fosfato desidrogenase<sup>34</sup>.

Durante a glicólise temos a produção de ATP que assegura o funcionamento da expulsão do sódio para fora da célula, sendo que ao nível da membrana a enzima ATPase libera energia do ATP que é utilizada nesta função. É também através do ATP que a membrana mantém seus lipídeos. Produz-se também o NADH reduzido que é um coenzima da metemoglobina redutase ou diaforase<sup>34</sup>.

O NADPH reduzido produzido na via das pentoses é a coenzima da glutation-redutase a qual assegura a regeneração do glutation reduzido (GSH), o qual possui um papel protetor contra a oxidação da globina e das proteínas estruturais. Nesta mesma fase a enzima

glutation-peroxidase transforma o GSH e a  $H_2O_2$  em duas moléculas de  $H_2O$  e GSSG (glutation oxidado)<sup>6,22,36,56</sup> sendo que este ciclo representa 10 % da glicólise<sup>63</sup>

O glóbulo vermelho maduro, encontrado no sangue periférico dos vertebrados, é ocupado em seu interior pela hemoglobina, que desempenha importante função orgânica de transportar oxigênio aos tecidos. A hemoglobina é uma proteína com peso molecular de 68.000, formada por quatro cadeias de globina e quatro moléculas de heme<sup>6</sup>. A maior parte da síntese desta proteína dá-se nos eritroblastos e o restante nos reticulócitos<sup>35,12</sup>.

O heme é uma porfirina contendo um átomo de ferro. A porfirina possui quatro anéis pirrólicos com nitrogênio, reunidos por pontes metênicas (-CH-) e oito cadeias laterais sendo metil, vinil ou ácido propiônico. O ferro localiza-se no centro, ligado aos quatro nitrogênios dos anéis pirrólicos e possui duas valências livres<sup>6</sup>,

A globina é um conjunto de quatro cadeias polipeptídicas. Para cada molécula de hemoglobina A temos quatro cadeias idênticas duas a duas denominadas alfa e beta, possuindo 141 aminoácidos na cadeia alfa e 146 aminoácidos na cadeia beta, reunidas por ligações peptídicas (estrutura primária). A cadeia assim formada se dobra em espiral (estrutura secundária)<sup>6</sup>.

A estabilização é dada por ligações entre os aminoácidos colocados em contato pelas curvaturas da molécula (estrutura terciária). A reunião de duas cadeias alfa e duas cadeias beta dão origem a uma molécula simétrica globular (estrutura quaternária)<sup>6</sup>.

A estrutura terciária forma uma dobra superficial denominada bolsa do heme e é no seu interior que se localiza uma molécula do heme. Cada molécula de hemoglobina fixa quatro moléculas de oxigênio sobre o ferro e constitui a oxiemoglobina. Durante a fixação ou a liberação do oxigênio, as subunidades deslocam-se umas em relação às outras, com dilatação do conjunto no estado desoxigenado e contração no estado oxigenado. Os principais movimentos realizam-se ao nível das ligações fracas alfa1 - beta2 e alfa2 - beta1 onde temos apenas 19 aminoácidos<sup>6</sup>.

Ao nível da bolsa central entre as quatro subunidades, fixa-se no estado desoxigenado, a 2-3 difosfoglicerato (2-3-DPG) cuja origem está na via anexa da glicólise. É esta substância que regula a afinidade pelo oxigênio, com liberação de 2-3 DPG e contração da bolsa central durante a fixação de oxigênio sobre as quatro moléculas do heme<sup>6,35</sup>.

A captação e liberação do oxigênio pela hemoglobina provoca uma movimentação nas cadeias da globina, sendo que durante a liberação deste gás as cadeias beta separam-se ocasionando uma entrada do 2,3-difosfoglicerato (2-3-DPG) que se adapta entre essas globinas, deslocando o oxigênio para os tecidos, uma vez que existe uma menor afinidade pelo mesmo na molécula<sup>6</sup>.

Em algumas situações o ferro em estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) contido na célula vermelha madura é transformado para o estado férrico ( $Fe^{3+}$ ), dando origem a metemoglobina perdendo a capacidade de fixar o oxigênio. Nas pessoas normais as pequenas quantidades formadas desta metemoglobina são rapidamente revertidas por ação de sistemas enzimáticos<sup>34,70</sup>.

A hemoglobina e o GSH do glóbulo vermelho sofrem ações oxidativas de diferentes padrões, originários das drogas oxidantes, afetando também a membrana celular. Verifica-se um aumento na concentração de metemoglobina, diminuição dos níveis de GSH e formação de corpúsculos de Heinz<sup>55</sup>.

O equilíbrio no nível de metemoglobina na célula indica que a lenta oxidação química da hemoglobina é compensada pela redução enzimática<sup>36</sup>

A hemoglobina é protegida da oxidação, tanto pela localização do heme ligado à cadeia globínica em um invólucro de histidinas e aminoácidos, como por processos metabólicos existentes no interior do glóbulo vermelho<sup>70</sup>. O peróxido de hidrogênio formado pela metemoglobina pode ser destruído pela superóxido-dismutase ou pela glutathione-peroxidase<sup>17,56</sup>.

A metemoglobinemia caracteriza-se pela presença de cianose em pessoas não portadoras de doenças cardiopulmonares ou distúrbios hemodinâmicos<sup>18</sup> e é formada naturalmente quando pequenas quantidades de ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) são oxidados para íon férrico ( $Fe^{3+}$ ), perdendo a capacidade de fixar oxigênio molecular de forma reversível, diminuindo portanto o transporte do mesmo pelo glóbulo vermelho proporcionalmente à sua concentração<sup>64</sup>.

Define-se a metemoglobina como uma oxidação da hemoglobina, onde a sexta posição de coordenação do ferro hêmico liga-se a uma molécula de água (forma ácida) ou a um íon hidroxila (forma alcalina)<sup>70</sup>. A metemoglobinemia clínica é um termo impropriamente utilizado uma vez que a metemoglobina situa-se apenas intracelularmente. Apresenta-se como primária ou congênita, secundária quando induzida por drogas e enterogênica quando produzida nas infecções por bactérias produtoras de nitrito<sup>26</sup>.

Alguns medicamentos (sulfamidas, hidantoínas) e substâncias tóxicas (nitritos e cloratos) induzem uma maior produção de metemoglobina, sendo que sua reversão vai depender principalmente da presença normal do sistema enzimático NADH-redutase<sup>70</sup>.

Vários autores efetuaram estudos *in vitro* para demonstrarem a ação de agentes oxidantes sobre a hemoglobina<sup>1,18,26,29,30,41</sup>. Cohen e Hochstein em estudo da geração de peróxido de hidrogênio por agentes hemolíticos concluíram que o peróxido é um intermediário tóxico comum a muitos agentes hemolíticos<sup>17</sup>.

Estudos sobre a ação da dapsona na membrana da célula vermelha e seu efeito na glicólise revelaram uma diminuição no nível do glutathione reduzido (GSH) devido provavelmente à ligação do mesmo com grupos sulfidrilas na hemoglobina. A diminuição dos fosfolípidos e da atividade da acetilcolinesterase na membrana celular levam a um aumento da auto hemólise<sup>65</sup>.

O tratamento com Dapsona (4-4' diaminodifenil sulfona) em altas doses em pacientes portadores de Dermatite Herpetiforme leva à presença de anemia ocasionada por hemólise e má absorção intestinal resultante de alterações na mucosa jejunal. Os pacientes apresentam uma reticulocitose persistente devido à hemólise<sup>19</sup>

Balakrishnan e colaboradores, em 1989, investigaram o efeito hemolítico da terapia com dapsona em 44 hansenianos, com doses variáveis entre 1,3 e 3,3 mg/quilo de peso corporal. Os autores observaram decréscimo dos níveis de hemoglobina após 30 dias de terapêutica em aproximadamente metade dos pacientes que ingeriram 100 miligramas ao dia, atribuindo este fato ao efeito hemolítico da dapsona<sup>2</sup>

Os pacientes portadores de hanseníase são submetidos a um tratamento prolongado com o medicamento 4-4'-diaminodifenil sulfona (Dapsona), na dose de 100 miligramas ao dia e desta forma, caso apresentem diminuição da NADH-diaforase, desenvolverão cianose de intensidade diretamente proporcional à formação de metemoglobina. A hanseníase é um grave problema de saúde pública de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, atingindo mais de 5 milhões de pessoas<sup>58</sup> Trata-se de uma doença causada por um bacilo álcool-ácido-resistente, *Mycobacterium leprae*, classificada em tipos, grupos e variedades dependendo da resposta imunológica celular do hospedeiro ante o bacilo<sup>59</sup>

Os hansenianos apresentam taxas de hemoglobina diminuídas provavelmente devido ao efeito hemolítico da dapsona e níveis de metemoglobina superiores aos das pessoas saudáveis, porém abaixo de níveis tóxicos<sup>50</sup> Os níveis de hemoglobina e dos reticulócitos não possuem relação com a NADH-redutase da metemoglobina segundo estudos feitos em hansenianos sob sulfonoterapia, por Caticha-Alfonso e colaboradores<sup>14</sup> em 1985.

A atividade da NADH-redutase não apresenta diferença estatística significativa no hemolisado de sangue de pacientes sob tratamento sulfônico em comparação com pessoas normais<sup>50</sup> e estudos efetuados *in vitro* com membranas de hemácias tratadas com sulfona revelou um aumento do nível desta enzima no sobrenadante em uma relação dose dependente<sup>4</sup>

A NADH-redutase é uma enzima localizada na face interna da membrana eritrocitária e no interior do glóbulo vermelho, sendo similares imunologicamente e estando ambas diminuídas nos portadores de metemoglobinemia congênita<sup>43,49</sup>. Esta enzima é uma flavoproteína tendo a flavina-adenina dinucleotídeo como grupo prostético<sup>46</sup>.

O sistema enzimático mais importante e em cuja falência é formada uma quantidade considerável de metemoglobina denomina-se NADH-metemoglobina redutase ou NADH-diaforase<sup>72</sup>. Essa enzima foi identificada em 1959 por Scott e Griffith<sup>76</sup>. A nicotina-adenina-dinucleotídeo (NAD) é uma coenzima de desidrogenases e assim como podem, na forma oxidada aceitar hidrogênio de substratos, reduzindo-se a NADH, podem ceder hidrogênio na forma reduzida, reoxidando-se. A transferência de hidrogênio da coenzima doadora, que se oxida, para o substrato aceptor que se reduz é catalisada por desidrogenases, que são específicas para seus substratos. A determinação espectrofotométrica é possível porque dependendo do pH, a reação pode ter sentidos diferentes, tanto oxidando uma coenzima reduzida como reduzindo uma coenzima oxidada<sup>70</sup>.

As taxas baixas de metemoglobina presente nos indivíduos normais devem-se ao equilíbrio entre sua formação e sua redução pela presença de sistemas enzimáticos ligados ao NADH e NADPH. A via redutora de maior utilidade e importância para o glóbulo vermelho é a NADH-desidrogenase, sendo influenciada pela disponibilidade de NADH e de citocromo *b<sub>5</sub>*. A fonte de NADH utilizada para a redução da metemoglobina provém da glicólise anaeróbia de Ebdem-Meyerhof, através da reação do gliceraldeído-fosfato desidrogenase, onde o NAD é reduzido a NADH. Nesta mesma via temos o consumo do NADH na reação do lactatodesidrogenase impedindo o acúmulo do mesmo<sup>72</sup>.

A NADH-metemoglobina-redutase catalisa somente a redução do citocromo *b<sub>5</sub>* eritrocitário na presença de NADH, não agindo no transporte de elétrons entre o citocromo *b<sub>5</sub>* reduzido e a metemoglobina <sup>46,47,62</sup>

Foram descritas várias enzimas NADH-desidrogenase: NADH-desidrogenase I<sup>75,78</sup>, NADH-metemoglobina ferrocianeto redutase<sup>31</sup> e NADH-citocromo *b<sub>5</sub>* redutase<sup>61</sup>, as quais catalisam a redução do DCIP, ferrocianeto e citocromo *b<sub>5</sub>*, respectivamente, sendo as mesmas expressões de uma mesma proteína.

A NADH-citocromo *b<sub>5</sub>* redutase é uma proteína de membrana, composta de uma porção hidrofílica, a qual contém o local ativo da enzima sendo revelada na superfície citoplasmática e uma pequena seqüência hidrofóbica, a qual ancora a proteína na membrana. Esta porção hidrofóbica está localizada na direção do carbono terminal <sup>53,54,81</sup>.

Existe uma relação entre a enzima ligada à membrana do eritrócito e a citocromo *b<sub>5</sub>* redutase solúvel eritrocitária. Com a utilização de eletroforese de dupla difusão e exposição a antisoros foram demonstrados comportamentos idênticos entre estas duas enzimas. A identidade imunológica entre a forma solúvel e a citocromo *b<sub>5</sub>* redutase microsomal ligada à membrana em humanos e em animais foi demonstrada através de estudos científicos <sup>47,49</sup> levando a dedução de que a enzima ligada a face interna da membrana no eritrócito é uma citocromo *b<sub>5</sub>* redutase<sup>16</sup>.



As enzimas NADPH-desidrogenases transferem elétrons para o azul de metileno e corantes óxido-redutores semelhantes, os quais fazem a redução da metemoglobina de forma não enzimática<sup>8,36</sup>. Foram isoladas duas NADPH-desidrogenases (A e B) as quais reduzem o DCIP rapidamente<sup>75</sup>, porém a redução da metemoglobina é lenta e não reduzem a metemoglobina-ferrocianeto, nem o citocromo *b<sub>5</sub>*. A NADPH-desidrogenase está presente em níveis normais nos glóbulos vermelhos dos pacientes portadores de metemoglobinemia congênita<sup>72</sup>.

O glóbulo vermelho maduro não contém citocromo *c* endógeno sendo possível que no estágio imaturo ou nucleado, o eritrócito utiliza-se de enzimas como a citocromo redutase, mas após a reversão para a forma anaeróbia do metabolismo a função enzimática seja somente da metemoglobina redutase <sup>36</sup>

A origem da NADH-citocromo *b<sub>5</sub>* redutase é sugerida como sendo microsomal devido a semelhante digestão tripsínica entre o citocromo *b<sub>5</sub>* eritrocitário e o originário de microsomas hepáticos humanos<sup>72</sup>. Os ribossomas agrupados são denominados microsomas e são considerados como responsáveis pela síntese de enzimas e proteínas sob influência do DNA e do RNA mensageiro<sup>6</sup>.

## II - OBJETIVO

A atividade da NADH-metemoglobina redutase e a metemoglobinemia em hansenianos foi estudada por Magna e Beiguelman<sup>50</sup>, em 1984, sendo encontrada uma alta incidência de pacientes (22,5%) com deficiência parcial desta atividade no hemolisado. Posteriormente Banzato e Magna<sup>4</sup>, em 1991, relataram o efeito *in vitro* da dapsona na atividade esta mesma enzima, em membranas de eritrócitos de pessoas sadias, encontrando um aumento dose dependente desta atividade enzimática no sobrenadante, pós tratamento sulfônico, provavelmente devido à liberação da enzima ligada à membrana.

O eritrócito maduro é incapaz de sintetizar novas proteínas por ser desprovido de núcleo e de organelas citoplasmáticas. Quando o estoque de enzimas que recebeu na sua fase de maturação se esgota<sup>25</sup>, começa seu envelhecimento, ocasionando a hemólise<sup>6</sup>. As pessoas portadoras de hanseníase, dada a evolução crônica da doença, necessitam ingerir por longo período de tempo uma droga comprovadamente oxidante, podendo levar a um aumento da metemoglobina.

Tendo por base estes dados anteriores, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade da NADH-metemoglobina redutase, no hemolisado e nas membranas eritrocitárias (*ghost cells*), de pacientes hansenianos submetidos a uma monoterapia com diaminodifenil sulfona, visando possivelmente determinar o comportamento desta atividade enzimática, nestes pacientes, comparando com um grupo controle composto por pessoas sadias, que não estivessem ingerindo drogas oxidantes.

### III - REVISÃO DA LITERATURA

Os trabalhos científicos relacionados com metemoglobinemia datam do começo do século, sendo que, a partir do final da década de 50, com a descoberta de enzimas ligadas a redução da metemoglobina, é que surgiram os artigos relacionados às atividades enzimáticas.

Scott e Hoskins, em 1959, determinaram os níveis de oxihemoglobina e metemoglobina em Esquimós do Alasca e em Índios, sendo que 15 apresentaram metemoglobinemia em uma população de 20.000 pessoas, chegando a conclusão que as metemoglobinemias encontradas eram de origem hereditária e recessiva, em vista do aparecimento de membros afetados em uma mesma família<sup>77</sup>.

Scott e Griffith, em 1959, descreveram a ausência de uma enzima, a diaforase, nas células vermelhas de pessoas com metemoglobinemia hereditária. Esta enzima tem a capacidade de reduzir a metemoglobina<sup>76</sup>.

Ross e Desforges, em 1959, determinaram a redução da metemoglobina no sangue de cordão umbilical de 18 crianças nascidas a termo e em um grupo controle de 12 adultos normais. Os autores observaram que os eritrócitos do cordão umbilical reduziam a metemoglobina em menor quantidade que as do grupo controle, na presença de lactato, azul de metileno ou glicose, interpretando esses achados como decorrentes da deficiência transitória de NADH-metemoglobina reductase ou de enzimas responsáveis pela geração de NADH nas hemácias. Isto pode justificar o aparecimento freqüente de metemoglobinemia em crianças recém-nascidas<sup>68</sup>.

Scott, em 1960, estudou a relação entre a diaforase eritrocitária e a metemoglobinemia hereditária, determinando a atividade da diaforase pelo método de Edelho, Hayaishi e Teply adaptado, em 318 pessoas entre os Esquimós do Alasca e Índios Ingalik. O autor encontrou baixos níveis de diaforase eritrocitária nos metemoglobinêmicos, concluindo que esta patologia era adquirida de forma recessiva<sup>73</sup>.

Scott e McGraw, em 1962, isolaram e purificaram a NADH-metemoglobina reductase de glóbulos vermelhos humanos normais relatando que este sistema enzimático reduzia o DCIP, citocromo *c* e a metemoglobina<sup>78</sup>. Como a taxa de redução do DCIP era muito mais rápida, cerca de 9.000 vezes superior a da metemoglobina, este é utilizado para medir a atividade enzimática de hemolisados originários de eritrócitos tratados com nitrito<sup>39</sup>.

Ross, em 1963, efetuou um estudo da deficiência de atividade da NADH-metemoglobina diaforase em sangue do cordão umbilical de 54 crianças nascidas a termo e 54 adultos como grupo controle, utilizando a técnica de Scott modificada, encontrando uma média abaixo do normal nos recém nascidos. O autor relatou que a deficiência transitória desta

enzima é o motivo pelo qual essas crianças apresentam-se mais susceptíveis a desenvolverem metemoglobinemia adquirida<sup>67</sup>.

Beutler e Baluda, em 1963, efetuaram um estudo da interação entre populações celulares e o papel do azul de metileno, demonstrando que a mistura de células normais com células de pacientes portadores de metemoglobinemia congênita facilitam a redução da metemoglobina, sendo que o azul de metileno é o mediador da interação celular<sup>7</sup>.

Balsamo e colaboradores, em 1964, descreveram a deficiência da NADH-diaforase em três Índios Navajos metemoglobinêmicos, sugerindo uma alta frequência do gen para metemoglobinemia congênita entre esses Índios<sup>3</sup>, como havia sido demonstrado em outras duas raças Norte Americanas, Esquimós e Índios Atabascan<sup>77</sup>.

Scott e colaboradores, em 1965, purificaram<sup>78</sup> e estudaram a contribuição da NADH-desidrogenase I e II e NADPH-desidrogenase A e B purificadas pela cromatografia, na redução da metemoglobina. Os autores concluíram que a NADH-desidrogenase I contribuiu com dois terços da capacidade de redução da metemoglobina<sup>75</sup>.

Jaffé, em 1966, publicou um trabalho onde estudou as metemoglobinemias hereditárias associadas com anormalidades metabólicas dos eritrócitos. O autor faz uma revisão histórica das descrições de cianose congênita citando como possível precursora a descrita por François, em 1945, sendo que em 1891 Dittrich descreveu a ocorrência de cianose desencadeada por droga. O autor neste trabalho faz uma pormenorizada descrição da redução da metemoglobina para hemoglobina no eritrócito humano, bem como relata detalhadamente as anormalidades metabólicas das metemoglobinemias hereditárias<sup>38</sup>. O autor, em 1959, efetuou um estudo da redução da metemoglobina em glóbulos vermelhos humanos incubados com nucleosídeos e açúcares, concluindo que estas substâncias foram incapazes de reduzir a metemoglobina de pessoas portadoras de metemoglobinemia congênita, ocorrendo o inverso com as pessoas normais, salientando que esta observação é consistente com o conceito de que a metemoglobinemia congênita decorre de uma falência no transporte de elétrons para a metemoglobina<sup>39</sup>.

Jaffé e colaboradores, em 1966, apresentaram um estudo investigatório em três famílias com cianose metemoglobinêmica hereditária, encontrando deficiência de atividade da NADH-metemoglobina reductase em seus eritrócitos. Os dados apresentados são compatíveis com uma herança autossômica recessiva de metemoglobinemia hereditária. Estas três famílias eram de origens diferentes, ou seja: Porto Riquenha, Anglo Saxônica e Italiana<sup>40</sup>.

Zamudio e Canessa, em 1966, evidenciaram que a membrana da célula vermelha humana, preparada como "ghost cells", apresentaram capacidade de oxidar NADH usando diferentes receptores de elétrons, tais como citocromo *c*, ferricianeto e DCIP. Isto demonstra que a membrana celular do eritrócito tem atividade NADH-acceptor-oxidoreductase<sup>89</sup>.

Kaplan e Beutler, em 1967, efetuaram estudo eletroforético das células vermelhas, livres de hemoglobina, para NADH e NADPH-diaforase, em pessoas normais e pacientes metemoglobinêmicos. Em dois pacientes portadores de metemoglobinemia encontraram atividade da NADH-diaforase em torno de 10 % e no terceiro paciente o nível foi de 25 % do normal<sup>42</sup>.

Hegesh e colaboradores, em 1968, apresentaram um novo método para determinar a ferrihemoglobina-redutase (NADH-metemoglobina redutase) nos glóbulos vermelhos, sendo mais rápido que o descrito por Scott, em 1960, pois eliminava o tratamento das células com o nitrito de sódio e sua posterior lavagem. A medida espectrofotométrica durava apenas 3 minutos<sup>31</sup>.

Bloom e Zarkowsky, em 1969, investigaram as características eletroforéticas da NADH-metemoglobina redutase em três famílias sem ligações de parentesco, com uma deficiência desta enzima em três padrões enzimáticos. Os resultados demonstraram a existência de duas enzimas eritrocitárias diferentes que oxidam o NADH ou o NADPH na presença de corantes óxido-redutores, sendo que a deficiência de NADH-metemoglobina redutase é responsável pela metemoglobinemia congênita. A presente investigação detectou quatro tipos de padrões eletroforéticos: bandas de mobilidade normal e intensidade diminuída; atividade discretamente diminuída e mobilidade lenta; atividade diminuída e mobilidade rápida e ausência de bandas, o que indica uma heterogeneidade nesta patologia<sup>10</sup>

Scott, em 1969, efetuou a comparação entre seu método e o proposto por Hegesh e colaboradores, concluindo que ambos os métodos eram satisfatórios para o estudo de metemoglobinemia, chegando a resultados similares, reconhecendo a maior rapidez no método do NADH-ferrocianeto, apesar de mais trabalhosa<sup>74</sup>.

Zamudio e colaboradores, em 1969, estudaram a relação entre a estrutura da membrana eritrocitária e a atividade do NADH-(receptor)-oxidoreductase em membranas eritrocitárias (*ghost cells*). Os autores utilizaram sal de nitrobluetetrazolium e o ferricianeto como receptor de elétrons. Esta demonstração evidenciou que a atividade do NADH-ferricianeto na membrana do glóbulo vermelho está fortemente ligada à integridade física da membrana da "ghost cells"<sup>90</sup>.

Detter e colaboradores, em 1970, determinaram o nível de metemoglobina, redução da metemoglobina *in vitro*, na presença de glicose e lactato e a atividade da NADH-diaforase pela técnica de Scott<sup>73</sup>, em 378 amostras de sangue de doadores, encontrando alteração eletroforética em 2 amostras nas bandas da NADH-diaforase, sendo uma de natureza hereditária<sup>20</sup>.

Hegesh e colaboradores, em 1971, descreveram a caracterização eletroforética das bandas de NADH e NADPH-diaforase extraídas de eritrócitos humanos. Foi utilizado gel

de poliacrilamida de alta força de resolução. Os autores demonstraram que pacientes com metemoglobinemia congênita apresentam ausência das bandas de NADH<sub>3</sub> e NADH<sub>4</sub>, responsáveis pela redução de metemoglobina nos glóbulos vermelhos humanos<sup>32</sup>.

Sugita e colaboradores, em 1971, purificaram a NADH-desidrogenase em eritrócitos humanos e a redução da metemoglobina por esta enzima. Os autores utilizaram o método de Hegesh e Avron para a atividade da NADH-metemoglobina redutase e o DCIP para a atividade do NADH-diaforase. Os resultados da taxa de redução de metemoglobina na presença de citocromo *b<sub>5</sub>* é aproximadamente igual a taxa de redução do citocromo *b<sub>5</sub>*. Isto sugere uma redução não enzimática da metemoglobina pelo citocromo *b<sub>5</sub>*, o qual é reduzido enzimaticamente pelo NADH<sup>83</sup>.

Kuma e colaboradores, em 1972, estudaram a metemoglobina redutase em pessoas pertencentes a uma família japonesa com metemoglobinemia congênita, homocigotas e heterocigotas, comparando com sangue de pessoas normais. A atividade enzimática seguiu a técnica descrita por Scott e McGraw<sup>78</sup> e a atividade enzimática pós eletroforese foi determinada de acordo com a técnica de Kaplan e Beutler<sup>42</sup>. Os autores isolaram isoenzimas diaforases de células vermelhas normais e metemoglobinêmicas e concluíram que a diaforase A é a metemoglobina redutase com papel fisiológico na hemácia<sup>46</sup>.

Passon e Hultquist, em 1972, isolaram e caracterizaram uma NADH-citocromo *b<sub>5</sub>* redutase solúvel de eritrócitos humanos, que catalisava rapidamente a redução do citocromo *b<sub>5</sub>*. Os autores afirmam ser esta enzima a NADH-desidrogenase I. Esta redutase é altamente específica para NADH quando se utiliza o citocromo *b<sub>5</sub>*, o DCIP e o ferrocianeto como receptores de elétrons<sup>61</sup>.

Schwartz e colaboradores, em 1972, apresentaram uma variante instável da NADH metemoglobina redutase em três famílias de Porto Riquinhos, não consanguíneas, com metemoglobinemia hereditária. A atividade de NADH metemoglobina redutase no hemolisado de cinco pacientes metemoglobinêmicos foi em torno de 3,2 a 6,4 % da média normal<sup>71</sup>.

Kitao e colaboradores, em 1974, estudaram a deficiência da metemoglobina redutase (citocromo *b<sub>5</sub>* redutase) em uma mulher japonesa de 36 anos de idade, cianótica, com concentração de metemoglobina de 33% e com atividade da NADH-diaforase celular em torno de 17% das células normais. No levantamento familiar os autores descrevem a mãe como heterocigota, o pai não foi examinado por ter falecido, um irmão da paciente é heterocigoto, seu marido é normal e seu casal de filhos apresenta-se como heterocigoto. A atividade da diaforase II estava deficiente e concluem que a redutase citocromo *b<sub>5</sub>* desempenha um papel de maior importância na redução fisiológica da metemoglobina nos eritrócitos humanos<sup>44</sup>.

Leroux e colaboradores, em 1975, descreveram o encontro de uma deficiência de NADH diaforase e citocromo *b<sub>5</sub>* redutase em diferentes tecidos, entre os quais as células

vermelhas, leucócitos, músculos, fígado e fibroblastos de pacientes metemoglobinêmicos e portadores de retardo mental. No defeito enzimático do tipo I há apenas uma deficiência da citocromo *b<sub>5</sub>* redutase solúvel enquanto que no tipo II este defeito é generalizado, apresentando-se tanto na eritrocitária quanto nos microsossomais. Neste tipo II há envolvimento neurológico<sup>48</sup>.

Kuma e colaboradores, em 1976, efetuaram um estudo da similaridade imunoquímica entre a metemoglobina redutase solúvel e o citocromo *b<sub>5</sub>* dos eritrócitos humanos com a NADH-citocromo *b<sub>5</sub>* redutase e citocromo *b<sub>5</sub>* de microsossomos de fígado de ratos. Os anticorpos contra a citocromo *b<sub>5</sub>* redutase inibiu apenas a redução do citocromo *b<sub>5</sub>*, sem afetar o transporte de elétrons entre o citocromo *b<sub>5</sub>* e a metemoglobina<sup>47</sup>.

Enomoto e Sato, em 1977, relataram a ligação assimétrica do citocromo *b<sub>5</sub>* com a membrana do eritrócito humano. Os autores demonstraram que a distribuição assimétrica do colesterol na membrana é a responsável pela ligação assimétrica do citocromo *b<sub>5</sub>*, sendo que o mesmo ocorre com a NADH citocromo *b<sub>5</sub>* redutase<sup>23</sup>.

Fisher e colaboradores, em 1977, demonstraram que a NADH-diaforase, também denominada metemoglobina redutase ou citocromo *b<sub>5</sub>* redutase é codificada pelo locus autossomal *DLA<sub>1</sub>* do cromossoma 22, utilizando a eletroforese em gel para o estudo da atividade da NADH-diaforase<sup>27</sup>.

Vives-Corróns e colaboradores, em 1978, apresentaram a deficiência de metemoglobina redutase (Citocromo *b<sub>5</sub>* redutase) nos eritrócitos e leucócitos associada com retardo mental em uma criança de dois anos de idade, de origem espanhola. A atividade desta enzima nos eritrócitos e leucócitos dos pais e da irmã da criança era intermediária, concordando com o modo recessivo desta herança para esta enzimopatia<sup>88</sup>.

Tomoda e colaboradores, em 1980, estudaram o mecanismo de redução da metemoglobina nos eritrócitos humanos através da análise das mudanças da metemoglobina, intermediários da hemoglobina e oxihemoglobina durante a redução da metemoglobina, medindo a contribuição da NADH e NADPH-metemoglobina redutase. Os autores ressaltam a maior importância da NADH-metemoglobina redutase na redução da metemoglobina nos glóbulos vermelhos<sup>86</sup>.

Tanishima e colaboradores, em 1980, apresentaram um estudo dos níveis da NADH-citocromo *b<sub>5</sub>* redutase nas plaquetas e leucócitos de pessoas normais e em portadores de metemoglobinemia congênita com ou sem sintomas neurológicos. Os níveis enzimáticos estavam diminuídos em todos os elementos dos pacientes com metemoglobinemia congênita do tipo II e apenas nos eritrócitos dos que apresentavam uma deficiência do tipo I<sup>85</sup>.

Choury, Leroux e Kaplan, em 1981, efetuaram um estudo dos níveis da metemoglobina redutase (citocromo *b<sub>5</sub>* redutase) ligados à membrana dos eritrócitos humanos

de pessoas normais e metemoglobinêmicos. Neste estudo evidencia-se que esta enzima apresenta-se solúvel nos eritrócitos humanos e também ligada à membrana. A enzima está fortemente ligada à face interna da membrana do eritrócito sendo que os autores utilizaram a digestão pela catepsina D para libertar a enzima.<sup>16</sup>

Matsuki e colaboradores, em 1981, reportaram o decaimento do citocromo *b<sub>5</sub>* e da citocromo *b<sub>5</sub>* redutase nos eritrócitos humanos de acordo com a idade dos mesmos. Os autores demonstraram que a enzima e o citocromo *b<sub>5</sub>* diminuía proporcionalmente com relação ao tempo de vida dos eritrócitos nas pessoas normais. Com relação aos pacientes com metemoglobinemia congênita o mesmo acontecia apenas com relação a atividade da enzima<sup>52</sup>

Kitajima e colaboradores, em 1981, efetuaram a purificação e estudaram as propriedades moleculares e cinéticas da NADH-citocromo *b<sub>5</sub>* redutase na membrana dos eritrócitos. Os resultados deste trabalho indicam que a enzima é uma proteína intrínseca da membrana, sendo imunologicamente similar à enzima solúvel. Nos pacientes portadores de metemoglobinemia congênita a atividade da NADH-metemoglobina redutase estava diminuída no citoplasma e na superfície interna da membrana do eritrócito<sup>43</sup>.

Panin e colaboradores, em 1984, mediram a atividade da citocromo *b<sub>5</sub>* redutase nos eritrócitos e nos leucócitos em pessoas aparentemente saudáveis, de ambos os sexos e de idades que variavam desde os recém natos até a idade adulta. A atividade enzimática é mais baixa nos eritrócitos dos recém nascidos aumentando após os dois meses de vida, atingindo valores similares as do adulto. Com relação aos leucócitos os valores são mais elevados do primeiro mês aos 2 anos de idade. Não existe diferença significativa entre os valores encontrados no cordão umbilical e a partir do segundo ano de vida<sup>60</sup>

Magna e Beiguelman, em 1984, determinaram a dosagem da hemoglobina, metemoglobina e a atividade da metemoglobina redutase em 182 hansenianos que ingeriram diariamente uma dose de 100 mg de dapsona e em um grupo controle de 137 pessoas normais. Os autores encontraram níveis baixos de hemoglobina, metemoglobina em nível mais elevado e NADH-diaforase nos hansenianos não diferindo do grupo controle, porém com uma maior dispersão em torno da média. A dosagem de sulfona nos pacientes foi de 4,19 mg/litro com desvio padrão de 2,26 mg/litro<sup>50</sup>. A taxa de hemoglobina foi determinada pela equação da análise espectrofotométrica da mistura de hemoglobina<sup>5,87</sup>.

Caticha-Alfonso e colaboradores, em 1984, determinaram a atividade da NADH-redutase de metemoglobina, dosagem da hemoglobina e contagem de reticulócitos em 60 hansenianos, com idades entre 27 a 80 anos e ingerindo doses diárias de 100 mg de DDS. Os autores encontraram níveis da atividade da NADH-redutase de metemoglobina de 43,54 para o sexo masculino com desvio padrão de 10,76 ( $10^4 \cdot A_{600}/\text{min}$ ) e 61,73 para o sexo feminino com desvio padrão de 14,14 ( $10^4 \cdot A_{600}/\text{min}$ ) Não foi encontrada correlação



significativa entre a atividade enzimática e a taxa de hemoglobina ou a contagem de reticulócitos<sup>14</sup>.

Tanishima e colaboradores, em 1985, apresentaram um estudo da metemoglobinemia hereditária devido à deficiência de citocromo *b<sub>5</sub>* redutase nos eritrócitos e em outras células sanguíneas de pacientes sem distúrbios neurológicos ou mentais. Foi encontrada atividade enzimática diminuída nos eritrócitos e nas outras células dos pacientes, embora não tenham encontrado distúrbios neurológicos ou mentais. Estes pacientes seriam classificados como tipo III, sendo que a determinação enzimática apenas nos leucócitos e plaquetas não é suficiente para classificar como tipo generalizado<sup>85</sup>.

Hegesh e colaboradores, em 1986, relataram um caso de paciente apresentando cianose, após dois meses de vida, tendo sido feito um estudo na atividade da NADH-citocromo *b<sub>5</sub>* redutase que apresentava-se normal. Os autores encontraram valores diminuídos de citocromo *b<sub>5</sub>*, confirmando que este elemento é de fundamental importância para o sistema de redução da metemoglobina *in vivo*<sup>33</sup>

Keuh e colaboradores, em 1986, descreveram um caso clínico cujo paciente procedente da China, apresentava deficiência de metemoglobina redutase, sendo que os autores citam como sendo o primeiro paciente devidamente documentado, no sudoeste asiático, portador desta deficiência enzimática<sup>45</sup>.

Borgese e colaboradores, em 1987, determinaram a concentração de NADH-citocromo *b<sub>5</sub>* redutase nos eritrócitos de pessoas normais e portadores de metemoglobinemia através de ensaio radioimunológico, concluindo que eram reduzidos os níveis de atividade da NADH-metemoglobina redutase nas células vermelhas, principalmente quando as taxas da enzima estavam diminuídas<sup>11</sup>.

Hafsia e colaboradores, em 1989, descreveram o caso de uma paciente portadora de cianose crônica, em ausência de doença cardiopulmonar, sendo diagnosticado ser a mesma portadora de uma deficiência de citocromo beta<sub>s</sub> redutase em forma homozigota<sup>28</sup>.

Jablonska-Skniecinska e colaboradores, em 1989, relataram a presença de deficiência da NADH-metemoglobina redutase em duas crianças, não portadoras de patologia cardíaca ou pulmonar<sup>37</sup>.

Zerez e colaboradores, em 1990, estudaram a redução da metemoglobina em hemácias de pacientes portadores de anemia falciforme e de talassêmicos. Os autores encontraram atividade aumentada da NADH-metemoglobina redutase nas células vermelhas dos portadores de talassemia, sendo que estas mesmas células apresentavam níveis aumentados da NADH, cofator na reação de redução da metemoglobina. A atividade desta enzima nos portadores de anemia falciforme foi semelhante aos indivíduos normais sendo que a NADH também não apresentava nível aumentado nas mesmas<sup>91</sup>.

Banzato e Magna, em 1991, efetuaram a determinação do efeito da sulfona, *in vitro*, sobre a atividade da NADH-metemoglobina redutase em suspensão de membranas de glóbulos vermelhos de doadores normais. Os autores determinaram a atividade enzimática em membranas incubadas ou não com sulfona, encontrando uma diferença significativa no sobrenadante das incubadas com a droga<sup>4</sup>. Foi utilizada a técnica de Stek e Kant para o preparo das membranas eritrocitárias<sup>82</sup>.

Chisholm e Stuart, em 1994, descreveram o caso de uma paciente do sexo feminino que possuía um pulso oxímetro de 82 %, anterior à indução anestésica para uma pequena cirurgia. Ao exame clínico detectou-se cianose sem outras anormalidades. A determinação da metemoglobina foi de 13,4 %, sendo diagnosticada ser a mesma portadora de uma deficiência congênita de metemoglobina redutase<sup>15</sup>.

Pesquisadores demonstraram que o tratamento com sulfona não aumenta a atividade da NADH-redutase no hemolisado<sup>50</sup> e também foi demonstrado *in vitro* que o tratamento de membrana de hemácias com sulfona aumentam a atividade enzimática no sobrenadante numa relação dose dependente<sup>4</sup>. Assim sendo, efetuamos um trabalho visando determinar a atividade da NADH-redutase em pacientes portadores de hanseníase, sob tratamento sulfônico, no hemolisado e na membrana da hemácia e comparar estes dados com um grupo de pessoas sadias que não ingerissem drogas oxidantes.

## **IV - CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODO**

### **IV.1 -CASUÍSTICA**

Amostra composta por 72 pacientes das mais variadas formas clínicas, submetidos a tratamento sulfônico, sendo 48 do sexo masculino e 24 do sexo feminino com idade variando entre 22 a 89 anos e idade média de 59,5 anos, ingerindo 100 mg ao dia de D.D.S.; e um grupo controle composto por 72 pessoas, sendo 48 do sexo masculino e 24 do sexo feminino, com idade entre 20 e 90 anos e idade média de 58,5 anos, não ingerindo medicamentos.

### **IV.2 - MATERIAL**

#### **IV.2.1-Aparelhos**

Contador de leucócitos Celm modelo 550

Diluidor de sangue Celm modelo

Microhematócrito Fanem modelo 210 IEC

Balança analítica Mettler modelo H80

Phametro digital PM600 Imbracrios  
Abba VP Super System Abbott  
Espectrofotômetro Celm Mod E 215-D  
Impressora Celm Mod SB-215-P  
Espectrofotômetro Coleman Junior II modelo 6-20 A  
Conversor Universal Bio Eng  
Centrífuga Celm Modelo LS 3  
Centrimicro Fanem Modelo 213 .100.300 Alta velocidade

#### **IV.2.2 - Acessórios**

Multipipette Eppendorf modelo 4780  
Pipeta Oxford Adjustable 10- 50 pl  
Pipeta Oxford Adjustable 40 - 200 µl  
Pipeta Oxford Sampler System 500 µl  
Pipeta SMI Micro-Pettor G 300 - 1000 µl  
Pipeta SMI Macro Petter H 1000-2000 µl  
Trompa de vácuo  
Tubos modelo Eppendorff  
Tubos de ensaio de polipropileno 10x75 mm opaco Difco  
Tubos cônicos graduados de 15 ml

#### **IV.2.3 – Reagentes**

$\text{Na}_2 \text{H PO}_4$  0,103 M  
 $\text{Na H}_2 \text{ PO}_4$  0,155 M  
 $\text{Na Cl}$  0,85 %  
 $\text{K H}_2 \text{ PO}_4$  0,1 M  
Tampão Fosfato M/15 M pH 6,6  
Tampão fosfato M/60 M pH 6,6  
EDTA 0,01 M  
KCN 10%  
Ácido Acético 12 %  
Ácido Tricloroacético a 12 %  
Tampão tris 1 M pH 7,55  
Tampão fosfato 20 mM OSM pH 7,40  
Cloridrato de N1-naftil-etileno diamina 0,1 %  
Sulfamato de amônio 1,5 %

Nitrito de Sódio a 0,3 %  
Diamino Difenil Sulfona 1 mg %  
2-6 Dichlorphenolindophenol  
NADH (Sigma)

### **IV.3 - MÉTODO**

Métodos utilizados:

#### **IV.3.1- Série Vermelha Completa**

A contagem de hemácias foi realizada no contador de células CC-550; a dosagem da hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina e determinada no mesmo aparelho. O hematócrito foi determinado pela técnica do microhematócrito; o VCM, CHCM e HCM foram calculados.

#### **IV.3.2- Contagem de Reticulócitos**

A coloração para a contagem de reticulócitos foi a do azul cresil brilhante em meio alcoólico, sendo feita a contagem em lâmina e correção pelo hematócrito<sup>80</sup>.

#### **IV.3.3- Dosagem da Sulfona**

A dosagem do DDS (4,4 diaminodifenil sulfona) total foi efetuada pela técnica descrita por Simpson modificado<sup>79</sup>, sendo utilizado sangue total do paciente colhido em EDTA.

#### **IV.3.4- Determinação da Atividade Enzimática no Hemolisado**

A atividade da NADH-metemoglobina reductase determinada pela técnica descrita por Scott<sup>73</sup> com algumas modificações, sendo determinada no hemolisado total e no sedimento de membranas eritrocitárias. Esta atividade foi determinada espectrofotometricamente em fluxo contínuo termostaticado, em 600 nm, por determinação cinética, com leituras feitas em intervalos de 1 minuto na variação da D.O. por 6 minutos.

Utilizamos o ACD (Ácido cítrico, citrato de sódio e glicose) como anticoagulante por proporcionar uma boa estabilidade enzimática.

A coenzima utilizada foi o NADH (Sigma) e o aceptor de H<sup>+</sup> o 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) (Merck).

Para o cálculo da atividade enzimática utilizamos o coeficiente de extinção de 20,1 para o DCIP e a fórmula para cálculo é a proposta por Campbell e Campbell<sup>13</sup>, com o resultado expresso em UI/litro e em UI/ grama de hemoglobina.

#### **IV.3.5 - Preparo das *Ghost Cells***

O preparo das membranas eritrocitárias seguiu a técnica descrita por Dodge e colaboradores<sup>21</sup>.

O isolamento da membrana do eritrócito é fundamental para o estudo da sua composição e através do uso de tampão fosfato 20 imOsm com pH 7,4 chega-se a uma condição ideal de preparação da membrana, livre de hemoglobina e com sua morfologia inalterada.

#### **IV.3.6- Determinação da Atividade Enzimática nas Membranas**

##### **Eritrocitárias**

Utilizamos a técnica de Scott<sup>73</sup> com algumas modificações.

O cálculo da atividade enzimática foi efetuado de acordo com a fórmula de Campbell e Campbell<sup>13</sup> e expresso em UI / mg de proteína.

#### **IV.3.7 - Determinação da Metemoglobina**

A metemoglobina foi determinada pela técnica de Evelyn e Malloy<sup>24</sup>.

A descrição detalhada das técnicas encontra-se no apêndice.

## V - RESULTADOS

Com relação ao grupo de pacientes portadores de hanseníase, obtivemos os seguintes resultados para as variáveis estudadas:

A idade média do grupo de pacientes foi de 59,54 anos e desvio padrão de 14,6 anos. Nos pacientes do sexo masculino esta média foi de 60,2 anos e desvio padrão de 13,6 anos, enquanto que nas do sexo feminino foi de 58,0 anos e desvio padrão de 16,4 anos.

A metemoglobina apresentou uma média de 1,50 % com desvio padrão de 0,74 %, sendo que no sexo masculino esta média foi de 1,51 % com desvio padrão de 0,71% e no sexo feminino 1,49% e desvio padrão de 0,82%.

A contagem média de hemácias foi de  $4,47 \times 10^6 / \text{mm}^3$  e desvio padrão de  $0,47 \times 10^6 / \text{mm}^3$ , hemoglobina média de 12,39 gramas/litro e desvio padrão de 2,09 gramas/litro e hematócrito médio de 39,01 % e desvio padrão de 5,43%. Os pacientes do sexo masculino apresentaram um número médio de hemácias de  $4,54 \times 10^6 / \text{mm}^3$ , desvio padrão de  $0,44 \times 10^6 / \text{mm}^3$ , hemoglobina de 12,7 g/litro, desvio padrão de 1,94 g/l, hematócrito de 39,7 % e desvio padrão de 5,09 %. As pacientes do sexo feminino apresentaram um número de hemácias de  $4,33 \times 10^6 / \text{mm}^3$ , desvio padrão de  $0,51 \times 10^6 / \text{mm}^3$ , hemoglobina de 11,6 g/l, desvio padrão de 2,19 g/l, hematócrito de 37,5 % e desvio padrão de 5,80 %.

Os índices hematológicos médios encontrados foram: Volume Corpuscular Médio (VCM) de  $86,86 \mu^3$  e desvio padrão de  $3,41 \mu^3$ , Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) de 27,47pg e desvio padrão de 2,12pg e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) de 31,63% e desvio padrão 1,65%. Os pacientes do sexo masculino apresentaram um VCM de  $87,2 \mu^3$  desvio padrão de  $3,27 \mu^3$ , HCM de 27,8 pg, desvio padrão de 1,94pg e CHCM de 31,9 %, desvio padrão de 1,44%. Nas pacientes do sexo feminino encontramos os seguintes resultados: VCM médio de  $86,1 \mu^3$  e desvio padrão de  $3,6 \mu^3$ , HCM médio de 26,6 pg e desvio padrão de 2,2 pg e CHCM médio de 30,8 % e desvio padrão de 1,8 %.

A contagem média de reticulócitos foi de 2,96 % e desvio padrão de 2,23% ou  $154.809 / \text{mm}^3$  e desvio padrão de  $121.621 / \text{mm}^3$  No sexo masculino esta média foi de 2,81% e desvio padrão de 2,37 %, sendo que no sexo feminino este valor médio foi de 3,25% e desvio padrão de 1,93%.

Com relação à dosagem da sulfona obtivemos uma média de 3,76 mg/litro e desvio padrão de 1,73 mg/litro. Nos pacientes do sexo masculino esta média foi de 3,48 mg/1 e desvio padrão de 1,43 mg/1, enquanto que no sexo feminino foi de 4,33 mg/1 e desvio padrão de 2,14 mg/1.

A densidade óptica média do hemolisado foi de 0,245 e desvio padrão de 0,043.

A atividade enzimática no hemolisado apresentou uma média de 65,62 UI/1 e desvio padrão de 14,69 UI/1. A média encontrada nos pacientes do sexo masculino foi de 63,87 UI/1 e desvio padrão de 15,80 UI/1 e no sexo feminino foi de 69,11 UI/1 e desvio padrão de 11,69 UI/1. Quando corrigida pela hemoglobina encontramos uma média de 5,45 UI/g. Hb/1 e desvio padrão de 1,54 UI/g Hb. Nos pacientes do sexo masculino a média foi de 5,12 UI/gHb e desvio padrão de 1,49 UI/g.Hb e nas do sexo feminino 6,09 UI/gHb e desvio padrão de 1,46 UI/gHb.

Com relação às membranas eritrocitárias obtivemos uma dosagem média da proteína total de 199,5 miligramas por litro e desvio padrão de 99,7 miligramas por litro. No grupo de pacientes do sexo masculino a dosagem de proteína foi de 174,4 mg/1 e desvio padrão de 83,7 mg/1 e nas do sexo feminino 238,2 mg/1 e desvio padrão de 128,2 mg/1.

A atividade enzimática média nas membranas eritrocitárias foi de 3,39 unidades/mg de proteína e desvio padrão de 1,56 unidades/mg de proteína. Nos pacientes do sexo masculino esta atividade foi de 3,54 unidades/mg de proteína e desvio padrão de 1,47 unidades/mg de proteína e nos do sexo feminino 4,25 unidades/mg de proteína e desvio padrão de 2,15 unidades/mg de proteína.

Para o cálculo da atividade enzimática utilizamos o coeficiente de extinção de 20,1 para o DCIP<sup>83</sup> e a fórmula de Campbell e Campbell<sup>13</sup>, onde leva-se em consideração o delta A da mostra por minuto, diâmetro da cuba (d), coeficiente de extinção (E), fator de conversão de moles por litro ( $10^6$ ), tempo de duração da leitura cinética (T), volume total reacional (Vt) e volume da amostra (Va).

$$(\Delta A \text{ amostra} / E \times d) \times 10^6 \times 1/T \times Vt / Va = \text{UI/1}$$

No apêndice o anexo 1 e 1 a apresenta os resultados individuais de todas as variáveis e o anexo 3, a média, desvio padrão, valores máximo e mínimo encontrados no grupo de hansenianos.

No grupo controle obtivemos os seguintes resultados:

A idade média das pessoas do grupo controle foi de 58,5 anos com desvio padrão de 14,2 anos. Nas pessoas do sexo masculino foi de 60,1 anos e desvio padrão de 13,7 anos e nas do sexo feminino 55,3 anos e desvio padrão de 14,9 anos.

A metemoglobina apresentou uma média de 0,43 % e desvio padrão de 0,29 %, sendo de 0,42% no sexo masculino com desvio padrão de 0,30% e de 0,45 % e desvio padrão de 0,28% no sexo feminino.

Os dados hematológicos médios encontrados foram Hemácias em número de  $4,88 \times 10^6/\text{mm}^3$  e desvio padrão de 0,43 milhões/ $\text{mm}^3$ ; hemoglobina de 14,59 gramas/litro e desvio padrão de 1,61 gramas/litro e hematócrito de 43,75 % e desvio padrão de 4,51 %. Com relação às pessoas do sexo masculino estes dados foram os seguintes: hemácias 4,96

milhões/mm<sup>3</sup> e desvio padrão de 0,47 milhões/mm<sup>3</sup>; hemoglobina 14,9 gramas/litro e desvio padrão de 1,77 gramas/litro; hematócrito de 44,5 % e desvio padrão de 4,96 %. As pessoas do sexo feminino apresentaram os seguintes valores: hemácias 4,71 milhões/mm<sup>3</sup> e desvio padrão de 0,26 milhões/mm<sup>3</sup>; hemoglobina de 13,9 gramas/litro e desvio padrão de 0,94 gramas/litro; hematócrito de 42,0 % e desvio padrão de 2,77 %.

Os índices hematológicos médios foram: Volume Corpuscular Médio 89,46  $\mu^3$  e desvio padrão 1,78  $\mu^3$ ; Hemoglobina Corpuscular Média 29,81 picogramas e desvio padrão de 1,27 picogramas e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média 33,29 % e desvio padrão de 1,13 %. No sexo masculino obtivemos os seguintes índices: VCM de 89,5  $\mu^3$  e desvio padrão de 2,07  $\mu^3$ ; HCM de 29,9 picogramas e desvio padrão de 1,39 picogramas e CHCM de 33,3 % e desvio padrão de 1,23 %. Nas pessoas do sexo feminino foram: VCM de 89,2  $\mu^3$  e desvio padrão de 0,92  $\mu^3$ ; HCM de 29,4 picogramas e desvio padrão de 0,90 picogramas e CHCM de 33,1 % e desvio padrão de 0,87 %.

A densidade óptica do hemolisado apresentou um resultado de 0.254 e um desvio padrão de 0,025. No sexo masculino esta densidade ótica foi de 0,255 e desvio padrão de 0,024 e no sexo feminino 0,251 e 0,028 respectivamente.

A atividade enzimática do hemolisado foi de 76,48 UI/1 com desvio padrão de 10,99 UI/1. Esta atividade enzimática foi de 76,15 UI/1 e desvio padrão de 10,91 UI/1 para os homens e 77,15 UI/1 e desvio padrão de 11,36 UI/1 para as mulheres. Efetuando-se a correção desta atividade pela hemoglobina obtivemos a média de 5,32 UI/gHb e desvio padrão de 1,09 UI/gHb. Nos pacientes do sexo masculino a média foi de 5,21 UI/gHb e desvio padrão de 1,21 UI/g.Hb e nas do sexo feminino 5,54 UI/gHb e desvio padrão de 0,80 UI/gHb.

Com relação às membranas eritrocitárias a média da proteína total foi de 199,76 mg/litro com um desvio padrão de 60,05 mg/litro. O grupo de pacientes do sexo masculino apresentou proteína total de 208,36 mg/litro e desvio padrão de 64,66 mg/litro e as do sexo feminino 175,62 mg/litro e desvio padrão de 45,85 mg/litro. A atividade enzimática média foi de 4,42 unidades e desvio padrão de 1,37 unidades, sendo que no grupo masculino foi de 4,27 unidades e desvio padrão de 1,52 unidades e no feminino de 4,95 unidades e desvio padrão de 1,13 unidades.

A contagem média de reticulócitos apresentou um resultado de 1,51 % e desvio padrão de 0,59 % ou 76.111/mm<sup>3</sup> e desvio padrão de 29.850/mm<sup>3</sup> No sexo masculino foi de 1,58 % ou 79.448/mm<sup>3</sup> e no feminino 1,37 % ou 68.995/mm<sup>3</sup>

No apêndice os anexos 2 e 2a apresenta os resultados individuais e o anexo4, a média, desvio padrão, máximo e mínimo encontrados no grupo controle.

Os resultados da atividade enzimática no hemolisado e nas membranas eritrocitárias de ambos os grupos estudados apresentaram uma distribuição normal.



## VI- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A idade média dos pacientes hansenianos de nossa amostra não apresentou diferença estatística significativa em relação as pessoas do grupo controle ( $t = -0,605$ ; n.s.). A maioria dos elementos destas amostras possuem idade entre 50 e 70 anos.

Com relação a dosagem da metemoglobina nos pacientes hansenianos, encontramos níveis superiores e significativamente diferente do grupo controle ( $t = -12,27$ ;  $p < 0,001$ ). Esta variável apresentou níveis médios de 1,5 % nos hansenianos, sendo que 26% dos pacientes apresentaram níveis acima de 2 %, enquanto que no grupo controle o nível médio foi de 0,42% e o nível máximo de 1,49 %, este nível médio é o citado por Henry<sup>71</sup>. O nível de metemoglobina no eritrócito é determinado pelo balanço entre a oxidação e a redução do ferro localizado no heme. Nas pessoas normais menos de 1 % do total de hemoglobina presente encontra-se sobre a forma de metemoglobina, isto porque a capacidade de redução excede a taxa espontânea de oxidação do heme<sup>72</sup>.

A contagem de hemácias ( $t = 7,40$ ;  $p < 0,001$ ), a dosagem da hemoglobina ( $t = 8,943$ ;  $p < 0,001$ ) e a determinação do hematócrito ( $t = 7,406$ ;  $p < 0,001$ ) no grupo de hansenianos apresentou valores inferiores e diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. Esses dados são coincidentes com relatos de literatura onde são mencionados uma anemia freqüente nos hansenianos<sup>50</sup>.

No grupo de pacientes hansenianos encontramos hemoglobina em nível igual ou abaixo de 12,0 gramas/litro em um total de 44% , sendo que o hematócrito estava igual ou abaixo de 37% em um total de 37,5% de pacientes. No grupo controle estes achados foram de 5,5% em ambas as variáveis.

As causas desta patologia podem ser devido ao constante e prolongado tratamento sulfônico e também por ser a hanseníase uma doença crônica e com várias intercorrências. A sulfona possui uma ação comprovadamente hemolítica embora isto não seja muito comum quando utilizam-se doses de 100 mg/dia, sendo mais comuns em doses altas como as utilizadas em outras patologias. Os níveis de glutathione redutase encontram-se diminuídos nos glóbulos vermelhos desses pacientes e é proporcional a dose diária<sup>65</sup>.

Os índices hematológicos, VCM ( $t = 6,483$ ;  $p < 0,001$ ), HCM ( $t = 9,367$ ;  $p < 0,001$ ) e CHCM ( $t = 8,556$ ;  $p < 0,001$ ) dos pacientes são inferiores ao grupo controle em consequência dos dados descrito no parágrafo anterior.

A contagem dos reticulócitos apresentou níveis superiores no grupo de pacientes em relação ao grupo controle, sendo justificado pela ação hemolítica da sulfona ( $t = -5,534$ ;  $p < 0,001$ ). Aproximadamente 44 % dos pacientes apresentaram número de reticulócitos acima do normal, sendo que no grupo controle apenas 2,7 % apresentaram níveis acima do

normal. A média de nossos pacientes foram superiores e estatisticamente diferente ( $t = 2,80$ ;  $p < 0,01$ ) que os apresentados por Caticha-Alfonso e colaboradores<sup>14</sup>.

Com relação a sulfonemia não encontramos diferença estatística significativa entre nossos valores e os encontrados por Magna e colaboradores<sup>50</sup> ( $t = 0,441$ ; n.s.) nas dosagens ambulatoriais realizadas pelo autor, porém com relação aos valores encontrados pelo mesmo autor, em pacientes internados, os nossos resultados foram inferiores e com diferença estatística significativa ( $t = 3,925$ ;  $p < 0,001$ ). Observou-se uma correlação negativa entre a sulfonemia e a CHCM neste grupo de pacientes.

A medida da densidade óptica do hemolisado no grupo de pacientes não apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ( $t = 1,80$ ; n.s.).

A atividade enzimática no hemolisado, medida como NADH-diaforase, apresentou um valor médio inferior no grupo de pacientes em relação ao grupo controle, quando não corrigida pela hemoglobina, sendo esta uma diferença estatisticamente significativa ( $t = 6,277$ ;  $p < 0,001$ ). Quando corrigida pela hemoglobina obtivemos um valor discretamente superior para os hansenianos porém estatisticamente não significativa ( $t = 0,722$ ; ns.)

A dosagem da proteína total nas membranas eritrocitárias não apresentou diferença estatística significativa entre os dois grupo estudados ( $t = 0,02$ ; n.s.).

A atividade enzimática no grupo de pacientes, medida como NADH-diaforase nas ghost cells, livres de hemoglobina, por grama de proteína, apresentou-se em níveis inferiores as do grupo controle. A diferença estatística foi significativa ( $t = 5,604$ ;  $p < 0,001$ ). Observou-se uma correlação negativa entre esta atividade e a metemoglobina neste grupo de pacientes.

Provavelmente a diferença entre os níveis de NADH-diaforase no grupo de pacientes em relação ao grupo controle nas membranas dos eritrócitos seja devida à constante ação oxidante da D.D.S. sobre a hemoglobina com maior produção de metemoglobina. Este pigmento anormal não atinge níveis tóxicos pela ação enzimática, que se encontra em níveis normais em nossos pacientes. A utilização desta enzima pela hemácia para manter seu equilíbrio provavelmente justifica sua menor concentração nas membranas eritrocitárias.

Com relação a atividade da NADH-redutase temos uma maior concentração enzimática na membrana eritrocitária das pessoas do grupo controle, sendo que no hemolisado não notamos diferença estatística significativa quando corrigida pela taxa de hemoglobina. O local de produção desta enzima é no retículo endoplasmático dos precursores da célula vermelha madura<sup>71</sup>. O glóbulo vermelho maduro durante sua maturação sofre uma diminuição no número de organelas citoplasmáticas (mitocôndrias, ribossomas) até a ausência total, perdendo desta forma a capacidade de repor as enzimas utilizadas para a redução da metemoglobina formada<sup>25</sup> quando da ação oxidante exercida pela sulfona. Isto é demonstrado

em publicação onde os autores encontraram menor atividade enzimática nos eritrócitos mais velhos de pessoas normais e nos pacientes portadores de deficiência da NADH-citocromo b5 redutase<sup>52</sup>.

A existência de correlação significativa e negativa entre os níveis médios de atividade enzimática das membranas eritrocitárias e a metemoglobina nos pacientes hansenianos (anexo 11) sugere que o menor nível desta atividade enzimática pode ser explicado pelo maior nível médio de metemoglobina encontrado nos mesmos. Tal fato não ocorre com o grupo controle (anexo 12).

Sabe-se que as enzimas encontradas no citoplasma e na membrana celular possuem a mesma identidade imunológica, sendo portanto reguladas por um mecanismo de controle genético semelhantes<sup>16</sup>. A enzima ligada à face interna da membrana celular é uma precursora da enzima solúvel encontrada no interior do glóbulo vermelho<sup>43</sup>, sendo liberada pela proteólise parcial da mesma<sup>16</sup> justificando desta maneira a menor concentração nas membranas destas células nos pacientes hansenianos.

No apêndice o anexo 4 apresenta os resultados médios das variáveis do grupo de hansenianos e do grupo controle, bem como os valores de "t" e de p. Os gráficos comparativos entre os dois grupos estudados encontram-se após o apêndice.

Em resumo os pacientes portadores de hanseníase apresentaram em relação ao grupo controle:

- 1- Níveis médios de hemácias, hemoglobina, hematócrito e índices hematimétricos inferiores..

- 2- Níveis médios de metemoglobina superiores.

- 3- Níveis médios de reticulócitos aumentados.

- 4- Atividade enzimática da NADH-redutase em níveis médios inferiores no hemolisado sem correção pela hemoglobina.

- 5- Quando estes dados foram corrigidos pela taxa de hemoglobina são estatisticamente idênticos.

- 6- Atividade da NADH-redutase em níveis médios inferiores nas membranas das *ghost cells*.

- 7- A sulfonemia não apresentou diferença estatística significativa em relação a resultados publicados por outros autores.

## VII-CONCLUSÃO

Considerando que os eritrócitos maduros não possuem capacidade produtora de NADH-redutase, por não possuírem organelas em seu interior.

Considerando que as pessoas portadoras de hanseníase ingerem por longo tempo uma dose de 100 miligramas diária de dapsona, uma droga comprovadamente oxidante e que leva a uma maior produção de metemoglobina, conseqüentemente a um maior consumo de NADH-redutase, principal enzima capaz de reduzi-la.

Considerando os dados deste trabalho, anteriormente citados, podemos concluir que, mesmo *in vivo*, a sulfona tem um efeito de aumento da solubilização da NADH-redutase, evidenciada, principalmente, pela observação da diminuição da sua atividade ligada à membrana nas ghost cells, quando comparada com o grupo controle.

Esse efeito se reflete na manutenção do nível de atividade da NADH-redutase semelhante ao grupo controle, quando dosada no hemolisado.

## SUMMARY

We measured in the blood samples of 72 adults leprosy patients who were ingesting 100 mg of dapsone/day, the levels of erythrocytes, hemoglobin, methemoglobin, sulfone and reticulocytes. NADH-methemoglobin reductase was measured in the hemolysate and ghost cells. All subjects were inpatients of Instituto Lauro de Souza Lima - Baum S.P. Brazil.

Identical tests, except sulfone were applied in the blood samples of 72 healthy individuals that not ingested oxidant drugs.

The means of the erythrocytes, hemoglobin, hematocrit and hematological indexes were among patients lower than healthy individuals, what is due to the hemolytic effect of dapsone. An important mechanism for oxidant drug-induced hemolysis is because some of these drugs generate hydrogen peroxide by their reaction with hemoglobin<sup>17</sup>.

The mean level of methemoglobin in the leprosy patients was higher than in the control group, and it's also due to the action of dapsone, which has great potential to cause an increased methemoglobin level<sup>50</sup>.

A balance between the oxidation and reduction of heme iron determines the level of methemoglobin in erythrocytes. The NADH cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase of the erythrocytes reduced the ferric cytochrome *b<sub>5</sub>* generated from nonenzymatically reduction of methemoglobin by ferrous form of cytochrome *b<sub>5</sub>*<sup>72</sup>.

In this work we measured NADH-reductase activity in hemolysate and intact ghost cell of the leprosy patients who were ingesting dapsone. The enzymatic activity was determined by spectrophotometric assays as previously described by Scott<sup>73</sup>, with slight modifications. We incubated the washed erythrocytes for 30 minutes in a solution containing 1% (wt/vol) NaNO<sub>2</sub><sup>67</sup>. The erythrocyte ghosts were prepared according to Dodge et al<sup>21</sup>.

The mean enzyme activity in the hemolysate of the leprosy patients and the healthy individuals has not differed significantly when expressed in UI/gr.Hemoglobin/1, but the mean enzyme activity in erythrocytes ghost from leprosy patients was significantly smaller than that erythrocyte ghosts from healthy individuals. The present observation may be explained by the increased level of methemoglobin in the erythrocyte cytoplasm of the patients.

The consumption of the NADH-reductase is increased and the erythrocytes did not produce more enzymes because that cell during the maturation stages develops extrusion of its nucleus and decrease it's number of ribosomes (cytoplasmic organelles) where this enzyme is likely produced<sup>6</sup>.

The NADH-methemoglobin reductase reduces cytochrome *b<sub>5</sub>*, which converts non-enzymically methemoglobin into hemoglobin<sup>83</sup>.

Hultquist et al, 1974, suggest the microsomal origin of this protein by comparing the trypsin-digest cytochrome *b<sub>5</sub>* of erythrocytes with trypsin solubilized cytochrome *b<sub>5</sub>* from human liver microsomes<sup>72</sup>.

The cytochrome *b<sub>5</sub>* and NADH-cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase, which constitute the methemoglobin reducing system of mature human erythrocytes, originate from the endoplasmic reticulum of nucleated red cell precursors. The solubilizing agent is possibly a protease provided by lysosomes of the immature red cells<sup>72</sup>.

It's us therefore likely that leprosy patients, the consumption of erythrocyte membrane and soluble cytoplasmic NADH-reductase enzyme is increased due to raising of the methemoglobin level.

The membrane NADH-reductase enzyme is a precursor form of the soluble cytoplasm enzyme and both are regulated by a similar related genetic control mechanism<sup>43</sup>.

Dapsone promotes the increase in enzyme activity in the supernatant of ghost suspension after treatment with the drug, and was dependent on Dapsone concentration<sup>4</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALLEN, D.W. and JANDL, J.H. - Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action. *J. Clin Invest.* 40:454-75, 1961.
- 2- BALAKRISHNAN, S.; KARTHIKEYAN, S. e RAMU, g. - Investigations into haemolytic effects of Dapsone therapy in leprosy patients. *Ind. J. Med* 61(1): 10-6, 1989.
- 3- BALSAMO, P.; HARDY, W.R. and SCOTT, E.M. - Hereditary methemoglobinemia due to diaphorase deficiency in Navajo Indians *J. Pediat.* 65(6): 928-31, 1964.
- 4- BANZATO, C.E.M. and MAGNA L.A. - In vitro effect of Dapsone on NADH-methemoglobin reductase. *Int. J. Lepros.* 59(3) : 486-7 , 1991.
- 5- BENESCH, E.; BENESCH, R. and YUNG, S. - Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal. Biochem.* 55: 2458, 1973.
- 6- BERNARD, J.; LÉVI, J.-P.; CLAUVEL, J.-P.; RAIN, J.D. and VARET, B.- Anatomia e fisiologia do eritrócito e da série eritroblástica. In *Manual de Hematologia*. Tradução por Hidelbrando Monteiro Marinho. Livraria Editora Santos : 15-35, 1989. Tradução de Abrégé d' Hématologie- 3ª edição Paris 1976.
- 7- BEUTLER, E. and BALUDA, M.C. - The role of methemoglobin in oxidative degradation of hemoglobin. *Acta Haemat.* 27(6): 321-33, 1962.
- 8- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_ - Metemoglobin reduction. Studies of the interaction between cell populations and of the role of methylene blue. *Blood* 22(3): 323-33, 1963.
- 9- BEUTLER, E.; WEST, C. and BLUME, K.G. - The removal of leukocytes and platelets from whole blood. *J. Lab. Clin. Med* 88(2): 328-33, 1976.

- 10- BLOOM, G.E. and ZARKOWSKY, H.S. - Heterogeneity of the enzymatic defect in congenital methemoglobinemia. *New Eng. J Med* 281(17): 919-22, 1969.
- 11- BORGESSE, N.; PIETRINI, G and GAETANI, S.- Concentration of NADH-cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase in erythrocytes of normal and methemoglobinemic individuals measured with a quantitative radioimmunoblotting assay. *J. Clin. Invest.* 80(5): 1296-302, 1987, Nov.
- 12- BUNN, H.F. - Distúrbios da hemoglobina - Metemoglobinemia- In *Medicina Interna* - HARRISSON, T.R. - volume 2 , 13ª Edição, Cap.306: 1823-4, 1995, Editora Mc Graw Hill- Interamericana.
- 13-CAMPBELL, J.M. and CAMPBELL, J B - Cálculo baseado no coeficiente de extinção molar de um produto de reação com absorvância. In - *Matemática de Laboratório- Cálculo de enzimas aplicações médicas e biológicas.* 3ª Edição- Livraria Roca Ltda São Paulo- S.P. página 214;1986.
- 14- CATICHA-ALFONSO, O.S.; MAGNA, L.A. e BEIGUELMAN, B. - NADH-redutase de metemoglobina e reticulocitose. *Ciência e Cultura* 37(2) : 280-3, 1985.
- 15- CHISHOLM, D.G. and Stuart, H. - Congenital methaemoglobinaemia detected by preoperative pulse oximetry. *Can. J Anaesth.* 41(6): 519-22, 1994.
- 16- CHOURY, D.; LEROUX, A and KAPLAN, J-C. - Membrane-bound cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase (methemoglobin reductase) in human erythrocytes. *J Clin. Invest.* 67: 149-51, 1981.
- 17- COHEN, G. and HOCHSTEIN, P. - Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. *Biochemistry* 3(7): 895-900, July 1964.
- 18- CONROY, J.M.; BAKER, J.D.; MARTIN, W.J.; BAILEY, M.K. and DORMAN, B. H. - Acquired methemoglobinemia from multiple oxidants. *Southern Med Journ.* 86(10): 1156-9, 1993.



- 19-CREAM, J.J. and SCOTT, G.L. - Anaemia in dermatitis herpetiformis. The role of Dapsone- induced haemolysis and malabsorption. *Br. J. Derm.* 82: 333-42, 1970.
- 20- DETTER, J.C.; ANDERSON, J.E. and GIBLETT, E.R.- NADH Diaphorase: An inherited variant associated with normal methemoglobin reduction. *Am. J. Hum. Genet.* 22:100-4, 1970.
- 21- DODGE, J.T.; MITCHELL, C. and HANAHAN, D.J. - The preparation and characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100(1): 119-30, 1963.
22. EDELHOCH, H.; HAYAISHI, O. and TEPLY, L.J. - The preparation and properties of a soluble diphosphopyridine nucleotide cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* 197(1): 97-104, 1952.
23. ENOMOTO, K-I. and SATO, R. - Assymmetric binding of cytochrome *b<sub>5</sub>* to the membrane of human erythrocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta* 466: 136-47, 1977.
24. EVELIN, K.A. and MALLOY, H.T. - Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *Journal of Biological Chemistry*, 126: 655-62, 1938.
25. FEIG, S.A; NATHAN, D.G.; GERALD, P.S. AND ZARKOWSKI, H.S. : Congenital methemoglobinemia- the result of age-dependent decay of methemoglobin reductase. *Blood* 39: 407, 1972.
26. FINCH, C. A. - Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia. *The New Engl. J. of Med.* 239(13) : 470-8, 1948.
27. FISHER, R.A.; POVEY, S.; BOBROW, M.; SOLOMON, E.; BOYD, Y. and CARRITT, B. - Assignment of the *DLAL* locus to chromosome 22. *Ann. Hum. Genet., Lond.* 41: 151-5, 1977.

- 28- HAFSIA, R; MEDDEB, B.; MTIMET, B.; HAFSIA, A.; GALACTEROS, F.; KAPLAN, J.C. and BOUSSEN, M. - Congenital cyanosis due to methemoglobin reductase deficiency: first reported Tunisian case. *Now. Rev. Fr. Hematol.* 31(5): 371-3, 1989.
- 29- HARLEY, J.D. and MAUER, A.M. - Studies on the formation of Heins bodies. I. Methemoglobin production and oxyhemoglobin destruction. *Blood* 16(6) : 1722-35, 1960.
- 30- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_ - Studies on the formation of Heins bodies. II. The nature and significance of Heins bodies. *Blood* 17(1) : 418-33, 1961.
- 31- HEGESH, E.; CALMANOVICI, N. and AVRON, M. - New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH-Methemoglobin Reductase) in erythrocytes. *J. Lab & Clin. Med.* **72 (1)** :339- 44, 1968.
- 32- HEGESH, H.; CALMANOVICHI, N.; LUPO, M. and BOCHKOWSKY R. - The diaphorase bands of human erythrocytes. *J Lab. Clin. Med* 77: 859-66, 1971.
- 33- HEGESH, E.; HEGESH, J. and KAFTORY, A. - Congenital methemoglobinemia with a deficiency of cytochrome *b<sub>5</sub>*. *New Engl. J. Med* 314(12): 757-61, 1986.
- 34- HENRY, J.B. - Hemoglobina. In: TODD; SANFORD; DAVIDSON *Diagnósticos Clínicos e Conduta Terapêutica por Exames Laboratoriais. 16a edição*, Volume I: 946-54, Editora Manole Ltda, 1982.
- 35- HOFFBRAND, A.V. e PETTIT, J.E. - *Hematologia clínica ilustrada*- Manual e atlas colorido- Editora Manole Ltda, pag. 4.6-7, 1991.
36. HUENNEKENS, F.M.; CAFFREY, RW.; BASFORD, RE and GABRIO, B.W. - Erythrocyte metabolism IV. Isolation and properties of methemoglobin reductase. *J. Biol. Chem.* 227: 261-72, 1957.
37. JABLONSKA-SKWIECINSKA, E.; WIERZBICKA, M and KUBICKA, K. - Cyanosis in children caused by inherited methemoglobinemia due to deficiency

of NADH-dependent methemoglobin reductase in erythrocytes. *Pediatr. Pol.* 64(1): 53-9, 1989.

- 38- JAFFÉ, E.R. - Hereditary methemoglobinemias associated with abnormalities in the metabolism of erythrocytes. *Am. J. Med.* 41:786-98, 1966.
- 39- \_\_\_\_\_ - The reduction of methemoglobin in human erythrocytes incubated with purine nucleosides. *Clin. Invest.* 38: 1555-63, 1959.
- 40- JAFFÉ, E.R.; NEUMANN, R.M.; ROTHBERG, H.; WILSON, F.T.; WEBSTER, R.M. and WOLFF, J.A. - Hereditary methemoglobinemia with and without mental retardation. *Am. J. Med* 41: 42-55, 1966.
- 41- JANDL, J.H.; ENGLE, L.K and ALLEN, D.W. - Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. I.- Heinz body anemias as an acceleration of red cell aging. *J. Clin. Invest.* 39: 1818-36, 1960.
- 42- KAPLAN, J-C. and BEUTLER, E. - Electrophoresis of red cell NADH- and NADPH-diaphorases in normal subjects and patients with congenital methemoglobinemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29(4): 605-10, 1967
- 43- KITAJIMA, S.; YASUKOCHI Y. and MINAKAMI, S. - Purification and properties of human erythrocyte membrane NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 210(1): 330-9, 1981.
- 44- KITAO, T.; SUGITA, Y.; YONEYAMA, Y and HATTORI, K.- Methemoglobin reductase (cytochrome b<sub>5</sub> reductase) deficiency in congenital methemoglobinemia. *Blood* 44(6): 879-84, 1974.
- 45- KUEH, Y.K.; CHIO, L.F. and GUAN, R. - Congenital enzymopenic methaemoglobi-naemia. *Ann. Acari Med Singapore* 15(2): 250-4, 1986.
- 46- KUMA, F.; ISHIZAWA, S.; HIRAYAMA, K and NAKAJIMA, H. - Studies on methemoglobin reductase. I- Comparative studies of diaphorases from normal and methemoglobinemic erythrocytes. *J. Biol. Chem.* , 247(2):550-5, 1972.

- 47- KUMA, F.; PROUGH, RA. and MASTER, B. S. S. - Studies on methemoglobin reductase. Immunochemical similarity of soluble methemoglobin reductase and cytochrome *b*<sub>5</sub> of human erythrocytes with NADH-cytochrome *b*<sub>5</sub> reductase and cytochrome *b*<sub>5</sub> of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 600-7, 1976.
- 48- LEROUX, A.; JUNIEN, C.; KAPLAN, J.-C. and BAMBERGER, J. - Generalised deficiency of cytochrome *b*<sub>5</sub> reductase in congenital methaemoglobinaemia with mental retardation. *Nature* 258(18): 619-20, 1975.
- 49- LEROUX, A.; TORLINSKI, L. and KAPLAN, J.C. - Soluble and microsomal forms of NADH-cytochrome *b*<sub>5</sub> reductase from human placenta: Similarity with NADH-methemoglobin reductase from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 481: 50, 1977.
- 50- MAGNA L. A. and BEIGUELMAN, B. - NADH- Methemoglobin reductase and methemoglobinemia among leprosy patients. *Mt. J. Lepr.* 52(4): 475-81, 1984.
51. MARCHESI, S.L.; STEERS, E.; MARCHESI, V.T. and TILLACK, T.W. - Physical and chemical properties of a protein isolated from red cell membranes. *Biochemistry* 9(1): 50-7, 1970.
52. MATSUKI, T.; TAMURA, M.; TAKESHITA, M. and YONEYAMA, Y. - Age-dependent decay of cytochrome *b*<sub>5</sub> and cytochrome *b*<sub>5</sub> reductase in human erythrocytes. *Biochem. J.* 194: 327-30, 1981.
53. MELDOLESI J.; CORTE, G.; PIETRINI, G. and BORGESE, N. - Localization and biosynthesis of NADH-cytochrome *b*<sub>5</sub> reductase, an integral membrane protein, in rat liver cells. *J. Cell Biol.* 85: 516-26, 1980.
54. MIHARA, K.; SATO, R.; SAKAKIBARA, R. and WADA, H. - Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-cytochrome *b*<sub>5</sub> reductase: Location of the hydrophobic, membrane-binding region at the carboxyl-terminal end and the masked amino terminus. *Biochemistry* 17(14): 2829-34, 1978.

- 55- MILLER, A. and SMITH, H.C. - The intracellular and membrane effects of oxidant agents on normal red cells. *British Journal of Haematology* 19: 417-28, 1970.
- 56- MILLS, G.C. and RANDALL, H.P. - Hemoglobin catabolism- II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 232: 589- 98, 1958.
- 57- MOLESWORTH, B.D. and NARAYANASWAMI, P.S. - The treatment of lepromatous leprosy with 4,4'-Diaminodiphenyl Sulfone in oil. Findings in 100 cases treated for one year, with a note on the technique of sulfone determinations by I.A. Simpson. *Int. J. Lepr.* 17(3):197-210, 1949.
- 58- NORDEEN, S.K.; LOPES BRAVO, L and SUNDARESAN, T.K. - Mise au point - nombre estimatif de cas de lèpre dans le monde. *Acta Lepr.* 8(3): 121-5, 1993.
- 59- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD- Una guía para el control de la lepra, 1988. Ministerio de Sanidad Y Consumo, Espanha.
- 60- PANIN, G.; PERNECHELE, M.; GIURIOLI, R; SECCHIERI, S.; MILANESI, O.; PELLEGRINO, P.A and CHIANDETTI, L. - Cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase activity in erythrocytes and leukocytes as related to sex and age. *Clin. Chem.* 30(5): 701-3, 1984.
- 61- PASSON, P.G. and HULTQUIST, D.E. - Soluble cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase from human erythrocytes. *Bioch. Biophys. Acta* 275: 62-73, 1972.
- 62-PETRAGNANI, N.; NOGUEIRA, O.C. and RAW, I. - Methemoglobin reduction through cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase. *Nature*, 184:1651, 1959.
- 63-RAPAPORT, S.I.- Hemoglobinopatias e síndromes talassêmicas. In : *Introdução à Hematologia*. Editora Harper & Row do Brasil Ltda, 5º capítulo: 54-70, 1978.
- 64- \_\_\_\_\_ - Metemoglobinemia . In: *Introdução à Hematologia*. Editora Harper & Row do Brasil Ltda, 5º capítulo: 109-10, 1978.

- 65 - RASBRIDGE, M.R. and SCOTT, G.L. - The haemolytic action of Dapsone : The Effect on Red-Cell Glycolysis . *Brit. J. Haemat.* 24:169-81, 1973.
- 66- RIEDER J. - Quantitative determination of the bacteriostatically active fraction of sulfonamides and the sum of their inactive metabolites in the body fluids. - *Chemotherapy* 17: 01-21, 1972.
- 67- ROSS, J.D. - Deficient activity of DPNH-dependent methemoglobin diaphorase in cord blood erythrocytes. *Blood* 21 (1) : 51-62, 1963.
- 68- ROSS, J.D. and DESFORGES, J.F. - Reduction of methemoglobin by erythrocytes from cord blood. *Pediatrics* 23: 718-26 , 1959.
- 69- SCHRIER, S.L. - Red cell membrane biology- In: *Clinics in Hematology* 14(1): 112, 1985.
- 70- SCHWARTZ, J.M. and JAFFÉ, E.R. - Hereditary methemoglobinemia with deficiency of NADH-dehydrogenase. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*(Stanbury, J.B.; Wyngaarden, J.B. & Fredricson, D.S. eds) 4a. edição., McGraw-Hill, Inc., New York 1452-64, 1978.
- 71- SCHWARTZ, J.M.; PARESS. P.S.; ROSS, J.M.; DIPILLO, F. and RIZEK R. - Unstable variant of NADH-methemoglobin reductase in Puerto Ricans with hereditary methemoglobinemia. *J. Clin. Invest.* 51: 1594-601, 1972.
- 72- SCHWARTZ, J.M.; REISS, A.L. and JAFFÉ, E.R. - Hereditary methemoglobinemia with deficiency of NADH-cytochrome *b*<sub>5</sub> reductase. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*(Stanbury, J.B.; Wyngaarden, J.B. & Fredricson, D.S. eds), McGraw-Hill, Inc., New York 1654-65, 1983.
- 73- SCOTT, E.M. - The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. *J. Clin. Invest.* 39: 1176-9, 1960,
- 74- \_\_\_\_\_ - A comparison of two methods of DPNH-methemoglobin reductase. *Clin. Chim. Acta* 23: 495-8, 1969.

- 75- SCOTT, E. M.; DUNCAN, I.W. and EKSTRAND, V. - The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*,240(1): 4815, 1965.
76. SCOTT, E.M. and GRIFFITH, I.V. - The enzymic defect of hereditary methemoglobinemia- diaphorase (Preliminary notes). *Biochem. and Biophys. Acta* 34: 584-6, 1959.
77. SCOTT, E.M. and HOSKINS, D.D. - Hereditary methemoglobinemia in Alaskan Eskimos and Indians. *Blood* 13(7) : 795-802, 1958.
78. SCOTT, E.M. and MCGRAW, J.C. - Purification and properties of diphosphopyridine nucleotide diaphorase of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 237(1): 249-52, 1962.
79. SIMPSON, I. A. - Appendix. Method of sulfone estimations. *Int. J. of Lepr.* 17(3): 208- 10, 1949.
80. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA (ed.), São Paulo. Enzimopatias eritrocitárias. In : *Manual de Técnicas e Recomendações Hematológicas*. Cap III (B): 125-23, 1975.
- 81- SPATZ, L. and STRITTMATTER, P. - A form of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome *b5* reductase containing both the catalytic site and an additional hydrophobic membrane-binding segment. *J. Biol. Chem.* 248(3): 793-9, 1973.
- 82- STECK, T.L. and KANT, J.A. - Preparation of impermeable ghost and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes.In: *Methods in Enzymology* Volume 31: Biomembranes, Part A. Fleischer. S. and Parker, L. eds. New York: Academic Press, 1974, pags. 172-80.
- 83- SUGITA, Y.; NOMURA, S. and YONEYAMA, Y. - Purification of reduced pyridine nucleotide dehydrogenase from human erythrocytes and methemoglobin reduction by the enzyme. *J. Biol. Chem.* 246(19): 6072-78, 1971.

- 84- TANISHIMA, K.; MATSUKI, T.; FUKUDA, N.; TAKESHITA, M and YONEYAMA, Y. - NADH- cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase in platelets and leukocytes with special reference to normal levels and to levels in carriers of hereditary methemoglobinemia with or without neurological symptoms. *Acta Haemat.* 63: 07-12, 1980.
- 85- TANISHIMA, K.; TANIMOTO, K.; TOMODA, A.; MAWATARI, K.; MATSUKAWA, S.; YONEYAMA, Y.; OHKUWA, H and TAKAZAKURA, E. - Hereditary methemoglobinemia due to cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase deficiency in blood cells without associated neurologic and mental disorders. *Blood* 66(6): 1288-91, 1985.
- 86- TOMODA, A.; IDA, M.; TSUJI, A. and YONEYAMA, Y. - Mechanism of methaemoglobin reduction by human erythrocytes. *Biochem. J.* 188(2): 535-40, 1980.
- 87- VAN ASSENDELFF, O.W. and ZIJLSTRA, W.G. - Extinction coefficients for use in equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal. Biochem.* 69: 43-8, 1975.
- 88- VIVES-CORRONS, J.L.; PUJADES, A.; VELA, E.; CORRETGER, J.M.; LEROUX, A. and KAPLAN, J.C. - Congenital methemoglobin-reductase (cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase) deficiency associated with mental retardation in a spanish girl. *Acta Haemat.* 59: 348-53, 1978.
- 89- ZAMUDIO, I. and CANESSA, M. - Nicotinamide-adenine-dinucleotide dehydrogenase activity of human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 120: 165-9, 1966.
- 90- ZAMUDIO, I.; CELLINO, M. AND CANESSA-FISCHER, M. - The relation between membrane structure and NADH:(acceptor) oxidoreductase activity of erythrocyte ghosts. *Arch. Biochim. Biophys.* 129: 336-45, 1969.
- 91- ZERES, C.R.; LACHANT, N.A. and TANAKA, K.R.- Impaired erythrocyte methemoglobin reduction in sickle cell disease: Dependence of methemoglobin reduction on reduced nicotinamide adenine dinucleotide content *Blood* 76(5): 1008-14, 1990.





Anexo 1 RESULTADOS DOS PACIENTES HANSENIANOS

NOME	REG.	IDADE	SEXO	METAHb	HEMACIAS	HEMOG.	HEMAT.	VCM	HCM	CHCM	RET%
G.P.N.	10051	56	MASC	0.97	4.10	11.6	35	85.3	28.2	33.1	1.15
J.O.	14473	42	MASC	2.09	4.90	14.8	44	89.7	30.2	33.6	1.56
A.R.F.	4669	53	FEM	2.53	5.00	15.0	45	90.0	30.2	33.5	1.5
M.C.J.	9806	71	FEM	1.99	4.30	10.8	37	86.0	25.1	29.1	5.34
A.L.B.	39404	22	FEM	2.05	3.20	7.2	25	78.1	22.5	28.8	2.66
A.P.S.	35229	63	MASC	0.51	4.00	9.7	34	85.0	24.2	28.5	1.13
M.C.F.	33156	67	MASC	1.26	4.10	11.1	36	87.8	27.0	30.8	5.04
V.M.N.	10052	50	FEM	0.79	3.30	7.7	27	81.8	23.3	28.5	4.32
M.A.C.	4072	60	FEM	2.06	4.20	11.4	35	83.3	27.1	32.5	6.68
J.A.A.	9483	60	MASC	2.42	5.40	16.5	49	90.7	30.5	33.6	1.63
J.A.	8894	50	MASC	1.69	5.20	15.0	47	90.3	28.8	31.9	1.35
J.P.O.	12044	50	MASC	3.50	4.20	11.4	36	85.7	27.1	31.6	5.44
A.A.A.	14621	64	FEM	2.20	5.30	15.4	48	90.5	29.0	32.0	1.92
C.M.L.	14602	38	FEM	2.85	4.60	13.2	41	89.1	28.6	32.1	5.92
H.F.N.	8808	73	MASC	0.25	4.40	11.9	39	88.6	27.0	30.5	2.94
G.A.O.	8622	71	FEM	0.26	4.50	11.9	40	888	26.4	29.7	2.04
I.S.O.	9784	60	FEM	0.65	4.90	13.8	44	89.7	28.1	31.3	1.85
E.L.S.	4979	54	FEM	0.47	4.90	13.0	44	89.7	26.5	29.5	1.56
O.J.N.	12693	39	MASC	0.46	5.50	16.1	50	90.9	29.2	32.2	1.33
H.C.S.	4981	53	MASC	1.69	5.40	15.5	49	90.7	28.7	31.6	1.74



Anexo 1a - RESULTADOS DOS PACIENTES HANSENIANOS

NOME	D.O.HEM.	DE/DT HEM.	ATIV.HEM.	ATIV.CORR.	PROT GHOST	DE/DT GHOST	ATIV.GHOST	SULFONA
G.P.N.	0.236	5.833	52.35	4.51	89.6	6.550	7.31	2.39
J.O.	0.209	7.166	64.31	4.34	334.2	10.516	3.15	2.40
A.R.F.	0.291	5.833	52.35	3.49	343.9	6.166	1.79	1.98
M.C.J.	0.266	9.000	80.77	7.48	491.7	7.500	1.53	5.12
A.L.B.	0.270	5.833	52.35	7.27	368.1	7.316	1.99	4.87
A.P.S.	0.266	8.666	77.77	8.02	89.6	7.716	8.61	2.81
M.C.F.	0.272	9.500	85.26	7.68	143.8	5.816	4.04	2.54
V.M.N.	0.277	8.333	74.78	9.71	138.7	6.450	4.65	4.74
M.A.C.	0.272	10.666	95.73	8.40	196.9	8.616	8.89	5.20
J.A.A.	0.287	9.666	86.75	5.26	171.5	6.400	3.73	3.88
J.A.	0.282	10.833	97.23	6.48	113.5	6.016	5.30	3.27
J.P.O.	0.311	10.833	97.23	8.53	233.6	3.966	1.70	2.74
A.A.A.	0.306	9.666	86.75	5.63	293.2	9.766	3.33	2.56
C.M.L.	0.267	7.833	70.30	5.33	241.1	8.433	3.50	1.94
H.F.N.	0.327	10.500	94.23	7.92	153.3	9.283	6.05	6.24
G.A.O.	0.245	7.500	67.31	5.66	188.6	9.283	4.92	6.04
I.S.O.	0.239	7.500	67.31	4.88	205.2	9.166	4.47	5.02
E.L.S.	0.238	7.333	65.81	5.06	240.5	8.650	3.60	6.39
O.J.N.	0.240	6.333	56.84	3.53	207.5	8.200	3.95	7.75
H.C.S.	0.259	6.833	61.32	3.71	214.6	7.950	3.70	6.87



Anexo 2 - RESULTADOS DO GRUPO CONTROLE

NOME	REG.	IDADE	SEXO	METAHb	HEMACIAS	HEMOG.	HEMAT.	VCM	HCM	CHCM
S.C.	20870	65	MASC	0.39	5.20	15.2	47	90.4	29.2	32.3
A.R.F.	20888	73	MASC	0.90	4.70	14.2	42	89.3	30.2	33.8
G.M.O.	20871	69	MASC	0.32	4.70	13.4	42	89.4	28.5	31.9
J.F.M.	20893	77	MASC	0.40	4.90	14.6	44	89.8	29.8	33.2
L.B.	20913	85	MASC	0.83	5.50	16.1	50	90.9	29.3	32.2
E.C.	20905	77	MASC	0.61	4.20	11.7	37	88.1	27.8	31.6
E.R.	20874	50	MASC	0.29	4.90	15.6	44	89.8	31.8	25.5
R.M.P.N.	20876	49	FEM	0.76	5.10	15.3	46	90.2	30.0	33.3
T.A.M.	20895	48	MASC	0.58	5.40	16.6	49	90.7	30.7	33.9
L.M.R.	20887	62	MASC	0.54	4.70	13.8	42	89.4	29.4	32.8
M.B.Z.		53	MASC	0.94	5.00	15.4	45	90.0	30.8	34.2
A.B.	20931	57	MASC	0.47	5.00	15.4	45	90.0	30.8	34.2
M.N.	20961	60	MASC	0.22	4.10	12.2	36	87.8	29.8	33.8
E.N.	20928	80	MASC	0.07	5.00	14.3	45	90.0	28.6	31.8
F.M.	20935	61	MASC	0.18	4.40	12.8	39	88.6	29.1	32.8
C.C.N.	20971	69	FEM	0.32	4.70	13.6	42	89.3	28.9	32.4
R.E.S.	20946	51	MASC	0.61	5.60	16.8	51	91.0	30.0	32.9
J.R.P.	21020	58	MASC	0.32	5.60	16.7	51	91.0	29.8	32.7
J.M.	20996	64	MASC	0.07	5.10	15.6	46	90.2	30.6	33.9
A.M.	20995	69	MASC	0.29	4.40	12.8	39	88.6	29.1	32.8

Anexo 2a - RESULTADOS DO GRUPO CONTROLE

NOME	D.O.HEM.	DE/DT HEM.	ATIV.HEM.	ATIV.CORR.	PROT GHOST	DE/DT GHOST	ATIV.GHOST
R.H.R.	0.280	8.333	74.78	5.38	156.6	81.16	5.18
C.Z.	0.318	9.333	83.76	5.66	223.7	94.16	4.21
M.M.L.	0.319	8.166	73.28	5.12	270.9	94.83	3.50
M.T.	0.315	8.166	73.28	4.58	260.9	84.66	3.25
F.C.C.	0.331	7.000	62.82	4.02	218.7	92.33	4.22
L.E.C.	0.325	7.166	64.31	4.73	288.3	98.16	3.41
J.O.R.	0.297	10.000	92.74	5.94	216.8	67.83	3.13
B.A.T.	0.251	7.666	68.80	4.00	140.1	71.16	5.12
O.C.C.	0.238	8.833	79.27	5.50	108.4	77.66	7.17
C.R.G.D.	0.240	8.666	77.77	5.59	150.7	87.00	5.77
P.M.B.	0.238	7.666	58.80	4.98	92.5	64.83	7.01
O.F.	0.233	7.000	62.82	4.08	153.4	7.383	4.81
A.G.R.	0.231	7.166	64.31	4.12	190.4	9.416	4.95
G.M.G.	0.241	6.833	61.32	4.29	185.1	9.516	5.14
W.A.M.	0.247	6.000	53.85	3.87	190.4	9.616	5.05
E.N.I.	0.238	7.166	64.31	4.32	169.2	10.400	6.15
J.I.F.	0.228	6.666	59.82	4.57	261.8	6.050	2.31
L.L.N.	0.235	8.166	73.29	5.51	132.2	9.566	7.24
N.M.	0.234	6.666	59.82	3.99	124.3	9.100	7.32
A.M.	0.256	6.500	58.33	3.62	240.6	10.283	4.27
S.G.	0.250	6.833	61.32	3.93	235.3	7.883	3.35
I.T.T.S.	0.259	7.000	62.82	4.79	228.7	8.316	3.64
M.A.S.G.	0.256	6.000	53.85	4.72	238.2	8.383	3.52
O.S.	0.272	6.333	56.83	3.42	306.5	8.516	2.78
J.S.	0.230	9.666	86.75	5.19	129.8	5.750	4.43
P.M.	0.266	8.166	73.28	4.98	139.4	8.283	5.94
R.S.F.	0.249	10.166	91.23	6.66	139.1	7.133	5.13
G.M.S.	0.257	8.333	74.78	4.64	126.6	7.900	6.24
G.C.	0.250	9.333	83.76	5.82	122.9	7.016	5.71
M.V.F.C.	0.265	10.333	92.74	7.13	187.8	8.133	4.33
R.M.	0.265	9.666	86.75	5.63	183.1	7.916	4.32
T.I.M.	0.187	8.666	77.77	5.93	122.9	7.666	6.24
LC.N.	0.234	9.833	88.25	6.69	155.3	9.916	6.39
O.R.	0.271	9.833	88.25	8.32	159.9	7.483	4.68
H.M.	0.260	9.666	86.75	6.33	157.6	8.683	5.51
J.F.L.	0.277	9.333	83.76	5.33	135.5	8.983	6.63
R.B.	0.225	9.333	83.76	4.93	100.8	7.466	7.41
J.M.P.V.	0.219	6.833	61.32	3.56	126.6	8.783	6.94
P.V.	0.212	7.333	65.81	4.33	138.4	5.766	4.17
M.A.S.T.	0.267	8.000	71.80	4.95	163.5	7.133	4.36
K.T.	0.225	9.000	80.77	9.85	133.3	6.850	5.14
M.E.K.O.	0.226	10.333	92.74	5.80	150.3	6.466	4.30
M.B.C.	0.233	9.333	83.76	6.07	157.6	8.150	5.17
E.T.C.	0.224	9.166	82.26	5.75	210.9	7.850	3.72
L.A.B.A.	0.257	9.166	82.26	6.38	181.8	8.083	4.45
W.M.	0.247	7.666	68.80	4.41	201.2	8.566	4.26
A.R.	0.234	7.000	62.82	3.95	181.8	8.633	4.75
A.G.	0.222	7.833	70.30	4.92	237.6	8.433	3.55
J.D.C.	0.255	7.833	70.30	4.34	244.8	8.700	3.55
J.M.R.	0.247	7.166	64.31	4.59	276.3	8.233	2.98
L.V.B.	0.242	9.500	85.26	5.43	247.3	7.483	3.03
C.J.S.B.	0.238	8.666	77.77	4.80	254.5	8.600	3.38

Anexo 2a -RESULTADOS DO GRUPO CONTROLE

NOME	D.O.HEM.	DE/DT HEM.	ATIV.HEM.	ATIV.CORR	PROT GHOST	DE/DT GHOST	ATIV.GHOST
S.C.	0.260	9.833	88.25	5.81	134.9	8.200	6.08
A.R.F.	0.269	9.666	86.75	6.11	170.6	8.083	4.74
G.M.O.	0.252	9.000	80.77	6.03	201.1	8.833	4.39
J.F.M.	0.256	8.666	77.77	5.33	308.1	6.916	2.25
L.B.	0.269	10.666	95.73	5.95	269.9	7.400	2.74
E.C.	0.234	9.500	85.26	7.29	264.8	7.350	2.78
E.R.	0.272	10.500	94.23	6.04	129.9	5.583	4.30
R.M.P.N.	0.265	9.666	86.75	5.67	249.5	7.716	3.09
T.A.M.	0.260	9.500	85.26	5.14	285.2	7.583	2.66
L.M.R.	0.249	9.333	83.76	6.07	275.0	7.516	2.73
M.B.Z.	0.265	8.333	74.78	4.86	239.3	8.583	3.59
A.B.	0.255	8.333	74.78	4.86	305.5	8.400	2.75
M.N.	0.261	8.333	74.78	6.13	236.8	8.050	3.82
E.N.	0.263	9.833	88.25	6.17	303.0	8.350	2.76
F.M.	0.264	8.666	77.77	6.08	236.8	8.583	3.63
C.C.N.	0.254	9.000	80.77	5.94	183.3	8.566	4.67
R.E.S.	0.262	9.000	80.77	4.81	198.6	8.516	4.29
J.R.P.	0.263	10.000	89.75	5.37	290.2	7.300	2.52
J.M.	0.268	9.333	83.76	5.37	292.8	7.766	2.65
A.M.	0.253	9.666	86.75	6.78	257.2	8.033	3.12



ANEXO 3 - VARIANTES DOS PACIENTES HANSENIANOS

	<i>MÉDIA</i>	<i>D.Padrão</i>	<i>C.V.</i>	<i>MÍNIMO</i>	<i>MÁXIMO</i>
IDADE (ANOS)	59,54	14,60	24,52	22,00	89,00
TEMPO TRAT(ANOS)	25,61	12,90	50,38	1,00	54,00
METAHB (%)	1,50	0,74	49,38	0,00	3,50
HEMACIAS (X10 <sup>6</sup> )	4,47	0,47	10,70	3,20	5,50
HEMOGLOBINA (g/dl)	12,39	2,09	16,86	7,20	16,50
HEMATÓCRITO. (%)	39,01	5,43	13,93	25,00	50,00
VCM (μ <sup>3</sup> )	86,86	3,41	3,93	77,70	91,00
HCM (pg%)	27,47	2,12	7,73	22,00	30,80
CHCM (%)	31,63	1,65	5,22	27,90	34,60
SULFONA (mg/l)	3,76	1,73	46,09	0,55	8,78
D.O.* HEMOLISADO	0,245	0,043	17,72	0,162	0,394
ATIV. HEMOLIS. (UI/l)	65,62	14,69	22,38	37,39	97,23
ATI.HEM.COR/Hb(UI/gHb/l)	5,45	1,54	28,30	2,56	9,71
PROT. GHOST (g/l)	199,52	99,72	53,18	66,60	514,70
ATIV. GHOST (u)	3,39	1,56	46,02	0,82	8,61
RETICULÓCITOS %	2,96	2,23	75,13	0,90	9,56
RETIC. ABSOL. (10 <sup>3</sup> )	154,80	121,62	78,56	46,20	602.700

n=72 \* D.O. = Densidade óptica

ANEXO 4- VARIANTES DO GRUPO CONTROLE

	<i>MÉDIA</i>	<i>D.PADRÃO</i>	<i>C.V.</i>	<i>MÍNIMO</i>	<i>MÁXIMO</i>
IDADE (ANOS)	58,50	14,22	24,31	20,0	90,0
METAHB. (%)	0,43	0,29	68,76	0,0	1,29
HEMACIAS (X10 <sup>6</sup> )	4,88	0,43	8,86	3,2	5,70
HEMOGLO (g/dl)	14,59	1,61	11,06	8,2	17,2
HEMATOC (%)	43,75	4,51	10,32	25,0	52,0
VCM (μ <sup>3</sup> )	89,46	1,78	1,99	78,1	91,2
HCM (pg%)	29,81	1,27	4,26	25,2	32,5
CHCM (%)	33,29	1,13	3,41	30,3	36,2
D.O.* HEMOLIS.	0,254	0,025	10,14	0,187	0,331
ATIV.HEM. (UI/l)	76,48	10,99	14,37	53,85	95,73
ATI.HEM.COR(UI/gHb/l)	5,32	1,09	20,63	3,42	9,85
PROT.GHO.(g/l)	199,76	60,05	30,06	92,5	308,1
ATIV GHO. (u)	4,42	1,37	31,02	2,25	7,41
RETI. %	1,51	0,59	39,42	0,95	5,15
RET. ABS. (10 <sup>3</sup> )	76,11	29,85	39,22	48,40	261,00

n= 72 \* D.O.= Densidade óptica

## ANEXO 5 - ANÁLISE DAS VARIÁVEIS

	GRUPO CONTROLE		GRUPO PACIENTES		<i>t</i>	<i>p</i>
	<i>MÉDIA</i>	<i>D. PADRÃO</i>	<i>MÉDIA</i>	<i>D.PADRÃO</i>		
IDADE	59,54	14,60	58,50	14,22	-0,605	n.s.
METAHb	1,50	0,74	0,43	0,29	-12,27	<0,001
HEMACIAS	4,47	0,47	4,88	0,43	7,400	<0,001
HEMOGLOBINA	12,39	2,09	14,59	1,61	8,943	<0,001
HEMATOCRITO	39,01	5,43	43,75	4,51	7,406	<0,001
VCM	86,86	3,41	89,46	1,78	6,483	<0,001
HCM	27,47	2,12	29,81	1,27	9,367	<0,001
CHCM	31,63	1,65	33,29	1,13	8,556	<0,001
D.O.HEMOLIS.	0,245	0,043	0,254	0,025	1,800	n.s.
ATIV.HEM. (UI/I)	65,62	14,69	76,487	10,99	6,277	<0,001
ATL.HEM.Cor Hb	5,45	1,54	5,32	1,09	0,722	n.s.
PROT.GHOST	199,52	99,72	199,76	60,05	0,020	n.s.
ATIV GHOST	3,39	1,56	4,42	1,37	5,604	<0,001
RETICULOC %	2,96	2,23	1,51	0,59	-5,534	<0,001
RETICULOC(10 <sup>3</sup> )	154,80	121,62	76,11	29,85	-5,490	<0,001
SULFONEMIA	3,76	1,73				

## ANEXO 6- TÉCNICAS UTILIZADAS

### 1-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

#### 1.a - PADRONIZAÇÃO DO HEMOLISADO.

Colher 5,0 ml de sangue em 1,0 ml de anticoagulante ACD.

Centrifugar a amostra para separar o plasma.

Lavar as hemácias 3 vezes em solução salina tamponada( 9 partes de S.F. e 1 parte 0,1 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) .

Adicionar as células igual volume de NaNO<sub>2</sub> a 1%, preparado na hora, agitar e deixar em repouso por 60 minutos.

Lavar as células por 5 vezes em 10 ml de salina tamponada (acima) para remover o excesso de nitrito. Preparar e ler todas as diluições em 600 nm contra água destilada.

#### 1.b - PREPARO E LEITURA DAS DILUIÇÕES

	Diluição	hemácias tratadas	água dest.	D.O.(600 nm)
1 -	1/100	0,1ml	10 ml.....	.606
2 -	1/150	0,1 ml	15 ml.....	.363

	Diluição	hemácias tratadas	água dest.	D.O.(600 nm)
3 -	1/200	0,05ml	10 ml .....	.272
4 -	1/250	0,05 ml	12,5 ml .....	.227
5 -	1/300	0,05 ml	15 ml .....	.200
6 -	1/350	0,05 ml	17,5ml .....	.152

### 1.c - ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO HEMOLISADO

Pipetar em um tubo de vidro 12x100 mm:

0,05 ml de DCIP 0,012 M ( 7,8 mg/2ml)

0,05 ml de tampão tris-HCl 1M

0,1 ml de EDTA 0,01M

3 ml do hemolisado ( todas as amostras), homogeneizar.

Adicionar 0,05 ml de NADH 0,0088 M ( 6,4 mg/ml) e homogeneizar.

Ler em 600 nm a cada 30 segundos, durante 5 minutos, em temperatura de 25 graus centígrados, contra um blank onde o hemolisado é substituído por 3 ml de água destilada.

<b>DILUIÇÃO</b>	<b>1/100</b>	<b>1/150</b>	<b>1/200</b>	<b>1/250</b>	<b>1/300</b>	<b>1/350</b>
0 .....	583	1.236	1.045	1.160	1.070	1.000
30 SEGUNDOS.....	569	1212	1.038	1.144	1.060	.985
1 MINUTO .....	561	1.190	1.015	1.127	1.040	.971
1 MIN. e 30 SEG .....	509	1.182	1.004	1.111	1.032	.955
2 MINUTOS .....	462	1.163	.989	1.099	1.015	.946
2 MIN.e30 SEG .....	453	1.132	.959	1.078	997	.933
3 MINUTOS.....	446	1.112	.935	1.062	.983	.921
3 MIN e 30 SEG .....	438	1.085	.916	1.047	.968	.910
4 MINUTOS.....	424	1.069	.902	1.033	.953	.899
4 MIN. e 30 SEG.....	415	1.043	.879	1.018	.938	.890
5 MINUTOS .....	405	1.016	.860	.997	.924	.882

### **1.d - Preparação do hemolisado**

Colher 5 ml de sangue para cada 1 ml de ACD ( 1,47 gramas de glicose, 1,32 gramas de citrato de sódio e 0,44 gramas de Acido cítrico). Após separação do plasma por centrifugação a 3500 rpm, efetuar a lavagem das células por 3 vezes em solução salina tamponada (9 partes de cloreto de sódio a 0,9 % e 1 parte de fosfato de potássio 0,1 M; pH 7,3-13,62 g/litro). Aspirar a película esbranquiçada sobre a camada de hemácias para a eliminação dos leucócitos<sup>9,51</sup>.

No passo seguinte, adicionar às células lavadas igual volume de salina tamponada, contendo nitrito de sódio a 1% e após homogeneização a mistura deve ficar em repouso por 60 minutos<sup>67</sup>.

Passado esse tempo, efetuar a lavagem por 5 vezes com salina tamponada gelada para remover-se o excesso de nitrito.

Para cada 0,1 ml de células oxidadas adicionar 1,9 ml de água destilada para obter-se o primeiro hemolisado. A partir desta diluição a 1/20 preparar uma nova diluição a 1/200, uma vez que esta diluição foi a que mostrou uma atividade enzimática linear na curva de calibração. Determinar a densidade óptica do hemolisado, medindo-se sua absorção em 600 nm.

### **1.e - Atividade enzimática do hemolisado**

Utilizar o método de Scott<sup>73</sup> para a determinação da diaforase eritrocitária. Em tubos de ensaio 12 x 75 adicionar 50 µl de Tris (hidróxido de metil) aminometano 1 M (pH 7,55-121,14 g/litro+50 ml HCl conc.), 100 µl de EDTA 0,01 M (0,186 g em 50ml) e 50 µl de DCIP (2,6- dicloroindofenol) 0,0012 M ( 0,395 g/ml).

No tubo referente ao desconhecido adicionar 3 mililitros do hemolisado diluído a 1/200.

No tubo utilizado como blank adicionar 2,78 ml de Água.

Iniciar a reação pela adição de 50 µl de difosfopiridina nucleotídeo (NADH) 0,0088 M (6,24 mg/ml). A densidade óptica deve ser medida a cada minuto de

intervalo, por um período de 6 minutos, em 600 nm em cubeta com fluxo termostatizado a 25 graus centígrados.

Para o cálculo da atividade enzimática utilizar o coeficiente de extinção de 20,1 para o DCIP<sup>83</sup> e a fórmula de Campbell e Campbell<sup>13</sup>.

$$(\Delta A \text{ amostra} / E \times d) \times 10^6 \times 1/T \times V_t / V_a = UI/l.$$

### **1.f- Preparo das ghost cells**

O sangue colhido em ACD deve ser centrifugado para separar o plasma e o botão leucocitário. Em seguida, lavar as células vermelhas com salina tamponada por 3 vezes. Ressuspender o sedimento em 10 ml de solução tampão fosfato 20 mOsm pH 7,4<sup>21</sup> e após agitação, aguardar 10 minutos antes da centrifugação a 4.500 rpm por 20 minutos. Aspirar o sobrenadante e aos 2 ml de sedimento adicionar novamente 10 ml de tampão fosfato 20 mOsm pH 7,4, seguida de nova centrifugação.

Após essa etapa, colocar os 2 ml de sedimento em tubo de Eppendorf e centrifugar a 22.000 g por 20 minutos. O sedimento das membranas eritrocitárias (ghost cells) deve ser lavado novamente, em tampão fosfato 20 mOsm pH 7,4 para obter-se um sedimento livre de hemoglobina e centrifugar a 22.000g por 20 minutos. Ressuspender esse sedimento em 1,2 ml de água destilada.

Proceder então a homogeneização apurada desta suspensão para obter-se uma mistura homogênea, a qual será utilizada para a dosagem da proteína total pela técnica da BIOLAB, no ABBA VP SS.

A atividade enzimática das membranas eritrocitárias deve ser determinada adicionando-se a 1 ml da suspensão de membrana, 50 ul de Tris-hidroximetil-aminometano 1 M (pH 7,55-12I,14 g/litro+50 ml HCl conc.), 100 pi de EDTA 0,01 M (0,186 g em 50ml) e 50 IA de DCIP 0,0012 M ( 0,395 g/ml). e 50 l de NADH 0,0088 M. Acionar o cronômetro e medir as densidades ópticas por 6 minutos em um espectrofotômetro com cubeta termostatizada a 25 graus centígrados, em fluxo contínuo para 1 ml de capacidade.

Para o cálculo da atividade enzimática utilizar o coeficiente de extinção de 20,1 para o DCIP<sup>83</sup> e a fórmula de Campbell e Campbell<sup>13</sup>.

$$(AA \text{ amostra} / E_x d) \times 106 \times 1/T \times V_t / V_a = UI/1.$$

## **2- Dosagem da Metemoglobina**

Uma amostra de 0,1 ml de sangue total colhido com EDTA, foi adicionado a 10 ml de tampão fosfato m/60, pH 6,6 (1,9 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2,72 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -M/15- diluir 1/4 para uso), e deixar em repouso por 5 minutos.

Ler em 635 mu, após acertar a densidade óptica em zero com água destilada, sendo esta densidade denominada L1. Adicionar 1 gota de solução neutralizada de cianeto de sódio (solução de cianeto de sódio a 10% é mistura em partes iguais com uma solução de ácido acético a 12%, devendo ser utilizada por uma hora) e após 2 minutos efetuar nova leitura no mesmo comprimento de onda contra o mesmo blank. Esta leitura é a L2. A diferença entre L1 e L2 é proporcional à concentração de metemoglobina . A fórmula para o cálculo da metemoglobina é a seguinte:  $M(g\%) = 100.(L1-L2) / 2,77^{24}$ .

## **3 - Dosagem da Sulfona ( método de Simpson<sup>57.79</sup> modificado)**

Em tubo de ensaio 15 x 150 mm pipetar:

0,5 ml de sangue total em EDTA

2,5 ml de água deionizada

2,5 ml de Ácido clorídrico 2 N.

Agitar vigorosamente por 30 segundos e acrescentar 2 ml de ácido tricloroacético a 12 % para a desproteinização.

Filtrar a mistura em papel de filtro comum. A 2 ml do filtrado acrescentar 50 microlitros de NaNO<sub>2</sub> a 0,3 % para a diazotação da sulfona.

Agitar e deixar em repouso por 3 minutos em temperatura ambiente. Adicionar 50 ul de sulfamato de amônio a 1,5 % para a remoção do excesso de nitrito.

Agitar e deixar em repouso por 2 minutos. Adicionar 50 microlitros de solução de cloridrato de N-1-naftil-etileno diamina a 0,1 % com a produção de uma cor púrpura.

Agitar, colocar no escuro por 20 minutos e ler em 550 nm, cubas 12 x 75 mm. Comparar o resultado com o obtido em uma curva padrão. O padrão de sulfona foi preparado de acordo com a técnica descrita por Rieder, J.<sup>66</sup>, onde 64 miligramas de D.D.S. pura foi dissolvida em 1 ml de NaOH 1N e adicionado 19 ml de tampão fosfato pH 8,0 (33,83 gramas de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O + 1,36 gramas de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + água deionizada qsp 1 litro).

Este padrão vale 320 miligramas por 100 mililitros e a partir desta solução foi preparado as demais soluções para a construção da curva de calibração.

#### **4 - Determinação do Hematócrito (microhematócrito)**

Encher 5/4 do tubo capilar para microhematócrito com sangue total em EDTA, e obstruir uma das extremidades.

Colocar no aparelho de microhematócrito e centrifugar por 5 minutos. Após este tempo fazer a leitura do tubo capilar em tabela própria.

Normal: feminino de 35 a 45 % homem de 36 a 52%

#### **5 - Dosagem da hemoglobina (automatizado)**

Efetuar a diluição do sangue total em EDTA no diluidor próprio para diluição de leucócitos e hemoglobina usando como diluente a solução salina tamponada Isocelm II.

Acrescentar 2 gotas de Celmlise II e aguardar 3 minutos. Efetuar a leitura no contador de leucócitos modelo CC-550.

Normal: mulheres 11,0 a 18,0 gramas % - homem 13,0 a 20,0 gramas %

## **6 - Contagem de hemácias (automatizado)**

Após efetuar a diluição para a contagem de leucócitos e dosagem da hemoglobina, e antes de colocar o celmlise II efetuar nova diluição para glóbulos vermelhos no diluidor. Agitar a diluição e efetuar a contagem no CC 550.

Normal: mulheres  $4,2$  a  $5,4 \times 10^6$  - homem  $4,5$  a  $6,0 \times 10^6$ .

## **7 - Contagem de reticulócitos (azul cresil brilhante)**

Colocar 2 gotas de azul-cresil brilhante em meio alcoólico e evaporar o álcool por aquecimento. Aguardar esfriar e acrescentar duas gotas de sangue total em EDTA. Após 15 minutos efetuar os esfregaços<sup>80</sup>.

Normal:  $0,8$  a  $2,0 \%$  ou  $35.000$  a  $120.000/ \text{mm}^3$ .

## **8- Índices Hematimétricos (cálculos)**

### **8.a - V.C.M.**

Divide-se o valor do hematócrito pelo número de hemácias ( $\times 106$ ).

Normal:  $83$  a  $93 \mu^3$ .

### **8.b - HCM**

Divide-se o valor da hemoglobina em gramas/dl pelo número de hemácias e multiplica-se por  $10^7$ .

Normal:  $27$  a  $31 \text{ pg}$ .

### **8.c - C.H.C.M.**

Divide-se o valor da hemoglobina em gramas/dl pelo hematócrito e multiplica-se por  $100$ .

Normal:  $32$  a  $36\%$ .



## ANEXO 7

### DADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS OBTIDOS

#### ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA MEMBRANA ERITROCITÁRIA NA HANSENÍASE

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
0 MIN.	.785	.662	.633	.621	.768	.383	.341	.783	.849	.645
1 MIN.	.705	.630	.541	.536	.701	.296	.256	.702	.756	.556
2 MIN.	.631	.613	.480	.471	.656	.241	.209	.645	.692	.510
3 MIN.	.596	.595	.452	.412	.622	.180	.172	.582	.642	.462
4 MIN.	.552	.581	.423	.377	.578	.153	.141	.548	.584	.428
5 MIN.	.522	.569	.391	.344	.542	.119	.119	.519	.551	.401
6 MIN.	.501	.556	.368	.312	.526	.092	.086	.482	.520	.372
	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20
0 MIN.	.793	.845	.416	.668	.485	.586	.598	.519	.598	.594
1 MIN.	.701	.732	.323	.545	.399	.417	.501	.428	.503	.487
2 MIN.	.632	.671	.275	.475	.332	.358	.457	.362	.443	.422
3 MIN.	.570	.623	.221	.412	.281	.301	.402	.320	.348	.379
4 MIN.	.541	.594	.192	.365	.234	.264	.366	.274	.284	.331
5 MIN.	.508	.561	.146	.328	.187	.235	.328	.244	.266	.298
6 MIN.	.488	.532	.125	.306	.139	.218	.301	.218	.235	.277
	#21	#22	#23	#24	#25	#26	#27	#28	#29	#30
0 MIN.	.648	.596	.697	.673	.578	.626	.691	.566	.441	.365
1 MIN.	.552	.502	.622	.580	.438	.528	.610	.480	.395	.329
2 MIN.	.441	.436	.562	.503	.349	.448	.551	.413	.360	.293
3 MIN.	.394	.376	.514	.446	.296	.393	.499	.361	.329	.266
4 MIN.	.358	.330	.478	.401	.269	.349	.455	.320	.304	.240
5 MIN.	.319	.295	.446	.367	.256	.313	.421	.290	.281	.220
6 MIN.	.299	.264	.421	.340	.250	.291	.390	.269	.263	.202
	#31	#32	#33	#34	#35	#36	#37	#38	#39	#40
0 MIN.	.764	.485	.568	.676	.621	.560	.586	.793	.600	.540
1 MIN.	.704	.441	.463	.576	.589	.518	.530	.721	.545	.493
2 MIN.	.651	.395	.389	.489	.558	.479	.476	.668	.494	.448
3 MIN.	.608	.363	.333	.422	.529	.443	.428	.618	.451	.406
4 MIN.	.568	.333	.294	.369	.500	.411	.386	.581	.413	.370
5 MIN.	.535	.310	.263	.325	.479	.382	.350	.549	.380	.339
6 MIN.	.505	.282	.241	.291	.456	.355	.321	.520	.353	.309

	#41	#42	#43	#44	#45	#46	#47	#48	#49	#50
0 MIN.	.507	.501	.510	.640	.675	.654	.555	.842	.768	.707
1 MIN.	.454	.435	.471	.529	.611	.617	.479	.620	.677	.587
2 MIN.	.409	.387	.433	.471	.552	.594	.417	.457	.610	.498
3 MIN.	.363	.341	.401	.421	.500	.570	.362	.331	.546	.382
4 MIN.	.329	.300	.369	.377	.458	.545	.310	.250	.493	.354
5 MIN.	.298	.264	.345	.341	.422	.527	.266	.186	.448	.297
6 MIN.	.271	.234	.331	.307	.391	.505	.225	.138	.409	.247

	#51	#52	#53	#54	#55	#56	#57	#58	#59	#60
0 MIN.	.692	.688	.714	.766	.718	.810	.867	.772	.866	.637
1 MIN.	.503	.442	.615	.566	.635	.687	.758	.632	.774	.474
2 MIN.	.367	.292	.544	.440	.566	.601	.660	.534	.699	.377
3 MIN.	.267	.190	.479	.333	.502	.529	.587	.463	.640	.323
4 MIN.	.189	.119	.421	.254	.444	.465	.526	.402	.591	.293
5 MIN.	.133	.075	.367	.187	.395	.409	.470	.353	.552	.280
6 MIN.	.087	.044	.321	.135	.348	.360	.428	.309	.517	.250

	#61	#62	#63	#64	#65	#66	#67	#68	#69	#70
0 MIN.	.701	.679	.387	.608	.605	.582	.600	.581	.586	.716
1 MIN.	.554	.596	.299	.558	.440	.441	.355	.401	.325	.458
2 MIN.	.440	.521	.227	.508	.309	.339	.222	.251	.151	.300
3 MIN.	.326	.457	.164	.471	.206	.254	.137	.150	.071	.231
4 MIN.	.254	.396	.109	.436	.123	.180	.087	.085	.045	.208
5 MIN.	.201	.343	.065	.402	.066	.123	.059	.047	.037	.200
6 MIN.	.184	.295	.026	.370	.019	.076	.043	.024	.036	.197

	#71	#72
0 MIN.	.823	.619
1 MIN.	.666	.427
2 MIN.	.541	.289
3 MIN.	.452	.209
4 MIN.	.391	.168
5 MIN.	.353	.149
6 MIN.	.331	.142

## ANEXO 8

## ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO HEMOLISADO NA HANSENÍASE

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
0 MIN.	.241	.237	.273	.275	.388	.237	.262	.244	.231	.255
1 MIN.	.229	.224	.259	.263	.378	.226	.254	.234	.221	.245
2 MIN.	.220	.214	.248	.256	.372	.219	.247	.225	.212	.239
3 MIN.	.213	.206	.239	.247	.364	.212	.239	.217	.202	.232
4 MIN.	.202	.199	.230	.240	.354	.205	.232	.208	.196	.227
5 MIN.	.192	.192	.224	.231	.348	.197	.228	.200	.190	.221
6 MIN.	.182	.185	.215	.223	.343	.191	.222	.192	.180	.214
	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20
0 MIN.	.527	.264	.265	.274	.274	.378	.281	.338	.325	.334
1 MIN.	.523	.254	.257	.262	.262	.372	.275	.328	.320	.331
2 MIN.	.515	.247	.251	.255	.255	.367	.271	.322	.315	.326
3 MIN.	.507	.239	.247	.248	.249	.362	.267	.316	.311	.322
4 MIN.	.499	.233	.242	.239	.245	.357	.263	.311	.307	.318
5 MIN.	.493	.224	.236	.233	.239	.352	.259	.305	.302	.313
6 MIN.	.487	.217	.229	.229	.234	.347	.255	.300	.298	.309
	#21	#22	#23	#24	#25	#26	#27	#28	#29	#30
0 MIN.	.293	.494	.500	.440	.461	.429	.428	.466	.469	.495
1 MIN.	.288	.485	.491	.431	.451	.421	.418	.459	.461	.486
2 MIN.	.282	.474	.484	.424	.444	.415	.413	.452	.455	.479
3 MIN.	.277	.466	.477	.418	.438	.408	.408	.447	.449	.472
4 MIN.	.272	.457	.471	.411	.432	.402	.403	.441	.444	.465
5 MIN.	.267	.448	.465	.405	.425	.397	.398	.435	.438	.458
6 MIN.	.262	.440	.459	.400	.420	.391	.394	.430	.434	.452
	#31	#32	#33	#34	#35	#36	#37	#38	#39	#40
0 MIN.	.467	.445	.426	.462	.510	.478	.433	.412	.674	.595
1 MIN.	.460	.436	.416	.452	.500	.470	.424	.403	.663	.583
2 MIN.	.453	.430	.410	.446	.493	.464	.417	.397	.654	.575
3 MIN.	.446	.425	.403	.439	.486	.458	.411	.391	.648	.568
4 MIN.	.440	.419	.398	.433	.479	.452	.405	.385	.641	.559
5 MIN.	.435	.414	.392	.427	.472	.446	.399	.380	.634	.551
6 MIN.	.429	.409	.386	.422	.465	.442	.394	.375	.627	.543

	#41	#42	#43	#44	#45	#46	#47	#48	#49	#50
0 MIN.	.522	.459	.440	.423	.546	.254	.545	.439	.399	.187
1 MIN.	.516	.453	.434	.417	.534	.239	.534	.431	.390	.178
2 MIN.	.510	.447	.429	.412	.525	.230	.526	.424	.384	.171
3 MIN.	.503	.442	.423	.407	.517	.222	.518	.416	.379	.165
4 MIN.	.497	.437	.418	.402	.509	.215	.510	.408	.370	.157
5 MIN.	.491	.432	.413	.398	.503	.208	.502	.400	.361	.149
6 MIN.	.485	.431	.409	.394	.496	.196	.493	.393	.354	.143

	#51	#52	#53	#54	#55	#56	#57	#58	#59	#60
0 MIN.	.231	.298	.212	.410	.223	.402	.207	.544	.193	.344
1 MIN.	.223	.280	.205	.400	.216	.390	.201	.533	.181	.337
2 MIN.	.218	.273	.199	.394	.209	.383	.195	.526	.172	.327
3 MIN.	.213	.267	.191	.387	.203	.375	.188	.518	.163	.318
4 MIN.	.207	.259	.186	.381	.197	.364	.186	.510	.155	.310
5 MIN.	.200	.248	.180	.374	.192	.356	.180	.501	.144	.307
6 MIN.	.195	.240	.177	.367	.188	.348	.172	.492	.136	.294

	#61	#62	#63	#64	#65	#66	#67	#68	#69	#70
0 MIN.	.374	.398	.458	.576	.359	.392	.331	.250	.218	.398
1 MIN.	.358	.386	.448	.564	.347	.381	.319	.240	.208	.388
2 MIN.	.346	.376	.435	.553	.338	.373	.308	.232	.200	.380
3 MIN.	.338	.367	.424	.543	.329	.366	.298	.224	.193	.373
4 MIN.	.329	.358	.413	.531	.319	.358	.287	.217	.186	.366
5 MIN.	.319	.349	.403	.520	.310	.351	.277	.210	.179	.360
6 MIN.	.310	.340	.393	.511	.301	.345	.268	.205	.173	.354

	#71	#72
0 MIN.	.206	.227
1 MIN.	.198	.218
2 MIN.	.191	.210
3 MIN.	.185	.204
4 MIN.	.179	.197
5 MIN.	.173	.191
6 MIN.	.168	.186

## ANEXO 9

## ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA MEMBRANA ERITROCITÁRIA - GRUPO CONTROLE

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
0 MIN.	.669	.782	.794	.799	.812	.739	.637	.680	.571	.531
1 MIN.	.381	.517	.529	.667	.632	.541	.306	.348	.245	.253
2 MIN.	.250	.364	.357	.564	.519	.408	.276	.270	.141	.101
3 MIN.	.202	.277	.290	.473	.432	.311	.260	.261	.112	.028
4 MIN.	.189	.238	.248	.403	.363	.239	.248	.259	.107	.022
5 MIN.	.184	.223	.233	.341	.312	.187	.236	.255	.106	.014
6 MIN.	.182	.217	.225	.291	.258	.150	.230	.253	.105	.009
	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20
0 MIN.	.658	.633	.693	.727	.666	.824	.763	.873	.670	.864
1 MIN.	.341	.328	.419	.364	.447	.593	.674	.460	.419	.633
2 MIN.	.279	.240	.266	.212	.276	.416	.611	.332	.253	.484
3 MIN.	.274	.204	.182	.169	.177	.310	.550	.311	.170	.378
4 MIN.	.271	.195	.146	.160	.126	.247	.494	.306	.136	.314
5 MIN.	.270	.192	.132	.158	.096	.215	.443	.301	.127	.271
6 MIN.	.269	.190	.128	.156	.089	.200	.400	.299	.124	.247
	#21	#22	#23	#24	#25	#26	#27	#28	#29	#30
0 MIN.	.728	.789	.588	.550	.491	.667	.483	.562	.672	.512
1 MIN.	.523	.523	.327	.329	.332	.460	.212	.375	.483	.252
2 MIN.	.381	.398	.181	.179	.240	.328	.104	.249	.361	.114
3 MIN.	.313	.326	.116	.098	.191	.246	.065	.170	.297	.054
4 MIN.	.281	.300	.093	.061	.163	.201	.057	.126	.266	.025
5 MIN.	.265	.292	.086	.044	.151	.178	.055	.101	.254	.024
6 MIN.	.255	.290	.085	.039	.146	.170	.055	.088	.251	.024
	#31	#32	#33	#34	#35	#36	#37	#38	#39	#40
0 MIN.	.488	.553	.599	.599	.652	.565	.618	.535	.475	.430
1 MIN.	.262	.379	.364	.491	.504	.407	.487	.345	.397	.283
2 MIN.	.127	.262	.210	.392	.386	.193	.381	.214	.325	.163
3 MIN.	.059	.178	.103	.319	.295	.119	.301	.120	.266	.086
4 MIN.	.027	.137	.039	.246	.221	.064	.242	.064	.212	.032
5 MIN.	.016	.109	.025	.194	.169	.042	.199	.028	.167	.012
6 MIN.	.013	.093	.004	.150	.131	.026	.170	.008	.129	.002

	#41	#42	#43	#44	#45	#46	#47	#48	#49	#50
0 MIN.	.568	.550	.888	.934	.979	.961	.996	.990	.955	.896
1 MIN.	.468	.254	.594	.521	.662	.690	.708	.675	.680	.735
2 MIN.	.386	.207	.466	.485	.538	.543	.548	.538	.523	.619
3 MIN.	.264	.174	.416	.478	.504	.478	.494	.495	.458	.534
4 MIN.	.186	.167	.402	.471	.501	.454	.480	.487	.442	.473
5 MIN.	.167	.165	.400	.466	.499	.449	.479	.485	.438	.431
6 MIN.	.157	.162	.399	.463	.494	.447	.478	.484	.433	.402

	#51	#52	#53	#54	#55	#56	#57	#58	#59	#60
0 MIN.	.983	.934	.547	.571	.612	.470	.474	.494	.664	.641
1 MIN.	.670	.761	.214	.277	.308	.290	.240	.204	.392	.316
2 MIN.	.557	.630	.089	.154	.144	.156	.108	.088	.351	.217
3 MIN.	.540	.540	.078	.102	.102	.092	.051	.063	.335	.193
4 MIN.	.536	.480	.060	.090	.092	.066	.036	.057	.334	.184
5 MIN.	.535	.442	.057	.086	.090	.059	.032	.055	.331	.180
6 MIN.	.534	.418	.055	.086	.088	.055	.030	.053	.329	.178

	#61	#62	#63	#64	#65	#66	#67	#68	#69	#70
0 MIN.	.494	.465	.685	.554	.664	.522	.547	.611	.587	.487
1 MIN.	.229	.191	.449	.266	.357	.289	.343	.340	.395	.349
2 MIN.	.088	.039	.296	.121	.198	.131	.192	.188	.250	.232
3 MIN.	.051	.025	.220	.068	.145	.058	.102	.128	.161	.157
4 MIN.	.044	.018	.188	.054	.135	.036	.055	.109	.109	.106
5 MIN.	.042	.016	.175	.052	.126	.026	.040	.104	.092	.071
6 MIN.	.039	.014	.170	.050	.121	.021	.032	.097	.076	.049

	#71	#72
0 MIN.	.508	.606
1 MIN.	.270	.388
2 MIN.	.132	.254
3 MIN.	.071	.181
4 MIN.	.054	.147
5 MIN.	.048	.131
6 MIN.	.042	.124

## ANEXO 10

## ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO HEMOLISADO NO GRUPO CONTROLE

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
0 MIN.	.376	.383	.379	.354	.476	.376	.296	.267	.443	.242
1 MIN.	.371	.371	.370	.343	.473	.368	.287	.257	.429	.231
2 MIN.	.358	.363	.362	.335	.466	.360	.273	.249	.420	.222
3 MIN.	.350	.353	.354	.327	.458	.353	.262	.242	.411	.213
4 MIN.	.342	.344	.346	.319	.450	.346	.252	.235	.403	.205
5 MIN.	.334	.336	.338	.312	.442	.340	.243	.228	.396	.197
6 MIN.	.326	.327	.330	.305	.434	.333	.234	.221	.390	.190
	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20
0 MIN.	.276	.314	.217	.189	.237	.210	.215	.339	.406	.389
1 MIN.	.269	.306	.209	.180	.231	.202	.208	.329	.397	.381
2 MIN.	.260	.298	.201	.173	.224	.194	.200	.320	.391	.374
3 MIN.	.252	.291	.194	.167	.218	.187	.194	.312	.384	.368
4 MIN.	.244	.285	.187	.161	.212	.180	.187	.305	.378	.361
5 MIN.	.237	.278	.180	.154	.206	.173	.181	.298	.372	.356
6 MIN.	.230	.272	.174	.148	.201	.167	.175	.290	.366	.350
	#21	#22	#23	#24	#25	#26	#27	#28	#29	#30
0 MIN.	.395	.228	.231	.240	.269	.281	.475	.288	.334	.304
1 MIN.	.384	.220	.224	.234	.255	.271	.456	.276	.317	.280
2 MIN.	.378	.213	.217	.226	.242	.262	.446	.267	.306	.271
3 MIN.	.372	.205	.211	.219	.234	.254	.438	.259	.299	.264
4 MIN.	.366	.198	.205	.213	.226	.246	.430	.251	.291	.256
5 MIN.	.360	.192	.200	.207	.219	.239	.421	.244	.284	.249
6 MIN.	.354	.186	.195	.202	.211	.232	.414	.238	.278	.242
	#31	#32	#33	#34	#35	#36	#37	#38	#39	#40
0 MIN.	.293	.184	.275	.255	.282	.363	.253	.503	.222	.252
1 MIN.	.278	.165	.254	.238	.263	.350	.232	.490	.209	.242
2 MIN.	.268	.157	.244	.228	.254	.338	.224	.484	.203	.233
3 MIN.	.258	.150	.236	.219	.245	.332	.217	.478	.196	.226
4 MIN.	.250	.144	.230	.211	.238	.323	.210	.473	.189	.219
5 MIN.	.243	.138	.222	.203	.230	.314	.204	.467	.185	.211
6 MIN.	.235	.132	.216	.196	.224	.307	.197	.462	.178	.204

	#41	#42	#43	#44	#45	#46	#47	#48	#49	#50
0 MIN.	.247	.262	.466	.412	.268	.264	.240	.250	.301	.306
1 MIN.	.232	.245	.451	.396	.255	.250	.230	.240	.291	.297
2 MIN.	.221	.233	.440	.386	.245	.242	.222	.231	.282	.289
3 MIN.	.213	.225	.430	.379	.236	.236	.215	.223	.275	.282
4 MIN.	.206	.215	.423	.371	.228	.229	.209	.216	.268	.275
5 MIN.	.200	.207	.416	.364	.220	.223	.203	.210	.261	.269
6 MIN.	.193	.200	.410	.357	.213	.218	.198	.203	.254	.263

	#51	#52	#53	#54	#55	#56	#57	#58	#59	#60
0 MIN.	.303	.498	.372	.359	.266	.250	.405	.277	.486	.402
1 MIN.	.287	.481	.361	.346	.250	.235	.385	.266	.466	.387
2 MIN.	.275	.473	.348	.336	.239	.226	.375	.255	.451	.377
3 MIN.	.267	.466	.337	.326	.231	.218	.365	.246	.445	.367
4 MIN.	.260	.459	.329	.318	.225	.211	.356	.236	.438	.358
5 MIN.	.252	.453	.320	.309	.218	.204	.349	.228	.430	.351
6 MIN.	.246	.446	.313	.301	.212	.198	.341	.220	.423	.344

	#61	#62	#63	#64	#65	#66	#67	#68	#69	#70
0 MIN.	.433	.395	.412	.505	.494	.501	.443	.521	.433	.442
1 MIN.	.417	.386	.398	.490	.484	.484	.426	.505	.418	.420
2 MIN.	.408	.374	.389	.480	.474	.472	.418	.496	.408	.411
3 MIN.	.396	.365	.382	.472	.465	.465	.412	.488	.402	.405
4 MIN.	.390	.356	.376	.466	.457	.457	.404	.481	.393	.396
5 MIN.	.383	.347	.369	.459	.450	.449	.398	.474	.386	.389
6 MIN.	.376	.339	.362	.452	.444	.442	.391	.467	.379	.382

	#71	#72
0 MIN.	.664	.450
1 MIN.	.648	.434
2 MIN.	.636	.424
3 MIN.	.628	.414
4 MIN.	.621	.406
5 MIN.	.614	.398
6 MIN.	.608	.392



ANEXO 11

**ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS DOS HANSENIANOS**

Nos anexos apresentamos uma análise de correlação das variáveis comuns dos hansenianos.

	idade	sexo	metahb	hemac.	hemog.	hemat.	vcm	hcm	chcm	sulfona	at_Hem
idade	1.0000										
sexo	.0711	1.0000									
metahb	-.1302	.0092	1.0000								
hemac	-.1533	.2052	.2309	1.0000							
hemog.	-.1564	<b>.2408</b>	<b>.3252</b>	<b>.9578</b>	1.0000						
hemat.	-.1629	.1982	<b>.2465</b>	<b>.9909</b>	<b>.9648</b>	1.0000					
VCM	-.1456	.1495	<b>.2397</b>	<b>.8497</b>	<b>.8679</b>	<b>.9101</b>	1.0000				
HCM	-.1141	<b>.2824</b>	<b>.3752</b>	<b>.7522</b>	<b>.9032</b>	<b>.7804</b>	<b>.7727</b>	1.0000			
CHCM	-.0742	<b>.3199</b>	<b>.3575</b>	<b>.4830</b>	<b>.6785</b>	<b>.4800</b>	<b>.4091</b>	<b>.8761</b>	1.0000		
Sulfona	.1369	<b>-.2335</b>	-.1889	-.0651	-.1396	-.0797	-.1527	<b>-.2796</b>	<b>-.2954</b>	1.0000	
at_hem.	-.0916	-.1692	.03106	.1120	.0628	.1241	.1299	-.0295	.1100	.0666	1.0000
D.O.hem.	-.1355	-.1540	<b>.2393</b>	.1822	.1918	.1972	.2083	.1531	.0623	.0132	<b>.3602</b>
Prot_gh	<b>-.3522</b>	<b>-.3227</b>	.1417	.0568	.0388	.0575	.0370	-.0112	-.0605	-.0703	.1587
ativ_gh	.2185	.0794	<b>-.2866</b>	-.0340	-.0352	-.0257	.0035	-.0603	-.0813	.2213	.0500
ret.(%)	.1667	-.0976	-.1021	<b>-.3619</b>	<b>-.4063</b>	<b>-.3529</b>	<b>-.2637</b>	<b>-.4042</b>	<b>-.4301</b>	-.0076	.1230
ret.(abs)	.1525	-.0932	-.1122	<b>-.3840</b>	<b>-.4307</b>	<b>-.3769</b>	<b>-.2926</b>	<b>-.4284</b>	<b>-.4438</b>	-.0162	.1124
at.c.hem.	.1603	.2989	.1732	-.5447	-.6075	-.5384	-.4699	-.6202	-.5404	-.1673	.9997

n=72 valor crítico + ou - .2317 (p<0.05) at.c.hem.= atividade corrigida do hemolisado pela Hb.

	D.O. HEMOL.	PROT_GHOST	ATIV_GHOST	RETICUL. %	RETICUL.(abs)	at.c.hem
D.O. hemol	1.0000					
prot_gh	<b>.2446</b>	1.0000				
ativ_gh	.0980	<b>-.6239</b>	1.0000			
reticul (%)	-.2083	.0258	-.0425	1.0000		
ret(absol)	-.2197	.0208	-.0398	<b>.9942</b>	1.0000	
at.c.hem.	.3608	.1592	.0238	.1230	.1124	1.0000

n=72 valor crítico + ou - .2317 (p<0.05) at.c.hem.= atividade corrigida do hemolisado pela Hb.

ANEXO 12

**ANALISE DE CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO GRUPO CONTROLE**

Nos anexos apresentamos a análise de correlação das variáveis comuns do grupo controle.

	idade	sexo	metahb	hemac.	hemog.	hemat.	vcm	hcm	chem	at_Hem
idade	1.0000									
sexo	.1648	1.0000								
metahb	-.1004	-.0602	1.0000							
hemac	-.1293	<b>.2787</b>	-.0367	1.0000						
hemog.	-.2104	<b>.2933</b>	-.1068	<b>.9492</b>	1.0000					
hemat.	-.1392	<b>.2628</b>	-.0464	<b>.9977</b>	<b>.9564</b>	1.0000				
VCM	-.1739	.0884	-.1313	<b>.8345</b>	<b>.8605</b>	<b>.8678</b>	1.0000			
HCM	<b>-.3116</b>	.1881	-.2163	<b>.4791</b>	<b>.7254</b>	<b>.5093</b>	<b>.6411</b>	1.0000		
CHCM	<b>-.2576</b>	.1288	-.2063	.1300	<b>.4199</b>	.1485	<b>.2338</b>	<b>.8578</b>	1.0000	
at_hem.	.1576	-.0430	.1211	.0012	-.0506	-.0014	-.0288	-.1357	-.1733	1.0000
D.O.hem.	-.2148	.0797	<b>.2715</b>	.0605	.0916	-.0608	-.0773	-.1318	.1151	.0894
Prot.gh.	.1079	<b>.2371</b>	.1145	.0340	.0561	.0416	.0969	.1004	.0720	-.0674
ativ_gh	-.1553	-.2240	-.1323	.0019	-.0243	-.0004	-.0213	-.0775	-.0930	-.0806
ret(%)	-.1879	.1803	.0375	.1427	.1677	.1445	.1183	.1574	.1303	-.0522
ret(abs)	-.1792	.1774	.0628	.1118	.1365	.1124	.0782	.1352	.1256	-.0547
at.c.hem.	<b>.2401</b>	-.1440	.1823	<b>-.6165</b>	<b>-.6891</b>	<b>-.6321</b>	<b>-.6698</b>	<b>-.5973</b>	<b>-.3809</b>	<b>.7289</b>

n=72 valor crítico + ou - .2317 (p<0.05) at.c.hem.=atividade corrigida do hemolisado pela hemoglobina

	D.O. HEMOL.	PROT_GHOST	ATIV_GHOST	RETICUL. %	RET.(ABS)	AT.C.HEM.
D.O. hemol	1.0000					
prot_gh	<b>.3855</b>	1.0000				
ativ_gh	<b>-.3194</b>	<b>-.8951</b>	1.0000			
reticul (%)	.2113	.1533	-.0900	1.0000		
ret(absol)	.2229	.1555	-.0970	<b>.9973</b>	1.0000	
at.c.hem.	-.0216	-.1105	-.0225	-.1472	-.1230	1.0000

n=72 valor crítico + ou - .2317 (p<0.05) at.c.hem.: atividade corrigida do hemolisado pela hemoglobina

## **FICHA DE IDENTIFICAÇÃO -**

NOME:

REGISTRO No.:-

SEXO

IDADE:-

TEMPO DE DOENÇA:-

FORMA CLÍNICA:-

TEMPO DE TRATAMENTO:-

DOSE DIÁRIA:-

### **VARIÁVEIS AVALIADAS**

HEMATIMETRIA:-

DOSAGEM DE HEMOGLOBINA:-

HEMATÓCRITO:-

HCM:-

VCM:-

CHCM:-

CONTAGEM DE RETICULÓCITOS:-

METAHEMOGLOBINA:-

SULFONEMIA:-

D.O. SUBSTRATO:

METAHEMOGLOBINA:

REDUTASE

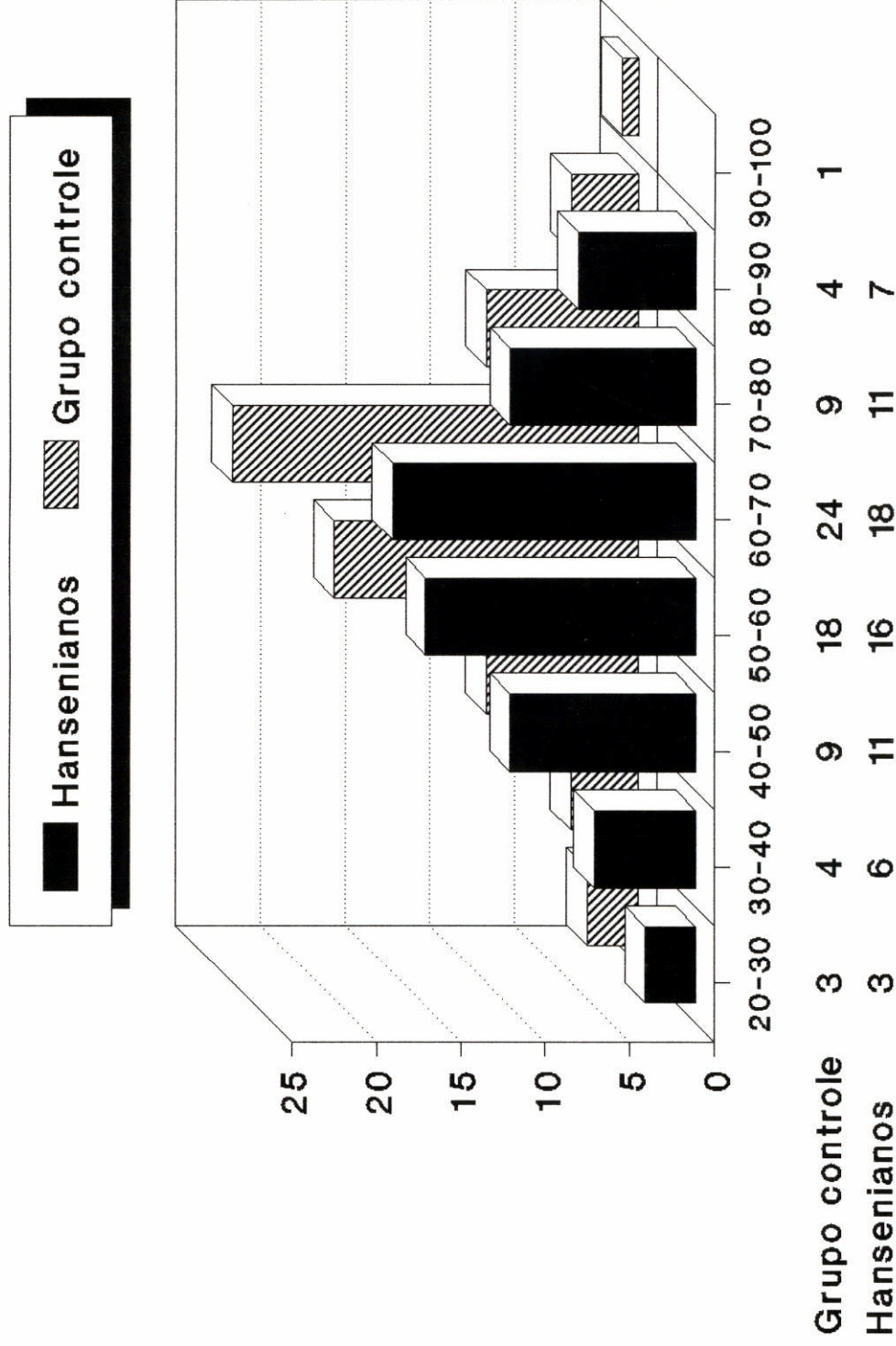
a) Extrato bruto:  $\Delta E/\text{minuto} =$

Atividade enzimática:

b) Membrana eritrocitária :  $AE/\text{minuto} =$

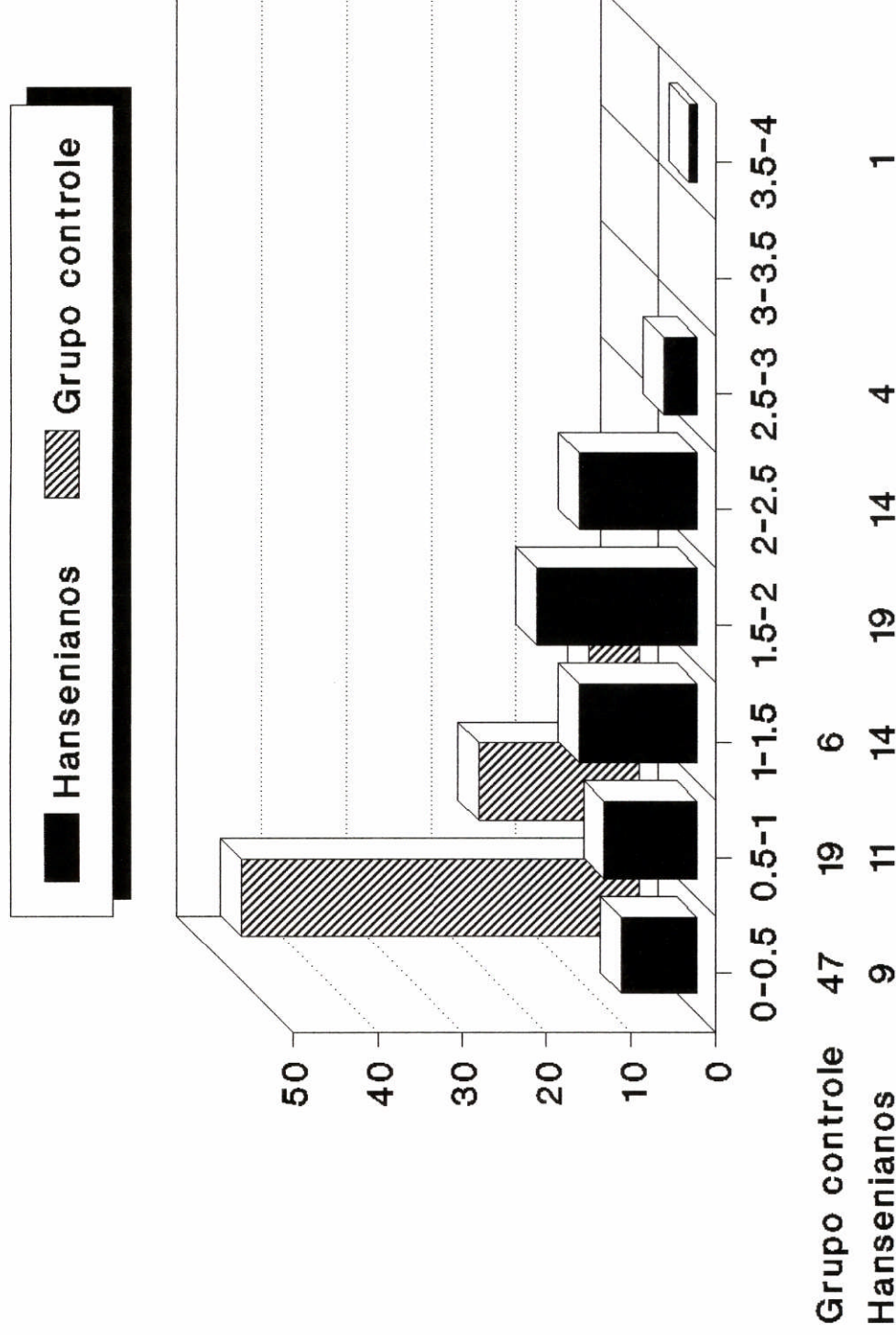
Atividade enzimática:

# Gráfico 1 -Idade (anos)



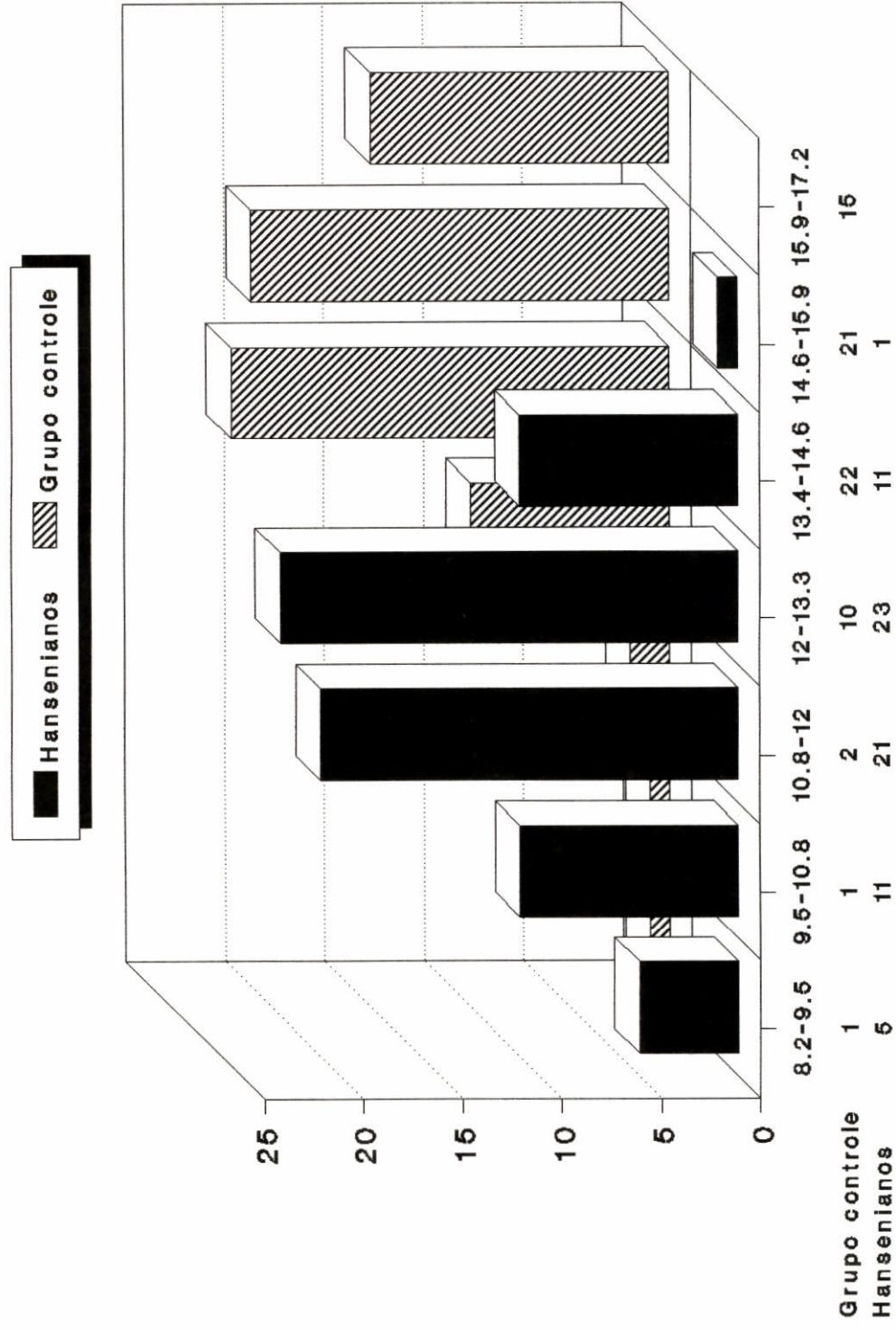
Dirceu Dalpino ILSL-Bauru 1997

# Gráfico 2 - Metemoglobina (%)



Dirceu Dalpino - ILSL- Bauru- 1997

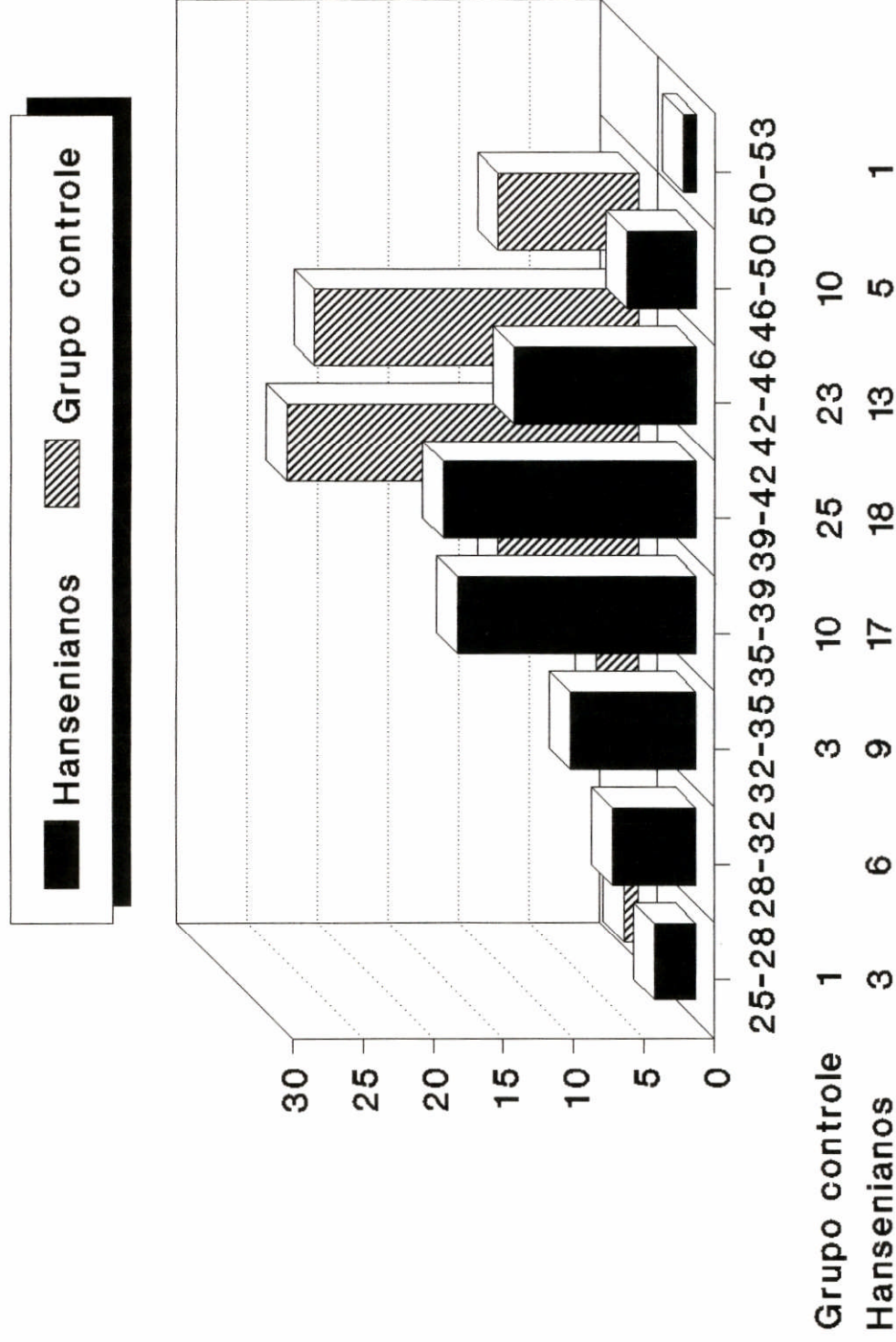
# Gráfico 3 - Hemoglobina (g/dl)



Dirceu Dalpino - ILSL- Bauru - 1997

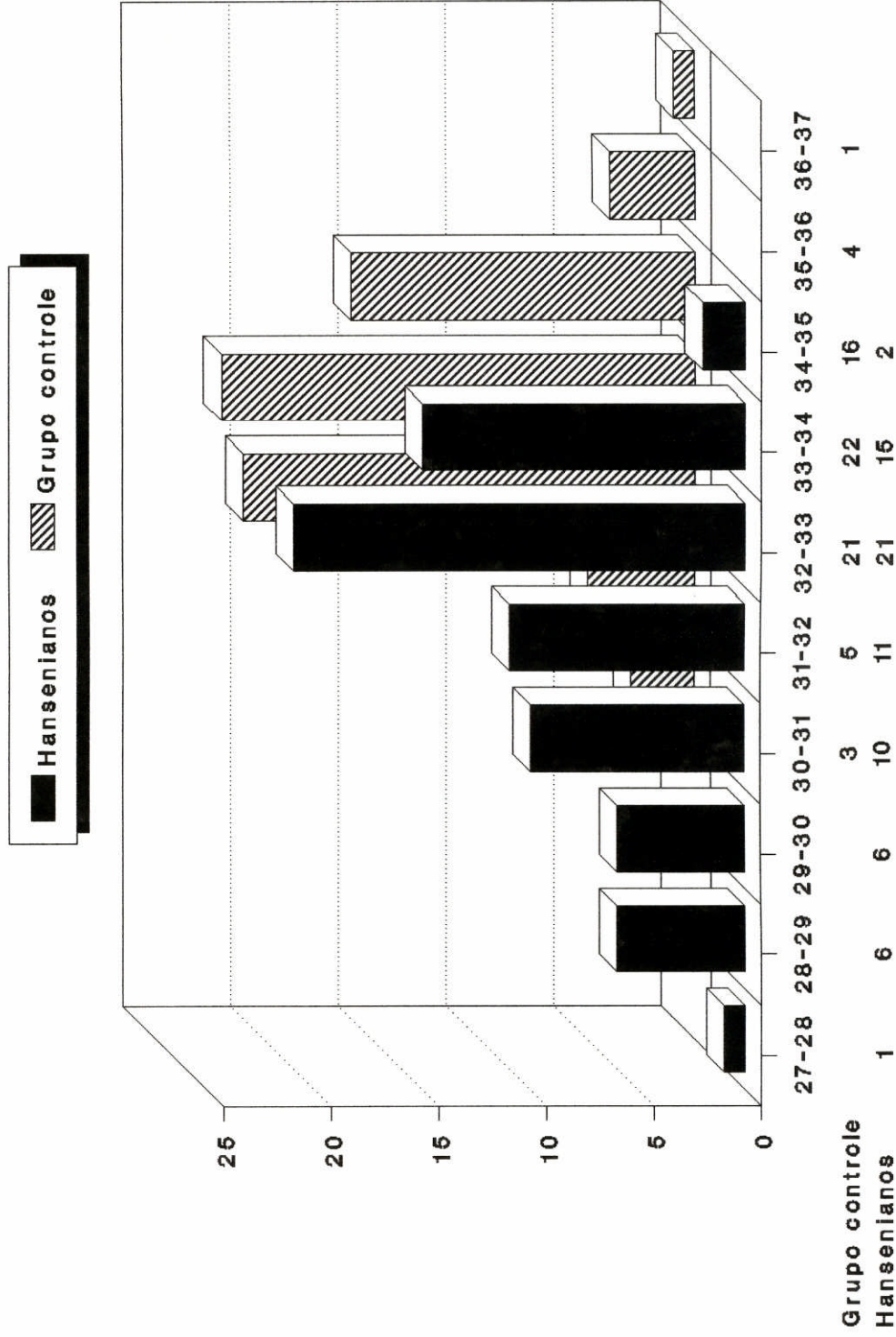


# Gráfico 4 - Hematócrito (%)



Dirceu Dalpino - ILSL - Bauru 1997

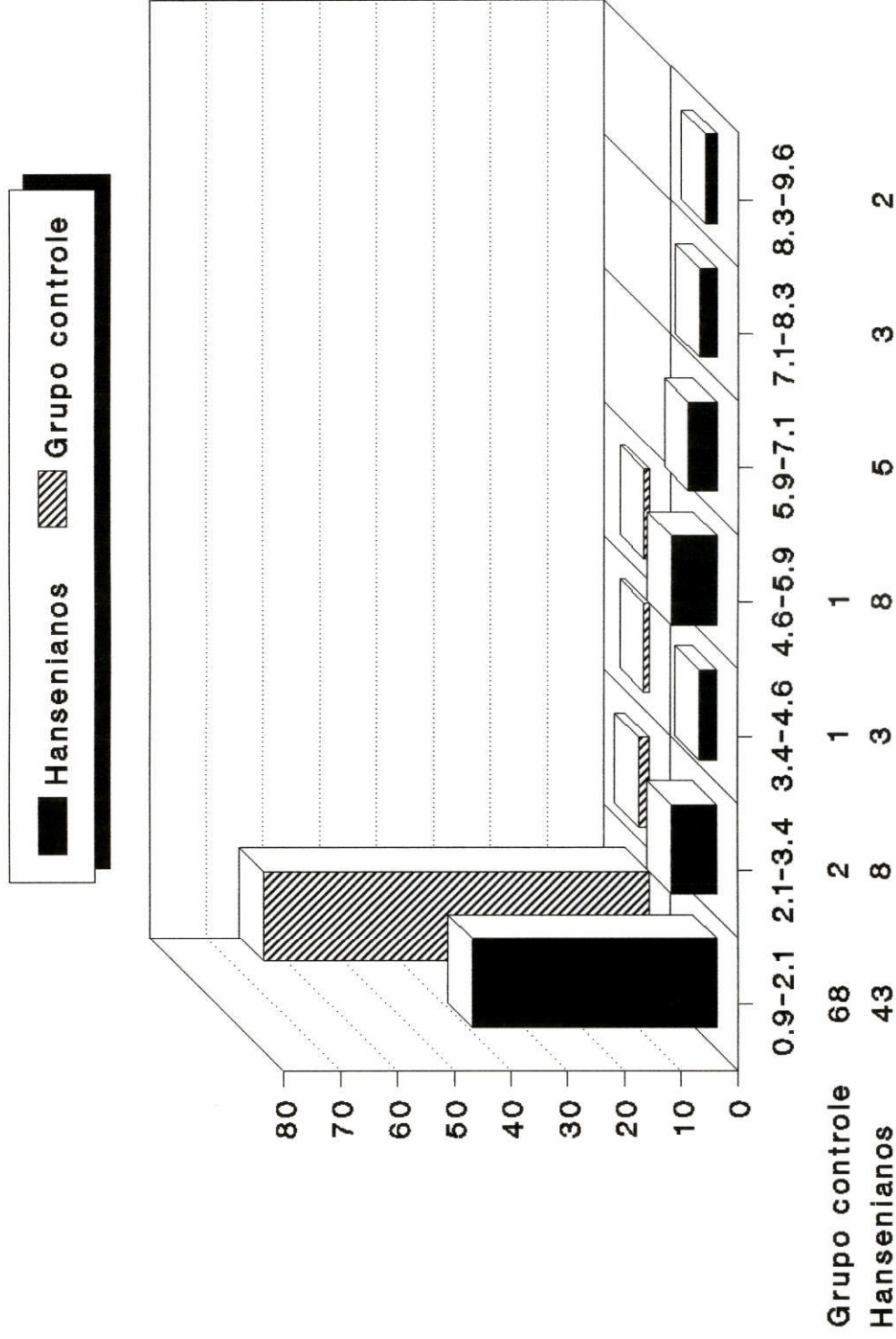
# Gráfico 5 - CHCM (%)



Dirceu Dalpino - ILSL - Bauru 1997

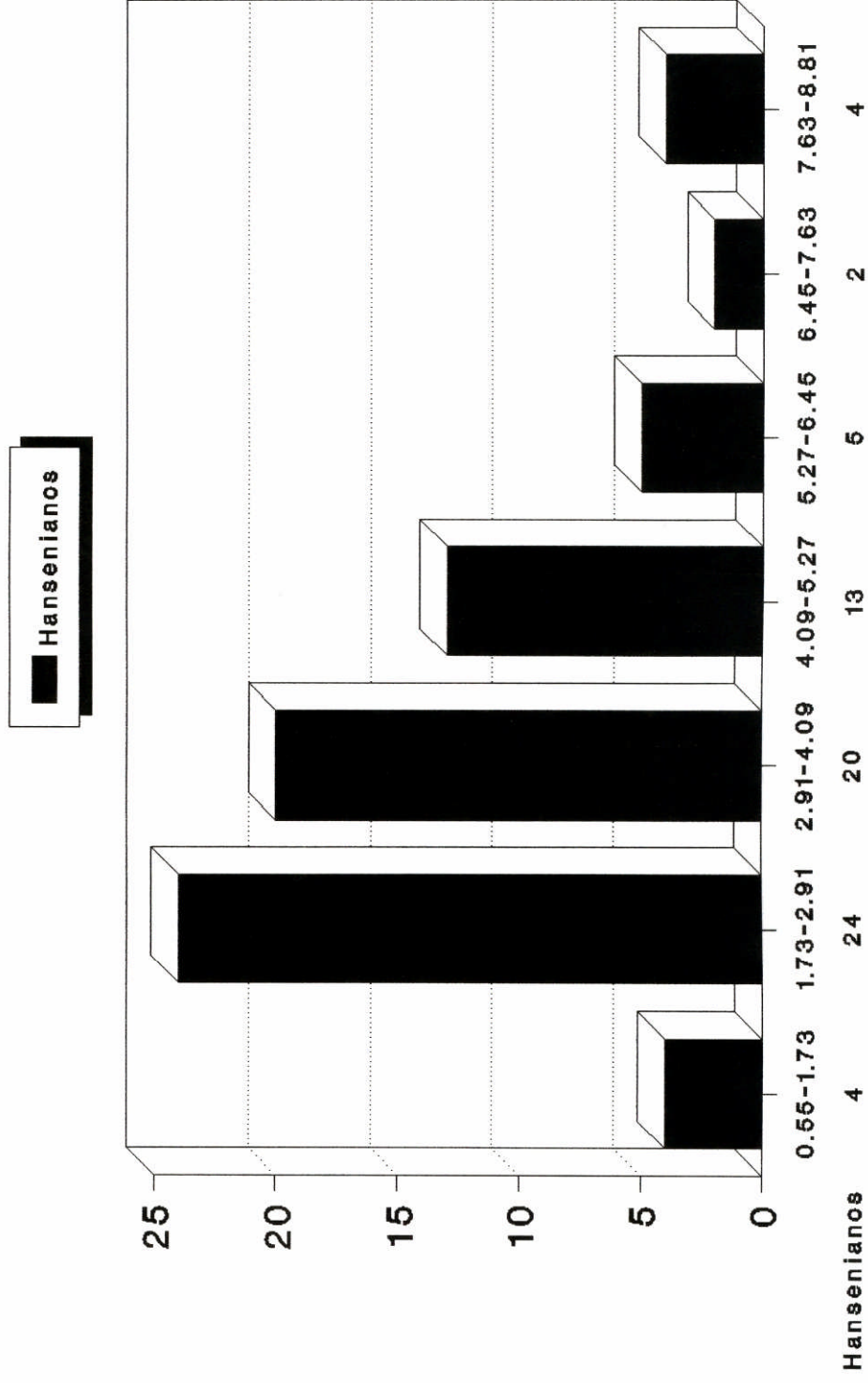


# Gráfico 6 - Reticulócitos (%)



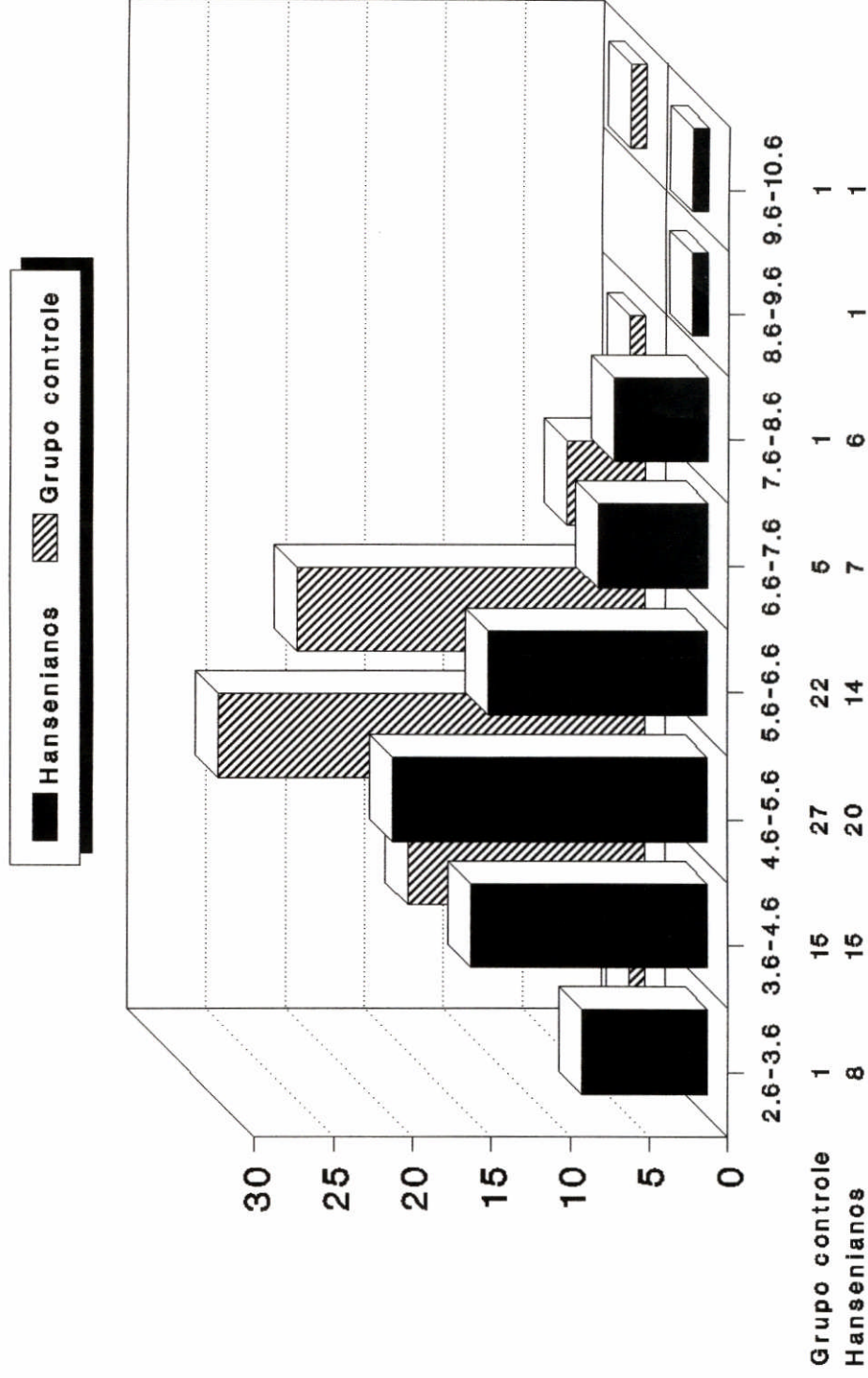
Dirceu Dalpino - ILSL - Bauru 1997

# Gráfico 7 -Sulfona nos hansenianos (mg/l)



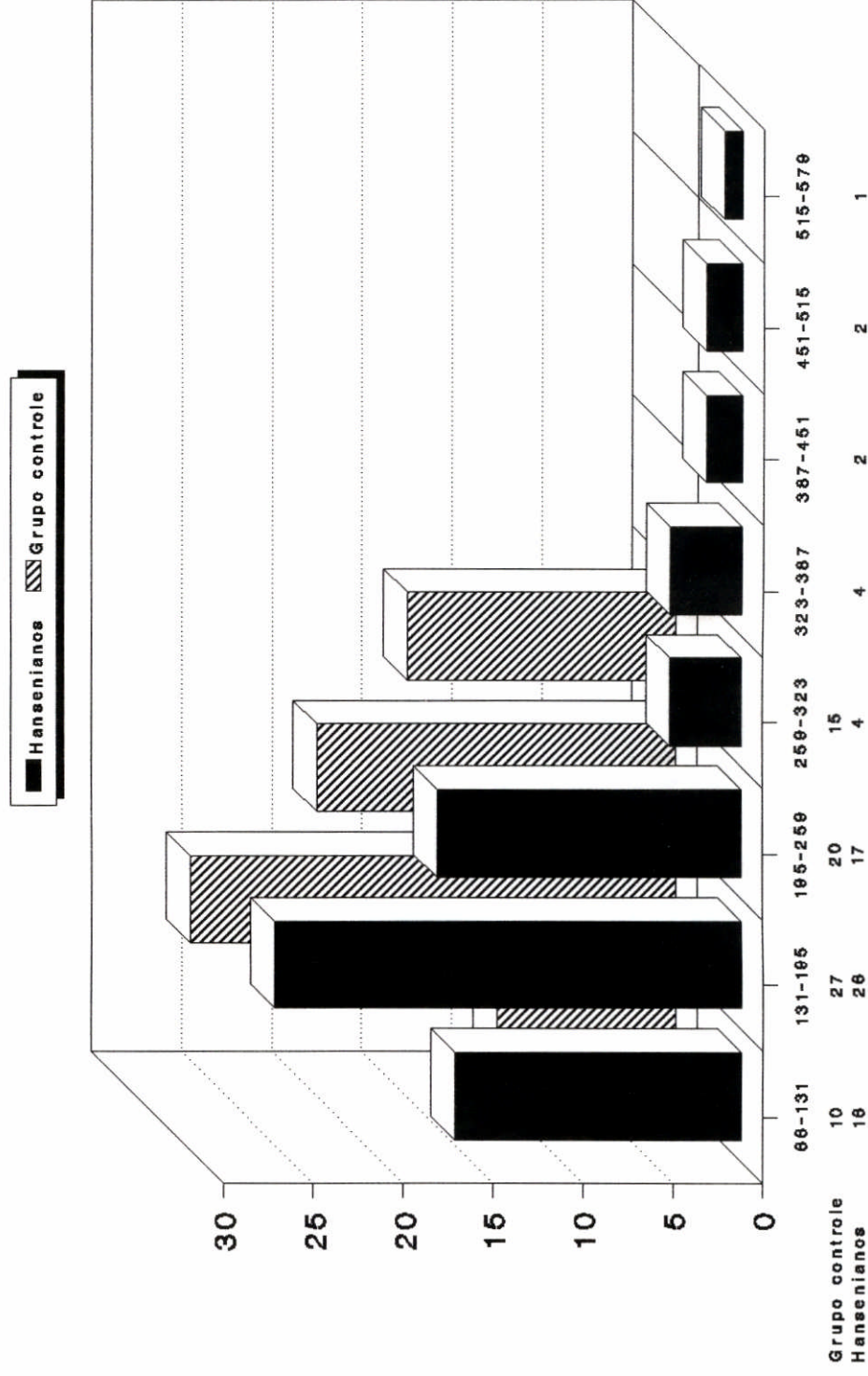
Dirceu Dalpino - ILSL - Bauru 1997

# Gráfico 8 - Atividade NADH-redutase no hemolisado



Dirceu Dalpino - ILSL - Bauru 1997

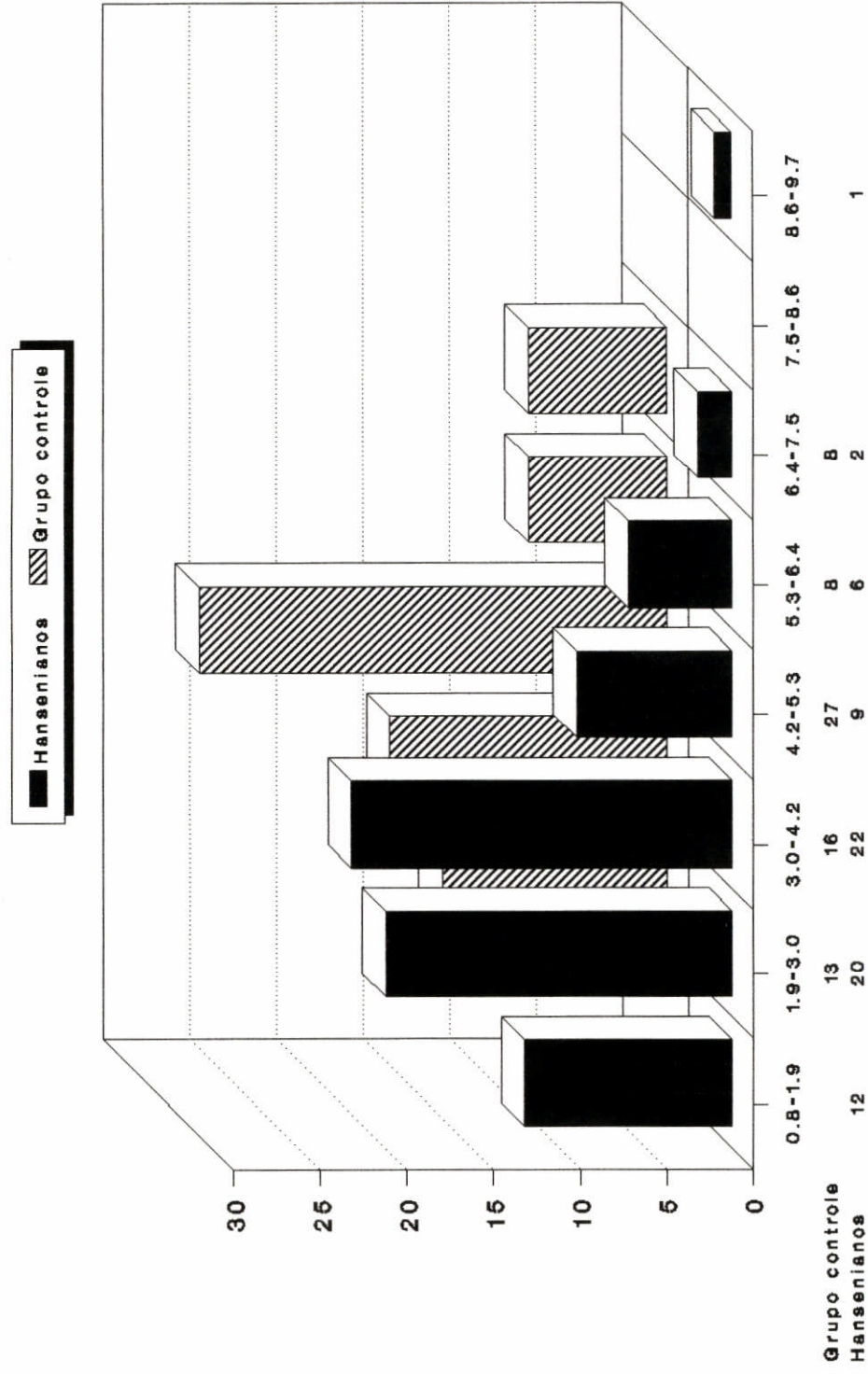
Gráfico 9 - Proteína na membrana eritrocitária (mg/l)



Dirceu Dalpino - ILSL - Bauru 1997



# Gráfico 10 - Atividade da NADH-redutase na membrana eritrocitária



Dirceu Dalpino - ILSL - Bauru 1997