

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 menos⁶⁹.

O glóbulo vermelho é uma célula anucleada, possui uma membrana cuja estrutura é semelhante às das outras células, com dupla camada de fosfolípidos 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 polirribossomas⁶.

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 (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 monofosfato⁶.

A primeira, através de reações anaeróbias (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 NAD^{34} .

A segunda, através da via da hexose monofosfato, a glicose é transformada em triose fosfato através de pentoses (açúcares compostos de C5) sendo a única fonte de origem do NADPH reduzido. A enzima mais importante desta via é a glicose-6-fosfato desidrogenase³⁴.

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 lípidos. Produz-se também o NADH reduzido que é um coenzima da metemoglobina redutase ou diaforase³⁴.

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)^{6,22,36,56} sendo que este ciclo representa 10 % da glicólise⁶³

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 heme⁶. A maior parte da síntese desta proteína dá-se nos eritroblastos e o restante nos reticulócitos^{35,12}.

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 livres⁶,

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)⁶.

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)⁶.

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 aminoácidos⁶.

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^{6,35}.

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 molécula⁶.

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^{34,70}.

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 Heinz⁵⁵.

O equilíbrio no nível de metemoglobina na célula indica que a lenta oxidação química da hemoglobina é compensada pela redução enzimática³⁶

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 vermelho⁷⁰. O peróxido de hidrogênio formado pela metemoglobina pode ser destruído pela superóxido-dismutase ou pela glutathione-peroxidase^{17,56}.

A metemoglobinemia caracteriza-se pela presença de cianose em pessoas não portadoras de doenças cardiopulmonares ou distúrbios hemodinâmicos¹⁸ 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 concentração⁶⁴.

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)⁷⁰. 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 nitrito²⁶.

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-redutase⁷⁰.

Vários autores efetuaram estudos *in vitro* para demonstrarem a ação de agentes oxidantes sobre a hemoglobina^{1,18,26,29,30,41}. 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 hemolíticos¹⁷.

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 hemólise⁶⁵.

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 hemólise¹⁹

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 dapsona²

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 pessoas⁵⁸ 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 bacilo⁵⁹

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 tóxicos⁵⁰ 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 colaboradores¹⁴ 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 normais⁵⁰ 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 dependente⁴

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^{43,49}. Esta enzima é uma flavoproteína tendo a flavina-adenina dinucleotídeo como grupo prostético⁴⁶.

O sistema enzimático mais importante e em cuja falência é formada uma quantidade considerável de metemoglobina denomina-se NADH-metemoglobina redutase ou NADH-diaforase⁷². Essa enzima foi identificada em 1959 por Scott e Griffith⁷⁶. 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 oxidada⁷⁰.

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 *b₅*. 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 mesmo⁷².

A NADH-metemoglobina-redutase catalisa somente a redução do citocromo *b₅* eritrocitário na presença de NADH, não agindo no transporte de elétrons entre o citocromo *b₅* reduzido e a metemoglobina ^{46,47,62}

Foram descritas várias enzimas NADH-desidrogenase: NADH-desidrogenase I^{75,78}, NADH-metemoglobina ferrocianeto redutase³¹ e NADH-citocromo *b₅* redutase⁶¹, as quais catalisam a redução do DCIP, ferrocianeto e citocromo *b₅*, respectivamente, sendo as mesmas expressões de uma mesma proteína.

A NADH-citocromo *b₅* 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 esta localizada na direção do carbono terminal ^{53,54,81}.

Existe uma relação entre a enzima ligada à membrana do eritrócito e a citocromo *b₅* 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 *b₅* redutase microsomal ligada à membrana em humanos e em animais foi demonstrada através de estudos científicos ^{47,49} levando a dedução de que a enzima ligada a face interna da membrana no eritrócito é uma citocromo *b₅* redutase¹⁶.

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^{8,36}. Foram isoladas duas NADPH-desidrogenases (A e B) as quais reduzem o DCIP rapidamente⁷⁵, porém a redução da metemoglobina é lenta e não reduzem a metemoglobina-ferrocianeto, nem o citocromo *b*₅. A NADPH-desidrogenase está presente em níveis normais nos glóbulos vermelhos dos pacientes portadores de metemoglobinemia congênita⁷².

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 ³⁶

A origem da NADH-citocromo *b*₅ redutase é sugerida como sendo microsomal devido a semelhante digestão tripsínica entre o citocromo *b*₅ eritrocitário e o originário de microsomas hepáticos humanos⁷². Os ribossomas agrupados são denominados microsomas e são considerados como responsáveis pela síntese de enzimas e proteínas sob influência do DNA e do RNA mensageiro⁶.