

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 família⁷⁷.

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 metemoglobina⁷⁶.

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-nascidas⁶⁸.

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 recessiva⁷³.

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 metemoglobina⁷⁸. 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 nitrito³⁹.

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 adquirida⁶⁷.

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 celular⁷.

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 Índios³, como havia sido demonstrado em outras duas raças Norte Americanas, Esquimós e Índios Atabascan⁷⁷.

Scott e colaboradores, em 1965, purificaram⁷⁸ 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 metemoglobina⁷⁵.

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 hereditárias³⁸. 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 metemoglobina³⁹

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 Italiana⁴⁰.

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-oxidoreductase⁸⁹.

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 normal⁴².

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 minutos³¹.

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 patologia¹⁰

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-ferricianeto, apesar de mais trabalhosa⁷⁴.

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"⁹⁰.

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 Scott⁷³, em 378 amostras de sangue de doadores, encontrando alteração eletroforética em 2 amostras nas bandas da NADH-diaforase, sendo uma de natureza hereditária²⁰.

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 NADH₃ e NADH₄, responsáveis pela redução de metemoglobina nos glóbulos vermelhos humanos³².

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 *b₅* é aproximadamente igual a taxa de redução do citocromo *b₅*. Isto sugere uma redução não enzimática da metemoglobina pelo citocromo *b₅*, o qual é reduzido enzimaticamente pelo NADH⁸³.

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 McGraw⁷⁸ e a atividade enzimática pós eletroforese foi determinada de acordo com a técnica de Kaplan e Beutler⁴². 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 hemácia⁴⁶.

Passon e Hultquist, em 1972, isolaram e caracterizaram uma NADH-citocromo *b₅* redutase solúvel de eritrócitos humanos, que catalisava rapidamente a redução do citocromo *b₅*. Os autores afirmam ser esta enzima a NADH-desidrogenase I. Esta redutase é altamente específica para NADH quando se utiliza o citocromo *b₅*, o DCIP e o ferrocianeto como receptores de elétrons⁶¹.

Schwartz e colaboradores, em 1972, apresentaram uma variante instável da NADH metemoglobina redutase em três famílias de Porto Riquenhos, 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 normal⁷¹.

Kitao e colaboradores, em 1974, estudaram a deficiência da metemoglobina redutase (citocromo *b₅* 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 *b₅* desempenha um papel de maior importância na redução fisiológica da metemoglobina nos eritrócitos humanos⁴⁴.

Leroux e colaboradores, em 1975, descreveram o encontro de uma deficiência de NADH diaforase e citocromo *b₅* 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 *b₅* redutase solúvel enquanto que no tipo II este defeito é generalizado, apresentando-se tanto na eritrocitária quanto nos microsossomais. Neste tipo II há envolvimento neurológico⁴⁸.

Kuma e colaboradores, em 1976, efetuaram um estudo da similaridade imunoquímica entre a metemoglobina redutase solúvel e o citocromo *b₅* dos eritrócitos humanos com a NADH-citocromo *b₅* redutase e citocromo *b₅* de microsossomos de fígado de ratos. Os anticorpos contra a citocromo *b₅* redutase inibiu apenas a redução do citocromo *b₅*, sem afetar o transporte de elétrons entre o citocromo *b₅* e a metemoglobina⁴⁷.

Enomoto e Sato, em 1977, relataram a ligação assimétrica do citocromo *b₅* 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 *b₅*, sendo que o mesmo ocorre com a NADH citocromo *b₅* redutase²³.

Fisher e colaboradores, em 1977, demonstraram que a NADH-diaforase, também denominada metemoglobina redutase ou citocromo *b₅* redutase é codificada pelo locus autossomal *DLA₁* do cromossoma 22, utilizando a eletroforese em gel para o estudo da atividade da NADH-diaforase²⁷.

Vives-Corróns e colaboradores, em 1978, apresentaram a deficiência de metemoglobina redutase (Citocromo *b₅* 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 enzimopatia⁸⁸.

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 vermelhos⁸⁶.

Tanishima e colaboradores, em 1980, apresentaram um estudo dos níveis da NADH-citocromo *b₅* 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 I⁸⁵.

Choury, Leroux e Kaplan, em 1981, efetuaram um estudo dos níveis da metemoglobina redutase (citocromo *b₅* 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.¹⁶

Matsuki e colaboradores, em 1981, reportaram o decaimento do citocromo *b₅* e da citocromo *b₅* redutase nos eritrócitos humanos de acordo com a idade dos mesmos. Os autores demonstraram que a enzima e o citocromo *b₅* 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 enzima⁵²

Kitajima e colaboradores, em 1981, efetuaram a purificação e estudaram as propriedades moleculares e cinéticas da NADH-citocromo *b₅* 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 eritrócito⁴³.

Panin e colaboradores, em 1984, mediram a atividade da citocromo *b₅* 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 vida⁶⁰

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/litro⁵⁰. A taxa de hemoglobina foi determinada pela equação da análise espectrofotométrica da mistura de hemoglobina^{5,87}.

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 reticulócitos¹⁴.

Tanishima e colaboradores, em 1985, apresentaram um estudo da metemoglobinemia hereditária devido à deficiência de citocromo *b₅* 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 generalizado⁸⁵.

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 *b₅* redutase que apresentava-se normal. Os autores encontraram valores diminuídos de citocromo *b₅*, confirmando que este elemento é de fundamental importância para o sistema de redução da metemoglobina *in vivo*³³

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 enzimática⁴⁵.

Borgese e colaboradores, em 1987, determinaram a concentração de NADH-citocromo *b₅* 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 diminuídas¹¹.

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_s redutase em forma homozigota²⁸.

Jablonska-Skniecinska e colaboradores, em 1989, relataram a presença de deficiência da NADH-metemoglobina redutase em duas crianças, não portadoras de patologia cardíaca ou pulmonar³⁷.

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 mesmas⁹¹.

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 droga⁴. Foi utilizada a técnica de Stek e Kant para o preparo das membranas eritrocitárias⁸².

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 redutase¹⁵.

Pesquisadores demonstraram que o tratamento com sulfona não aumenta a atividade da NADH-redutase no hemolisado⁵⁰ e também foi demonstrado *in vitro* que o tratamento de membrana de hemácias com sulfona aumentam a atividade enzimática no sobrenadante numa relação dose dependente⁴. 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
 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 mOSM 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 hematócrito⁸⁰.

IV.3.3- Dosagem da Sulfona

A dosagem do DDS (4,4 diaminodifenil sulfona) total foi efetuada pela técnica descrita por Simpson modificado⁷⁹, 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 Scott⁷³ 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⁺ 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 Campbell¹³, 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 colaboradores²¹.

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 Scott⁷³ com algumas modificações.

O cálculo da atividade enzimática foi efetuado de acordo com a fórmula de Campbell e Campbell¹³ e expresso em UI / mg de proteína.

IV.3.7 - Determinação da Metemoglobina

A metemoglobina foi determinada pela técnica de Evelyn e Malloy²⁴.

A descrição detalhada das técnicas encontra-se no apêndice.