

## ATIVIDADE DA NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA EM HEMOLISADO E MEMBRANAS ERITROCITÁRIAS DE PACIENTES HANSENIANOS SOB TRATAMENTO SULFÔNICO

Dirceu Dalpino<sup>1</sup>  
Luís Alberto Magna Diltor<sup>2</sup>  
Vladimir Araújo Opromolla<sup>1</sup>

**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, todos ingerindo doses diárias de 100 mg de diamino-difenil-sulfona. Idênticos testes, exceto dosagem de sulfona, foram efetuados no sangue de 72 pessoas normais, não ingerindo medicamentos oxidantes. Foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas variáveis da série vermelha, metemoglobina, reticulócitos e na atividade enzimática da NADH-redutase nas membranas eritrocitárias entre os dois grupos. A atividade enzimática nas membranas eritrocitárias foi inferior e estatisticamente significativa com relação ao grupo-controle. 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. Tendo em vista termos encontrado níveis inferiores de atividade enzimática nas membranas eritrocitárias dos hansenianos e níveis coincidentes no hemolisado, em comparação com um grupo-controle, podemos afirmar que, provavelmente, isto se deve 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.

**Palavras-chave:** Hanseníase. NADH-redutase. Diaforase. NADH-metemoglobina-redutase.

### 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>44</sup>.

O glóbulo vermelho é uma célula

anucleada, possui uma membrana, cuja estrutura é semelhante à das outras células, com dupla camada de fosfolipídeos, estabilizada pelo colesterol e nesta membrana encontram-se proteínas intercaladas. Ele é composto por água, hemoglobina, íons potássio, enzimas e glicose. A hemoglobina é seu maior constituinte e representa um terço do seu peso. Não se consegue distinguir organelas em seu interior. O reticulócito, que

<sup>1</sup>Instituto Lauro de Souza Lima - C. Postal 62 - 1 7001-970 - Bauru - SP - E-mail: [pesquisa@lsl.br](mailto:pesquisa@lsl.br)

<sup>2</sup>Universidade de Campinas - Campinas - SP

é um eritrócito mais jovem, possui algumas organelas em seu interior, tais como mitocôndrias e polirribossomas<sup>4</sup>.

O glóbulo vermelho 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 provem da glicólise que, pela ação da hexoquinase, transforma-se em glicose-6-fosfato, catalisada por duas vias, a de Embden-Meyerhof e a da hexose-monofosfato<sup>4</sup>.

Na primeira via, através de reações anaeróbias (via de Embden-Meyerhof), em uma primeira fase a glicose-6-fosfato origina dois trióis-fosfatos e na segunda fase, tem-se 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 as formas de adenosina-trifosfato (ATP), a partir da adenosina-difosfato (ADP), e duas moléculas de nicotinamida – adenina – dinuc - leotídeo reduzido (NADH), a partir da nicotinamida adenina-dinucleotídeo<sup>21</sup>.

Na segunda, através da via da hexose-monofosfato, a glicose é transformada em triose-fosfato, através de pentoses (açúcares compostos de 5 carbonos), sendo a única fonte de origem do nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzido (NADPH). A enzima mais importante desta via é a glicose-6-fosfato-dehidrogenase<sup>21</sup>.

Durante a glicólise tem-se a produção de ATP, que assegura o funcionamento da expulsão do sódio para fora da célula, sendo que, em nível de 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, que é um coenzima da metemoglobina-redutase ou diaforase.

O NADPH, produzido na via das pentoses, é a coenzima da glutathion-redutase, a qual assegura a regeneração do glutathion-reduzido (GSH), o qual possui um papel

protetor contra a oxidação da globina e das proteínas estruturais. Nesta mesma fase, a enzima glutathion-peroxidase transforma o GSH e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  e GSSG (glutathion-oxidado)<sup>4,14,23,24</sup>, sendo que este ciclo representa 10 % da glicólise<sup>40</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>4</sup>. A maior parte da síntese desta proteína dá-se nos eritroblastos e o restante, nos reticulócitos<sup>6,22</sup>.

O heme é uma porfirina contendo um átomo de ferro. A porfirina possui quatro anéis pirrólicos com nitrogênio, reunidos por pontes metênicas ( $-\text{CH}=\text{}$ ) e oito cadeias laterais, sendo metil, vinil, ácido propiônico. O ferro localiza-se no centro, ligado aos quatro nitrogênios dos anéis pirrólicos e possui duas valências livres<sup>4</sup>.

A globina é um conjunto de quatro cadeias polipeptídicas. Para cada molécula de hemoglobina A temos quatro cadeias idênticas duas  $\alpha$  e duas  $\beta$ , denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ , possuindo 141 aminoácidos na cadeia  $\alpha$  e 146 aminoácidos na cadeia  $\beta$ , reunidas por ligações peptídicas (estrutura primária). A cadeia, assim formada, dobra-se em espiral (estrutura secundária)<sup>4</sup>.

A estabilização é dada por ligações entre os aminoácidos colocados em contato pelas curvaturas da molécula (estrutura terciária). A reunião de duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$  dão origem a uma molécula simétrica globular (estrutura quaternária)<sup>4</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 em nível das ligações fracas alfa1-beta2 e alfa2-beta1, onde temos apenas 19 aminoácidos<sup>4</sup>.

Em 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>4,22</sup>.

A captação e liberação do oxigênio pela hemoglobina, em sua forma molecular, 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-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>4</sup>.

Em algumas situações, o ferro em estado ferroso ( $\text{Fe}^{++}$ ), contido na célula vermelha madura, é transformado para o estado férrico ( $\text{Fe}^{+++}$ ), dando origem à 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>24,45</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>33</sup>.

O equilíbrio no nível de metemoglobina na célula indica que a lenta oxidação química da hemoglobina é compensada pela redução enzimática<sup>23</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>45</sup>. O peróxido de hidrogênio, formado pela metemoglobina, pode ser destruído pela glutation-peroxidase<sup>10,34</sup>.

A metemoglobinemia caracteriza-se pela presença de cianose em pessoas não portadoras de doenças cardiopulmonares ou distúrbios hemodinâmicos<sup>11</sup>. É formada naturalmente quando pequenas quantidades de ferro ferroso ( $\text{Fe}^{++}$ ) são oxidados para íon férrico ( $\text{Fe}^{+++}$ ), perdendo a capacidade de fixar oxigênio molecular de forma reversível, diminuindo, portanto, o transporte do mesmo pelo glóbulo vermelho, proporcionalmente à sua concentração<sup>41</sup>.

Define-se a metemoglobina como uma oxidação da hemoglobina, a sexta posição de coordenação do ferro hêmico liga-se a uma molécula de água (meio ácida) ou a um íon hidroxila (meio alcalino)<sup>45</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>17</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>45</sup>.

Vários autores efetuaram estudos *in vitro* para demonstrar a ação de agentes oxidantes sobre a hemoglobina<sup>1,11,17,18,19,24</sup>. Cohen e Hochstein<sup>10</sup>, em estudo da geração de peróxido de hidrogênio por agentes hemolíticos, concluíram que o peróxido é um intermediário tóxico, comum a muitos agentes hemolíticos. Estudos sobre a ação da dapsona na membrana da célula vermelha e seu efeito na glicólise revelaram uma diminuição no nível do GSH devido, provavelmente, à ligação do mesmo com grupos sulfidrilas na hemoglobina. A diminuição dos fosfolípidos e da atividade da acetilcolinesterase na membrana celular leva a um aumento da auto-hemólise<sup>42</sup>.

O tratamento com dapsona (4,4'-diaminodifenil-sulfona, DDS) em altas doses, em pacientes portadores de dermatite herpétiforme, 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>12</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/kg 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.

Os pacientes portadores de hanseníase são submetidos a um tratamento prolongado com DDS, 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>35</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>36</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>29</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>8</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>. Estudos efetuados *in vitro*,

com membranas de hemácias tratadas com sulfona, revelaram um aumento do nível desta enzima, no sobrenadante em uma relação dose-dependente<sup>3</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>25,29</sup>. Esta enzima é uma flavoproteína, tendo a flavina-adenina-dinucleotídeo como grupo prostético<sup>26</sup>.

O sistema enzimático mais importante, 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>50</sup>. A nicotina-adenina-dinucleotídeo (NAD) é uma coenzima de desidrogenases e assim na forma oxidada, aceitar hidrogênio de substratos, reduzindo-se a NADH; pode, na forma reduzida, ceder hidrogênio, 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>45</sup>.

As taxas baixas de metemoglobina 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 provem da glicólise anaeróbia de Embden-Meyerhof, através da reação do gliceraldeído-fosfato-desidrogenase, em que o NAD é reduzido a NADH. Nesta mesma via tem-se o consumo do NADH na reação do lactato-desidrogenase, impedindo o acúmulo do mesmo<sup>47</sup>.

A NADH-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<sup>26,27,39</sup>.

Foram descritas várias enzimas NADH-desidrogenase: NADH-desidrogenase-I<sup>49,51</sup>, NADH - metemoglobina - ferrocianeto-reduzase<sup>20</sup> e NADH-citocromo-b5-reduzase<sup>38</sup>, as quais catalisam a redução do 2,6 dicloroindofenol (DCIP), ferrocianeto e citocromo-b5, respectivamente, sendo as mesmas expressões de uma mesma proteína.

A NADH-citocromo-b5-reduzase é uma proteína de membrana, composta de uma porção hidrofílica, a qual contém o local ativo da enzima 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>31,32,54</sup>.

Existe uma relação entre a enzima ligada à membrana do eritrócito e a citocromo-b5-reduzase 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-reduzase microssomal, ligada à membrana em humanos e em animais, foi demonstrada através de estudos científicos<sup>27,28</sup> levando à dedução de que a enzima, ligada à face interna da membrana no eritrócito, é uma citocromo-b5-reduzase".

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>5,23</sup>. Foram isoladas duas NADPH-desidrogenases (A e B), as quais reduzem o DCIP rapidamente<sup>49</sup>, porém a redução da metemoglobina é lenta e não reduz a metemoglobina-ferrocianeto, nem o citocromo-b5. A NADPH-desidrogenase está presente em níveis normais nos glóbulos vermelhos dos pacientes portadores de metemoglobinemia congênita<sup>47</sup>.

O glóbulo vermelho maduro não contém citocromo-c endógeno, sendo possível que, no estágio imaturo ou nucleado, o eritrócito

utilize-se de enzimas como a citocromo-reduzase, mas após a reversão para a forma anaeróbia do metabolismo, a função enzimática seja somente da metemoglobina-reduzase<sup>23</sup>.

A origem da NADH-reduzase é sugerida como sendo microssomal, devido a semelhante digestão tripsínica entre o citocromo-b5-eritrocitário e o originário de microssomas hepáticos humanos<sup>47</sup>. Os ribossomas agrupados são denominados microssomas e são considerados responsáveis pela síntese de enzimas e proteínas sob influência do DNA e do RNA mensageiro'.

## CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

### 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 DDS; 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 oxidantes. Todos os pacientes e as pessoas do grupo-controle foram previamente consultados e concordaram em participar do trabalho. Nenhum medicamento foi administrado aos mesmos

### MÉTODO:

A contagem de hemácias foi realizada no contador de células CC-550; a dosagem da hemoglobina pelo método da cianometemoglobina e determinada no mesmo aparelho. O hematócrito foi determinado pela técnica do microematócrito.

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>53</sup>.

A dosagem do DDS total foi efetuada pela técnica descrita por Simpson modificado<sup>52</sup>.

A atividade da NADH-metemoglobina-redutase, determinada pela técnica descrita por Scott<sup>48</sup> com algumas modificações, sendo determinada no hemolisado total e no sedimento de membranas eritrocitárias. Esta atividade foi determinada espectrofotometricamente em fluxo contínuo termostatizado, em 600 nm, por determinação cinética, com leituras feitas em intervalos de 1 minuto na variação da densidade óptica (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 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>7</sup>, com o resultado expresso em UI/litro e em UI/ grama de hemoglobina.

O preparo das membranas eritrocitárias

seguiu a técnica descrita por Dodge e colaboradores<sup>13</sup>. O isolamento da membrana do eritrócito é fundamental para o estudo da sua composição e através do uso de tampão fosfato 20 mOsm com pH 7,4 chega-se a uma condição ideal de preparação da membrana, livre de hemoglobina e com sua morfologia inalterada.

Utilizamos a técnica de Scott<sup>48</sup> com algumas modificações. O cálculo da atividade enzimática foi efetuado de acordo com a fórmula de Campbell e Campbell<sup>7</sup> e expresso em UI / mg de proteína.

A metemoglobina foi determinada pela técnica de Evelyn e Malloy<sup>15</sup>.

## RESULTADOS

Com relação ao grupo de pacientes portadores de hanseníase, os resultados estão sumarizados na tabela I. Os resultados obtidos no grupo-controle estão demonstrados na tabela II.

**TABELA I.** Variáveis dos pacientes hansenianos (n=72)

	MÉDIA	D. PADRÃO	C.V.	MÍNIMO	MÁXIMO
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
METEMOGLOBINA (%)	1,50	0,74	49,38	0,00	3,50
HEMACIAS (X106)	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 (3)	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. HEMOLISADO (UI/I)	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
PROTEÍNA GHOST (WI)	199,52	99,72	53,18	66,60	514,70
ATIVIDADE GHOST (u)	3,39	1,56	46,02	0,82	8,61
RETICULÓCITOS (%)	2,96	2,23	75,13	0,90	9,56
RETICUL. ABS. (103)	154,80	121,62	78,56	46,20	602.700

**TABELA II.** Variáveis do grupo-controle (n=72)

	MÉDIA	D. PADRÃO	C.V.	MÍNIMO	MÁXIMO
IDADE (ANOS)	58,50	14,22	24,31	20,0	90,0
METEMOGLOBIN. (%)	0,43	0,29	68,76	0,0	1,29
HEMACIAS (X106)	4,88	0,43	8,86	3,2	5,70
HEMOGLOBINA (g/dl)	14,59	1,61	11,06	8,2	17,2
HEMATOCRITO (%)	43,75	4,51	10,32	25,0	52,0
VCM (3)	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.* HEMOLISADO	0,254	0,025	10,14	0,187	0,331
ATIV.HEMOLIS. (UI/I)	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
PROTEÍNA GHOST(g/l)	199,76	60,05	30,06	92,5	308,1
ATIV. GHOST (u)	4,42	1,37	31,02	2,25	7,41
RETICULÓCITOS%	1,51	0,59	39,42	0,95	5,15
RETICUL. ABS. (103)	76,11	29,85	39,22	48,40	261,00

n=72 \* D.O. = densidade óptica D.padrão= desvio-padrão C.V.= coeficiente de variação

VCM= volume corpuscular médio HCM=hemoglobina corpuscular média

CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média COR= corrigido

ATI ou ATIV.= atividade ABS = contagem absoluta Hemolis. ou Hem.= hemolisado

TRAT.= tratamento RETICUL.= reticulócito Hb = hemoglobina

## DISCUSSÃO

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

Com relação à 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 o nível médio citado por Henry'. 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>47</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 apresentaram valores inferiores e diferença estatística significativa em relação ao grupo-controle. Esses dados são coincidentes com relatos de literatura que mencionam uma anemia freqüente nos hansenianos<sup>29</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 enfermidade podem ser devidas 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 enfermidades. Os níveis de glutathion-redutase encontram-se diminuídos nos glóbulos vermelhos desses pacientes e são proporcionais a dose diária de sulfona

Os índices hematológicos, volume corpuscular médio (VCM) ( $t = 6,483$ ;  $p < 0,001$ ), hemoglobina corpuscular média (HCM) ( $t = 9,367$ ;  $p < 0,001$ ) e concentração de hemoglobina corpuscular média (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 foi superior e estatisticamente diferente ( $t = 2,80$ ;  $p < 0,01$ ) que a apresentada por Caticha-Alfonso e colaboradores<sup>8</sup>.

Com relação à sulfonemia, não encontramos diferença estatística significativa entre nossos valores e os encontrados por Magna e colaboradores<sup>29</sup> ( $t = 0,441$ ; n.s.), nas dosagens ambulatoriais realizadas pelos autores, porém com relação aos valores encontrados pelos mesmos autores, 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 atividade enzimática no hemolisado, medida como NADH-redutase, 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 significativo ( $t = 0,722$ ; ns.)

A atividade enzimática no grupo de pacientes, medida como NADH-redutase nas *ghost cells*, livres de hemoglobina, por grama de proteína, apresentou-se em níveis inferiores a 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-redutase no grupo de pacientes, em relação ao grupo-controle, nas membranas dos eritrócitos, seja devida à constante ação oxidante da DDS 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 à 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'. O glóbulo vermelho, 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' quando da ação oxidante exercida pela sulfona. Isto é demonstrado em publicação de autores que encontraram menor atividade enzimática nos eritrócitos mais velhos de pessoas normais e nos pacientes portadores de deficiência da NADH-citocromo-b5-redutase<sup>30</sup>.

A existência de correlação significativa e negativa entre os níveis médios de atividade enzimática das membranas eritrocitárias e a metemoglobina nos pacientes hansenianos 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.

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>9</sup>. A enzima ligada à face interna da membrana celular é uma precursora da enzima solúvel encontrada no interior do glóbulo vermelho<sup>25</sup>, sendo liberada pela proteólise parcial da mesma", justificando, desta maneira, a menor concentração nas membranas destas células nos pacientes hansenianos.

Na tabela III apresentamos os resultados médios das variáveis do grupo de hansenianos e do grupo-controle, bem como os valores de "t" e de "p". Em resumo, os pacientes portadores de hanseníase apresentaram em relação ao grupo-controle: Níveis médios de hemácias, hemoglobina, hematócrito e índices hematimétricos inferiores. Níveis médios de metemoglobina superiores. Níveis médios de reticulócitos aumentados. Atividade enzimática da NADH-redutase em níveis médios inferiores no hemolisado sem correção pela hemoglobina. Quando estes dados foram corrigidos pela taxa de hemoglobina tornaram-se estatisticamente idênticos. Atividade da NADH-redutase em níveis médios inferiores nas membranas das *ghost cells*. A sulfonemia não apresentou diferença estatística significativa em relação a resultados publicados por outros autores.

**TABELA III.** Medida das variáveis do grupo de pacientes (n=72) e do grupo-controle (n=72)

	MÉDIA	D. PADRÃO	MÉDIA	D. PADRÃO	t	p
	GRUPO PACIENTES		GRUPO CONTROLE			
IDADE	59,54	14,60	58,50	14,22	-0,605	n.s.
METEMOGLOBINA	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
HEMATÓCRITO	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. HEMOLISADO	0,245	0,043	0,254	0,025	1,800	n.s.
ATIV. HEM. (UI/l)	65,62	14,69	76,487	10,99	6,277	<0,001
ATI. HEM. COR Hb	5,45	1,54	5,32	1,09	0,722	n.s.
PROTEÍNA 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
RETICULÓCITO (%)	2,96	2,23	1,51	0,59	-5,534	<0,001
RETICUL. (103)	154,80	121,62	76,11	29,85	-5,490	<0,001
SULFONEMIA	3,76	1,73				

VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; ATIV.= atividade; HEM.= hemolisado; COR Hb= corrigido pela hemoglobina; D.O.= densidade óptica; RETICUL.= reticulócito

**SUMMARY** - We measured in the blood samples of 72, adults leprosy patients, who were ingesting 100 mg of dapson/day, the levels of erythrocytes, hemoglobin, methemoglobin, sulphone and reticulocytes. NADH-methemoglobin-reductase was measured both in the hemolysate and ghost cells. As a control, identical tests, except for sulphone measure, were applied to blood samples from 72 healthy individuals who did not ingest any oxidant drug. Significant statistical differences regarding the values in erythrocytes, methemoglobin, reticulocytes and activity of NADH- reductase in the erythrocytes ghosts were found among these two groups. The mean enzyme activity in the hemolysate of the leprosy patients and the healthy individuals has not differed significantly when expressed in UI/g.Hemoglobin/l. The enzyme activity in erythrocytes ghosts from leprosy patients was significantly smaller then that in erythrocytes ghosts from healthy individuals. The mean level of methemoglobin in the leprosy patients was higher than in the control group, probably due to oxidizer action of sulphone. Tends in view we have found smaller levels of enzymatic activity in the erythrocytes membranes of the leprosy patients and coincident levels in the hemolysate compared to controls, we can affirm that probably this is due to an enzymatic displacement from the cellular membrane to the cytoplasm, with the objective of maintaining in the erythrocyte a constant hemoglobinic balance, in spite of the sulphone oxidizer action.

**Key-words:** Leprosy. NADH- reductase. Diaphorase. NADH-methemoglobin-reductase.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, D.W., JANDL, J.H. Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action. *J. Clin. Invest.*, v.40, p.454-475, 1961.
2. BALAKRISHNAN, S., KARTHIKEYAN, S., RAMU, G. Investigations into haemolytic effects of dapsone therapy in leprosy patients. *Indian J. Med.*, v.61, p.10-16, 1989.
3. BANZATO, C.E.M., MAGNA L.A. In vitro effect of Dapsone on NADH-methemoglobin reductase. *Int. J. Leprosy*, v.59, p.486-487, 1991.
4. BERNARD, J., et al. Anatomia e fisiologia do eritrócito e da série eritroblástica. In: \_\_\_\_\_ **Manual de hematologia**. Santos, 1989. p.15-35.
5. BEUTLER, E., BALUDA, M.C. Metemoglobin reduction. Studies of the interaction between cell populations and of the role of methylene blue. *Blood*, v.22, p. 323-33, 1963.
6. BUNN, H. F. Distúrbios da hemoglobina - metemoglobinemia. In: HARRISSON, T.R. **Medicina interna**. 13. ed. São Paulo: Mc Graw Hill, 1995. v.2., p.1823-1824.
7. CAMPBELL, J.M. , 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**. 3.ed. São Paulo: Roca, 1986. p.214.
8. CATICHA-ALFONSO, O.S., MAGNA, L.A., BEIGUELMAN, B. NADH - redutase de metemoglobina e reticulocitose. **Ciência e Cultura**, v.37, p.280-283, 1985.
9. CHOURY, D., LEROUX, A. , KAPLAN, J.C. Membrane-bound cytochrome *b5* reductase (methemoglobin reductase) in human erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, v.67, p.149-51, 1981.
10. COHEN, G., HOCHSTEIN, P. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. **Biochemistry**, v.3, p.895-900, 1964.
11. CONROY, J.M., BAKER, J.D., MARTIN, W.J. et al. Acquired methemoglobinemia from multiple oxidants. **Soot. Med. J.**, v.86, p.1156-1159, 1993.
12. CREAM, J. J., SCOTT, G.L. Anaemia in dermatitis herpetiformis. The role of Dapsone- induced haemolysis and malabsorption. **Brit. J. Derm.**, v.82, p.333-342, 1970.
13. DODGE, J.T., MITCHELL, C., HANAHAN, D.J. The preparation and characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.100, p.119-130, 1963.
14. EDELHOCH, H., HAYAISHI, O., TEPLY, L.J. The preparation and properties of a soluble diphosphopyridine nucleotide cythochrome c reductase. *J. biol. chem* , v.197, p. 97-104, 1952.
15. EVELIN, K.A., MALLOY, H.T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *J. biol. chem.*, v.126, p. 655-662, 1938.
16. FEIG, S.A., NATHAN, D.G., GERALD, P.S. et al. Congenital methemoglobinemia- the result of age-dependent decay of methemoglobin reductase. **Blood**, v.39, p.407, 1972.
17. FINCH, C. A. Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia. **The New Engl. J. of Med.** v. 239, p.470-478, 1948.
18. HARLEY, J.D. , MAUER, A.M. Studies on the formation of Heins bodies. I. Methemoglobin production and oxyhemoglobin distruction. **Blood**, v.16, p.1722-35 , 1960.
19. HARLEY, J.D., MAUER, A.M. Studies on the formation of Heins bodies. II. The nature and significance of heins bodies. **Blood**, v.17, p.418-33, 1961.
20. HEGESH, E., CALMANOVICI, N., AVRON, M. - New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH-Methemoglobin Reductase) in erythrocytes. **J. Lab & Clin. Med.** . v. 72, p.339-44, 1968.
21. HENRY, J.B. Hemoglobina. In: TODD, SANFORD, DAVIDSON. **Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais**. 16. ed., São Paulo: Manole, 1982. V.I, p. 946-54.
22. HOFFBRAND, A.V., PETTIT, J.E. **Hematologia clínica ilustrada: manual e atlas colorido**. São Paulo: Manole, 1991. p.4-7.

23. HUENNEKENS, F.M., CAFFREY, R.W., BASFORD, R.E., et al. Erythrocyte metabolism. IV. Isolation and properties of methemoglobin reductase. **J. Biol. Chem.**, v.227, p.261-72, 1957.
24. JANDL, J.H., ENGLE, L.K., ALLEN, D.W. Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. I. Heinz body anemias as an acceleration of red cell aging. **J. Clin. Invest.**, v.39, p.1818-36, 1960.
25. KITAJIMA, S., YASUKOCHI Y., MINAKAMI, S. Purification and properties of human erythrocyte membrane NADH-cytochrome b5 reductase. **Arch. Biochem. Biophys.** v.210, p.330-9, 1981.
26. KUMA, F., ISHIZAWA, S., HIRAYAMA, K, NAKAJIMA, H. Studies on methemoglobin reductase. I. Comparative studies of diaphorases from normal and methemoglobinemic erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v.247, p.550-5, 1972.
27. KUMA, F., PROUGH, R.A., MASTER, B. S. S. Studies on methemoglobin reductase. Immunochemical similarity of soluble methemoglobin reductase and cytochrome b5 of human erythrocytes with NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 of rat liver microsomes. **Arch. Biochem. Biophys.** v.172, p.600-7, 1976,
28. LEROUX, A., TORLINSKI, L., KAPLAN, J.C. Soluble and microsomal forms of NADH-cytochrome b5 reductase from human placenta: Similarity with NADH-methemoglobin reductase from human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.481, p.50, 1977.
29. MAGNA L. A., BEIGUELMAN, B. NADH-Methemoglobin reductase and methemoglobinemia among leprosy patients. **Int. J. Lepr.** v.52, p.475-81, 1984
30. MATSUKI, T., TAMURA, M., TAKESHITA, M. et al. Age-dependent decay of cytochrome b5 and cytochrome b5 reductase in human erythrocytes. **Biochem. J.**, v.194, p.327-30, 1981.
31. MELDOLESI J., CORTE, G., PIETRINI, G. et al. Localization and biosynthesis of NADH-cytochrome b5 reductase, an integral membrane protein, in rat liver cells. **J. Cell Biol.**, v.85, p.516-26, 1980.
32. MIHARA, K., SATO, R., SAKAKIBARA, R. et al. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide - cytochrome b5 reductase: Location of the hydrophobic, membrane-binding region at the carboxyl-terminal end and the masked amino terminus. **Biochemistry**, v.17, p.2829-34, 1978.
33. MILLER, A., SMITH, H.C. The intracellular and membrane effects of oxidant agents on normal red cells. **Brit. J. Haem.**, v.19, p.417-28, 1970.
34. MILLS, G.C., RANDALL, H.P. - Hemoglobin catabolism II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. **J. Biol. Chem.**, v.232, p.589- 98, 1958.
35. NORDEEN, S.K., LOPES BRAVO, L., SUNDARESAN, T.K. Mise au point - nombre estimatif de cas de lepre dans le monde. **Acta Lepr.**, v.8, p.121-5, 1993.
36. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Una guía para el control de la lepra**. Madri: Ministerio de Sanidad Y Consumo, 1988..
37. PANIN, G., PERNECHELE, M., GIURIOLI, R. et al. Cytochrome b5 reductase activity in erythrocytes and leukocytes as related to sex and age. **Clin. Chem.**, v.30, p.701-3, 1984.
38. PASSON, P.G., HULTQUIST, D.E. Soluble cytochrome b5 reductase from human erythrocytes. **Bioch. Biophys. Acta**, v.275, p.62-73, 1972.
39. PETRAGNANI, N., NOGUEIRA, O.C., RAW, I. Methemoglobin reduction through cytochrome b5 reductase. **Nature**, v.184, p.1651. 1959.
40. RAPAPORT, S.I. Hemoglobinopatias e síndromes talassêmicas. In : \_\_\_\_\_ **Introdução à hematologia**. Rio de Janeiro: Harper & Row do Brasil. 1978. p.54-70.
41. Metemoglobinemia . In: \_\_\_\_\_ **Introdução à hematologia**. Rio de Janeiro: Harper & Row do Brasil,1978. p.109-10.
42. RASBRIDGE, M.R., SCOTT, G.L. The haemolytic action of dapsona : he efect on red-cell glycolysis . **Brit. J. Haemat.**, v.24, p.169-81, 1973.
43. ROSS, J.D. Deficient activity of DPNH-dependent methemoglobin diaphorase in cord blood erythrocytes. **Blood**, v.21, p.51-62,1963.

44. SCHWARTZ, J.M., JAFFÉ, E. R. Hereditary methemoglobinemia with deficiency of NADH-dehydrogenase. In: STANBURY, J.B., WYNGAARDEN, J.B., FREDRICKSON, D.S. eds. **The metabolic basis of inherited disease**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 1978. p.1452-64
45. SCHWARTZ, J.M., PARESS, P.S., ROSS, J.M., DIPILLO, F., RIZEK R. Unstable variant of NADH-methemoglobin reductase in Puerto Ricans with hereditary methemoglobinemia. *J. Clin. Invest.*, v. 51, p.1594-601, 1972.
46. SCHWARTZ, J.M., REISS, A.L., JAFFÉ, E.R. Hereditary methemoglobinemia with deficiency of NADH-cytochrome *b5* reductase. In: STANBURY, J.B., WYNGAARDEN, J.B., FREDRICKSON, D.S., eds. **The metabolic basis of inherited disease**. New York: McGraw-Hill, 1983. p.1654-65.
47. SCOTT, E.M. The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. *I. Clin. Invest.*, v.39, p.1176-9, 1960.
48. SCOTT, E. M., DUNCAN, I.W. , EKSTRAND, V. The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, v.240, p.481-5, 1965.
49. SCOTT, E.M., GRIFFITH, I.V. The enzymic defect of hereditary methemoglobinemia- diaphorase (Preliminary notes). *Biochem. and Biophys. Acta*, v.34, p.584-6, 1959.
50. SCOTT, E.M., MCGRAW, J.C. Purification and properties of diphosphopyridine nucleotide diaphorase of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, v.237, p.24952, 1962.
51. SIMPSON, I. A. Appendix. Method of sulfone estimations. *Int. J. of Leprosy*, v.17, p.208-10, 1949.
52. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA. Enzimopatias eritrocitárias. In \_\_\_\_\_ Manual de Técnicas e Recomendações Hematológicas. São Paulo: 1975. p.125-23.
53. SPATZ, L., 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.* v.248, p.793-9, 1973.
54. SUGITA, Y., NOMURA, S., YONEYAMA, Y. Purification of reduced pyridine nucleotide dehydrogenase from human erythrocytes and methemoglobin reduction by the enzyme. *I. Biol. Chem.*, v.246, p.6072-78. 1971.