

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/5579
IB/80620

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1984

LUIS ALBERTO MAGNA

*Este exemplar corresponde
 a redação final da Tese
 defendida pelo candidato
 Dr. Luis Alberto Magna e aprovada
 pela comissão julgadora
 de Campinas, 14 de março de 1984
 Bernardo Beiguelman*

A NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA E METEMOGLOBINEMIA EM HANSENIANOS SOB TRATAMENTO SULFÔNICO

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador:
 Prof. Dr. Bernardo Beiguelman

1 9 8 4

**UNICAMP
 BIBLIOTECA CENTRAL**

Classif. T	
Autor M274m	
V.	Ex.
Tombo BC/ 5579	
IB/ 558	

IB/80620
BC/5579

INDICE

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I.1 - A metemoglobina	1
I.2 - A redução da metemoglobina	2
I.3 - O sistema NADPH-dependente	4
I.4 - As enzimas do sistema NADPH-dependente	6
I.5 - O sistema NADH-dependente	7
I.6 - As enzimas do sistema NADH-dependente	7
I.7 - A deficiência de NADH-redutase do citocromo b ₅ e metemoglobine - mia congênita	10
I.8 - Variantes eletroforéticas da NADH-redutase de metemoglobina	12
I.9 - A deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina	13

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

15

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS

III.1 - A amostra estudada	16
III.2 - A coleta de sangue	16
III.3 - A dosagem de hemoglobina e de metemoglobina	16
III.4 - Dosagem da atividade da NADH-redutase de metemoglobina	17
III.5 - A dosagem dos níveis de DDS	18

CAPÍTULO IV - RESULTADOS

20

CAPÍTULO V - DISCUSSÃO

37

CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES

60

RESUMO

61

SUMMARY

62

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

63

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma proteína globular, com peso molecular de 68.000, composta de quatro sub-unidades de cadeias peptídicas de mesmo peso, cada uma das quais com cerca de 140 resíduos de aminoácidos e um grupo prostético constituído por um anel tetrapirrólico contendo um átomo de ferro. As cadeias peptídicas, também chamadas globinas e que diferem entre si por sua estrutura primária, são designadas por letras do alfabeto grego.

O indivíduo adulto normal apresenta dois tipos de hemoglobina em seus eritrócitos, a hemoglobina A ou componente hemoglobínico maior, que representa de 97% a 99% do seu conteúdo hemoglobínico, e a hemoglobina A₂. A primeira é constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias beta, sendo essas últimas substituídas por duas cadeias delta na hemoglobina A₂.

A hemoglobina tem como função o transporte de oxigênio aos tecidos depois de captá-lo a nível pulmonar. Isso é feito às custas de uma ligação reversível entre a molécula de oxigênio, sob a forma de ânion superóxido, e o átomo de ferro (Fe^{++}) das sub-unidades da molécula de hemoglobina. Nessa ligação ocorre transferência parcial de um elétron do ferro ao oxigênio ($Fe^{++}.O=O^{-}$). Quando o oxigênio se dissocia esse elétron normalmente retorna ao átomo de ferro, apesar de poder ocorrer o inverso em escala reduzida, ou seja, a passagem do ferro do seu estado ferroso inicial para o estado férrico (Fe^{+++}).

I.1. A metemoglobina

A hemoglobina com o ferro oxidado (forma férrica) recebe o nome de metemoglobina ou ferriemoglobina, e pode ser definida, portanto, como um derivado oxidado da hemoglobina onde o Fe^{++} passou a Fe^{+++} . O pigmento assim formado é incapaz de combinar com o oxigênio e apresenta cor castanha em meio ácido, com picos de absorção em 550 e 631 nm, situação em que o ferro está ligado à água. Quando em meio alcalino, o ferro encontra-se ligado a ânions hidroxila e a cor do pigmento torna-se vermelho-escura, com picos de absorção em 540 e 575 nm.

Na maioria das pessoas a concentração de metemoglobina está em torno de 2% da hemoglobina total, considerando-se a ocorrência de metemoglobinemia quando esse valor é ultrapassado. Isso se prende ao fato de existirem mecanismos que, de um lado protegem a hemoglobina contra a oxida

ção e, de outro, promovem a redução da metemoglobina, devolvendo um elétron ao átomo de Fe^{+++} , que volta, assim, ao estado ferroso.

De fato, os ânions superóxidos são eliminados por uma dismutase de superóxido, ao passo que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é reduzido pela catalase e pela redutase de glutatião (Winslow e Anderson, 1978). Além disso, a própria fração globínica da hemoglobina protege o ferro contra a oxidação, havendo provas de que se o núcleo heme é separado da molécula de globina o átomo de ferro sofrerá oxidação a uma velocidade maior do que na hemoglobina íntegra. O heme ligado à globina localiza-se em um bolsão constituído por dois resíduos de histidina e aminoácidos neutros, os quais determinam uma região hidrófoba na molécula, o que dificulta a perda de elétrons do átomo de ferro para o oxigênio. Tal perda, é claro, seria facilitada em meio aquoso (Schwartz e Jaffé, 1978). A descrição de metemoglobinemia em pacientes portadores de hemoglobinas com substituição de aminoácidos na região do bolsão e que são genericamente chamadas de hemoglobinas M (Efremov *et al.*, 1974) serve para realçar o papel da cadeia de globina na prevenção da oxidação do átomo de ferro.

A redução da metemoglobina deve-se à transferência de elétrons para o ferro oxidado, a qual se processa em duas etapas segundo Tomoda *et al.* (1980). Na primeira delas ocorre a formação de moléculas híbridas, nas quais as duas cadeias alfa ou as duas cadeias beta têm seu átomo de ferro reduzido. Na segunda etapa completa-se a redução dos átomos de ferro das cadeias restantes. Aqui é interessante notar que, devido ao seu maior potencial de oxido-redução, o átomo de ferro das cadeias beta é reduzido mais rapidamente que o das cadeias alfa.

I.2. A redução da metemoglobina

A redução da metemoglobina pode ocorrer diretamente, pela ação do ácido ascórbico ou do glutatião reduzido, ou enzimaticamente, mediante o concurso de redutases dependentes de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADH) ou de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH) (Gibson, 1948).

A redução direta da metemoglobina não parece ter um papel fisiológico importante. Realmente, sabe-se que pacientes com escorbuto e, portanto, carentes de vitamina C, bem como indivíduos com hemólise congênita devida à deficiência da sintetase de glutatião e, conseqüentemente, de glutatião, geralmente não apresentam metemoglobinemia. Além disso, ambas as substâncias são incapazes de promover redução significativa da me

temoglobina in vitro (Schwartz e Jaffé, 1978).

Hemácias previamente tratadas com nitrito, procedimento que converte praticamente toda a hemoglobina em metemoglobina, têm capacidade de reduzir a metemoglobina se suspensas em meio contendo glicose ou lactato (Gibson, 1948; Jaffé et al., 1966 ; Jaffé , 1966). Com ambos os substratos, a taxa de redução da metemoglobina é equivalente ao acúmulo de piruvato intra-eritrocitário (Gibson, 1948).

Não é possível provocar qualquer alteração na taxa de redução da metemoglobina em hemácias previamente tratadas com nitrito e suspensas em meio glicosado ao qual se adicionaram íons fluoreto. Nesse caso, essa redução é acompanhada do acúmulo de gliceratos ao invés do acúmulo de piruvato. O iodoacetato, por outro lado, é capaz de, nas mesmas condições, reduzir em até 90% a capacidade eritrocitária de redução da metemoglobina (Gibson, 1948).

Tendo em mente que os íons fluoreto inibem a via glicolítica na reação catalisada pela enolase, e que o iodoacetato inibe a desidrogenase de 3-fosfato de gliceraldeído, fica evidente que a reação catalisada por essa última é de crucial importância no mecanismo eritrocitário de redução da metemoglobina.

De fato, as observações acima quanto ao papel da glicose e do lactato na redução da metemoglobina permitem concluir que ambos os substratos concorrem para essa redução, uma vez que ambos são capazes de prover NADH necessário para a mesma. Assim, o excesso de lactato promove a redução da metemoglobina acompanhada da produção de piruvato, às custas da reação catalisada pela desidrogenase láctica, a qual, concomitantemente, promove a redução do NAD. Fenômeno semelhante ocorre com o excesso de glicose, que também produz, ao lado da redução da metemoglobina, o acúmulo intra-eritrocitário de piruvato. Nesse caso, como se viu acima, tal acúmulo decorre de um aumento da oxidação de 3-fosfato de gliceraldeído, a qual é também acompanhada da redução do NAD.

A redução da metemoglobina por hemácias tratadas com nitrito e suspensas em meio contendo glicose é bastante acelerada pela adição de azul de metileno, ao passo que se tais hemácias estiverem suspensas em meio contendo lactato, a redução da metemoglobina permanece inalterada. Esse aumento da taxa de redução da metemoglobina na presença de azul de metileno não é acompanhado do acúmulo intra-eritrocitário de piruvato e gliceratos (Gibson, 1948).

O fato de as hemácias de indivíduos deficientes de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6PD) serem incapazes de mostrar esse tipo de resposta indica, claramente, que a metemoglobina também pode ser reduzida mediante o concurso de NADPH, que é gerado, na hemácia, na reação catalisada por essa enzima (Gibson, 1948).

Em resumo, os mecanismos eritrocitários de redução da metemoglobina dependem tanto de NADH quanto de NADPH e, em ambos os casos, tem-se o concurso de enzimas da via glicolítica que catalisam reações nas quais ocorre a redução do NAD e do NADP.

A redução da metemoglobina propriamente dita, por sua vez, depende de enzimas que catalisam a transferência de elétrons dessas coenzimas para o Fe^{+++} da metemoglobina, como se verá adiante. Desse modo, pode-se afirmar que as hemácias apresentam dois sistemas enzimáticos de redução da metemoglobina, um deles NADPH-dependente e o outro NADH-dependente.

I.3. O sistema NADPH-dependente

O azul de metileno aumenta enormemente a capacidade eritrocitária de redução da metemoglobina na presença de glicose, embora esse efeito não ocorra quando as hemácias são suspensas em lactato. Além disso, a redução da metemoglobina na presença de azul de metileno não é acompanhada por acúmulo concomitante de piruvato, nem de 1,3-difosfoglicerato. Por outro lado, tanto as hemácias de indivíduos normais quanto as de indivíduos portadores de metemoglobinemia congênita comportam-se de maneira semelhante nessas condições (Gibson, 1948).

Essas observações levaram Gibson (1948) a postular que a adição de azul de metileno a suspensões de hemácias em meio contendo glicose abria um novo processo metabólico no concernente à redução da metemoglobina. Esse autor concluiu, ainda, que a adição do azul de metileno utilizaria o NADPH como coenzima, uma vez que tal via depende da fosforilação da glicose (Gibson, 1948).

De fato, eritrócitos deficientes de desidrogenase de 6-fosfato de glicose ou de desidrogenase de NADPH não aumentam a velocidade de redução da metemoglobina na presença de azul de metileno, ao contrário do que acontece com os eritrócitos sem deficiência dessas duas enzimas (Schwartz e Jaffé, 1978). A figura 1 ilustra o processo de redução da metemoglobina por essa via.

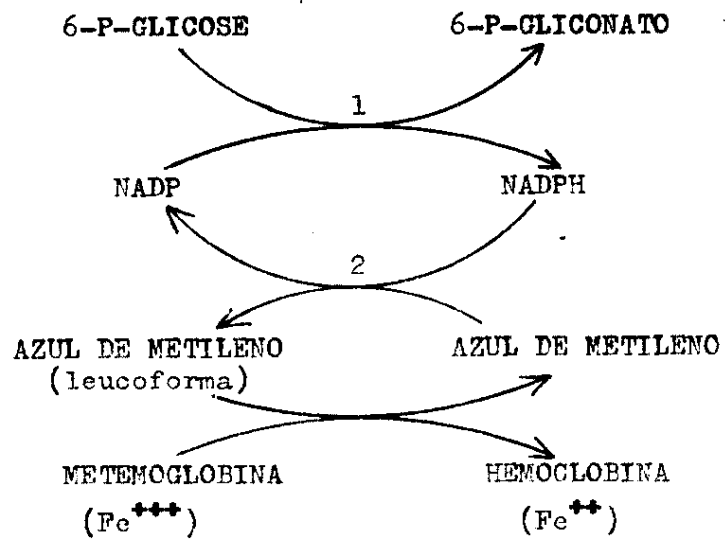


FIGURA 1. Redução da metemoglobina pela utilização do NADPH.
1. desidrogenase de 6-fosfato de glicose
2. desidrogenase de NADPH

Esse sistema metabólico NADPH-dependente, por outra lado, não parece desempenhar papel fisiológico importante, uma vez que, tanto in vivo quanto in vitro, a redução da metemoglobina ocorre somente na presença de azul de metileno ou de riboflavina (Kaplan e Chirouze, 1978 ; Matsuki et al., 1978; Hirano et al., 1981). Além disso, indivíduos com deficiência de G-6PD não são portadores de metemoglobinemia (Schwartz e Jaffé, 1978).

I.4. As enzimas do sistema NADPH-dependente

Além da hexoquinase e da G-6PD, a redução da metemoglobina, nessa via, depende de uma desidrogenase de NADPH (figura 1), que foi caracterizada por Yubisui et al. (1977) como sendo a NADPH-redutase de flavina, também chamada de NADPH-redutase de metemoglobina. Essa enzima reduz a metemoglobina ao transferir elétrons do NADPH para o azul de metileno ou outros corantes similares, ou ainda para a flavina, os quais, sem o concurso de outras enzimas, transferem elétrons para a metemoglobina, reduzindo-a (Schwartz e Jaffé, 1978).

Essa desidrogenase, de peso molecular ao redor de 21 000, tem capacidade de reduzir rapidamente o 2,6-diclorofenol-indofenol (DCIP) e, na ausência de azul de metileno, reduz lentamente a metemoglobina (Scott et al., 1965). Embora tenha alta afinidade pelo NADPH, o NADH pode, também, ser por ela utilizado como coenzima e, nesse caso, a velocidade da reação é cerca de 1/4 daquela observada na presença de NADPH (Huennekens et al., 1957).

Scott et al. (1965) identificaram duas formas de desidrogenase de NADPH, as quais diferem somente no comportamento cromatográfico em coluna de fosfato de cálcio, e que foram chamadas por esses autores de desidrogenase de NADPH A e B.

Do ponto de vista fisiológico, entretanto, a NADPH-redutase de metemoglobina não tem grande importância, uma vez que as hemácias não têm o seu acceptor intermediário de elétrons para transferi-los à metemoglobina (Schwartz e Jaffé, 1978).

Com relação à terapêutica, entretanto, essa enzima é extremamente importante visto que se pode conseguir a diminuição da concentração de metemoglobina mediante a administração de azul de metileno ou de riboflavina, uma vez que essas substâncias desempenham o papel do acceptor intermediário de elétrons entre essa enzima e a metemoglobina, estimulando,

desse modo, essa via metabólica (Kaplan e Chirouze, 1978; Matsuki et al., 1978; Hirano et al., 1981).

I.5. O sistema NADH-dependente

Como já se mencionou anteriormente, hemácias previamente tratadas com nitrito e, portanto, com toda a hemoglobina convertida em metemoglobina, são capazes de reduzir a metemoglobina quando suspensas em meio contendo glicose ou lactato. Em ambos os casos, a redução da metemoglobina é acompanhada de acúmulo de piruvato (Gibson, 1948).

O fato de o iodoacetato, que inibe a desidrogenase de 3-fosfato de gliceraldeído, bloquear a redução da metemoglobina indica que tal redução se processa com o concurso do NADH, que é gerado durante a oxidação do 3-fosfato de gliceraldeído (Gibson, 1948).

O sistema de redução da metemoglobina NADH-dependente é o mais importante do ponto de vista fisiológico, uma vez que os eritrócitos dos indivíduos portadores de metemoglobinemia congênita, ao contrário dos eritrócitos de indivíduos normais, têm a capacidade de redução da metemoglobina muito diminuída na presença de glicose ou lactato além do que não acumulam piruvato nessas condições (Gibson, 1948).

A transferência de elétrons do NADH produzido na via glicolítica para a metemoglobina se faz às custas de uma desidrogenase de NADH, que, primeiramente, reduz o citocromo b_5 eritrocitário, o qual, por sua vez, transfere elétrons não-enzimaticamente para a metemoglobina (Petraghiani et al., 1959; Hultquist e Passon, 1971; Sugita et al., 1971), como ilustra a figura 2.

Figura 2

I.6. As enzimas do sistema NADH-dependente

Além das enzimas da via glicolítica, principalmente a desidrogenase de 3-fosfato de gliceraldeído e a desidrogenase láctica, o sistema NADH-dependente de redução da metemoglobina requer a utilização de uma desidrogenase de NADH, como está ilustrado na figura 2.

Petraghiani, Nogueira e Raw (1959) foram os primeiros autores a demonstrar que essa desidrogenase tinha a capacidade de reduzir o citocromo b_5 que, por sua vez, reduz diretamente a metemoglobina. Posteriormente demonstrou-se que o citocromo b_5 era constituinte normal da hemácia, sendo a sua concentração um fator limitante da velocidade de redução

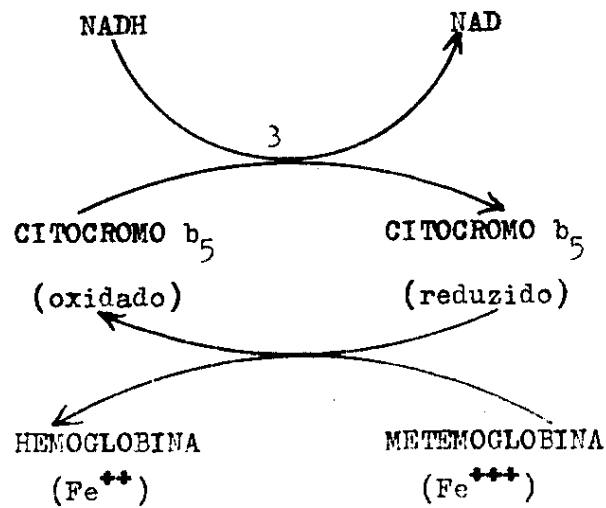
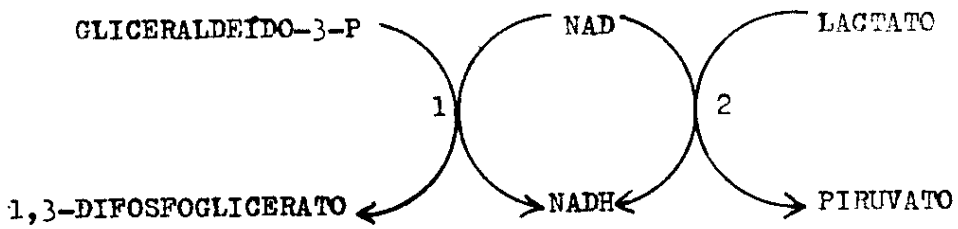


FIGURA 2. Redução da metemoglobinina pela utilização do NADH.

1. desidrogenase de 3-fosfato de gliceraldeído
2. desidrogenase láctica
3. desidrogenase de NADH

da metemoglobina, razão pela qual as hemácias jovens, que têm maior concentração de citocromo b_5 , têm maior capacidade de redução da metemoglobina (Hultquist e Passon, 1971).

Essa desidrogenase é específica para o NADH (Scott et al., 1965) assim como para o citocromo b_5 (Sugita et al., 1971), razão pela qual ela passou a ser chamada de NADH-redutase do citocromo b_5 (EC 1.6.2.2) ou, simplesmente, NADH-redutase de metemoglobina, cujo peso molecular é da ordem de 33 000 (Schwartz e Jaffé, 1978). Como essa enzima também catalisa a rápida redução do DCIP na presença de NADH, sendo esse corante utilizado, inclusive, para a mensuração da sua atividade, a NADH-redutase de metemoglobina é costumeiramente chamada de NADH-diaforase ou simplesmente diaforase.

O papel fisiológico dessa enzima é de grande importância uma vez que, como já se mencionou acima, a redução da metemoglobina nos eritrócitos é feita às custas da utilização de NADH. As hemácias possuem o acceptor intermediário de elétrons para essa via (citocromo b_5), o que não ocorre com o sistema NADPH-dependente, no qual esse acceptor não existe naturalmente nos eritrócitos.

Estudos de cromatografia em coluna de fosfato de cálcio do hemolisado parcialmente purificado para a atividade de redutase de metemoglobina permitiram a Scott et al. (1965) identificar duas redutases NADH-dependentes, que foram por eles chamadas de NADH-desidrogenase I e II. Esses autores calcularam que a desidrogenase I tem 61% da capacidade eritrocitária de redução da metemoglobina, enquanto que a desidrogenase II tem somente cerca de 6% dessa capacidade.

A NADH-desidrogenase ou redutase I de Scott et al. (1965) foi posteriormente identificada com a NADH-redutase do citocromo b_5 (Schwartz e Jaffé, 1978) e, em cromatografia de coluna de DEAE-celulose ela elui na segunda fração, razão pela qual Kitao et al. (1974) a chamaram de diaforase II.

Além das hemácias, a NADH-redutase do citocromo b_5 é encontrada em várias outras células, tais como os leucócitos, as células musculares, os hepatócitos, os fibroblastos e as células cultivadas a partir do líquido amniótico (Leroux et al., 1975). Nas hemácias tanto o citocromo b_5 quanto a sua redutase se apresentam sob forma solúvel, enquanto que nos outros tecidos essas duas proteínas estão fortemente ligadas ao retículo endoplasmático, onde participam das reações de óxido-redução microsomiais (Kaplan et al., 1979).

I.7. A deficiência de NADH-redutase do citocromo b₅ e metemoglobinemia congênita

De longa data conhecem-se casos de indivíduos portadores de metemoglobinemia congênita, também chamada de metemoglobinemia idiopática, bem como o fato de tais casos apresentarem recorrência familiar (Schwartz e Jaffé, 1978). Tais indivíduos, que apresentam níveis de metemoglobina de cerca de 25% da hemoglobina total são, usualmente, assintomáticos, e apresentam como sinal clínico somente a cianose. Mesmo que tais níveis atinjam a cifra de 40%, as únicas queixas são de fadiga e dispnéia aos grandes esforços (Beiguelman, 1983).

O trabalho de Gibson (1948) comprovou que a metemoglobinemia, nesses casos, é conseqüente à deficiência dos eritrócitos em reduzir a metemoglobina às custas da utilização de NADH. Esse autor concluiu que tal deficiência residia na baixa atividade da desidrogenase de NADH e sugeriu a inclusão da metemoglobinemia congênita no grupo de doenças classificadas como erros inatos do metabolismo.

Scott (1960), estudando populações indígenas e de esquimós do Alasca, nas quais existe uma alta prevalência de indivíduos com metemoglobinemia congênita, observou que tais pessoas apresentavam deficiência de diaforase eritrocitária medida no hemolisado, ao passo que seus pais mostravam essa enzima com atividade intermediária em relação a eles e aos filhos de "pais normais".

Scott (1960) postulou a existência de um par de alelos autossômicos responsáveis pela determinação da atividade da diaforase eritrocitária, sendo a metemoglobinemia congênita considerada um caráter autossômico recessivo. A sua conclusão foi reforçada pelo fato de que suspensões de hemácias previamente tratadas com nitrito em meio contendo glicose reduzem a metemoglobina muito lentamente se tais hemácias provêm de indivíduos metemoglobinêmicos, enquanto que as hemácias dos pais de tais indivíduos têm capacidade intermediária de redução da metemoglobina quando comparadas à das hemácias de seus filhos e à de hemácias de indivíduos normais (Jaffé et al., 1966). Curiosamente, entretanto, Jaffé et al. (1966) afirmam não terem detectado uma correlação precisa entre o nível da atividade de enzimática do hemolisado e a capacidade de redução da metemoglobina pelas hemácias isoladas.

Desde então muitos casos de metemoglobinemia congênita devida à deficiência de NADH-redutase de metemoglobina têm sido relatados

(Fialkow et al., 1965; Ritter et al., 1973; Bianchi-Scarrá et al., 1976; Mast et al., 1976; González et al., 1978; Board e Pidcock, 1981, entre outros). Paralelamente, os estudos bioquímicos acerca dessa enzima permitiram caracterizar que tais casos deviam-se, especificamente, à deficiência da NADH-redutase do citocromo b_5 (Kitao et al., 1974; Leroux et al., 1975; Vives-Corróns et al., 1978; Tanishima et al., 1980).

A constatação de que muitos pacientes com metemoglobinemia congênita apresentavam retardamento mental (Fialkow et al., 1965; Jaffé et al., 1966; Kaplan et al., 1974; Kitao et al., 1974) conduziu à caracterização de duas formas clínicas de metemoglobinemia congênita, quais sejam, a do tipo I (sem retardamento mental) e a do tipo II (com retardamento mental) (Kaplan et al., 1979).

Na metemoglobinemia congênita do tipo I a deficiência enzimática é restrita aos eritrócitos e, como já se mencionou acima, a cianose é o único sinal clínico, fato que usualmente conduz à pesquisa de afecções cardíaco-pulmonares antes que se faça o diagnóstico de metemoglobinemia (Kaplan et al., 1979).

Na metemoglobinemia congênita do tipo II, por outro lado, a deficiência de NADH-redutase do citocromo b_5 parece ser generalizada, uma vez que, nesses casos, a atividade dessa enzima está bastante deprimida não somente nas hemácias, mas também nos leucócitos (Heusden et al., 1971; Leroux et al., 1975), células musculares, hepatócitos e fibroblastos (Leroux et al., 1975). Do ponto de vista clínico os sinais mais importantes são o retardamento mental, microcefalia, estrabismo, atetose e opistótono, além, é claro, da cianose. O quadro neurológico é progressivo, estabelecendo-se durante o primeiro ano de vida, a partir do segundo ou terceiro mês (Kaplan et al., 1979).

Tendo em vista que na metemoglobinemia congênita do tipo I somente as hemácias mostram deficiência enzimática, tem-se que, nesse caso, somente a forma solúvel da enzima está comprometida, ao passo que na metemoglobinemia congênita do tipo II tanto a forma solúvel quanto a microsomal estão comprometidas (Kaplan et al., 1979).

O tratamento da metemoglobinemia congênita do tipo I visa à diminuição da cianose apresentada pelos pacientes e é puramente cosmético, uma vez que tais indivíduos raramente manifestam sintomatologia.

Nas pessoas com metemoglobinemia congênita cuja G-6PD tem atividade normal, o nível sanguíneo de metemoglobina é corrigido rapidamente pela administração de azul de metileno por via endovenosa na dose

de 1 a 2 mg por kg de peso corporal, a qual, eventualmente, pode ser repetida (Gabel e Bunn, 1974), ou por via oral, na dose de 200 a 300 mg durante três dias (Gabel e Bunn, 1974; Chandrasekar et al., 1974). Depois disso o nível de metemoglobina anterior ao tratamento só será atingido ao término de 10 a 14 dias. Independentemente da atividade da G-6PD, a metemoglobinemia congênita pode ser controlada pela administração de meio a um grama diário de vitamina C ou de 30 a 60 mg diários de riboflavina (Kaplan e Chirouze, 1978; Hirano et al., 1981). O grande inconveniente do ácido ascórbico, entretanto, é que o uso prolongado da vitamina C pode ser responsável por hiperoxalúria e formação de cálculos renais (Kaplan e Chirouze, 1978).

1.8. Variantes eletroforéticas da NADH-redutase de metemoglobina

A eletroforese do hemolisado em gel de amido e pH variando de 8,6 a 9,3 permite a identificação, na grande maioria dos casos, de uma única banda de NADH-diaforase, localizada em posição anódica em relação à hemoglobina A₂ e que recebeu a notação Dia 1 (Hopkinson et al., 1970; Schwartz e Jaffé, 1978). Além dela, outras seis variantes eletroforéticas, designadas Dia 2-1, Dia 2, Dia 3-1, Dia 4-1, Dia 5-1 e Dia 6-1 também foram descritas, nas quais, com exceção da variante Dia 2, duas isoenzimas estão presentes, uma delas com a mesma mobilidade da variante Dia 1 e a outra mais lenta (Dia 3-1 e Dia 4-1) ou mais rápida que ela (Dia 2-1, Dia 5-1 e Dia 6-1). Nenhuma dessas variantes, entretanto, com provável exceção da variante Dia 6-1, estão associadas à diminuição da atividade enzimática (Hopkinson et al., 1970; Board e Pidcock, 1981).

Outras variantes com mobilidade eletroforética diferente das acima citadas e associadas à metemoglobinemia congênita passaram a ser designadas pela localidade de origem dos indivíduos portadores das mesmas, tais como as variantes Beni-Messous (Kaplan et al., 1974) e Santiago de Cuba (González et al., 1978).

A maioria das variantes deficientes de NADH-redutase de metemoglobina estudadas do ponto de vista eletroforético têm mobilidade semelhante à variante Dia 1, considerada como a variante normal (Schwartz e Jaffé, 1978) e a baixa atividade por elas apresentada pode estar associada à sua instabilidade (Kaplan et al., 1974; Mast et al., 1976; González et al., 1978) ou a menor taxa de produção da molécula enzimática (Kitao et al., 1974).

Todas essas variantes, porém, são raras e determinadas por alelos do gene responsável pela produção da variante normal, de sorte que as variantes deficientes são mais frequentes em heterozigose. Assim, quando a heterozigose de um gene produtor de uma variante causadora de metemoglobina ocorre juntamente com o alelo produtor da variante normal, o indivíduo é normal, ao passo que quando ela ocorre entre alelos causadores de metemoglobinemia o heterozigoto também apresentará metemoglobinemia congênita (Beiguelman, 1983).

I.9. A deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina

Se por um lado os indivíduos homozigotos dos alelos produtores de variantes deficientes de NADH-redutase de metemoglobina apresentam altas taxas de metemoglobina em seu sangue, tem-se que as pessoas consideradas heterozigotas de um desses alelos têm seus níveis sanguíneos de metemoglobina dentro dos limites normais (Fialkow et al., 1965; Jaffé et al., 1966). A atividade redutora da metemoglobina notada nos hemolisados desses últimos, entretanto, encontra-se diminuída (Scott, 1960), sendo cerca de 2/3 da atividade presente nos hemolisados de indivíduos normais (Jaffé, 1966).

Apesar de serem assintomáticos, considera-se que os indivíduos com deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina têm maior suscetibilidade à ação de compostos oxidantes capazes de promover a formação de metemoglobina. Cohen et al. (1968), ao estudar seis soldados norte-americanos que manifestaram cianose quando submetidos a medicação anti-malárica, observaram que os mesmos apresentavam a NADH-redutase de metemoglobina eritrocitária com atividade deficiente.

Entre esses soldados, a cianose, decorrente do aumento dos níveis sanguíneos de metemoglobina para valores entre 20% a mais de 30% da hemoglobina total, esteve associada à manifestação de sintomatologia própria da metemoglobinemia tóxica, qual seja, cefaléia, fadiga, tontura, náusea, vômitos e/ou dispnéia.

A medicação anti-malárica empregada nesse caso constou de cloroquina (300 mg/dia), primaquina (15 mg/dia) e diaminodifenilsulfona (25 mg/dia) e cada um desses fármacos, isoladamente, provocou metemoglobinemia nos pacientes em doses isentas de quaisquer efeitos metemoglobinêmicos em pessoas normais. Além disso, a diaminodifenilsulfona (DDS) mostrou ser o medicamento com maior potencial quanto à indução de metemoglobinemia (Cohen

et al., 1968).

Mais raramente a deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina pode estar associada a metemoglobinemia transitória no período neo-natal, sem que haja o concurso concomitante de substâncias oxidantes (Lo et al., 1970).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

Os únicos trabalhos relativos à frequência populacional de indivíduos com deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina foram os realizados por Scott (1960) e Fialkow et al. (1965). Esses últimos autores verificaram em uma amostra de 49 doadores de sangue não aparentados que dois indivíduos (4,1%) tinham atividade enzimática semelhante à das pessoas que Scott (1960) classificara como sendo heterozigotas do gene da deficiência de NADH-redutase de metemoglobina. Esse dado sugeriria que tais indivíduos deveriam ocorrer na população com uma frequência maior que a esperada com base na incidência dos raros casos de metemoglobinemia congênita (homozigotos deficientes).

Por outro lado, sabe-se que a maioria dos hansenianos in gere uma dose diária de 100 mg de DDS, dose essa que é quatro vezes maior que a descrita por Cohen et al. (1968) como sendo capaz de provocar metemoglobinemia tóxica em indivíduos com deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina. A cianose entre os hansenianos, que tem sido atribuída a doses excessivas dessa sulfona (Cochrane, 1950; Desforges et al., 1959) poderia, pois, ser devida, pelo menos em certos casos, à deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina. Muitos casos de metemoglobinemia entre tais pacientes poderiam passar despercebidos, seja porque a cianose é difícil de ser observada em indivíduos de pele escura, seja porque muitos hansenianos apresentam níveis de hemoglobina muito inferior ao normal (Beiguelman et al., 1974). Como se sabe, se a concentração de metemoglobina não ultrapassar 2 g% a cianose não será detectada clinicamente, mesmo em pacientes caucasóides.

Levando em conta o exposto, o presente trabalho teve por objetivo investigar a atividade da NADH-redutase de metemoglobina bem como os níveis de metemoglobina em uma amostra de hansenianos sob tratamento com DDS e em uma amostra de indivíduos sadios.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

III.1. A amostra estudada

Os níveis de hemoglobina, de metemoglobina, de NADH-redutase de metemoglobina e de sulfonas foram investigados em amostras de sangue de 182 hansenianos adultos, em sua maioria de origem caucasóide (17 negróides) e que ingeriam uma dose diária de 100 mg de DDS (4,4'-diaminodifenilsulfona). As mesmas dosagens, exceção feita à dos níveis sanguíneos de DDS, foram feitas em amostras de sangue de 137 soldados do Exército brasileiro (128 caucasóides e 9 negróides), os quais, durante a realização deste estudo, afirmaram não estar ingerindo qualquer tipo de medicamento.

Entre os hansenianos, 87 eram pacientes de ambulatório residindo em Campinas, SP (46 homens e 41 mulheres), enquanto que os 95 restantes foram constituídos por homens internados em um sanatório (Hospital "Dr. Francisco Ribeiro Arantes", Itu, SP). O tempo de tratamento sulfônico variou de um mês a 40 anos entre os pacientes de ambulatório (média = 8,61; dp = 9,63), e de 4 meses a 45 anos entre os pacientes internados no sanatório (média = 16,89; dp = 12,23). A idade média foi de 59,96 anos (dp = 13,78) entre os pacientes do sanatório, 43,3 anos (dp = 14,55) entre os pacientes do ambulatório e 19 anos (dp = 0,94) entre os indivíduos sadios.

III.2. A coleta de sangue

Coletaram-se 3 ml de sangue venoso de todos os indivíduos em tubos contendo 0,1 ml de uma solução de ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) a 3%. Transferiram-se, então, alíquotas de 0,5 ml de sangue para tubos contendo 0,2 ml de solução de ácido cítrico-citrato de sódio-glicose (ACD) as quais foram mantidas em geladeira por um período máximo de 10 dias, com agitação diária. Essas alíquotas destinaram-se à dosagem da atividade da NADH-redutase de metemoglobina, uma vez que a solução de ACD mantém a atividade dessa enzima inalterada por um período de até duas semanas (Scott, 1960).

III.3. A dosagem de hemoglobina e de metemoglobina

As dosagens de hemoglobina e de metemoglobina foram feitas após 2 a 3 horas da coleta do sangue. Com esse objetivo, alíquotas de 0,1 ml de cada amostra de sangue contendo 1 mg/ml de EDTA foram hemolisadas em 4,9 ml de água destilada, seguindo-se a transferência de 0,2 ml do hemolisado para 1,8 ml de solução salina tamponada (K_2HPO_4 a 0,01 M em so-

lução de NaCl a 0,9%, pH 7,3). Determinou-se a absorvância dessa última so lução em três diferentes comprimentos de onda - 560, 576 e 630 nm - contra um branco contendo somente a solução salina tamponada.

Os níveis de oxiemoglobina, de desoxiemoglobina e de metemoglobina no hemolisado foram calculados de acordo com o método descrito por Benesch et al. (1973), usando os coeficientes de extinção corrigidos se gundo Van Assendelft e Zijlstra (1975). Desse modo, resolveu-se a seguinte equação matricial, onde a matriz de coeficientes indica os coeficientes de extinção:

$$\begin{bmatrix} 0,867 & 1,280 & 0,430 \\ 1,580 & 0,970 & 0,445 \\ 0,014 & 0,110 & 0,363 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \text{Oxiemoglobina} \\ \text{Desoxiemoglobina} \\ \text{Metemoglobina} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{560} \\ A_{576} \\ A_{630} \end{bmatrix}$$

Os níveis de metemoglobina foram, então, transformados nos valores correspondentes àqueles obtidos pelo método de Evelyn e Malloy (1938), uma vez que ele é mais comumente empregado para a determi nação do conteúdo de metemoglobina. Obteve-se essa transformação pelo emprego da equação de regressão $y = 1,11 x - 0,008$, onde x é o valor original e y é o conteúdo de metemoglobina obtido de acordo com o método de Evelyn e Malloy (1938). Levando em conta que as amostras de sangue foram diluídas 500 vezes em dois passos sucessivos (hemólise em água destilada e diluição em solução salina tamponada), os níveis do hemolisado foram multiplicados por 500 para se obter os valores reais de oxiemoglobina, de desoxiemoglobi na e de metemoglobina no sangue. Expressaram-se os níveis de hemoglobina em g enquanto que a metemoglobina foi expressa em porcentagem da hemoglobi na total.

III.4. Dosagem da atividade da NADH-redutase de metemo globina

Mediu-se a atividade da NADH-redutase de metemoglobina co mo atividade de diaforase de acordo com a técnica de Scott (1960) com pe- quenas modificações. Os eritrócitos das alíquotas de sangue conservadas em ACD foram lavados inicialmente por três vezes em 7 ml de solução salina tamponada à temperatura ambiente. Após cada adição de solução salina tam- ponada as suspensões de hemácias foram centrifugadas por 10 minutos a 2 000 rpm.

Com o objetivo de conseguir a conversão total da hemoglo bina em metemoglobina adicionou-se ao concentrado de hemácias igual volume

de NaNO_2 a 1% em solução salina tamponada, ficando essa suspensão em repouso durante 20 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as hemácias foram lavadas novamente por mais cinco vezes a fim de haver remoção do excesso de nitrito. Provocou-se, então, a hemólise de 0,05 ml do concentrado de hemácias em 10 ml de água destilada, determinando-se a absorbância em 600 nm desse hemolisado sem a necessidade de centrifugá-lo, contra água destilada.

O passo seguinte consistiu da adição de 0,2 ml do corante DCIP a 0,012 M em tampão TRIS (tris-hidróxi-metil aminometano)-HCl a 1M e pH 7,6 contendo EDTA a 0,011 M a 3 ml do hemolisado. De acordo com Scott (1960) a presença de EDTA na solução reagente garante a reprodutibilidade da velocidade de redução não-enzimática do corante DCIP, apesar de ele não interferir na reação enzimática. Deu-se início à reação enzimática pela adição de 0,05 ml de NADH a 0,008 M, sendo a absorbância, em 600 nm, registrada continuamente durante 5 minutos à temperatura ambiente em um espectrofotômetro Jasco modelo Uvidec-2 acoplado a um registrador gráfico. Para cada série de amostras examinadas preparou-se um branco contendo 3 ml de água destilada em lugar do hemolisado. A atividade enzimática foi expressa como variação de absorbância a 600 nm por minuto multiplicada por 10^4 ($\Delta-A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$), partindo de uma absorbância de 0,2 do hemolisado no mesmo comprimento de onda.

III.5. A dosagem dos níveis de DDS

Os níveis de DDS no sangue dos hansenianos foram determinados por intermédio de uma adaptação do método descrito por Simpson em um apêndice do trabalho de Molesworth e Naranayaswami (1949). Após hemólise de 0,5 ml de sangue contendo EDTA em 2,5 ml de água destilada acrescentaram-se 2,5 ml de HCl a 2 N com o objetivo de aumentar a solubilidade da DDS e, conseqüentemente, conseguir melhor recuperação dessa sulfona. Essa mistura foi agitada vigorosamente, adicionando-se à mesma 2 ml de ácido tricloroacético a 12% para a desproteíntização do sangue. Depois de uma completa homogeneização, filtrou-se a mistura em papel de filtro comum.

Acrescentou-se a 2 ml do filtrado límpido 0,05 ml de uma solução de NaNO_2 a 0,3% para se obter a diazotação da sulfona. Após agitação seguida de repouso de 3 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 0,05 ml de sulfamato de amônio a 1,5% para a remoção do excesso de nitrito da solução. A solução foi agitada novamente e deixada em repouso por mais 2 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, adicionou-se 0,05 ml de uma

solução de cloridrato de N-1-naftil-etileno diamina a 0,1% que, ao se combinar com a DDS diazotada, produz um composto de cor púrpura. Essa solução foi agitada e mantida no escuro por 20 minutos, à temperatura ambiente, para o completo desenvolvimento da cor.

Determinou-se a absorvância dessa solução em 550 nm contra um reagente branco preparado com 0,5 ml de água destilada em lugar do sangue. Os níveis de DDS foram expressos em mg/l de sangue total, sendo as absorvâncias comparadas com as fornecidas por uma curva padrão de solução aquosa de DDS cristalina.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentadas as médias e os desvios-padrão dos níveis de hemoglobina, de metemoglobina, de sulfonas e de NADH-redutase de metemoglobina verificados nos pacientes sob tratamento em ambulatório e nos hospitalizados, bem como nos indivíduos sadios.

Tabela 1

As figuras 3 a 6 mostram os polígonos de frequência das distribuições dos indivíduos sadios e dos pacientes segundo os níveis de hemoglobina, de metemoglobina, de sulfonas e de NADH-redutase de metemoglobina. Em cada uma dessas figuras, o último polígono de frequência corresponde à distribuição dos pacientes reunidos em um único grupo, sem distinção do tipo de tratamento a que estavam submetidos (ambulatorial ou hospitalar).

Figuras 3 a 6

A discriminação dos valores individuais de todas as variáveis estudadas está apresentada nas tabelas 2 (pacientes sob tratamento ambulatorial), 3 (pacientes hospitalizados) e 4 (indivíduos sadios).

Tabelas 2 a 4

A análise de correlação simples entre os níveis de hemoglobina, de metemoglobina, de sulfonas e de NADH-redutase de metemoglobina, da idade dos pacientes e dos anos de tratamento por eles relatados está apresentada nas tabelas 5 (pacientes sob tratamento ambulatorial), 6 (pacientes hospitalizados) e 7 (total de hansenianos estudados).

Tabelas 5 a 7

Nas tabelas 5 a 7 é fácil constatar que entre os hansenianos o nível de hemoglobina está correlacionado negativa e significativamente com a idade, a sulfonemia e a atividade de NADH-redutase de metemoglobina. Entre os pacientes hospitalizados o nível de hemoglobina também está correlacionado negativa e significativamente com os anos de tratamento, sendo a significância dessa correlação mantida mesmo após a reunião dos hansenianos sob tratamento ambulatorial aos pacientes hospitalizados.

Nas mesmas tabelas verifica-se que os níveis de metemoglobina estão correlacionados positivamente com a sulfonemia. Essa correlação, entretanto, somente foi significativa em relação aos pacientes hospitalizados. Essa significância foi mantida mesmo após a reunião dos hansenianos em um único grupo.

A idade, como era de se esperar, correlacionou-se positiva e significativamente com os anos de tratamento. Além disso, entre os pacientes hospitalizados, a idade mostrou correlação positiva e significativa com os níveis de sulfonas. A significância da correlação positiva entre a idade e a sulfonemia foi mantida mesmo após a reunião dos hansenianos em um único grupo, apesar de ela não poder ser detectada entre os pacientes sob tratamento ambulatorial. Finalmente, a correlação positiva entre o nível de NADH-redutase de metemoglobina e a idade ou anos de tratamento somente foi significativa quando os hansenianos foram reunidos em um único grupo.

TABELA 1. Médias e desvios-padrão dos níveis de hemoglobina, de metemoglobina, de sulfonas e de NADH-redutase de metemoglobina nos hanseianos sob tratamento ambulatorial e hospitalar, bem como nos indivíduos sadios.

VARIÁVEL	AMBULATORIO		SANATORIO		CONTROLE	
	média	dp	média	dp	média	dp
Hemoglobina (g%)	11,56	1,55	10,45	1,82	13,72	1,45
Metemoglobina (%)	3,32	2,98	3,06	2,01	2,44	2,07
Sulfonemia (mg/l)	3,82	2,37	4,53	2,11	-	-
NADH-redutase de metemoglobina ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)	37,22	16,23	62,89	21,22	53,65	12,99

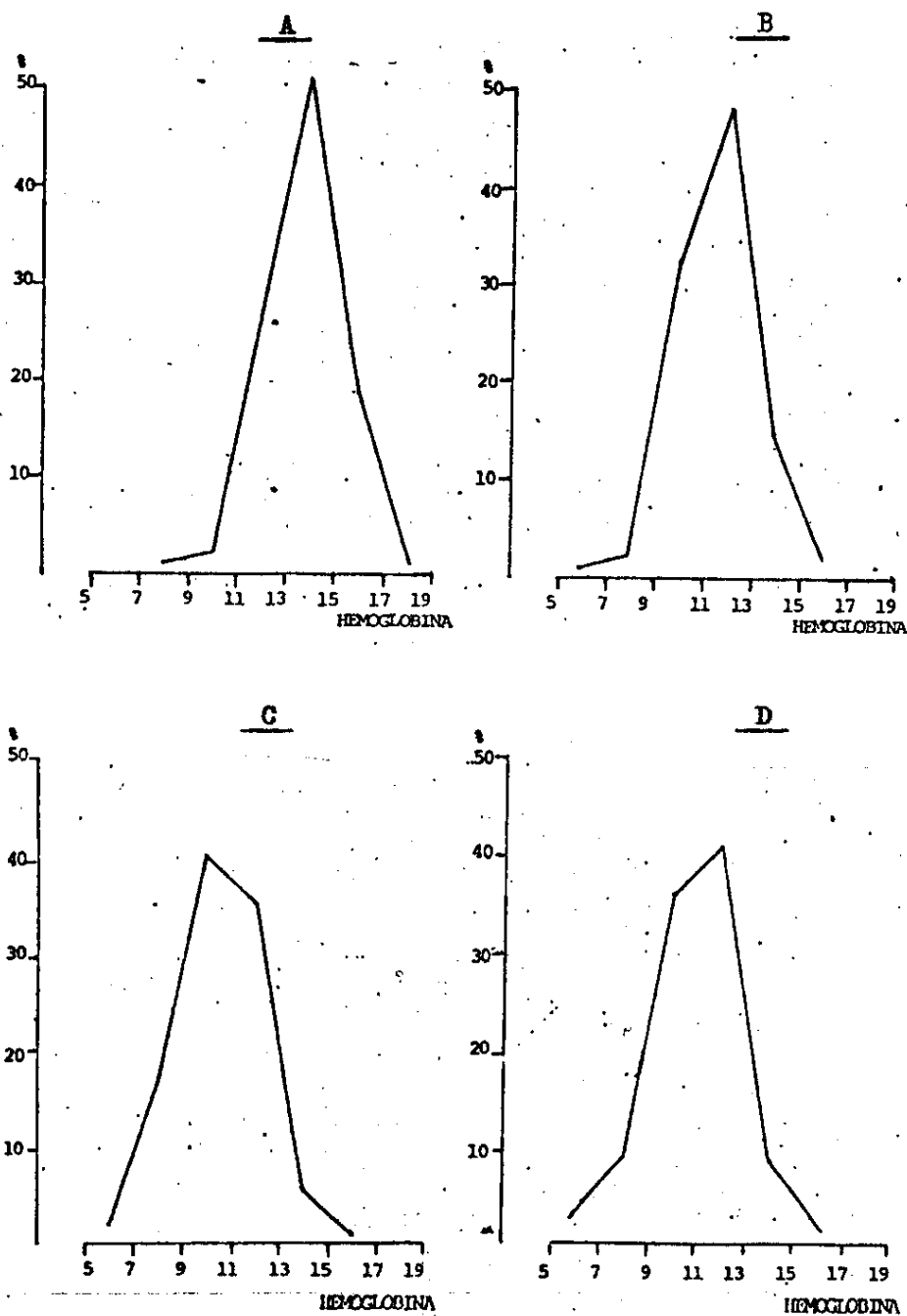


FIGURA 3. Polígonos de frequência das distribuições dos indivíduos segundo o nível de hemoglobina (g%).

A - indivíduos sadios

B - pacientes de ambulatório

C - pacientes hospitalizados

D - total de pacientes

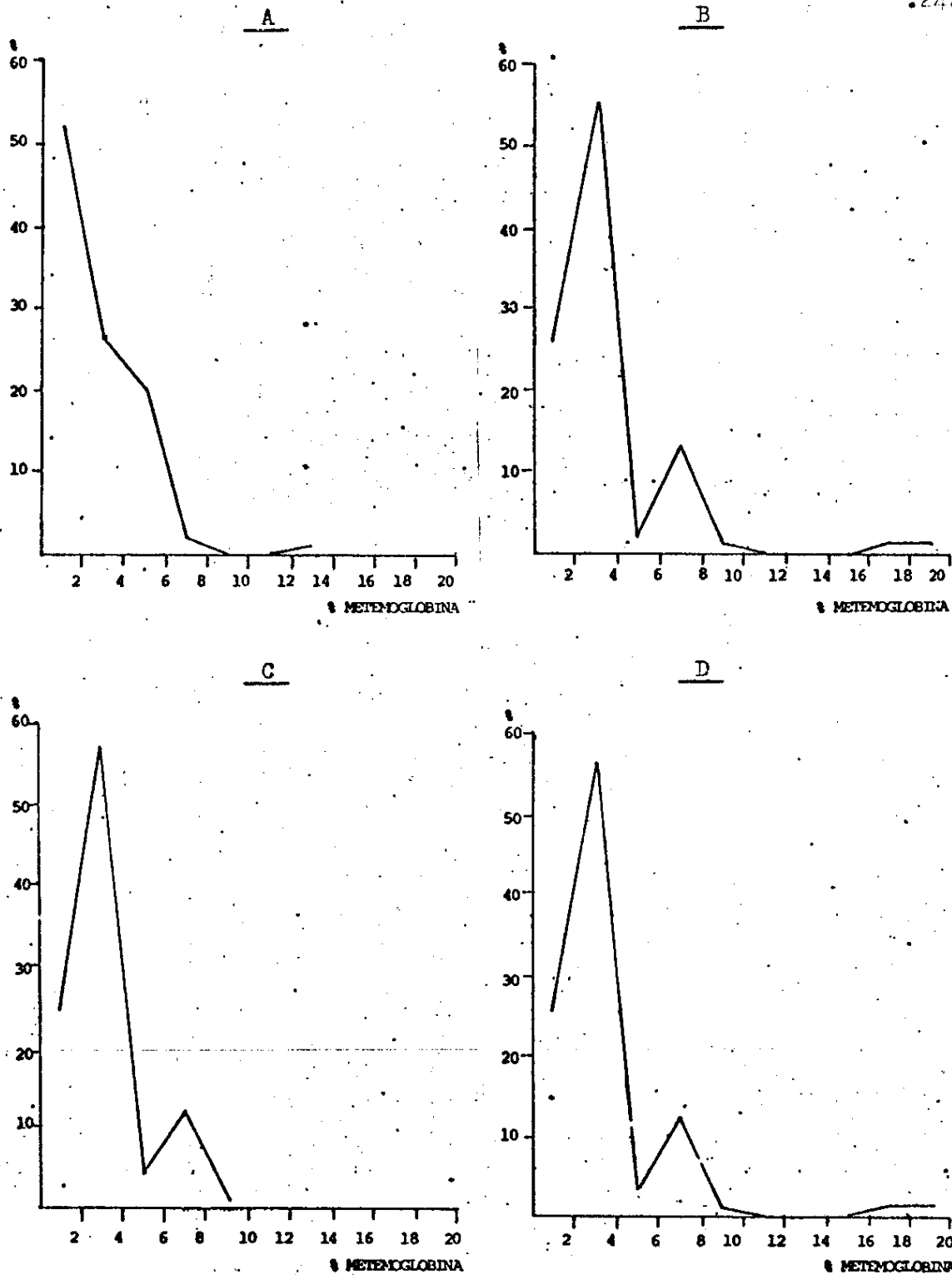


FIGURA 4. Polígonos de frequência das distribuições dos indivíduos segundo o nível de metemoglobina (%).

- A - indivíduos sadios
- B - pacientes de ambulatório
- C - pacientes hospitalizados
- D - total de pacientes

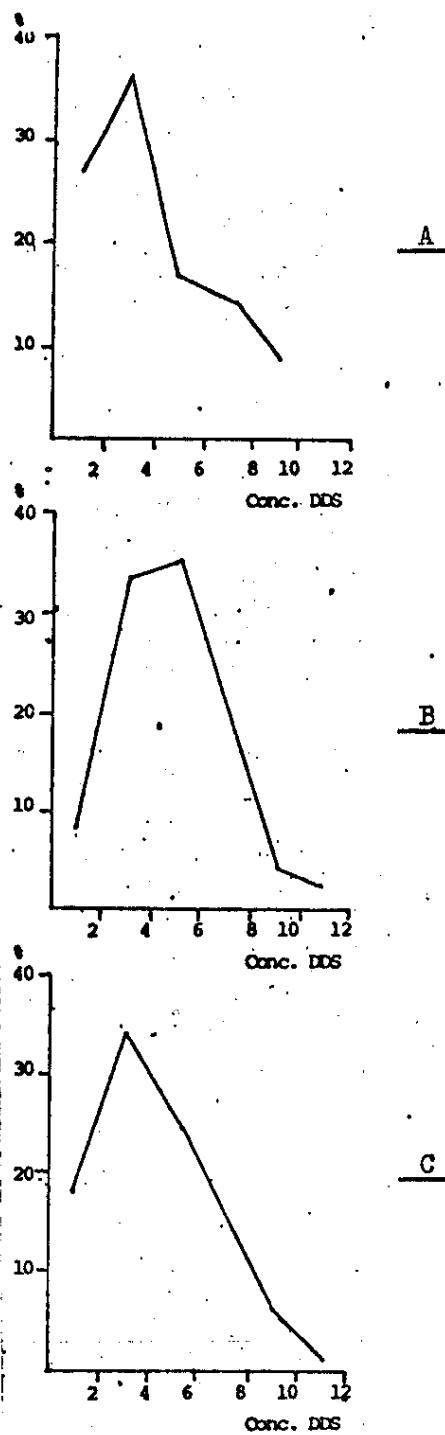


FIGURA 5. Polígonos de frequência das distribuições dos indivíduos segundo a sulfonemia (mg/l).

- A - pacientes de ambulatório
- B - pacientes hospitalizados
- C - total de pacientes

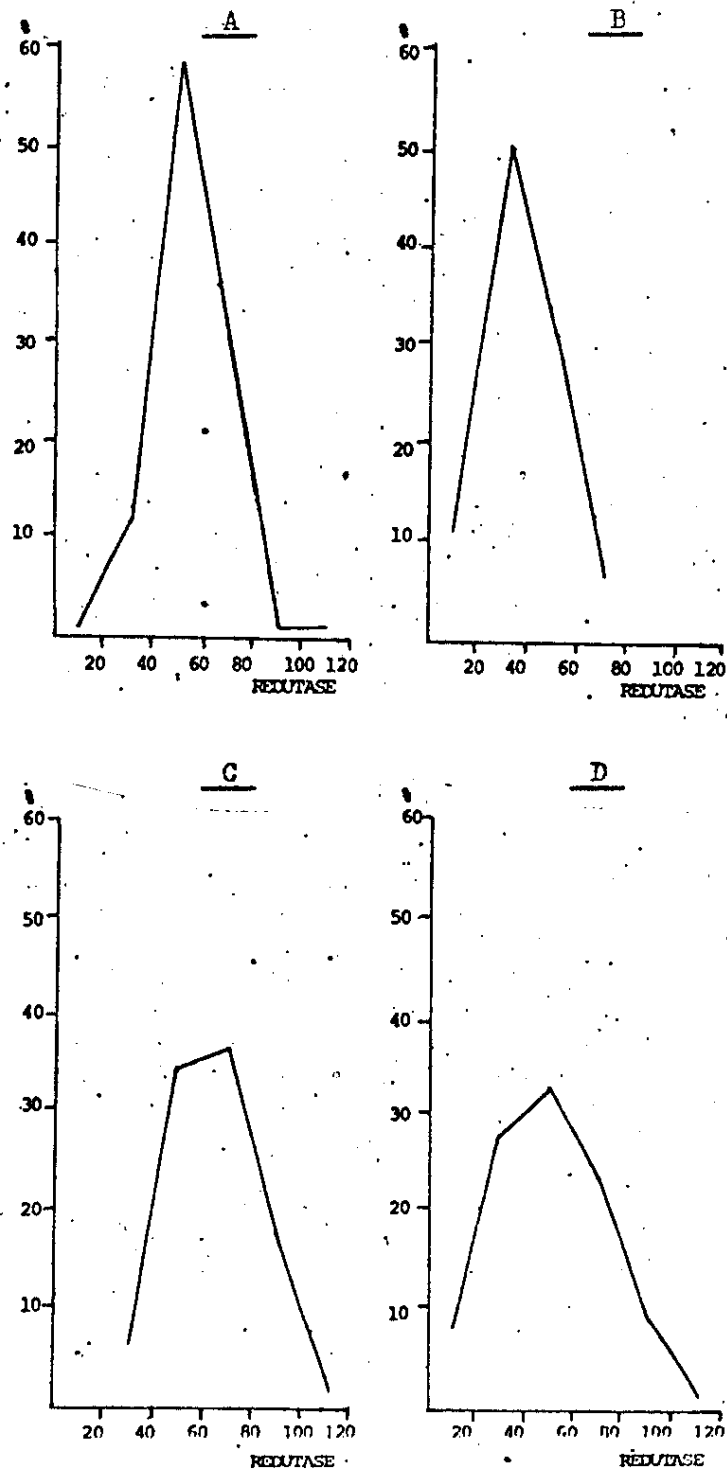


FIGURA 6. Polígonos de frequência das distribuições dos indivíduos segundo a atividade de NADH-redutase de metemoglobina ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$).

- A - indivíduos sadios
- B - pacientes de ambulatório
- C - pacientes hospitalizados
- D - total de pacientes

TABELA 2. Discriminação dos valores individuais das variáveis estudadas nos pacientes de ambulatório.

PACIENTE	HEMOGLO- BINA (g%)	METEMO- GLOBINA (%)	IDADE (anos)	TEMPO DE TRATAMENTO (anos)	SULFONEMIA (mg/l)	NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)
1	10,32	2,49	59	10	2,4	23,64
2	12,00	6,67	50	4	4,0	39,80
3	14,24	1,21	28	2,8	1,7	20,75
4	10,40	7,69	60	3,9	1,8	28,57
5	12,80	2,66	39	20	1,8	32,56
6	11,12	2,31	45	20	6,0	25,37
7	10,32	2,49	53	21	3,5	32,08
8	9,92	0,89	53	5	4,7	66,96
9	10,64	2,11	31	18	2,5	21,57
10	12,56	0,69	44	17	3,0	34,86
11	10,40	3,28	32	0,3	3,3	30,05
12	12,80	2,66	46	1	1,7	13,06
13	12,00	2,84	31	4	7,2	16,53
14	10,88	0,03	61	12	7,6	30,30
15	12,00	2,84	47	26	4,2	34,24
16	10,40	7,69	20	5	9,3	5,45
17	10,72	2,56	66	17	4,3	20,00
18	12,80	2,66	31	1	3,7	26,09
19	12,80	18,75	43	0,6	7,5	9,35
20	10,40	3,28	74	30	7,5	35,68
21	10,32	2,49	26	6,8	8,5	45,76
22	12,80	6,25	33	3	3,9	76,74
23	11,60	1,20	32	5,1	2,1	24,40
24	11,20	3,04	20	3,4	5,9	57,83
25	10,88	7,35	72	30	1,6	45,76
26	13,76	1,07	25	0,5	1,7	40,21
27	9,28	0,94	48	5	4,1	59,93
28	9,26	8,55	67	7	3,3	57,90
29	10,64	2,18	40	10	2,4	31,38
30	11,20	3,04	47	0,2	2,3	55,29
31	10,40	3,28	53	7	3,4	57,69
32	13,60	2,51	37	8	1,2	45,76
33	11,20	7,14	53	1	1,3	47,18
34	11,04	1,56	56	34	1,5	49,37
35	15,20	5,26	35	18	2,9	32,01
36	11,20	3,04	64	32	1,2	50,79
37	12,00	2,84	43	10	1,1	46,56
38	9,60	3,55	30	3	4,3	39,50
39	10,40	3,28	54	14	9,0	52,81
40	14,96	0,58	42	0,5	1,3	18,79
41	13,60	2,51	57	17	2,5	11,48
42	16,00	2,13	22	1,7	3,2	19,57
43	11,04	2,33	11	0,1	1,4	29,22
44	11,84	1,45	42	5	3,4	22,23
45	11,92	2,86	41	0,5	6,6	32,50
46	8,96	2,21	44	16	0,0	34,80
47	10,08	0,87	39	16	5,7	39,14
48	12,80	2,66	42	5	1,8	35,09
49	10,24	3,33	42	6	1,8	35,14

TABELA 2. Continuação

PACIENTE	HEMOGLO- BINA (%)	METEMO- GLOBINA (%)	IDADE (anos)	TEMPO DE TRATAMENTO (anos)	SULFONEMIA (mg/l)	NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)
50	10,08	0,87	36	2	1,6	47,94
51	11,92	2,86	64	2	7,1	63,76
52	13,52	2,52	50	22	1,4	54,46
53	12,00	2,84	47	2	5,7	50,90
54	12,72	2,02	35	4	0,9	69,01
55	9,76	1,94	39	0,1	5,1	79,90
56	8,96	2,03	40	0,6	4,3	25,35
57	12,00	2,84	45	0,5	4,8	58,66
58	10,40	3,28	40	0,4	1,6	21,04
59	9,84	2,71	33	0,8	3,9	39,80
60	13,60	5,88	14	3,0	2,8	58,90
61	11,04	1,56	84	11	8,0	24,35
62	12,00	2,84	42	3	2,6	29,81
63	11,84	1,45	58	26	3,7	24,25
64	11,20	3,04	54	2	4,0	19,92
65	13,28	0,02	25	1,3	2,9	31,08
66	12,00	2,84	21	1,5	8,4	40,90
67	11,60	6,90	54	30	2,8	23,71
68	12,56	0,69	34	0,25	1,5	43,68
69	11,76	0,74	25	3	8,4	33,80
70	11,60	6,90	69	3	6,0	19,45
71	10,88	0,03	35	0,05	2,3	29,04
72	14,24	1,21	34	5	6,9	44,43
73	11,04	1,56	25	3	7,0	45,41
74	13,52	1,90	25	2	3,7	57,46
75	9,44	3,61	50	3	6,9	75,16
76	6,88	3,73	34	25	3,9	59,73
77	11,20	3,04	48	10	7,9	28,89
78	9,12	3,75	59	5	8,6	40,62
79	12,00	17,20	64	40	2,7	36,43
80	12,00	6,67	31	2	2,4	36,59
81	13,04	2,10	43	4	1,1	23,80
82	12,64	6,33	51	3	3,2	26,26
83	12,00	6,67	57	15	4,2	42,31
84	12,00	2,84	65	21	0,0	28,30
85	11,20	2,07	44	1,5	2,2	25,79
86	13,60	2,51	33	1,5	2,6	8,26
87	10,40	1,75	27	5	2,4	26,65

TABELA 3. Discriminação dos valores individuais das variáveis estudadas nos pacientes hospitalizados.

PACIENTE	HEMOGLO- BINA (g%)	METEMO- GLOBINA (%)	IDADE (anos)	TEMPO DE TRATAMENTO (anos)	SULFONEMIA (mg/l)	NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA ($\Delta A_{600}/\text{min.}10^4$)
1	11,12	3,04	64	25	3,7	11,76
2	10,88	0,03	58	20	3,7	59,11
3	10,32	7,69	73	40	6,9	40,27
4	8,56	3,87	70	22	4,4	49,75
5	12,32	0,58	52	10	0,0	54,30
6	9,60	3,55	66	6	10,0	88,71
7	10,40	3,28	78	2,3	3,0	62,50
8	11,12	2,29	48	30	0,2	46,73
9	7,52	4,73	66	8	10,7	89,74
10	6,15	1,16	38	3	3,3	99,17
11	9,52	3,55	67	27	4,5	73,47
12	12,00	2,84	56	2	0,5	74,47
13	11,04	1,54	52	7	2,5	72,54
14	12,80	2,66	40	8	2,0	78,43
15	10,40	3,25	55	12	6,6	58,48
16	13,84	0,33	43	6	2,4	65,73
17	7,84	4,26	47	0,6	4,9	106,51
18	9,44	3,55	55	30	4,0	62,11
19	12,00	6,67	49	16	3,0	57,14
20	11,20	3,04	75	26	3,9	75,31
21	10,64	2,58	85	12	4,5	79,05
22	7,76	2,15	75	40	4,5	110,73
23	10,40	3,28	67	4	3,6	87,30
24	8,96	1,37	71	33	1,2	78,26
25	9,84	2,19	33	0,25	2,7	13,25
26	10,32	2,47	50	3	4,3	96,26
27	11,12	3,04	64	2	5,7	54,05
28	7,68	2,15	65	30	3,3	65,12
29	12,00	2,84	48	22	3,9	81,08
30	9,36	3,55	51	22	5,3	77,67
31	9,28	0,91	89	45	5,4	61,22
32	9,92	3,54	74	39	5,8	60,09
33	11,52	2,15	69	32	4,5	51,72
34	5,60	3,12	68	15	6,7	74,07
35	10,32	7,69	77	30	7,0	54,69
36	10,08	0,03	52	21	4,3	79,55
37	7,44	0,62	50	14	8,2	15,50
38	10,32	3,28	38	20	3,1	46,95
39	6,20	0,60	76	40	8,3	93,33
40	11,04	1,54	64	10	6,9	78,21
41	10,08	0,03	82	20	5,5	50,63
42	14,40	5,56	68	12	2,4	43,29
43	9,60	8,33	74	24	9,2	45,45
44	10,32	2,47	73	40	4,2	66,04
45	15,20	2,24	51	3	2,9	19,61
46	12,00	6,67	70	24	5,8	58,82
47	10,88	0,03	66	14	3,8	50,00
48	12,00	6,67	55	30	4,2	59,07
49	11,20	3,04	47	5	3,8	41,86

TABELA 3. Continuação

PACIENTE	HEMOGLO- BINA (g%)	METEMO- GLOBINA (%)	IDADE (anos)	TEMPO DE TRATAMENTO (anos)	SULFONEMIA (mg/l)	NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)
50	13,52	1,89	40	2	2,5	52,85
51	11,12	3,04	76	10	4,0	39,47
52	11,20	3,04	57	2	3,1	29,30
53	11,26	0,56	70	30	5,4	62,50
54	11,92	6,67	48	4	3,0	57,29
55	10,32	3,28	76	2	6,5	78,95
56	12,16	1,56	53	20	3,2	67,87
57	10,40	3,28	33	15	2,2	85,23
58	12,00	2,84	33	15	3,4	22,06
59	10,40	3,28	43	7	4,4	65,38
60	10,64	2,02	62	10	4,0	41,67
61	8,80	3,87	48	10	3,5	88,24
62	6,96	3,57	53	24	7,6	90,36
63	7,29	2,60	57	29	4,8	88,00
64	9,60	3,55	63	37	7,1	71,43
65	12,00	2,84	40	0,42	7,0	24,89
66	8,64	3,87	58	28	4,6	62,50
67	10,40	4,26	92	2	1,4	75,00
68	12,00	7,69	63	30	3,0	60,57
69	10,80	1,99	43	1	4,3	76,92
70	9,60	3,55	34	2	2,2	96,94
71	10,08	0,03	55	24	3,2	93,33
72	10,32	7,69	38	1,5	4,3	89,20
73	9,60	3,55	56	15	4,9	57,47
74	13,28	0,02	75	30	6,0	78,07
75	8,88	3,86	74	28	5,3	82,61
76	11,12	7,14	71	7	9,1	87,56
77	10,84	2,26	70	20	2,9	58,56
78	11,20	3,04	47	12	5,0	76,92
79	10,08	0,03	60	30	4,2	56,82
80	12,56	0,68	68	6	4,3	56,41
81	9,44	3,55	61	36	4,4	50,23
82	9,12	3,57	82	13	5,8	44,33
83	10,88	0,03	68	10	1,7	72,92
84	7,60	3,21	79	10	6,2	68,18
85	11,20	3,04	79	34	6,3	59,09
86	11,04	1,54	57	5	7,4	63,58
87	8,40	3,87	70	30	4,2	66,08
88	11,28	1,09	50	9	1,0	64,38
89	7,52	2,86	71	30	1,1	57,89
90	13,60	2,51	54	25	6,0	37,04
91	12,80	6,75	40	0,42	7,0	48,28
92	12,80	2,76	58	4	3,8	16,00
93	10,40	7,69	54	10	6,1	57,42
94	11,20	3,04	66	17	3,8	32,65
95	12,80	2,66	47	10	7,5	43,01

TABELA 4. Discriminação dos valores individuais das variáveis estudadas nos indivíduos sadios.

PACIENTE	HEMOGLOBINA (%)	METEMOGLOBINA (%)	NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA ($\Delta A_{600}/\text{min.}10^4$)
1	10,40	2,37	45,80
2	13,36	0,64	58,58
3	14,08	0,02	72,99
4	13,60	5,88	54,95
5	13,60	2,51	74,38
6	13,12	0,61	55,05
7	13,60	2,51	66,99
8	13,12	0,61	50,63
9	13,60	2,51	61,78
10	13,60	2,51	50,21
11	12,86	0,42	41,67
12	13,76	1,44	64,52
13	13,36	0,64	63,16
14	12,88	0,55	79,05
15	14,56	1,36	33,90
16	15,20	2,24	51,66
17	15,12	1,69	42,11
18	15,60	0,89	41,38
19	14,32	1,78	67,11
20	15,20	5,26	64,26
21	13,60	5,88	72,99
22	13,60	2,51	38,34
23	10,64	1,86	85,60
24	14,24	1,19	49,02
25	12,80	2,66	60,61
26	13,84	0,21	60,06
27	13,84	1,74	62,11
28	14,40	2,37	71,66
29	12,80	2,66	46,82
30	15,20	2,24	55,05
31	15,20	5,26	45,48
32	14,64	1,53	78,55
33	13,84	0,21	53,39
34	12,80	6,25	61,30
35	12,88	0,75	48,39
36	12,08	0,66	77,17
37	12,80	2,66	55,36
38	13,84	1,55	71,43
39	12,08	0,80	63,83
40	12,80	6,25	61,40
41	13,76	1,26	52,81
42	12,32	0,79	48,48
43	15,20	5,26	69,50
44	13,28	0,02	54,05
45	11,20	3,04	54,71
46	12,86	0,42	54,22
47	15,20	5,26	44,87
48	12,56	0,68	58,39
49	13,60	2,51	56,78

TABELA 4. Continuação

PACIENTE	HEMOGLOBINA (g%)	METEMOGLOBINA (%)	NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)
50	12,16	0,93	67,11
51	15,44	1,45	43,21
52	13,60	5,88	84,14
53	13,36	0,64	57,97
54	12,88	0,62	54,05
55	14,40	5,56	72,00
56	12,40	1,67	62,50
57	12,16	1,07	50,00
58	12,80	6,25	47,34
59	13,60	2,51	50,00
60	12,32	1,82	47,24
61	13,66	0,46	44,87
62	15,20	5,26	41,92
63	12,40	1,19	55,56
64	13,36	0,64	53,76
65	13,60	2,51	61,73
66	14,08	0,02	27,30
67	12,72	2,66	42,55
68	13,68	0,64	44,73
69	13,36	0,64	51,78
70	11,20	3,04	53,33
71	12,56	0,68	51,78
72	14,40	5,56	36,04
73	14,40	2,37	44,12
74	12,40	1,19	55,05
75	14,40	5,56	48,63
76	13,60	2,51	66,23
77	14,56	1,36	57,97
78	14,32	1,78	66,47
79	13,60	2,51	45,63
80	13,84	0,33	44,94
81	13,12	0,74	54,05
82	12,56	0,68	62,72
83	12,80	2,66	44,64
84	13,62	1,89	56,78
85	14,08	0,02	60,15
86	13,60	5,88	37,85
87	14,64	1,75	101,52
88	13,60	5,88	43,61
89	13,12	0,41	32,43
90	11,92	2,84	56,54
91	12,88	0,82	49,02
92	12,56	0,68	53,33
93	13,60	5,88	44,59
94	12,00	2,84	60,38
95	13,60	5,88	59,26
96	12,40	1,39	70,42
97	12,00	2,84	47,62
98	14,40	5,56	40,23
99	16,00	12,90	39,46
100	18,40	4,35	36,81

TABELA 4. Continuação

PACIENTE	HEMOGLOBINA (%)	METEMOGLOBINA (%)	NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)
101	16,80	2,03	48,51
102	14,40	2,37	58,24
103	16,80	4,76	41,56
104	16,40	1,37	48,51
105	10,08	0,03	66,95
106	14,40	2,37	64,21
107	16,40	0,85	54,70
108	13,60	2,51	57,00
109	15,12	1,69	51,74
110	14,32	1,78	52,26
111	11,92	2,84	59,44
112	16,00	5,00	53,27
113	13,60	2,51	51,69
114	14,88	0,02	60,17
115	15,20	5,26	50,93
116	11,84	2,14	53,64
117	13,36	0,64	60,32
118	14,08	0,02	57,47
119	13,60	5,88	70,03
120	14,40	2,37	45,56
121	13,60	5,88	72,48
122	15,20	2,24	40,16
123	16,80	4,76	49,23
124	13,60	5,88	55,53
125	14,24	1,19	34,36
126	16,80	4,76	24,64
127	13,62	1,77	31,96
128	9,36	0,91	16,43
129	8,56	0,99	37,83
130	16,08	0,65	51,32
131	12,80	2,66	40,82
132	15,20	5,26	22,91
133	13,68	0,77	38,90
134	11,60	1,79	42,29
135	15,84	1,08	35,24
136	14,64	1,53	55,72
137	16,00	5,00	41,07

TABELA 5. Resultados da análise de correlação simples entre as variáveis estudadas no grupo de pacientes de ambulatório.

VARIÁVEIS	METEMO- GLOBINA (%)	IDADE (anos)	TEMPO DE TRATAMENTO (anos)	SULFONEMIA (mg/l)	NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)
HEMOGLOBINA (g%)	0,004	-0,24*	-0,12	-0,22*	-0,23*
METEMOGLOBINA (%)		0,23*	0,18	0,08	-0,07
IDADE (anos)			0,49***	0,03	0,004
TEMPO DE TRA- TAMENTO (anos)				-0,11	-0,02
SULFONEMIA (mg/l)					0,05

* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$

TABELA 6. Resultados da análise de correlação simples entre as variáveis estudadas no grupo de pacientes hospitalizados.

VARIÁVEIS	METEMO- GLOBINA (%)	IDADE (anos)	TEMPO DE TRATAMENTO (anos)	SULFONEMIA (mg/l)	NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)
HEMOGLOBINA (g%)	0,02	-0,21*	-0,28 **	-0,28 **	-0,42 ***
METEMOGLOBINA (%)		0,02	-0,02	0,26 *	-0,03
IDADE (anos)			0,43 ***	0,26 *	0,06
TEMPO DE TRA- TAMENTO (anos)				0,11	0,04
SULFONEMIA (mg/l)					0,07

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

TABELA 7. Resultados da análise de correlação simples entre as variáveis no total de pacientes estudados.

VARIÁVEIS	METEMO- GLOBINA (%)	IDADE (anos)	TEMPO DE TRATAMENTO (anos)	SULFONEMIA (mg/l)	NADH-REDUTASE DE METEMOGLOBINA ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)
HEMOGLOBINA (%)	0,03	-0,34 ***	-0,30 ***	-0,28 ***	-0,45 ***
METEMOGLOBINA (%)		0,09	0,06	0,14	-0,07
IDADE (anos)			0,55 ***	0,20 **	0,29 ***
TEMPO DE TRA- TAMENTO (anos)				0,07	0,21 ***
SULFONEMIA (mg/l)					0,14

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO

Os dados da tabela 1 indicam que os níveis de hemoglobina observados entre os hansenianos são menores que os apresentados pelos indivíduos sadios. A análise da variância aplicada aos dados sobre hemoglobina constantes dessa tabela, após verificação de que as variâncias são homogêneas ($\chi^2_{(2)} = 5,859$; $0,05 < p < 0,10$), permite concluir que, em relação a essa variável, as três amostras diferem significativamente (tabela 8). Em vista disso elas foram comparadas duas a duas (tabela 9), constatando-se, assim, que os pacientes hospitalizados apresentaram menor teor de hemoglobina, enquanto que os pacientes sob tratamento de ambulatório mostraram nível de hemoglobina intermediário.

Tabelas 8 e 9

Os polígonos de frequência da figura 3 ilustram os fatos acima. Nessa figura, o polígono de frequência D, onde os pacientes são reunidos em uma amostra única, confirma que os baixos níveis de hemoglobina são uma característica dos hansenianos (Beiguelman et al., 1974, entre outros).

A existência de correlação significativa e negativa entre os níveis de hemoglobina e os de sulfonas (tabelas 5 e 6) sugere que o baixo nível de hemoglobina entre os hansenianos pode ser explicado pelo fato de a DDS ser um medicamento hemolítico, uma vez que o tratamento com esse fármaco determina menor vida média dos eritrócitos na circulação sanguínea (Degowin et al., 1966). Além disso, o fato de os pacientes hospitalizados mostrarem os menores níveis de hemoglobina pode estar associado ao maior tempo de tratamento a que eles estão submetidos. Como se pode ver nas tabelas 5 e 6, tanto entre os pacientes de ambulatório quanto entre os pacientes hospitalizados houve uma correlação negativa entre o nível de hemoglobina e o tempo de tratamento, apesar de tal correlação mostrar-se significativa somente nos últimos.

O teste de homogeneidade das variâncias dos níveis de hemoglobina mostrou que as mesmas diferem significativamente ($\chi^2_{(2)} = 19,60$; $p < 0,001$). Desse modo, compararam-se as amostras duas a duas em relação a essa variável.

A tabela 10 mostra os resultados dessa comparação e evidencia que, com relação às amostras de hansenianos, os pacientes de ambulatório mostraram maior variabilidade em torno da média ($F_{(86;94)} = 2,20$;

TABELA 8. Análise da variância dos níveis de hemoglobina aplicada aos dados da tabela 1.

VARIAÇÃO	GL	QM	F
Entre	2	320,97	126,27*
Dentro	316	2,54	
Total	318	4,54	

* $p < 0,05$

TABELA 9. Comparação das amostras tomadas duas a duas segundo os níveis de hemoglobina.

AMOSTRAS	GL	t
Sadios x Ambulatório	222	10,58***
Sadios x Sanatório	230	15,20***
Ambulatório x Sanatório	180	4,41***

*** $p < 0,001$

$p < 0,05$), muito embora o valor médio do nível de metemoglobina entre eles ter sido semelhante ao dos pacientes hospitalizados. De qualquer modo, tanto os pacientes de ambulatório quanto os hospitalizados mostram nível mais elevado de metemoglobina quando comparados aos indivíduos sadios, como se pode ver na tabela 10.

Tabela 10

As tabelas 11 a 13 mostram os resultados da análise de regressão múltipla entre os pacientes sob tratamento ambulatorial, pacientes hospitalizados e no total de pacientes reunidos em um único grupo quando o nível de metemoglobina é tomado como a variável dependente.

Tabelas 11 a 13

Essas tabelas servem para mostrar que o aumento do nível de metemoglobina entre os hansenianos foi discretamente influenciado pela concentração de sulfonas no sangue dos pacientes hospitalizados (coeficiente de determinação = 0,07).

A redução da metemoglobina depende, entre outros fatores, da produção intra-eritrocitária de NADH (Scott et al., 1965; Jaffé, 1966). A redução do NAD nas hemácias processa-se, como se sabe, durante a glicólise, que, por sua vez, depende da integridade da membrana do eritrócito para a captação de glicose do meio. Desse modo, o tratamento com DDS pode estar gerando um aumento de metemoglobina em decorrência da ação hemolítica desse medicamento (Degowin et al., 1966). Por outro lado, visto que a DDS é um fármaco oxidante, a metemoglobina poderia ser gerada por oxidação direta da hemoglobina nos hansenianos tratados, ou, ainda, pela combinação de hemólise e oxidação direta da hemoglobina. Em resumo, o aumento do nível de metemoglobina pode decorrer de uma diminuição da capacidade eritrocitária de redução desse pigmento por falta de NADH, ou de oxidação direta da hemoglobina, ou, ainda, da combinação desses dois fatores.

Apesar de ser detectada uma correlação positiva entre o nível de metemoglobina e a sulfonemia entre os pacientes sob tratamento ambulatorial, essa correlação, ao contrário do que foi observado entre os hansenianos hospitalizados, não foi significativa. A causa mais provável da ausência de correlação significativa entre o nível de metemoglobina e a sulfonemia nos pacientes de ambulatório parece decorrer da variabilidade do momento da coleta das amostras de sangue. De fato, em tais pacientes o intervalo entre os momentos da coleta de sangue e da ingestão da última dose de DDS oscilou entre cerca de duas horas a quinze dias. Já entre os pacien

TABELA 10. Comparação das amostras tomadas duas a duas segundo os níveis de metemoglobina.

AMOSTRAS	COMPARAÇÃO
Sadios x Ambulatório	$t(86;136) = -2,49^*$
Sadios x Sanatório	$t(230) = -2,27^*$
Ambulatório x Sanatório	$t(86;94) = 0,68$

* $p < 0,05$

TABELA 11. Resultados da análise de regressão múltipla aplicada aos dados dos pacientes de ambulatório tomando-se o nível de metemoglobina como a variável dependente.

VARIÁVEL	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	t (81)
Hemoglobina (g%)	0,14	0,22	0,64
Idade (anos)	0,04	0,03	1,33
Tempo de tratamento (anos)	0,03	0,04	0,75
Sulfonemia (mg/l)	0,13	0,14	0,93
NADH-redutase de metemoglobina ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)	-0,01	0,02	-0,50

TABELA 12. Resultados da análise de regressão múltipla aplicada aos dados dos pacientes hospitalizados tomando-se o nível de metemoglobina como a variável dependente.

VARIÁVEL	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	t(89)
Hemoglobina (g%)	0,09	0,13	0,69
Idade (anos)	-0,005	0,02	-0,25
Tempo de tratamento (anos)	-0,02	0,02	-0,10
Sulfonemia (mg/l)	0,28	0,10	2,80**
NADH-redutase de metemoglobina ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)	-0,001	0,01	-0,10

** $p < 0,01$

TABELA 13. Resultados da análise de regressão múltipla aplicada aos dados do total de pacientes tomando-se o nível de metemoglobina como a variável dependente.

VARIÁVEL	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	t (176)
Hemoglobina (g%)	0,10	0,12	0,83
Idade (anos)	0,01	0,01	1,00
Tempo de tratamento (anos)	0,01	0,02	0,50
Sulfonemia (mg/l)	0,17	0,09	1,89
NADH-redutase de metemoglobina ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$)	-0,01	0,01	-1,00

tes hospitalizados, as amostras de sangue foram coletadas, na grande maioria dos casos, cerca de uma a três horas após a ingestão da DDS.

Levando em conta que os pacientes hospitalizados têm uma dieta alimentar mais uniforme, é plausível supor que os hansenianos sob tratamento ambulatorial sofram, com maior probabilidade, a influência de tal fator capaz de promover alterações do nível de metemoglobina. Assim, por exemplo, o ácido ascórbico é capaz de promover redução não-enzimática da metemoglobina (Gibson, 1948), respondendo por 16% da capacidade eritrocitária de redução desse pigmento (Scott et al., 1965). Além disso, ele está associado à oscilação diária dos níveis de metemoglobina (Jaffé, 1966), sendo, inclusive, utilizado terapêuticamente com o propósito de reduzir os níveis desse pigmento sem função no transporte de oxigênio (Kaplan e Chirouze, 1978). Além do ácido ascórbico, a riboflavina também concorre para a diminuição dos níveis de metemoglobina (Kaplan e Chirouze, 1978; Hirano et al., 1981). Outros fatores, tais como conservantes ou substâncias adicionadas à água e, portanto, também relacionados à dieta, são capazes de promover um aumento da taxa de oxidação da hemoglobina (Nitzan et al., 1979; Hegesh e Shiloah, 1982), além de poluentes atmosféricos (Naoum et al., 1982).

A comparação dos pacientes de ambulatório com os hospitalizados no concernente à sulfonemia média mostrou que os hansenianos sob tratamento hospitalar têm quantidade significativamente maior de sulfonas em seu sangue ($t_{(180)} = -2,14; p < 0,05$). Esse fato reforça a observação feita acima no que diz respeito ao intervalo entre a última ingestão de DDS e a coleta de sangue dos hansenianos, uma vez que nos pacientes sob tratamento ambulatorial o nível de sulfonemia esteve significativa e negativamente correlacionado ao tempo decorrido entre a última ingestão desse medicamento e a coleta da amostra de sangue ($r = -0,28; p < 0,01$). Os polígonos de frequência da figura 5, que mostram as distribuições dos hansenianos segundo a sulfonemia, servem para ilustrar essa situação. De fato, os pacientes hospitalizados concentram-se, em maior número, entre aqueles que contêm nível mais elevado de DDS na circulação sanguínea, ao contrário do que ocorre com os hansenianos sob tratamento ambulatorial.

O teste de homogeneidade das variâncias dos níveis de NADH-redutase de metemoglobina mostrou que elas diferem significativamente ($\chi^2_{(2)} = 27,925; p < 0,01$). Por outro lado, apesar de os hansenianos hospitalizados mostrarem atividade enzimática média próxima à encontrada nos indivíduos sadios, tais médias também diferem significativamente ($t_{(94;136)} =$

3,81; $p < 0,01$). Quando os pacientes são tomados em conjuntos e comparados aos indivíduos sadios, nota-se maior aproximação do valor médio da atividade da NADH-redutase de metemoglobina ($t_{(136;181)} = 1,47$; $0,10 < p < 0,20$). Entretanto, as variâncias continuam significativamente diferentes ($F_{(181;136)} = 3,13$; $p < 0,01$).

Em relação à atividade da NADH-redutase de metemoglobina tem-se, pois, que os menores valores são encontrados entre os pacientes sob tratamento ambulatorial, dando-se o oposto com os pacientes hospitalizados, como ilustram os polígonos de frequência da figura 6.

A análise de regressão múltipla, tomando-se como variável dependente a atividade da NADH-redutase de metemoglobina, mostra que essa variável está significativa e negativamente correlacionada com o nível de hemoglobina, como se observa nas tabelas 14 e 15.

Tabelas 14 e 15

Por outro lado, quando se consideram os pacientes reunidos numa única amostra, além da correlação significativa e negativa com o nível de hemoglobina, a atividade da NADH-redutase de metemoglobina também está significativa e positivamente correlacionada à idade dos pacientes, como se pode ver na tabela 16.

Tabela 16

Tal correlação prende-se ao fato de os pacientes sob tratamento ambulatorial apresentarem os menores valores tanto de idade quanto de atividade da NADH-redutase de metemoglobina. Entretanto, a variável idade acrescenta muito pouco ao coeficiente de determinação da atividade da NADH-redutase de metemoglobina, que passa de 0,20 (quando se leva em conta somente o nível de hemoglobina) a 0,23 (quando, além do nível de hemoglobina, leva-se em conta a idade dos pacientes).

Já foi mencionado anteriormente que o tratamento com DDS promove hemólise, diminuindo a vida média dos eritrócitos (Degowin *et al.*, 1966). Por outro lado, sabe-se que as hemácias jovens mostram maior atividade de NADH-redutase de metemoglobina (Jaffé, 1966; González *et al.*, 1978). Esse fato poderia explicar o encontro de correlação negativa e significativa entre o nível de hemoglobina e a atividade de NADH-redutase de metemoglobina. Assim, nos hansenianos hospitalizados o nível mais alto de NADH-redutase de metemoglobina seria consequência da maior proporção de hemácias jovens em seu sangue.

TABELA 14. Resultados da análise de regressão múltipla aplicada aos dados dos pacientes de ambulatório tomando-se o nível de NADH-redu-tase de metemoglobina como a variável dependente.

VARIÁVEL	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	t(81)
Hemoglobina (g%)	-2,53	1,20	-2,11*
Metemoglobina (%)	-0,31	0,61	-0,51
Idade (anos)	-0,03	0,14	-0,21
Tempo de tratamento (anos)	-0,03	0,21	-0,14
Sulfonemia (mg/1)	0,006	0,77	0,01

* $p < 0,05$

TABELA 15. Resultados da análise de regressão múltipla aplicada aos dados dos pacientes hospitalizados tomando-se o nível de NADH-redutase de metemoglobina como a variável dependente.

VARIÁVEL	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	t(89)
Hemoglobina (g%)	-5,25	1,21	-4,34***
Metemoglobina (%)	-0,09	1,06	-0,08
Idade (anos)	0,02	0,17	0,12
Tempo de tratamento (anos)	-0,14	0,19	-0,74
Sulfonemia (mg/l)	-0,51	1,07	-0,48

*** $p < 0,001$

TABELA 16. Resultados da análise de regressão múltipla aplicada aos dados do total de pacientes tomando-se o nível de NADH-redutase de me temoglobina como a variável dependente.

VARIÁVEL	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	t(176)
Hemoglobina (g%)	-4,92	0,95	-5,19***
Metemoglobina (%)	-0,68	0,61	-1,11
Idade (anos)	0,26	0,11	2,30*
Tempo de tratamento (anos)	0,001	0,16	0,01
Sulfonemia (mg/l)	0,006	0,71	0,01

* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$

Entretanto, a diminuição da atividade da NADH-redutase de metemoglobina entre os pacientes de ambulatório contraria a hipótese sugerida acima, uma vez que tais pacientes estão sob a ação de um agente hemolítico e, conseqüentemente, deveriam mostrar maior proporção de hemácias jovens na circulação sanguínea, a exemplo dos pacientes hospitalizados. Contudo, uma observação mais cuidadosa dos resultados da análise de regressão múltipla mostrados nas tabelas 14 e 15 evidencia que, tanto entre os hanseianos hospitalizados quanto entre os sob tratamento ambulatorial, a atividade enzimática é influenciada pelos níveis de hemoglobina. Essa influência, porém, é mais acentuada entre os pacientes hospitalizados.

Considerando, porém, que os coeficientes de determinação da atividade da NADH-redutase de metemoglobina encontrados foram pequenos (0,05 e 0,18 respectivamente), é imperativo supor que outras variáveis, que não foram levadas em conta no presente trabalho, devem desempenhar um papel importante na determinação dos níveis de NADH-redutase de metemoglobina. Realmente, chama a atenção o fato de que, em recém-nascidos, essa enzima apresenta nível semelhante ao dos adultos nos quais ela mostra deficiência parcial (Ross, 1963). Além disso, a capacidade de redução da metemoglobina pelos eritrócitos de recém-nascidos está positivamente correlacionada com os níveis enzimáticos de NADH-redutase de metemoglobina, enquanto que, na idade adulta, essa correlação deixa de existir (Kanazawa et al., 1968).

Desde os estudos de Petragani, Nogueira e Raw (1959) sabe-se que a metemoglobina pode ser reduzida por uma NADH-redutase do citocromo b_5 , sendo essa reação bastante acelerada na presença de tal hemoproteína. Essa importante descoberta, feita numa época em que não se sabia que as hemácias contêm citocromo b_5 , não livrou, entretanto, o trabalho de Petragani et al. (1959) de ficar indevidamente relegado ao quase esquecimento durante algum tempo, apesar de o mesmo ter sido publicado em uma revista científica importantíssima. De qualquer modo, porém, a NADH-redutase de metemoglobina passou a ser caracterizada como NADH-redutase do citocromo b_5 . Estudos posteriores aos de Petragani et al. (1959) mostraram ser esse citocromo encontrado em maior quantidade nos reticulócitos e que, na presença de pouca enzima, ele garante altas taxas de redução da metemoglobina (Hultquist e Passon, 1971; Sugita et al., 1971). Conseqüentemente, o citocromo b_5 tem papel crucial na redução da metemoglobina, uma vez que ele é um fator que limita a velocidade da reação muito mais intensamente do que a própria quantidade de enzima presente.

O trabalho de Petragani et al. (1959) sugeriu que a re-

5579/IB

dução da metemoglobina depende de um sistema multienzimático, o que também foi posteriormente comprovado por Scott et al. (1965). Assim, a NADH-redutase do citocromo b_5 (chamada NADH-redutase de metemoglobina I por Scott e NADH-redutase de metemoglobina II por Kitao et al., 1974) é responsável, segundo Scott et al. (1965), por 61% da capacidade eritrocitária de redução da metemoglobina e é a enzima que se encontra deficiente nos indivíduos com metemoglobinemia congênita. Entretanto, além dela existem a NADH-redutase de metemoglobina II de Scott et al. (1965) e a NADPH-redutase de metemoglobina, responsáveis, respectivamente, por 6% e 5% da capacidade eritrocitária de redução da metemoglobina (Jaffé, 1966). Os restantes 28% dependem de componentes não-enzimáticos, como o ácido ascórbico e o glutatião (Gibson, 1948), que respondem, segundo Jaffé (1966) por, respectivamente, 16% e 12% da capacidade eritrocitária de redução da metemoglobina. Acredita-se, entretanto, que o glutatião não desempenha um papel importante in vivo, uma vez que indivíduos deficientes de desidrogenase de 6-fosfato de glicose não mostram metemoglobinemia, muito embora essa situação já tenha sido observada em indivíduos com deficiência de glutatião (Townes e Morrison, 1962).

Ainda com relação à atividade da NADH-redutase de metemoglobina deve-se tecer alguns comentários sobre o método de Scott (1960) aqui empregado. Assim, no concernente à velocidade de redução do 2,6-diclorofenol-indofenol pelo hemolisado é permissível supor que ela seja influenciada não apenas pela NADH-redutase do citocromo b_5 , mas também, entre outras substâncias, pela presença da NADH-redutase de metemoglobina II de Scott et al. (1965), da NADPH-redutase de metemoglobina, uma vez que essa última tem cerca de 25% de sua atividade catalítica na presença de NADH (Huennekens et al., 1957) e de glutatião reduzido, que tem grande capacidade de redução do 2,6-diclorofenol-indofenol (Scott, 1969).

No que diz respeito a estudos populacionais, as únicas aplicações do método de Scott (1960) foram aquelas feitas por ele mesmo e por Fialkow et al. (1965). Scott (1960) estudou um isolado de índios e esquimós do Alasca, entre os quais existe uma alta frequência de casos de metemoglobinemia congênita. A amostra estudada por ele, entretanto, não foi coletada aleatoriamente, tendo sido viciada pelo tipo de averiguação empregado, uma vez que incluiu famílias inteiras e parentes próximos de indivíduos metemoglobinêmicos. Isso explicaria a distribuição trimodal da atividade da NADH-redutase de metemoglobina encontrada por Scott (1960).

De qualquer modo, esse autor considerou três tipos de in

divíduos com relação à atividade da NADH-redutase de metemoglobina, quais sejam, os indivíduos com deficiência grave dessa enzima ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4 < 5$), os quais seriam homozigotos deficientes; os indivíduos com deficiência parcial da enzima ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4$ entre 13 e 30), os quais foram considerados heterozigotos; e os indivíduos com atividade normal de NADH-redutase de metemoglobina ($\Delta A_{600}/\text{min} \cdot 10^4 \geq 30$), os quais seriam os homozigotos normais

Por outro lado, quando o método de Scott (1960) foi aplicado a amostras de indivíduos tomados ao acaso, isto é, quando não havia excesso de pessoas com metemoglobinemia congênita nem com deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina, obteve-se uma distribuição unimodal em relação ao nível dessa enzima. Foi isso o que observaram Fialkow *et al.* (1965) em uma amostra de 49 indivíduos e o que foi encontrado no presente trabalho (figura 4). Essa unimodalidade não parece decorrer de uma eventual baixa frequência de heterozigotos na população e conseqüente falta de detecção desses elementos. De fato, entre os 137 indivíduos sadios examinados no presente trabalho, 4 (2,9%) apresentaram níveis de 16, 23, 25 e 27 unidades de atividade, que, de acordo com Scott (1960), deveriam classificá-los entre os heterozigotos do gene da deficiência de NADH-redutase de metemoglobina. Do mesmo modo, a distribuição unimodal dos indivíduos estudados por Fialkow *et al.* (1965) não foi devida à falta de pessoas cujo nível de NADH-redutase de metemoglobina era semelhante ao dos heterozigotos de Scott (1960), pois dos 49 indivíduos testados por Fialkow *et al.* (1965), 2 (4,1%) teriam sido classificados por Scott (1960) como heterozigotos.

Além disso, a proporção de indivíduos com deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina é maior entre os hansenianos (22,5%) do que entre os indivíduos sadios (2,9%; $\chi^2_{(1)} = 23,210$; $p < 0,001$). Tal proporção, entretanto, não parece ser devida a um excesso de heterozigotos entre os pacientes, uma vez que a ingestão diária de 100 mg de DDS não provocou sinais ou sintomas de metemoglobinemia tóxica nos 41 pacientes (22,5%) com deficiência dessa enzima, segundo a técnica de Scott (1960) nem nos 141 hansenianos (77,5%) com atividade normal de NADH-redutase de metemoglobina.

Por outro lado, o nível médio de metemoglobina entre os pacientes com deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina (3,20% dp = 3,06%) não diferiu significativamente do observado entre os pacientes com atividade normal dessa enzima (3,18%; dp = 2,35%). Esse fato está em desacordo com os achados de Cohen *et al.* (1968), uma vez que esses autores

concluíram que doses de 25 mg de DDS são capazes de induzir metemoglobine-
mia tóxica em indivíduos com deficiência parcial de NADH-redutase de mete-
moglobina.

Em relação à amostra estudada por Fialkow et al. (1965),
ainda é interessante assinalar que esses autores obtiveram valores médios
de atividade da NADH-redutase de metemoglobina semelhantes aos observados
no presente trabalho entre os indivíduos sadios (média = 55,6 e dp = 13,8
nos dados de Fialkow et al., 1965 e média = 53,6 e dp = 12,9 no presente
trabalho; $t_{(184)} = 0,93$; $0,30 < p < 0,40$).

O método de avaliação dos níveis de NADH-redutase de me-
temoglobina descrito por Hegesh et al. (1968) difere do método de Scott
(1960) pelo fato de usar-se no primeiro a própria metemoglobina como acep-
tor final de elétrons, razão pela qual ele tem sido considerado como mais
preciso por alguns autores (Schwartz e Jaffé, 1978). Entretanto, num estu-
do comparativo entre os dois métodos aplicados a 34 pessoas classificadas
por Scott (1969) como compostas de 19 homozigotos normais e 15 heterozigo-
tos do gene da deficiência de NADH-redutase de metemoglobina, esse autor
concluiu que os resultados alcançados pelos dois métodos eram idênticos ,
como se pode verificar na tabela 17.

Tabela 17

Tomando os valores da média e do desvio-padrão da tabela
17 como estimativas desses parâmetros, pode-se traçar a curva normal de ca
da distribuição de acordo com a função

$$f(x) = \frac{1}{s\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x - \bar{x}}{s}\right)^2}$$

onde \bar{x} e s são, respectivamente, a média e o desvio-padrão, x os valores da
variável e e a base dos logaritmos naturais.

Mesmo que os quatro indivíduos sadios que mostraram bai-
xa atividade enzimática fossem, como preconiza Scott (1960, 1969), hetero-
zigotos, ainda assim a distribuição das pessoas sadias segundo a atividade
da NADH-redutase de metemoglobina continuaria a ser unimodal. Isso porque,
com tal proporção de heterozigotos (2,9%), tem-se que a sua distribuição fi-
ca contida na dos homozigotos normais, como ilustra a figura 7.

Figura 7

TABELA 17. Comparação dos níveis de NADH-redutase de metemoglobina determinados de acordo com os métodos de Scott (1960) e Hegesh et al. (1968) (dados extraídos de Scott, 1969).

FENÓTIPO	MÉTODO			
	SCOTT (1960)		HEGESH <u>et al.</u> (1965)	
	média	dp	média	dp
Homozigotos normais (n = 19)	43,3	13,7	2,32	0,57
Heterozigotos (n = 15)	25,1	3,5	1,21	0,30

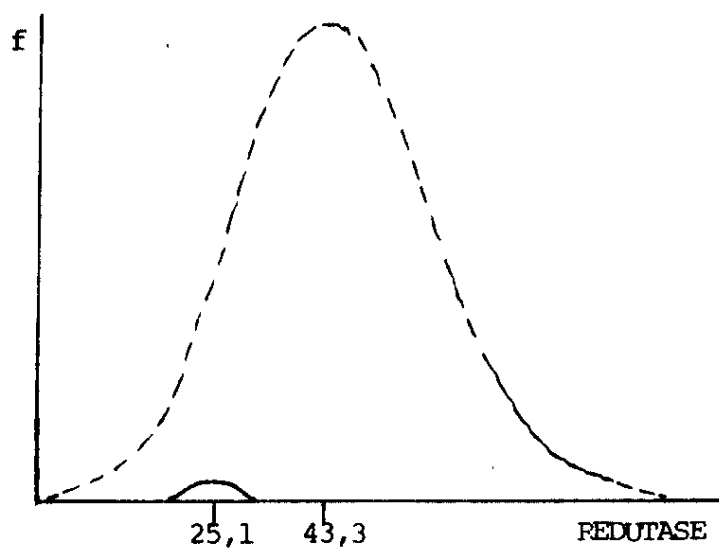


FIGURA 7. Distribuições esperadas dos homozigotos normais (—) e heterozigotos do gene da deficiência de NADH-redutase de metemoglobina (—) segundo os parâmetros descritos por Scott (1969) e considerando-se uma população composta de 97% de homozigotos normais e 3% de heterozigotos.

Por outro lado, em se chamando de $f_1(x)$ a função da distribuição dos supostos heterozigotos e de $f_2(x)$ a função da distribuição dos supostos homozigotos normais, pode-se determinar o ponto de intersecção entre essas duas distribuições fazendo $f_1(x) = f_2(x)$, situação em que o valor da variável correspondente ao ponto de interseção é obtido pela resolução da equação

$$(s_1^2 - s_2^2)x^2 + 2(s_2^2\bar{x}_1 - s_1^2\bar{x}_2)x + s_1^2\bar{x}_2 - s_2^2\bar{x}_1 - 2s_1s_2 \ln\left(\frac{N_2s_1}{N_1s_2}\right) = 0, \text{ onde } \underline{N},$$

\bar{x} e s são, respectivamente, o tamanho, a média e o desvio-padrão de cada a mostra, identificadas pelos índices 1 e 2 e x é o valor da variável. A equação acima, por ser quadrática, fornecerá duas raízes caso as distribuições tenham interpenetração. Nesse caso, tem interesse a raiz cujo valor se situar entre as médias das distribuições.

Aplicando o método acima aos dados da tabela 17, pode-se construir a figura 8, na qual se verifica que, mesmo partindo de amostras praticamente do mesmo tamanho de supostos heterozigotos e homozigotos normais, encontra-se uma proporção apreciável (19%) dos supostos homozigotos que pode ser classificada no grupo denominado por Scott (1960, 1969) de heterozigotos. As figuras 9 e 10 evidenciam que o mesmo é verdadeiro quando se aplica o método de Hegesh et al. (1968) aos 34 indivíduos estudados por Scott (1969) e, nesse caso, 12% dos supostos homozigotos normais apresentariam níveis enzimáticos considerados próprios dos heterozigotos.

Figuras 8 a 10

Em vista do exposto, parece plausível supor que tanto o método descrito por Scott (1960) quanto o de Hegesh et al. (1968) não são apropriados para a triagem dos indivíduos considerados heterozigotos do gene que causa a deficiência de NADH-redutase de metemoglobina. Realmente, para tal fim será necessário o emprego de um método específico, isto é, que utilize o citocromo b_5 como acceptor final de elétrons.

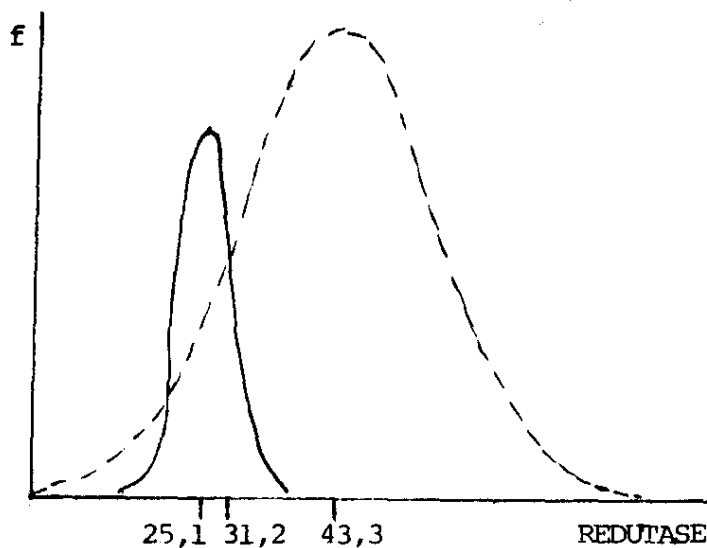


FIGURA 2. Distribuições dos homozigotos normais (—) e heterozigotos do gene da deficiência de NADH-redutase de metemoglobina (---) segundo os parâmetros descritos por Scott (1969) e considerando-se a mesma proporção fenotípica mostrada na tabela 17 (56% de homozigotos normais e 44% de heterozigotos).

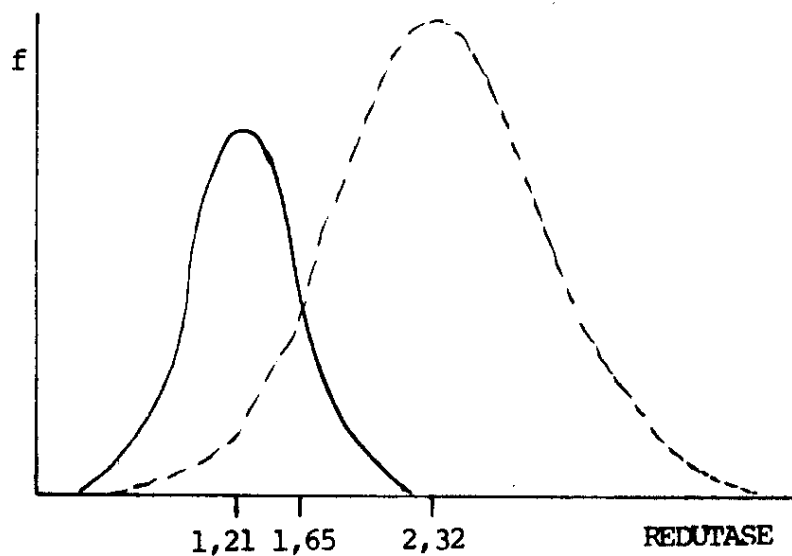


FIGURA 9. Distribuições dos homocigotos normais (—) e heterocigotos do gene da deficiência de NADH-redutase de metemoglobina (---) segundo os parâmetros obtidos por Scott (1969) com a técnica de Hegesh et al. (1968) e considerando-se a mesma proporção fenotípica mostrada na tabela 17 (56% de homocigotos normais e 44% de heterocigotos).

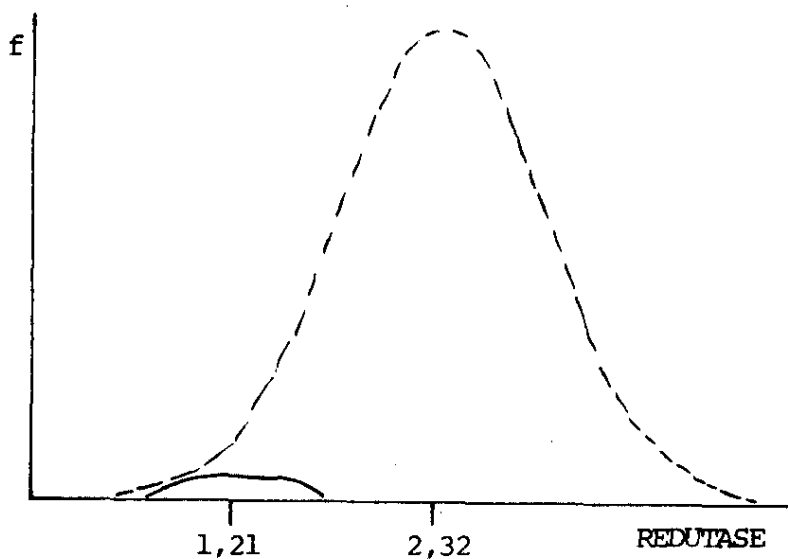


FIGURA 10. Distribuições esperadas dos homozigotos normais (—) e heterozigotos do gene da deficiência de NADH-redutase de metemoglobina (—) segundo os parâmetros obtidos por Scott (1969) com a técnica de Hegesh *et al.* (1968) e considerando-se 97% de homozigotos normais e 3% de heterozigotos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

Os níveis de hemoglobina, de metemoglobina, de sulfonas e de NADH-redutase de metemoglobina determinados em 182 hansenianos adultos, que ingeriam uma dose diária de 100 mg de DDS, e em 137 soldados do Exército brasileiro (exceção feita à dosagem de sulfonas) permitiram concluir que:

1. Os indivíduos sob tratamento sulfônico mostram menor nível de hemoglobina que os indivíduos sadios, o qual se correlaciona negativa e significativamente tanto com a sulfonemia quanto com o tempo de tratamento com DDS.
2. O nível de metemoglobina está aumentado entre os hansenianos sob tratamento sulfônico e correlacionado positiva e significativamente com a concentração sanguínea de sulfonas.
3. A atividade da NADH-redutase de metemoglobina determinada segundo a técnica de Scott (1960) apresenta maior variabilidade entre os hansenianos e está negativa e significativamente correlacionada com seu nível de hemoglobina.
4. A proporção de indivíduos com deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina é maior entre os hansenianos do que entre os indivíduos sadios.
5. A ingestão diária de 100 mg de DDS não provocou sinais ou sintomas de metemoglobinemia tóxica em 141 hansenianos com atividade normal de NADH-redutase de metemoglobina nem entre 41 pacientes com deficiência parcial dessa enzima.
6. O nível médio de metemoglobina entre os pacientes com deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina não diferiu significativamente do observado entre os pacientes com atividade normal dessa enzima.
7. A distribuição das amostras estudadas segundo a atividade da NADH-redutase de metemoglobina medida pelo método de Scott (1960) foi unimodal, o que indica que o método de Scott (1960) não é apropriado para estudos populacionais de triagem de heterozigotos deficientes de NADH-redutase de metemoglobina. Essa conclusão também se aplica ao método de avaliação da atividade dessa enzima descrito por Hegesh et al. (1968).

RESUMO

Os níveis de hemoglobina, de metemoglobina, de sulfonas e de NADH-redutase de metemoglobina foram determinados em 182 hansenianos adultos, que ingeriam uma dose diária de 100 mg de DDS, e em 137 soldados do Exército brasileiro (exceção feita à dosagem de sulfonas).

O nível médio de hemoglobina dos hansenianos foi menor do que o dos indivíduos sadios e esteve correlacionado negativa e significativamente com a sulfonemia e o tempo de tratamento com DDS.

A concentração de metemoglobina nos hansenianos foi discreta, porém significativamente maior em comparação com os indivíduos sadios. O aumento do nível de metemoglobina nos hansenianos foi influenciado pela sulfonemia, apesar de que em nenhum caso a ingestão diária de DDS tenha induzido sinais ou sintomas de metemoglobinemia tóxica.

O nível médio da atividade da NADH-redutase de metemoglobina nos hansenianos não diferiu do observado nos indivíduos sadios, apesar de a variância entre os primeiros ter sido significativamente maior que a observada entre os indivíduos sadios. Conseqüentemente, a proporção de pessoas com deficiência parcial de NADH-redutase de metemoglobina foi maior entre os hansenianos (22,5%) que entre os indivíduos sadios (2,9%). A atividade dessa enzima entre os hansenianos correlacionou-se negativamente com o nível de hemoglobina, estando correlacionada discreta e positivamente com a idade.

SUMMARY

The levels of hemoglobin, methemoglobin, sulfones and NADH-methemoglobin reductase were investigated among 182 leprosy adult patients who were ingesting a daily dosis of 100 mg dapsone as well as among 137 army enlisted men (exception made to sulfone dosage).

The mean level of hemoglobin among the patients was lower than that observed among the healthy subjects and negatively correlated to both the blood level of sulfones and the time under sulfone treatment.

The concentration of methemoglobin among the leprosy patients was slightly but significantly higher as compared to the healthy individuals. The increase of the methemoglobin level among the leprosy patients was influenced by the amount of sulfones in the blood. However, in no case the daily ingestion of dapsone was able to induce signs or symptoms of toxic methemoglobinemia.

The mean value of NADH-methemoglobin reductase activity exhibited by the leprosy patients did not differ from that observed among the healthy individuals. However, the variance of the former group was significantly higher than that observed among the healthy subjects. As a consequence, the proportion of individuals showing a partial deficiency of NADH-methemoglobin reductase was significantly higher among the leprosy patients (22.5%) than that observed among the healthy individuals (2.9%). The activity of this enzyme among the leprosy patients was negatively correlated to the hemoglobin level and slightly positively correlated to age.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEIGUELMAN, B. (1983). Farmacogenética e sistemas sanguíneos eritrocitários. Capítulo VII. Ed. Guanabara-Koogan-FUNCAMP, Rio de Janeiro. pp 56-60.
- BEIGUELMAN, B., PINTO JUNIOR, W., EL-GUINDY, M. M. e KRIEGER, H. (1974). Factors influencing the level of dapsone in blood. Bull. W.H.O., 51: 467 - 471.
- BENESCH, R. E., BENESCH, R., YUNG, S. (1973). Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. Anal. Biochem., 55: 245-248.
- BIANCHI-SCARRÀ, G., AJMAR, F., BRUZZONE, G., GAETANI, G. F. (1976). Biochemical and functional properties of methemoglobin diaphorase in congenital methemoglobinemia. Haematologica, 61: 261 - 268.
- BOARD, P. G. e PIDCOCK, E. (1981). Methaemoglobinemia resulting from heterozygosity for two NADH-methaemoglobin reductase variants: characterization as NADH-ferricyanide reductase. Br. J. Haematol., 47: 361 - 370.
- CHANDRASEKAR, S., RAJAGOPAL, G. e SUGANTHA, V. (1974). Hemoglobin E trait with methemoglobinemia. Indian J. Med. Sci., 28: 216 - 218.
- COCHRANE, R. C. (1950). Critical review of present position of sulfonotherapy in leprosy. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 44: 259 - 270.
- COHEN, R. J., SACHS, J. R., WICKER, D. J. e CONRAD, M. E. (1968). Methemoglobinemia provoked by malarial chemoprophylaxis in Vietnam. N. Engl. J. Med., 279: 1127 - 1131.
- DEGOWIN, R. L., EPPES, R. B., POWELL, R. D. e CARSON, P. E. (1966). The haemolytic effects of diaphenylsulfone (DDS) in normal subjects and in those with glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency. Bull. W.H.O., 35: 165 - 179.
- DESFORCES, J. F., THAYER, W. W. e DANSON, J. P. (1959). Hemolytic anemia induced by sulfoxone therapy, with investigations into mechanisms of its production. Am. J. Med., 27: 132 - 136.
- EFREMOV, G. D., HUISMAN, T. H. J., STANULOVIC, M., ZUROVEC, M., DUMA, H., WILSON, J. B. e JEREMIC, V. (1974). Haemoglobin M Saskatoon and Haemoglobin M Hyde Park in two Yugoslavian families. Scand. J. Haematol., 13: 48 - 60.
- EVELYN, K. A. e MALLOY, H. T. (1938). Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. J. Biol. Chem., 126: 656 - 662.

- FIALKOW, P. J., BROWDER, J. A., SPARKES, S. e MOTULSKY, A. G. (1965). Mental retardation in methemoglobinemia due to diaphorase deficiency. N. Engl. J. Med., 273: 840 - 845.
- GABEL, R. A. e BUNN, H. F. (1974). Hereditary methemoglobinemia as a cause of cyanosis during anesthesia. Anesthesiology, 40: 516 - 518.
- GIBSON, Q. H. (1948). The reduction of methemoglobin in red blood cells and studies on the cause of idiopathic methemoglobinemia. Biochem. J., 42: 13-23.
- GONZÁLEZ, R., ESTRADA, M., WADE, M., TORRE, E., SVARCH, E., FERNANDEZ, O., ORTIZ, R., GUZMAN, E. e COLOMBO, B. (1978). Heterogeneity of hereditary methemoglobinemia: a study of 4 Cuban families with NADH-methemoglobin reductase deficiency including a new variant (Santiago de Cuba variant). Scand. J. Haematol., 20: 385 - 393.
- HEGESH, E., CALMANOVICI, N. e AVRON, M. (1968). New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH-methemoglobin reductase) in erythrocytes. J. Lab. & Clin. Med., 72: 339 - 344.
- HEGESH, E. e SHILOAH, J. (1982). Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. Clin. Chim. Acta, 125: 107 - 115.
- HEUSDEN, A., WILLEMS, G., LAMBOTTE, C., HAINAUT, H., CHAPELLE, P. e MALCHAIR, R. (1971). Methemoglobinémie héréditaire avec ariération mentale étude de trois nouveaux cas. Arch. Franc. Péd., 28: 631 - 645.
- HIRANO, M., KATSUKI, T., TANISHIMA, K., TAKESHITA, M. SHIMIZU, S., NAGAMURA, Y. e YONEYAMA, Y. (1981). Congenital methaemoglobinemia due to NADH-methaemoglobin reductase deficiency: successful treatment with oral riboflavin. Br. J. Haematol., 47: 353 - 359.
- HOPKINSON, D. A., CORNEY, G., COOK, P. J. L., ROBSON, E. B. e HARRIS, H. (1970). Genetically determined electrophoretic variants of human red cell NADH-diaphorase. Ann. Hum. Genet. (London), 34: 1 - 10.
- HUENNEKENS, F. M., CAFFREY, R. W., BASFORD, R. E. e GABRIO, B. W. (1957). Erythrocyte metabolism. IV. Isolation and properties of methemoglobin reductase. J. Biol. Chem., 227: 261 - 272.
- HULTQUIST, D. E. e PASSON, P. G. (1971). Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome b_5 and cytochrome b_5 reductase. Nature New Biol., 229: 252 - 254.
- JAFFE, E. R. (1966). Hereditary methemoglobinemia associated with abnormalities in the metabolism of erythrocytes. Am. J. Med., 41: 786 - 798.

- JAFFE, E. R., NEUMANN, G., ROTHBERG, H., WILSON, F. T., WEBSTER, R. M. e WOLFF, J. A. (1966). Hereditary methemoglobinemia with and without mental retardation. Am. J. Med., 41: 42 - 55.
- KANAZAWA, Y., HATTORI, M., KOSAKA, K. e NAKAO, K. (1968). The relationship of NADH-dependent diaphorase activity and methemoglobin reduction in human erythrocytes. Clin. Chim. Acta, 19: 524 - 526.
- KAPLAN, J. C. e CHIROUZE, M. (1978). Therapy of recessive congenital methemoglobinemia by oral riboflavin. Lancet, 2: 1043 - 1044.
- KAPLAN, J. C., LEROUX, A., BAKOURI, S., GRANGAUD, J. P. e BENABADJI, N. (1974). La lésion enzymatique dans la methemoglobinémie congénitale récessive avec encéphalopathie. N. Rv. Fr. Hematol., 14: 755 - 770.
- KAPLAN, J. C., LEROUX, A. e BEAUVAIS, P. (1979). Formes cliniques et biologiques du déficit en cytochrome b₅ réductase. C. R. Soc. Biol., 173: 368-379.
- KITAO, T., SUGITA, Y., YONEYAMA, Y. e HATTORI, K. (1974). Methemoglobin reductase (cytochrome b₅ reductase) deficiency in congenital methemoglobinemia. Blood, 44: 879 - 884.
- LEROUX, A., JUNIEN, C. e KAPLAN, J. C. (1975). Generalised deficiency of cytochrome b₅ reductase in congenital methaemoglobinemia with mental retardation. Nature, 258: 619 - 620.
- LO, S. S., HITZIG, W. H. e MARTI, H. R. (1970). Hereditary methemoglobinemia due to diaphorase deficiency: report of a case of heterozygote presenting with cyanosis after birth. Acta Haemat., 43: 177 - 183.
- MAST, A., MILO, R., JUNIEN, C., LEROUX, A., KRISHNAMOORTHY, R., WAJCMAN, H., LABIE, D. e KAPLAN, J. C. (1976). Congenital enzymopenic methaemoglobinemia: clinical and biochemical study of a family with three homozygotes. Acta Haemat., 56: 174 - 182.
- MATSUKI, T., YUBISUI, T., TOMODA, A., YONEYAMA, Y., TAKESHITA, M., HIRANO, M., KOBAYASHI, K. e TANI, Y. (1978). Acceleration of methaemoglobin reduction by riboflavin in human erythrocytes. Br. J. Haemat., 39: 523 - 528.
- MOLESWORTH, B. D. e NARANAYASWAMI, P. S. (1949). The treatment of lepromatous leprosy with 4,4'-diaminodiphenylsulfone in oil. With a note on the technique of sulfone determinations, by SIMPSON, I. A. Int. J. Lepr., 17: 197 - 210.

- NAOUM, P. C., MOURÃO, C. A., RUIZ, M. A. e POLI NETO, A. (1982). Toxic methaemoglobinemia and sulphaemoglobinemia in a population from Cubatão (SP, Brazil): effect of industrial pollution? Ciência e Cultura, 34 : 529 - 532.
- NITZAN, M., VOLOVITZ, B. e TOPPER, E. (1979). Infantil methemoglobinemia caused by food additives. Clin. Toxicol., 15: 273 - 280.
- PETRAGNANI, N., NOGUEIRA, O. C. e RAW, I. (1959). Methaemoglobin reduction through cytochrome b_5 . Nature, 184: 1651.
- RITTER, H., SCHMIDT, K. e SCHMITT, J. (1973). Hereditary methemoglobinemia associated with diaphorase deficiency. Humangenetik, 17: 179 - 180.
- ROSS, J. D. (1963). Deficient activity of DPNH-dependent methemoglobin diaphorase in cord blood erythrocytes. Blood, 21: 51 - 62.
- SCHWARTZ, J. M. e JAFFE, E. (1978). Hereditary methemoglobinemia with deficiency of NADH-dehydrogenase. In: The metabolic basis of inherited disease (STANBURY, J. B., WYNGAARDEN, J. B. e FREDRICKSON, D. S., eds.), 4a. Ed., McGraw-Hill, Inc., New York, pp. 1452 - 1464.
- SCOTT, E. M. (1960). The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. J. Clin. Investig., 39: 1176 - 1179.
- SCOTT, E. M. (1969). A comparison of two methods of determining DPNH-methemoglobin reductase. Clin. Chim. Acta, 23: 495 - 498.
- SCOTT, E. M., DUNCAN, I. W. e EKSTRAND, V. (1965). The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of human erythrocytes. J. Biol. Chem., 240 : 481 - 485.
- SUGITA, Y., NOMURA, S. e YONEYAMA, Y. (1971). Purification of reduced pyridine nucleotide dehydrogenase from human erythrocytes and methemoglobin reduction by the enzyme. J. Biol. Chem., 246: 6072 - 6076.
- TANISHIMA, K., MATSUKI, T., FUKUDA, N., TAKESHITA, M. e YONEYAMA, Y. (1980). NADH-cytochrome b_5 reductase in platelets and leukocytes with special references to normal levels and to levels in carriers of hereditary methemoglobinemia. Acta Haemat., 63: 7 - 12.
- TOMODA, A., IDA, M., TSUJI, A. e YONEYAMA, Y. (1980). Mechanism of methemoglobin reduction by human erythrocytes. Biochem. J., 188: 535 - 540.
- TWONES, P. L. e MORRISON, M. (1962). Investigation of the deficit in a variant of hereditary methemoglobinemia. Blood, 19: 60 - 74.

VIVES-CORRONS, A., PUJADES, A., VELA, E., CORRETGER, J. M., LEROUX, A. e KAPLAN, J. G. (1978). Congenital methemoglobin reductase (cytochrome b₅ reductase) deficiency associated with mental retardation in a Spanish girl. Acta Haemat., 59: 348 - 353.

WINSLOW, R. M. e ANDERSON, W. F. (1978). The hemoglobinopathies. In: The metabolic basis of inherited disease (STANBURY, J. B., WYNGAARDEN, J. B. e FREDRICKSON, D. S., eds.), 4a. Ed., McGraw-Hill, Inc., New York, pp . 1465 - 1507.

YUBISUI, T., MATSUKI, T., TANISHIMA, K., TAKESHITA, M. e YONEYAMA, Y. (1977). NADPH-flavin reductase in human erythrocytes and the reduction of methemoglobin through flavin by the enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun., 76: 174 - 182.

(:):(:(:):(:(:):(:(:):(:(: