

Este exemplar corresponde a
versão final da tese de mestrado
apresentada em 08 de julho de 1987
pela médica SARA F. J. Saad.

SARA TERESINHA OLALLA SAAD


Prof. Dr. Fernando F. Costa

Orientador.

DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE
(G-6-PD) EM DOENÇAS FALCIFORMES

Tese de Mestrado

apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Campinas

- 1987 -

Aos meus pais o meu reconhecimento pela luta constante em razão da minha vida.

Às minhas filhas Laura e Thaís que durante tantos momentos foram privadas da minha companhia.

Ao companheiro Mário, meu ponto de equilíbrio, que além do carinho , incentivo e preciosa colaboração profissional, soube me substituir no cuidado às nossas filhas.

AGRADECIMENTOS

1. Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, orientador deste trabalho, pelo estímulo e apoio à minha iniciação científica e valiosa amizade.
2. A todos os funcionários, docentes e Chefe do Departamento de Patologia Clínica que tão gentilmente me receberam em seus laboratórios, em especial à Prof. Helena Z.W. Grotto e à Srta Elza M. Kimura pela amizade, apoio e auxílio prestado.
3. À Sra. Tereza Sueko Ide Sales pela competente colaboração técnica.
4. A todos os funcionários da coleta de sangue e ambulatório de cirurgia.
5. À Dra. Maria de Lourdes Rios Barjas pela solidariedade e auxílio na coleta de dados deste trabalho.
6. Ao Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho pela amizade e encaminhamento de controles com deficiência de G-6-PD.
7. Ao meu amigo Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza pela compreensão e encaminhamento de pacientes.
8. À Prof. Dr. Sílvia Regina Brandalise, demais funcionários e pacientes do Centro Infantil "Dr. Domingos Boldrini".
9. Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Marcelo Carvalho Ramos pela assessoria da análise estatística dos dados e irrestrito apoio.
10. Aos funcionários da pós-graduação que com presteza me ajudaram em momentos críticos.
11. À Prof. Dra. Mary Lucy de Sousa Queiroz, Dra. Carmen Silvia P. Lima e Dr. Frederico L. Dulley, pela solidariedade.

ÍNDICE

- INTRODUÇÃO	1
- CASUÍSTICA E MÉTODOS	12
CASUÍSTICA	13
MÉTODOS	16
1. Hematimetria	16
2. Estudo das Hemoglobinas	16
3. Estudo da G-6-PD	16
3.1. Redução do número de reticulócitos ..	17
3.2. Teste de fluorescência	18
3.3. Quantificação de G-6-PD	18
3.4. Eletroforese de G-6-PD	20
4. Análise Estatística	21
- RESULTADOS	22
1. Redução do número de reticulócitos	23
2. Teste de fluorescência	26
3. Quantificação de G-6-PD	29
4. Eletroforese de G-6-PD	38
5. Prevalência de deficiência de G-6-PD	41
- DISCUSSÃO	43
- RESUMO E CONCLUSÕES	52
- SUMMARY	55
- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
- APÊNDICE	68

INTRODUÇÃO

O eritrócito, com frequência descrito como uma célula funcionalmente simples, apresenta numerosos aspectos, relativos à sua estrutura e propriedades metabólicas, extremamente complexos e peculiares. A membrana celular, as enzimas necessárias ao metabolismo energético e a hemoglobina constituem um conjunto harmônico e em perfeito equilíbrio.

A captação, o transporte e a liberação de oxigênio não requerem a utilização de quantidades significativas de energia metabólica pela hemácia que, no entanto é necessária para que o eritrócito permaneça funcionalmente ativo e em circulação durante um período de aproximadamente 120 dias. A energia é utilizada para manter o ferro da hemoglobina na forma divalente; níveis intracelulares altos de potássio e reduzidos de sódio e cálcio, contra elevados gradientes de concentração; os grupos sulfidrilas das enzimas eritrocitárias, da membrana e da hemoglobina em sua forma ativa reduzida e, finalmente, para conservar a forma bicôncava da hemácia. Como as hemácias não possuem núcleo, ribossomos, mitocôndrias ou aparelho de Golgi, não sintetizam proteínas ou ácidos graxos e somente são capazes de obter energia por meio do metabolismo anaeróbico da glicose.

A glicose penetra facilmente nas hemácias, quase independentemente da sua concentração extracelular. Aproximadamente 90% é me

metabolizada a ácido láctico pela via de Embden-Meyerhof, em que são produzidos o trifosfato de adenosina (ATP), que fosforila proteínas de membrana e fornece energia para bomba de sódio e potássio, e a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), que é importante para manter o potencial redutor intracelular. O restante da glicose é metabolizado por meio da via oxidativa direta ou ciclo das pentoses-fosfato, cuja reação inicial é catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD). Esta via metabólica desempenha importante papel na geração de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), substância redutora capaz de opor-se à oxidação da hemoglobina e essencial à manutenção da glutatona em estado reduzido (GSH). A GSH é fundamental à manutenção da estabilidade da hemoglobina (Jandl e Allen, 1960) e das enzimas intracelulares, à proteção de lípidos da membrana contra peroxidação (Osaki e Naimann, 1966; Marks, 1967; Jaffé, 1970), além de constituir a principal fonte de grupos sulfidrila no interior da hemácia. De fato, uma diminuição da atividade da G-6-PD poderá resultar em lesão e destruição de hemácias, especialmente quando submetidas à ação de agentes oxidantes, ou em condições especiais, como no período neonatal, na presença de acidose diabética ou de infecções.

A deficiência de G-6-PD é uma entidade clínica resultante de anormalidade hereditária em que a atividade ou estabilidade da G-6-PD está reduzida. A descoberta da deficiência de G-6-PD é proveniente da investigação a respeito da hemólise provocada por uma droga antimalárica, a primaquina, que foi extensivamente utiliza-

da durante a Guerra da Coréia. Episódios de hemólise após administração de 8-aminoquinolina foram descritos em 1926; no entanto, somente durante a Guerra da Coréia foi possível o estudo da reação hemolítica em condições controladas e com metodologia adequada. Foi demonstrado que havia uma anormalidade intrínseca da hemácia e a hemólise, que era auto-limitada, dependia basicamente da idade celular. O estudo do metabolismo eritrocitário revelou então que os níveis de GSH nos indivíduos susceptíveis era reduzido, e a investigação dos passos metabólicos da formação de GSH mostrou diminuição da atividade de G-6-PD.

Os mecanismos básicos conducentes à hemólise quando da administração de drogas resultam da produção de H_2O_2 e íon superóxido (Cohen e Hochstein, 1964). Os alvos iniciais da oxidação são GSH, grupos SH das proteínas, heme, Fe^{++} e possivelmente lípides. Algumas substâncias podem formar radicais livres que oxidam o GSH, sem a formação de peróxido de hidrogênio como intermediário (Kozower e cols, 1969).

Os radicais livres de GSH podem determinar a oxidação para forma dissulfídica (GSSG) ou formar um composto misto com a hemoglobina. Estes compostos mistos advêm da ligação da glutathiona com o grupo sulfidrílico na posição β^{93} da hemoglobina (Allen e Jandl, 1961). Este composto é instável e determina mudanças conformacionais na hemoglobina, com exposição de grupos sulfidrílicos internos que facilmente se oxidam e dão origem a outros compostos mistos, por meio da ação da glutathiona redutase (Srivastava e Beutler,

1970). Na hemácia com deficiência de G-6-PD, este mecanismo protetor está prejudicado, ocorrendo então a formação de corpos de Heinz, que são os determinantes fundamentais de hemólise nesses pacientes. Classicamente, era atribuído um maior papel na lise do eritrócito à peroxidação de lípidos de membrana mas, atualmente acredita-se que isto apenas acompanhe a hemólise (Benatti e cols, 1981).

O mecanismo de hemólise consequente a infecções ou espontânea, em hemácias deficientes de G-6-PD, ainda não está inteiramente elucidado. Alguns autores sugerem que a geração de peróxido de hidrogênio durante a fagocitose possa ser um dos fatores precipitantes da lise celular (Baehner e cols, 1971).

A síntese de G-6-PD é determinada por um gene localizado no cromossomo X. Desse modo, os indivíduos do sexo masculino são hemizigotos para deficiência de G-6-PD, enquanto que as mulheres são homozigotas ou heterozigotas. Esse gene possui muitos alelos, e atualmente conhecem-se mais de 150 variantes de G-6-PD, com atividade funcional normal, deficiente ou aumentada.

A variante "normal" é designada como tipo B(Gd B) e representa a forma mais freqüente da enzima em todas as populações estudadas. Em indivíduos da raça negra é encontrada também outra variante, conhecida como tipo A(Gd A⁺). Esta enzima, que ocorre em 20% dos homens negróides (Beiguelman, 1983), tem migração eletroforética mais rápida que a enzima normal e pode ter uma redução de até 20% da atividade funcional (Yoshida e cols, 1967).

No Brasil, a freqüência de deficientes de G-6-PD é aproximadamente de 10% na população masculina negróide e 2% da caucasóide, como demonstraram entre outros, os estudos de Lewgoy e Salzano, 1965; Beiguelman e cols, 1968; Marques e Campos, 1975; Ramalho e Beiguelman, 1976. Em algumas regiões do país há freqüência elevada da variante Africana (A-), ao passo que a variante Mediterrânea é restrita aos caucasóides descendentes de italianos (Azevedo e Azevedo, 1974; Sena e cols, 1984). A variante Africana é sintetizada em quantidade normal, mas sua estabilidade "in vivo" está diminuída (Piomelli e cols, 1968). Assim, a atividade funcional dessa enzima diminui rapidamente na circulação, de modo que hemácias com mais de 50 dias contêm somente 5 a 15% da atividade enzimática normal. A mobilidade eletroforética desta variante é indistinguível daquela da A⁺. A variante Mediterrânea apresenta atividade funcional reduzida, propriedades cinéticas anômalas e migração eletroforética idêntica à normal. Em virtude da atividade de G-6-PD praticamente normal nas hemácias jovens de indivíduos Gd A⁻, os fenômenos hemolíticos são menos acentuados nos portadores desta variante do que naqueles da forma Mediterrânea (Yoshida e cols, 1967) onde todas as hemácias são deficientes independentemente do tempo de vida em circulação.

Por outro lado, outro polimorfismo genético de importância clínica no Brasil é representado pelas alterações hereditárias das hemoglobinas. Entre estas, tem papel relevante a hemoglobina S. Pre

valece na raça negra e sua maior incidência ocorre na África, mas também é encontrada em países do Mediterrâneo, principalmente Grécia, Itália e Israel, assim como na Arábia Saudita, Índia e entre negros americanos (Bunn e cols, 1977; Lehmann e Huntsmann, 1974). A estrutura molecular da Hb S foi determinada por Ingram em 1957 e difere da Hb A pela substituição de um único resíduo, um glutamyl por um valil, na 6ª posição da cadeia β . Esta molécula anômala, quando em concentração elevada e na forma "tensa" (T), isto é, desoxigenada, torna-se insolúvel e agrega-se em longos polímeros. Nestes polímeros, os tetrâmeros se dispõem ao redor de um eixo vertical originando, em cortes transversais, anéis de moléculas de Hb empilhados uns sobre os outros. A formação desses polímeros deforma o eritrócito, originando as clássicas hemácias em forma de foice (Dean e Schechter, 1978). A polimerização intracelular de Hb S desoxigenada corresponde, em essência, ao processo fisiopatológico básico subjacente às múltiplas manifestações orgânicas da anemia falciforme (Finch, 1972).

Além do estado homozigótico para Hb S, a anemia falciforme, outras associações genéticas levam a um predomínio de Hb S intraeritrocitária e desse modo apresentam manifestações clínicas semelhantes entre si. Essas associações são denominadas doenças falciformes e entre elas, merecem destaque, as interações da Hb S com a Hb C e com a talassemia β . A Hb C foi a segunda hemoglobina anômala identificada, e a alteração molecular deriva da substituição de um resíduo de ácido glutâmico por um de lisina, também na 6ª posi-

ção da cadeia globínica β . Esta hemoglobina anormal é freqüente na África, onde em algumas regiões, 17 a 28% da população possuem Hb C na sua forma heterozigota.

No Brasil, a distribuição das alterações hereditárias da hemoglobina é bastante heterogênea, sendo que no Estado de São Paulo a freqüência estimada de heterozigotos da Hb S e Hb C é respectivamente de 6,6 e 1% dos negróides (Ramalho, 1986). Além disso, a freqüência de heterozigotos para a talassemia β nessa região é de aproximadamente 1% na população caucasóide e de 6% nos descendentes não miscigenados de italianos. A interação entre a hemoglobinopatia S e a talassemia β ($S\beta$ -tal) ocorre em algumas partes da África e na população mediterrânea, especialmente Grécia e Itália. Em algumas populações brasileiras essa interação é freqüente (Zago e cols, 1980). Esse fato advém em razão de miscigenação entre descendentes negróides e italianos e à presença de Hb S em caucasóides descendentes de sicilianos e árabes (Zago e Costa, 1985; Ramalho, 1986).

O quadro clínico das doenças falciformes se caracteriza por episódios agudos, habitualmente classificados em vaso-oclusivos, a plásticos, síndrome de sequestração e hemolíticos, no seu conjunto denominados crises de falcização. As crises vaso-oclusivas, tanto por sua freqüência incomparavelmente maior, como pelas repercussões orgânicas globais que acarretam, figuram como manifestação clínica fundamental nos pacientes eritrofalcêmicos. Fatores desencadeantes como infecções, desidratação, febre e outros muitas vezes não detectados, são capazes de provocar uma redução abrupta na

plasticidade dos eritrócitos a nível capilar. O impedimento do fluxo, permitindo remoção do oxigênio dos eritrócitos discóides estagnados, que também falcizam, desencadeia fenômenos embólicos e tromboses, que representam o substrato morfológico das crises vaso-oclusivas. Alguns autores sugerem que as crises hemolíticas possam representar surtos de hemólise consequentes à concomitância de deficiência de G-6-PD em pacientes com doenças falciformes (Smits e cols, 1969).

As consequências da interação entre deficiência de G-6-PD e doenças falciformes são controvertidas e ainda não totalmente esclarecidas. As observações iniciais de Lewis e Hathorn em Gana (1963) e Piomelli e cols em New York (1972), que encontraram frequência e levada de deficientes de G-6-PD entre pacientes com anemia falciforme, conduziram à proposição que esta interação poderia abrandar as manifestações clínicas e aumentar a sobrevida nesses pacientes. Por outro lado, a associação entre doenças falciformes e deficiência de G-6-PD não foi observada em estudos realizados na Tanzânia (Marti e cols, 1965), Nigéria (Bienzle e cols, 1975), Jamaica (Milner e Serjeant, 1969) e Mississipi (Steinberg e Dreiling, 1974). Além disso, Konotey-Ahulu (1972) sugeriu, com base em observações clínicas na África, que esta associação teria efeito prejudicial sobre a evolução clínica destes doentes. Desse modo, eles procurariam o hospital com mais assiduidade e, portanto, o diagnóstico da associação seria mais frequente. No entanto, Gibbs e cols (1980) não observaram qualquer diferença significativa no quadro clínico.

co e hematológico de 31 pacientes com essa associação e 89 indivíduos apenas com anemia falciforme.

Além do mais, Beutler e cols (1974) observaram prevalência e levada de deficientes de G-6-PD em doentes com anemia falciforme e em irmãos heterozigotos desses pacientes, em relação à população - negróide controle. Com base nesses achados propuseram que esta associação refletisse unicamente o declínio paralelo de dois genes africanos para Hb S e Gb A⁻, como consequência de sua diluição no conjunto de genes da população negra americana. Desse modo, os indivíduos de origem africana, sem miscigenação, provavelmente apresentariam - essa associação com maior freqüência.

Outra possibilidade que justificaria a associação entre Hb S e deficiência de G-6-PD seria a proteção que estes dois genes, no estado heterozigótico, forneceria contra infecções por Plasmodium falciparum (Allison, 1960; Motulsky, 1960; Paslov e cols, 1978; - Friedman, 1978; Luzzato e Bienzle, 1979; Luzzato, 1979; Luzzato e Battistuzzi, 1984). Neste caso, em áreas malarígenas, a proteção de ambos os genes se somaria (Bernstein e cols, 1980).

O único estudo, com o objetivo de avaliar a associação dos genes para Hb S e Gd A⁻ no Brasil, foi realizado por Sena (1983) , que observou uma freqüência de heterozigotos para Hb S em deficientes de G-6-PD igual à da população negróide em geral.

Todos esses resultados conflitantes adviriam, em parte, da dificuldade técnica de detectar deficiência de G-6-PD em pacientes com doença falciforme. Estes pacientes apresentam grande porcentagem de hemácias jovens, caracterizadas por níveis enzimáticos elevados. (Yoshida e cols, 1967).

Consoante o exposto e tendo em vista os dados controvertidos existentes na literatura a respeito da associação de doenças falciformes e deficiência de G-6-PD, além da escassez de dados referentes a populações brasileiras, o objetivo deste trabalho foi avaliar a freqüência de deficiência de G-6-PD em pacientes com anemia falciforme, hemoglobinopatia SC e S β -talassemia num grupo de pacientes oriundos da região Nordeste do Estado de São Paulo. Adicionalmente, para consecução desse objetivo foram desenvolvidos e padronizados métodos para detecção de deficiência de G-6-PD, inclusive na presença de reticulocitose.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Na elaboração deste trabalho foram estudados 54 pacientes com doenças falciformes, todos do sexo masculino, com idade variando de 2 a 42 anos, atendidos em Hospitais Universitários da região Nordeste do Estado de São Paulo. Nenhum desses pacientes era procedente de área endêmica para malária, e compreendiam 31 com anemia falciforme (SS), 14 com hemoglobinopatia SC (SC) e 9 S β -talassêmicos (S β). Os experimentos nunca foram realizados durante crises de falcização, na presença de infecções ou de outras intercorrências clínicas e nem em indivíduos da mesma família.

O diagnóstico das alterações hereditárias das hemoglobinas foi baseado em dados clínicos, na determinação dos parâmetros hematimétricos, eletroforese de hemoglobina, dosagem de Hb A₂ e Hb F e, na maioria dos casos, por estudo familiar.

Além dos pacientes com doenças falciformes foram estudados:

- 1) 8 doadores de sangue do sexo masculino, previamente selecionados, portadores de deficiência de G-6-PD, variante A⁻ e eletroforese de Hb normal (D).
- 2) 4 pacientes com anemia hemolítica e reticulocitose (AH), compreendendo um com talassemia intermediária, um com esferocitose hereditária e dois com anemia hemolítica auto-imune. Neste grupo, apenas um paciente, portador de anemia hemolítica auto-imune, era do sexo feminino.
- 3) 11 adultos, médicos do HC-UNICAMP, todos do sexo masculino, sem alterações ao exame hematológico.

gico e à eletroforese de hemoglobina (controles normais).

Nenhum dos participantes do trabalho havia recebido transfusão de sangue no período de 4 meses precedentes ao estudo.

Todos os pacientes e controles foram informados sobre os procedimentos adotados e consentiram na retirada de sangue para sua realização.

Na tabela I estão relacionados os valores das médias e desvios padrões dos dados hematimétricos, dosagens de Hb F e Hb A₂ nos diversos grupos estudados. Os correspondentes dados individuais dos pacientes e controles, além da idade, encontram-se nas tabelas X a XV do Apêndice.

TABELA I - Características Hematológicas dos Pacientes e Controles - Todos os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão

Diagnóstico	nº de pacientes	Hb (g/dl)	Ht (%)	GV ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb A ₂ (%)	Hb F (%)
Anemia	31	8,26	25,58	2,97	86,70	28,33	2,42	6,25
Falciforme		1,24	3,51	0,51	8,72	3,09	0,48	4,31
Hemoglobino- patia SC	14	10,41	31,98	3,94	81,21	26,71	--	0,97
		1,71	4,93	0,79	11,92	4,15	--	0,40
S β -Talassemia	9	9,39	30,48	4,19	73,67	22,61	4,03	8,67
		1,70	3,65	0,78	6,96	2,34	0,51	9,19
Controles Normais	11	15,41	46,90	5,43	86,5	28,42	2,58	0,64
		0,72	1,36	0,40	3,88	0,91	0,36	0,27
Controles com Deficiência de G-6-PD	8	15,1	46,8	5,38	85,8	27,9	2,5	0,67
		0,57	1,1	0,37	5,21	1,28	0,34	0,19
Outras anemias hemolíticas	4	7,27	23,1	2,59	88,82	28,3	2,42	7,47
		1,07	4,25	0,36	6,98	1,24	0,45	1,26

MÉTODOS

1. Hematimetria

A contagem de glóbulos vermelhos, dosagem de Hb, determinação do hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), foram obtidos através de contador eletrônico Coulter modelo SSr.

2. Estudo das hemoglobinas

Foi realizado em amostras de sangue colhidas em etilenodiaminotetracetato (1,5 mg de EDTA por ml de sangue). Foram realizados eletroforese em acetato de celulose pH = 8,9 (Lehman e Huntsman, 1974), em gel de ágar pH = 6,1 (Weatherall e Clegg, 1972), solubilidade em tampão fosfato concentrado (Zago e cols, 1982), quantificação de Hb A₂ por eluição (Weatherall e Clegg, 1972) e dosagem de Hb F pelo método da desnaturação alcalina (Pembrey e cols, 1972).

3. Estudo da G-6-PD

Para o estudo da G-6-PD todos os indivíduos foram submetidos à punção venosa para coleta de, no mínimo, 3 ml de sangue em frascos contendo ACD (7,3 g de ácido cítrico; 22 g de citrato de sódio; 24,5 g de glicose e 1000 ml de água desionizada) como anticoagulante, na proporção de 0,5 ml de ACD para 3 ml de sangue. Todas as amostras de sangue foram armazenadas a 4°C até a realização

dos testes. Inicialmente foi realizada hematimetria e em seguida as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min., o plasma sobrenadante e camada leucocitária desprezados, as hemácias lavadas 3 vezes em solução salina (NaCl 0,9%) e realizada redução do número de reticulócitos. Antes e após a redução do número de reticulócitos foram feitas contagens de reticulócitos pelo método convencional com azul brilhante de cresil (Dacie e cols, 1975), teste de fluorescência e quantificação de G-6-PD. Além disso, foi realizada também eletroforese de G-6-PD em todas as amostras de sangue.

Todos esses procedimentos foram realizados num tempo inferior a 36 horas após a coleta do sangue, exceto a eletroforese da enzima que foi executada num prazo máximo de 7 dias.

3.1. Redução do número de reticulócitos

A redução do número de reticulócitos das amostras de sangue foi realizada com o objetivo de detectar pacientes deficientes de G-6-PD e que devido à reticulocitose apresentassem concentrações normais da enzima. A técnica utilizada foi a descrita por Herz e cols em 1970: hemácias lavadas eram colocadas em 6 tubos capilares de micro-hematócrito e centrifugados durante 10 min. Os tubos capilares eram então cortados na sua porção inferior, em uma região correspondente à 10% do hematócrito final. As hemácias contidas nessa região eram transferidas para um tubo de ensaio 10x75 mm, contendo 0,5 ml de salina, por intermédio da agitação com vórtex, até o extravazamento de todo o material dos tubos capilares para a salina.

A suspensão de hemácias e salina obtida era então transferida para outro tubo 10x75 mm e centrifugada a 2000 rpm por 5 min, obtendo-se assim hemácias em que o número de reticulócitos era reduzido. Nesse material fazia-se contagem de reticulócitos, teste de fluorescência e quantificação de G-6-PD.

3.2. Teste de fluorescência

O teste discriminatório inicial, realizado em todas as amostras, foi o teste de fluorescência como recomendado pelo Comitê Internacional para Padronização de Métodos em Hematologia (Beutler e cols, 1977). Resumidamente, o teste consistia de: 10 µl de sangue total ou hemácias ressuspensas em salina eram adicionadas a 100 µl de solução reagente contendo 10 µl de G-6-PD 10 mM/l; 10 µl de NADP 7,5 mM/l; 30 µl de saponina (1 g%); 30 µl de tampão Tris-HCl-EDTA 750 mM/l pH = 7,8; 10 µl de GSSG 8 mM/l e 10 µl de água desionizada. Após 5 a 10 min de incubação à temperatura ambiente, era aplicado 10 µl da mistura em papel de filtro Whatmann nº 1. Após a secagem, o papel de filtro era colocado sob uma lâmpada ultravioleta (366 nm) e procedia-se à leitura. Nos pacientes sem deficiência de G-6-PD a fluorescência era intensa, ao passo que nos deficientes era discreto ou ausente.

3.3. Quantificação de G-6-PD

A medida da atividade de G-6-PD foi realizada segundo técnica descrita por Beutler (1983), tanto nas hemácias apenas lavadas

como naquelas com número reduzido de reticulócitos, da seguinte maneira: o hemolizado era preparado adicionando-se as hemácias a uma solução estabilizadora contendo 10 μ M de NADP; 7 mM de β -mercapto-etanol e 2,7 mM de EDTA sódico pH = 7,0 numa proporção de hemácias: solução estabilizadora igual a 1:19. O material era homogeneizado e a hemólise obtida por congelamento e aquecimento. Media-se então a hemoglobina do hemolisado.

Para a quantificação eram necessários 2 tubos contendo, cada um, 580 μ l de água desionizada ; 100 μ l de NADP; 100 μ l de tampão Tris-HCl 1,0 M pH = 8,0 e 100 μ l de $MgCl_2$ 0,1 M. Adicionava-se 20 μ l de hemolisado em cada tubo e incubava-se a 37°C por 10 min. Em seguida colocava-se 100 μ l de G-6-PD 6 mM no tubo padrão e 100 μ l de água desionizada no "blank". Lia-se a densidade óptica a 37°C durante 10 min, em cubetas com percurso óptico de 1 cm, em comprimento de onda de 340 nm, com auxílio de espectrofotômetro Beckman, modelo 24.

O cálculo dos resultados obedeceu à seguinte equação:

$$\text{atividade (U.I.) / g Hb} = \frac{(\Delta D.O. / \text{min}) 10^5}{6,22 (\text{Hb}) (\text{vol enzima})}$$

- $\Delta D.O. / \text{min}$ = diferença de densidade óptica por min obtida com a leitura dos primeiros 5 min, após estabilização da solução.
- Hb = hemoglobina do hemolisado em g/dl.
- vol.enzima = volume de hemolisado colocado nos tubos padrão e "blank" = 20 μ l.

3.4. Eletroforese de G-6-PD

Em todas as amostras foi realizada eletroforese em acetato de celulose, pH = 9,0 (Sparkes e cols, 1969), com algumas modificações: o hemolisado era preparado utilizando-se 2 gotas das hemácias lavadas, 2 gotas de água e 2 gotas de tetracloreto de carbono, centrifugados a 2000 rpm por 10 min e separado apenas o sobrenadante. As fitas de eletroforese eram imersas, durante pelo menos 10 min, em 50 ml de tampão Tris-EDTA-borato pH = 9,0 e 2,5 mg de NADP. Após retirada do excesso de tampão com papel de filtro, as fitas eram colocadas na cuba eletroforética com o mesmo tampão a 4°C, o hemolisado era aplicado no polo negativo e a eletroforese realizada a 4°C, 220 V por 40 min. Numa mesma fita de eletroforese, além do hemolisado do paciente, eram aplicadas amostras controles (normal e deficiente com migração rápida). Em seguida, procedia-se à coloração: uma nova fita era imersa por alguns minutos em solução corante* recém-preparada, o excesso de corante era retirado e a fita colocada numa cuba fechada, sob a fita onde foi realizada a eletroforese. Após incubação à temperatura ambiente, no escuro e durante 15 min, era feita a leitura, classificando-se a enzima de acordo com a mobilidade eletroforética em normal, rápida ou lenta. Nos experimentos não foram observadas enzimas com migração lenta e entre a mobilidade normal (B) e a rápida (A), havia uma diferença

* solução corante: 9,4 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M pH = 8,0; 4 mg de NADP; 10 mg de G-6-P ; 2 mg de MTT; 0,6 mg de fenazina metassulfato.

de 0,4 cm. Com essa metodologia, foi possível observar também o padrão eletroforético das hemoglobinas correspondentes aos hemolisados aplicados.

4. Análise estatística

Na análise estatística deste trabalho foram utilizadas provas não paramétricas. Para a comparação de amostras independentes foi empregada a Prova de Kruskal-Wallis; no caso de 2 amostras relacionadas, a Prova de Wilcoxon e para os testes de correlação, o Coeficiente de Pearson. Para a análise da prevalência foram utilizadas a Prova do χ^2 com correção de Yates e, no caso de dados discretos, a Prova de Fisher. Em todos os testes, o nível de significância estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS

1. Redução do número de reticulócitos

Os resultados das contagens de reticulócitos antes e após a centrifugação estão representados na Tabela II. Os dados individuais encontram-se no Apêndice (Tabelas X a XV). Houve redução significativa ($t < 0.01$) no número de reticulócitos nos 6 grupos testados. A redução média da contagem de reticulócitos em relação à inicial foi de 49% nos pacientes com anemia falciforme, 53% naqueles com hemoglobinopatia SC, 65% nos S β -talassêmicos, 86% nos indivíduos com anemia hemolítica exceto doenças falciformes, 90% nos controles normais e 88% nos controles com deficiência de G-6-PD.

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do método de contagem de reticulócitos, esta foi determinada em 10 esfregaços obtidos com a mesma amostra de sangue, em 5 pacientes distintos. Na Tabela III estão representadas as porcentagens, médias, desvios padrões e coeficientes de variação. A média dos coeficientes de variação foi de 9,52% com valores compreendidos entre 6,9 e 13,9%.

TABELA II - Porcentagem de reticulócitos antes e após centrifugação. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão e variação.

nº de pacientes	Diagnóstico	antes	Reticulócitos após
31	SS	11,2 $\pm$ 5,38 (4,7-30,2)	5,7 $\pm$ 3,4 (1,2-13,7)
14	SC	3,57 $\pm$ 1,27 (2,4-7)	1,68 $\pm$ 1,22 (0,1-4)
9	S β	6,9 $\pm$ 5 (2,1-15,7)	2,41 $\pm$ 2,52 (0-6,3)
4	AH	11,7 $\pm$ 1,37 (9,8-13,0)	1,67 $\pm$ 1,27 (0,2-2,5)
11	N	1,33 $\pm$ 0,18 (1,0-1,6)	0,13 $\pm$ 0,12 (0-0,3)
8	D	1,23 $\pm$ 0,2 (1,0-1,5)	0,15 $\pm$ 0,14 (0-0,4)

SS - anemia falciforme; SC - hemoglobinopatia SC; S β - S β talassemia; AH - outras anemias hemolíticas exceto doenças falciformes; N - controles normais; D - controles com deficiência de G-6-PD.

TABELA III - Porcentagem de reticulócitos em 10 observações obtidas com a mesma amostra de sangue. Este procedimento foi realizado em amostras provenientes de 5 pacientes distintos.

Pacientes	Observações										Média	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
JHS	14,7	16,1	15,7	12,8	17,2	14	19,1	14,4	14,1	19,5	15,8	2,2	13,9
LCCI	10,6	11,2	11	-	9,8	10,6	9,1	9,8	9,6	9,2	10,1	0,8	7,9
MHA	5,1	5,6	5,6	5,9	6,5	6,0	6,0	5,6	5,5	5,8	6,3	0,4	6,9
MISM	18,2	-	19,5	17,3	23,3	19,2	19,4	22	23,2	20,6	20,3	2,1	10,3
FC	12,3	11,3	11,2	12,5	12,7	14,3	13,5	13,8	12,9	14	12,8	1,1	8,6

MÉDIA													9,5

2. Teste de fluorescência

O teste de fluorescência não demonstrou deficiência de G-6-PD (teste negativo = fluorescência positiva) nos controles normais e nos portadores de anemia hemolítica exceto doenças falciformes.

No grupo de pacientes com anemia falciforme não foi detectado nenhum deficiente quando o teste foi realizado em sangue total. No entanto, após redução do número de reticulócitos, três pacientes apresentaram resultados positivos para deficiência de G-6-PD (fluorescência negativa). Entre os doentes com hemoglobinopatia SC foram detectados 2 deficientes, utilizando-se amostras de sangue total e 3, após centrifugação. Nos S β -talassêmicos, antes e após a redução do número de reticulócitos, foi constatado apenas um deficiente. Estes resultados encontram-se na Tabela IV. A figura 1 ilustra o aspecto dos testes negativo e positivo.

TABELA IV - Teste de fluorescência antes e após redução do número de reticulócitos

Nº de pacientes	Diagnóstico	Fluorescência antes		Fluorescência após	
		normal	deficiente	normal	deficiente
31	SS	31	0	28	3
14	SC	12	2	11	3
9	S β	8	1	8	1
4	AH	4	0	4	0
11	N	11	0	11	0
8	D	0	8	0	8

SS - anemia falciforme; SC - hemoglobinopatia SC; S β - S β -talassemia; AH - outras anemias hemolíticas exceto doenças falciformes; N - controles normais; D - controles com deficiência de G-6-PD

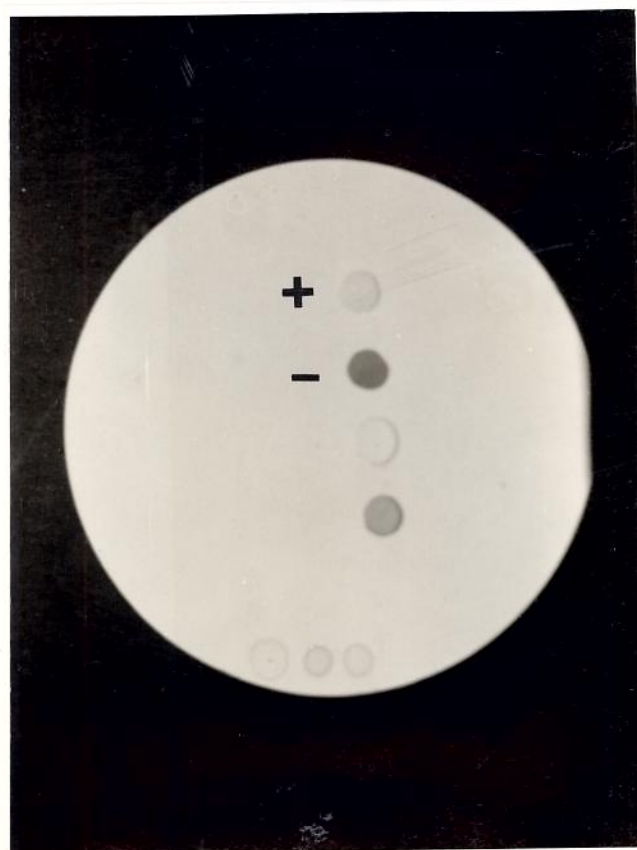


FIGURA 1 - Teste de fluorescência: normal (positivo)
deficiente (negativo)

3. Quantificação de G-6-PD

A variabilidade de ensaio enzimático foi avaliada com a quantificação de G-6-PD em 5 observações a partir da mesma amostra de sangue, em 3 indivíduos normais distintos. Na Tabela V estão representados os níveis de enzima, média, desvio padrão e coeficiente de variação de cada indivíduo. A média dos coeficientes de variação foi de 3,8%.

A quantificação de G-6-PD foi executada antes e após a redução do número de reticulócitos. Na Tabela VI estão resumidos os resultados dos diversos grupos estudados. Os dados individuais encontram-se no Apêndice, nas Tabelas X a XV.

Os níveis de enzima, nos indivíduos normais sem redução de reticulócitos, foi significativamente menor ($p < 0,001$) do que nos portadores de anemia hemolítica (SS, SC, S β , AH) e maior ($p < 0,001$) do que nos controles com deficiência de G-6-PD. Não houve diferença significativa nos níveis da enzima entre os 3 grupos de pacientes com doenças falciformes. No entanto, a atividade enzimática nestes doentes foi significativamente maior ($p < 0,002$) quando comparada a daqueles com anemia hemolítica exceto doenças falciformes.

As Figuras 2 e 3 ilustram todos os valores obtidos nos ensaios enzimáticos antes e após a redução de número de reticulócitos, respectivamente, tornando-se evidente as diferentes distribuições entre os grupos estudados. O traço horizontal representa as médias obtidas. As quantificações de G-6-PD nos pacientes com doenças falciformes foram significativamente maiores do que nos indivi

duos normais. No entanto, observa-se que no grupo de pacientes com hemoglobinopatia SS, três indivíduos apresentam níveis abaixo de 15 U.I./gHb, ao passo que os demais mostram valores superiores a 21 U.I./gHb. A identificação eletroforética mostrou que estes 3 pacientes eram portadores da variante A. É provável portanto, que representem pacientes deficientes de G-6-PD, cujos níveis enzimáticos estejam normais, ou próximos dos normais, como consequência do número elevado de reticulócitos. Nos pacientes com hemoglobinopatia SC e S β observam-se, respectivamente, 3 e 1 pacientes em situação semelhante.

Após redução do número de reticulócitos, houve queda significativa no nível da enzima ($t < 0,001$) em todos os 6 grupos testados.

Nos controles normais houve pequena redução nos níveis enzimáticos, contrastando com os pacientes portadores de outras anemias hemolíticas que não doenças falciformes, onde a acentuada redução nas quantificações de G-6-PD fez com que os níveis atingissem valores próximos dos normais. Os pacientes com doenças falciformes apresentaram comportamento peculiar: embora houvesse redução nos três grupos, esta foi pouco acentuada, com níveis ainda muito acima dos normais. No entanto, aqueles pacientes com provável deficiência de G-6-PD apresentaram comportamento diferente, com redução mais evidente nos níveis enzimáticos, atingindo valores abaixo dos normais. É importante ressaltar que em todos os 7 pacientes deficientes de G-6-PD, o teste de fluorescência foi positivo após

a redução do número de reticulócitos, ao passo que havia sido positivo em apenas 3 quando realizado em hemácias totais.

O coeficiente de Pearson para correlação dos níveis da enzima e número de reticulócitos foi aplicado nos pacientes pertencentes aos grupos SS, SC e S β , excetuando-se aqueles doentes que apresentavam também deficiência de G-6-PD, e nos pacientes com outras anemias hemolíticas que não doenças falciformes (AH) antes e após a redução do número de reticulócitos. Houve correlação positiva significativa apenas no grupo SS antes da redução de reticulócitos ($r = 0,38$ $p < 0,05$). A Figura 4 ilustra este resultado. Não houve correlação nos demais grupos estudados.

Não houve correlação dos níveis de Hb e atividade de G-6-PD.

Na Tabela VII é possível observar os resultados dos testes laboratoriais nos pacientes com doenças falciformes e concomitante deficiência de G-6-PD. Nota-se que o teste de fluorescência só detectou deficiência quando os níveis da enzima estavam abaixo de 6,4 U.I./gHb. Acima de 8,7 U.I./gHb sempre foi positivo.

TABELA V - Quantificação de G-6-PD (U.I./gHb) em 5 ensaios obtidos da mesma amostra de sangue. Este procedimento foi realizado em amostras provenientes de 3 indivíduos distintos.

Pacientes	Observações					Média	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)
	1	2	3	4	5			
MAS	12,76	12,76	12,15	11,84	12,52	12,4	0,4	3,8
JMC	11,01	11,62	10,8	11,11	11,2	11,15	0,3	2,9
FD	11,5	11,83	11,04	12,36	11,7	11,69	0,5	4,7
MÉDIA								3,8

TABELA VI - Quantificação de G-6-PD (U.I./gHb) antes e após redução de reticulócitos. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão e variação.

Diagnóstico	G-6-PD (U.I./gHb)	
	antes	após
SS	26,10 $\pm$ 6,36 (8,72-42,02)	21,65 $\pm$ 6,5 (5,31-30,08)
SC	20,7 $\pm$ 8,96 (2,73-32,03)	17,08 $\pm$ 8,32 (0,29-26,42)
S β	26,0 $\pm$ 10,05 (6,81-42,04)	18,67 $\pm$ 7,02 (5,58-26,09)
AH	20,27 $\pm$ 0,92 (19,34-21,53)	11,70 $\pm$ 0,90 (10,8-12,78)
N	12,16 $\pm$ 1,0 (10,76-13,7)	9,7 $\pm$ 1,53 (7,5-12,03)
D	1,31 $\pm$ 0,52 (0,71-2,17)	0,1 $\pm$ 0,19 (0-0,5)

SS - anemia falciforme; SC - hemoglobinopatia SC; S β - S β -talassemia; AH - outras anemias hemolíticas exceto doenças falciformes; N - controles normais; D - controles deficientes de G-6-PD

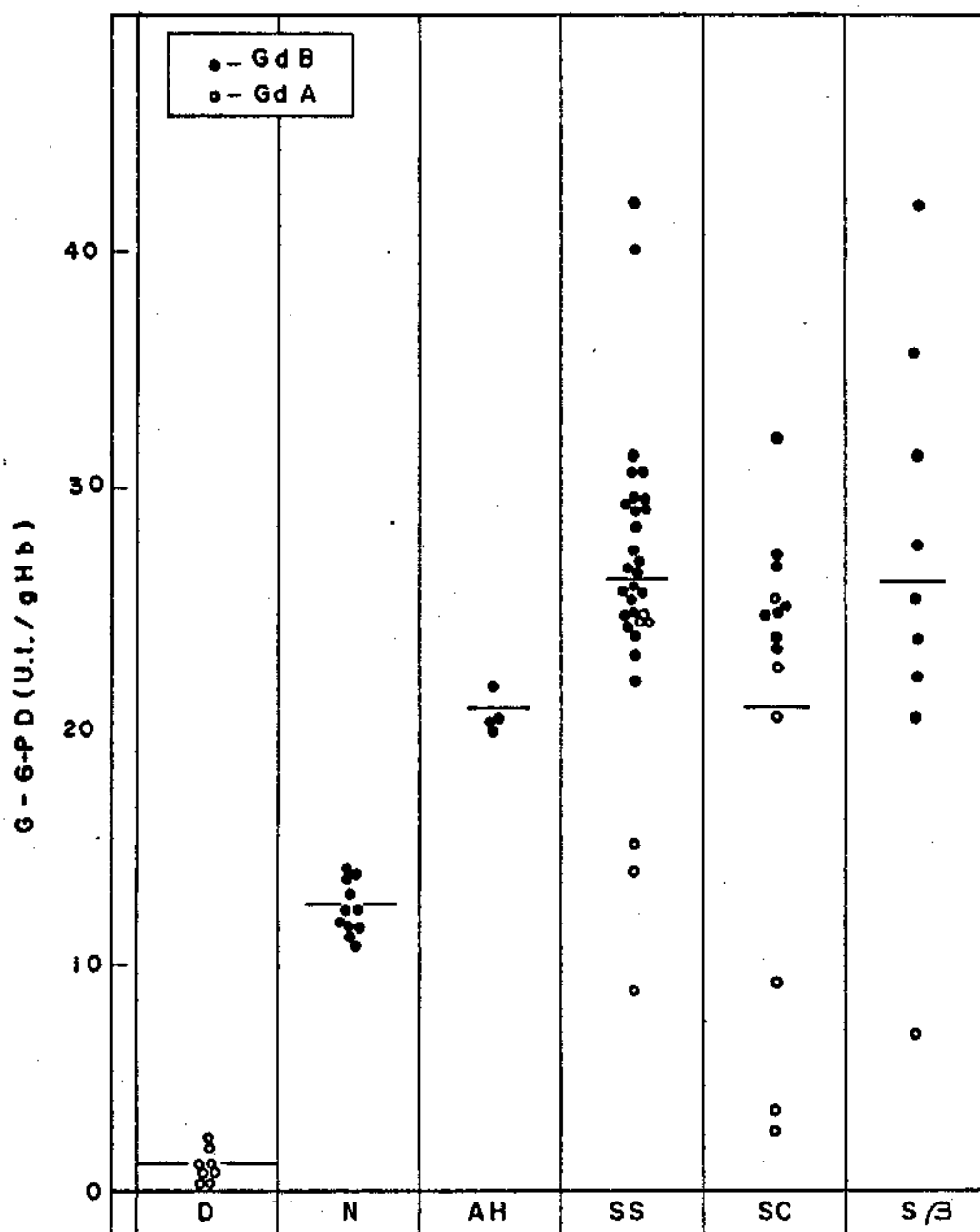


FIGURA 2 - Atividade de G-6-PD antes da redução do número de reticulócitos. O traço horizontal representa a média de cada grupo estudado. D - controles com deficiência de G-6-PD; N - controles normais; AH - outras anemias hemolíticas exceto doenças falciformes; SS - anemia falciforme; SC - hemoglobinopatia SC; Sβ - Sβ-talassemia

GdB- Migração normal; GdA- Migração rápida

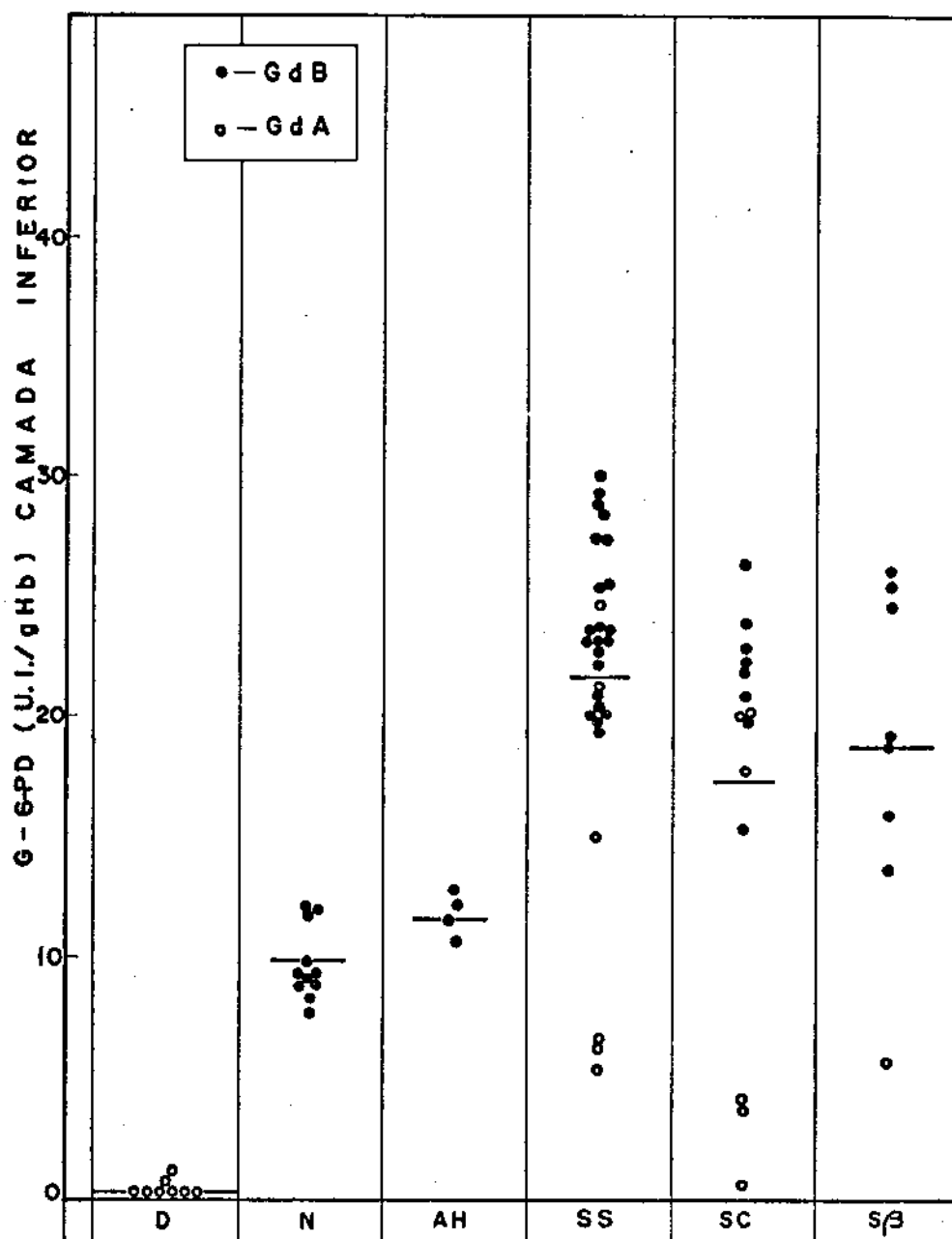


FIGURA 3 - Atividade de G-6-PD após redução do número de reticulócitos. O traço horizontal representa a média de cada grupo estudado. D - controles com deficiência de G-6-PD; N - controles normais; AH - outras anemias hemolíticas exceto doenças falciformes; SS - anemia falciforme; SC - hemoglobinopatia SC; Sβ - Sβ-talassemia.

GdB- Migração normal; GdA- Migração rápida

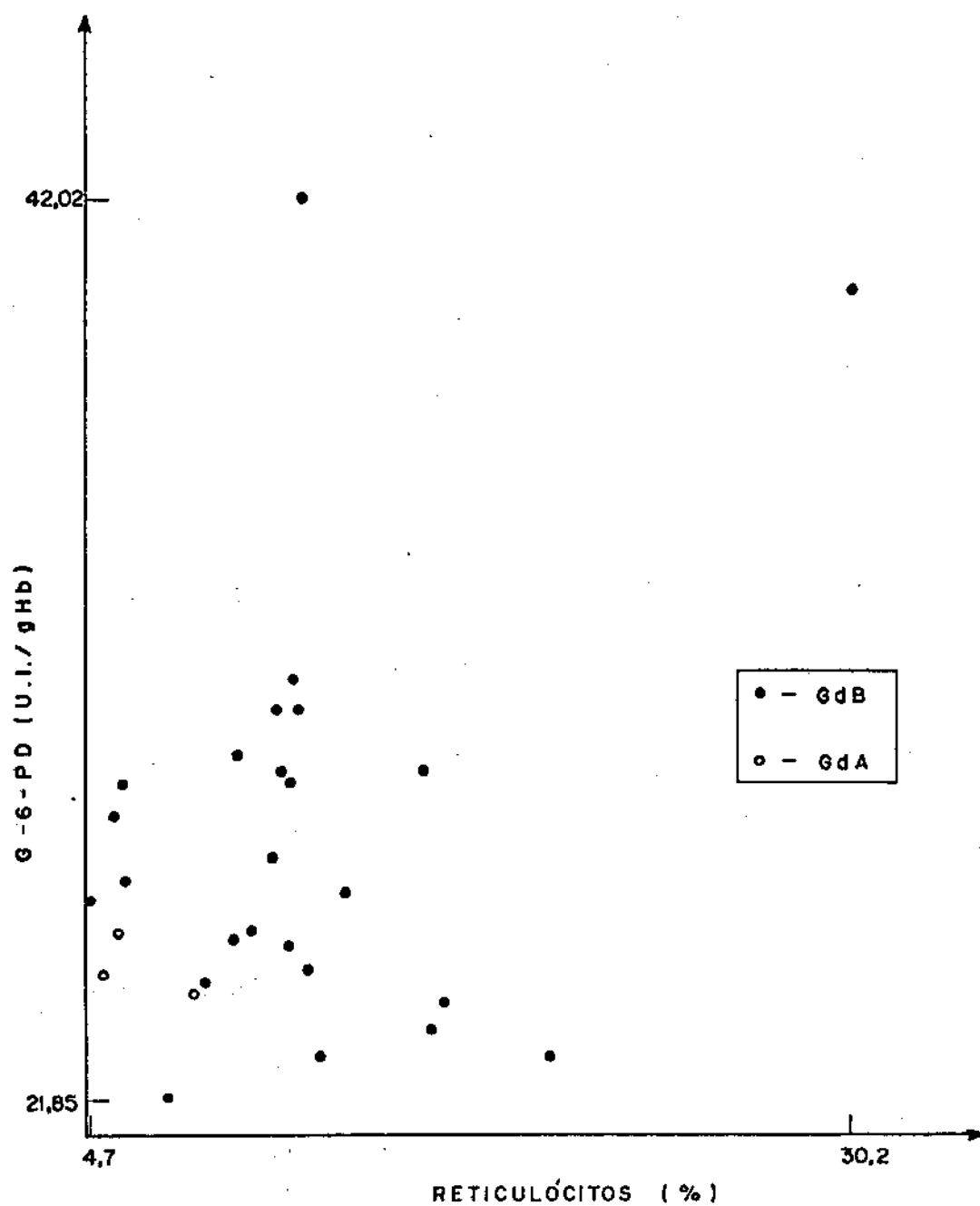


FIGURA 4 - Correlação entre atividade de G-6-PD e número de reticulócitos em pacientes com anemia falciforme, antes da redução do número de reticulócitos. ($r = 0,38$ $p < 0,05$)

GdB- Migração normal; GdA- Migração rápida

TABELA VII - Testes laboratoriais dos pacientes com doenças falciformes e deficiência de G-6-PD

Paciente	idade	diag-nóstico	reticulócitos antes	reticulócitos após	fluorescência antes	fluorescência após	G-6-PD(U.I./gHb) antes	G-6-PD(U.I./gHb) após	eletroforese após de G-6-PD
DAL	22	SS	11,6	5,8	+	-	13,7	6,11	A
AAN	28	SS	5,1	1,5	+	-	14,9	6,43	A
PCS	3	SS	3,2	-	+	-	8,72	5,31	A
JAA	18	SC	4,2	1,3	+	-	9,02	4,1	A
FAD	2	SC	2,5	1,4	-	-	3,5	3,5	A
MJ	18	SC	2,9	-	-	-	2,73	0,29	A
SAB	16	Sß	3	0,7	-	-	6,8	5,6	A

SS - anemia falciforme; SC - hemoglobinopatia SC; Sß - Sß-talassemia

4. Eletroforese de G-6-PD em acetato de celulose

A eletroforese de G-6-PD em acetato de celulose demonstrou migração eletroforética normal, sugestiva da enzima B, em todos os controles normais e nos pacientes com outras anemias hemolíticas que não doenças falciformes. Migração rápida, tipo A, foi observada em todos os controles com deficiência de G-6-PD, em 6 pacientes com anemia falciforme, 6 com hemoglobinopatia SC e 1 S β -talassêmico. Em três pacientes com anemia falciforme, 3 com hemoglobinopatia SC e no S β -talassêmico, a migração eletroforética tipo A coincidiu com o teste de fluorescência negativo após redução do número de reticulócitos, sugerindo, nestes casos, deficiência de G-6-PD com variante Africana. Nos demais pacientes com doenças falciformes a migração eletroforética foi normal. Todos estes resultados encontram-se da Tabela VIII. Os dados individuais encontram-se no Apêndice, Tabelas X a XV. A Figura 5 representa o aspecto da eletroforese em acetato de celulose.

TABELA VIII - Eletroforese de glicose-6-fosfato desidrogenase em acetato de celulose

nº de pacientes	diagnóstico	eletroforese de G-6-PD	
		tipo B	tipo A
31	SS	25	6
14	SC	8	6
9	S β	8	1
4	AH	4	0
11	N	11	0
8	D	0	8

SS - anemia falciforme; SC - hemoglobinopatia SC; S β - S β -talassemia; AH - outras anemias hemolíticas exceto doenças falciformes; N - controles normais; D - controles deficientes de G-6-PD

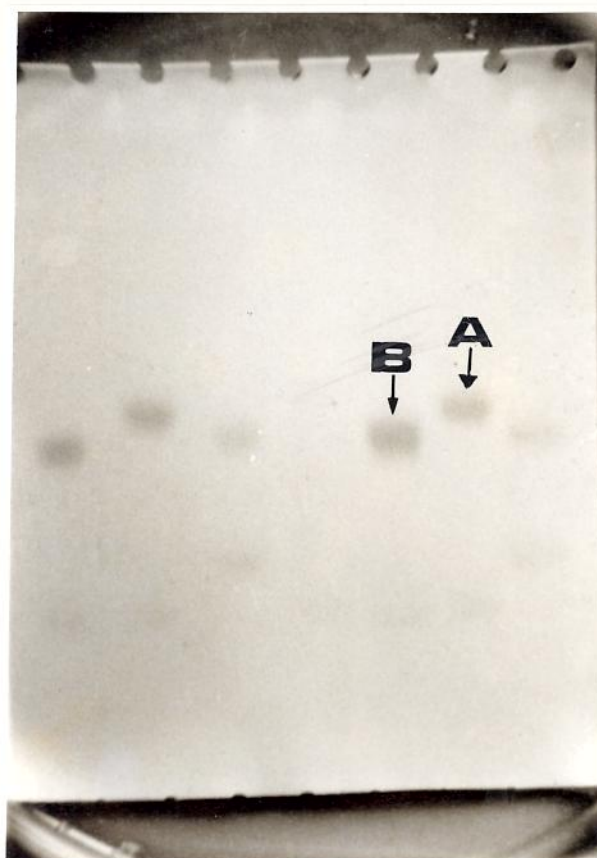


FIGURA 5 - Eletroforese de G-6-PD em acetato de celulose.

Migração normal = B

Migração rápida = A

5. Prevalência de deficiência de G-6-PD em doenças falciformes

No grupo de pacientes com hemoglobinopatia SS a prevalência de deficiência de G-6-PD foi de 9,7%. Os pacientes com hemoglobinopatia SC, por sua vez, apresentaram prevalência de 21,4% e os S β -talassêmicos de 11,1%. Esses resultados não diferiram significativamente daquele que é esperado para a população negróide masculina em nossa região (Beiguelman e cols, 1968; Ramalho, 1979).

Na Tabela IX pode-se observar esses resultados e a análise de χ^2 com correção de Yates, assim como os níveis de significância.

Quando os pacientes dos grupos SS, SC e S β foram subdivididos de acordo com a idade em maiores e menores de 15 anos, verificou-se que a prevalência de deficiência de G-6-PD também não diferiu significativamente da população negróide não selecionada. O mesmo ocorreu quando se comparou os subgrupos entre si.

Da mesma forma, quando foram comparadas as prevalências encontradas nos 3 grupos (SS, SC e S β) entre si, não houve diferença significativa.

TABELA IX - Frequência de deficiência de G-6-PD em pacientes masculinos com doenças falciformes

Diagnóstico	Total	nº com deficiência	χ^2 (Yates)	P
n	129	16	---	---
SS	31	3	0,071	0,79
SC	14	3	0,69	0,40
Sß	9	1	0,22	0,92

n = população negróide estudada por Ramalho (1979); SS - anemia falciforme; SC - hemoglobinopatia SC; Sß - Sß-talassemia

DISCUSSÃO

Os numerosos resultados conflitantes observados nos estudos que procuraram correlacionar deficiências de G-6-PD e anemia falciforme advêm, em grande parte, da dificuldade técnica da detecção desta alteração enzimática na presença de contingente elevado de hemácias jovens. Como já descrito, a atividade da variante Africana de G-6-PD é praticamente normal em hemácias jovens, o que dificulta sobremaneira a identificação dos pacientes em que há concomitância de deficiência de G-6-PD e anemia hemolítica com reticulocitose. De fato, com o objetivo de reduzir a influência do número elevado de reticulócitos, vários métodos laboratoriais foram descritos para separar as diferentes populações de eritrócitos. Em 1957, Boruñ e cols demonstraram que essas populações eritrocitárias podiam ser isoladas com base em gradiente de densidade. Assim, Herz e Kaplan (1965), padronizaram microtécnica para separação de eritrócitos de acordo com a sua densidade, e que posteriormente foi utilizada por Herz e cols (1970), para diagnóstico de deficiência de G-6-PD em negros, na vigência de crise hemolítica. Desde então, este método é em geral, recomendado para identificação de deficiência de G-6-PD em pacientes com grande população de hemácias jovens (Beutler e cols, 1979; Ringelhahn, 1972).

Especificamente em relação às doenças falciformes os métodos utilizados no diagnóstico de deficiência de G-6-PD incluem, tes

te de Brewer (Lewis e Hathorn, 1963 e 1965; Lewis e cols, 1966), dosagens enzimáticas acompanhadas de eletroforeses para identificação da variante anômala (El-Hazmi e Warsy, 1984; Warsy, 1985), além de testes citoquímicos que permitam a visualização das hemácias deficientes (Milner e Serjeant, 1969; Piomelli e cols, 1972; Beutler e cols, 1974; Steinberg e Dreiling, 1974; Bienzle e cols, 1975; Gibbs e cols, 1980). Neste trabalho foi empregado, pela primeira vez no estudo das doenças falciformes, o método descrito por Herz e cols para redução do número de reticulócitos e posterior identificação dos deficientes. Além da redução significativa no número de reticulócitos em todos os grupos testados, este método revelou-se particularmente útil no estudo de crianças, pois utiliza volumes reduzidos de sangue.

O teste de fluorescência é recomendado pelo Comitê Internacional de Padronização em Hematologia como teste discriminatório para detecção de deficiência de G-6-PD. Entre as vantagens apresentadas, enumeram-se a facilidade de execução, baixo custo, alta sensibilidade e especificidade. Os resultados obtidos neste trabalho tornam clara a necessidade de redução do número de reticulócitos e posterior realização do teste de fluorescência em pacientes portadores de doenças falciformes. De fato, foi possível observar que em 4 pacientes houve falha na detecção de deficiência de G-6-PD quando o teste foi realizado em sangue total.

Nos 7 pacientes cujo teste de fluorescência detectou deficiência de G-6-PD, a migração eletroforética desta enzima foi rápida,

compatível com a variante Gd A⁻, uma vez que a variante Gd A⁺ tem atividade praticamente normal.

A quantificação de G-6-PD nos pacientes que apresentavam concomitantemente deficiência enzimática e doenças falciformes mos-trou que a atividade era 6,5 vezes maior do que nos controles deficientes e semelhante ao nível alcançado pelos controles normais. Estes dados corroboram a noção que a doença falciforme modifica a expressão fenotípica da deficiência de G-6-PD, de modo que níveis enzimáticos normais ou aumentados não implicam na ausência de deficiência de G-6-PD. Além disso, importa ressaltar que esses valores não resultam na correção do defeito genético, porque as hemácias mais velhas são mais susceptíveis à hemólise por drogas ou infecções, como descrito por Smith e cols em 1969. Ainda nestes doentes, durante uma crise aplástica, como consequência da redução do número de reticulócitos, a deficiência de G-6-PD pode se expressar mais intensamente (Piomelli e cols, 1972).

Semelhante aos achados de Naylcr e cols (1960) e de Piomelli e cols (1972), não houve correlação entre a porcentagem de reticulócitos e a atividade de G-6-PD nos pacientes com doenças falciformes, antes e após a redução do número de reticulócitos, exceto quanto a uma fraca correlação no grupo SS, sem deficiência de G-6-PD e somente antes da centrifugação. Este resultado não é de todo inesperado, pois a contagem de reticulócitos pode não ser um indicador preciso da idade celular em face da perda aleatória de hemácias que ocorre na anemia falciforme (Erlandson, 1960).

Foi possível observar também que, após a redução no número de reticulócitos, os níveis de G-6-PD apresentaram redução mais acentuada nos pacientes com doenças falciformes e deficiência de G-6-PD do que nos demais indivíduos. Estudos prévios realizados por Piomelli e cols em 1968 evidenciaram que reticulócitos de indivíduos portadores da variante Africana de G-6-PD mostravam níveis elevados de atividade da enzima, semelhantes àqueles de pessoas normais. No entanto, a atividade enzimática declinava muito mais acentuadamente, com o passar do tempo, nos deficientes (Gd A⁻) do que nos controles normais. Esses dados parecem indicar que a variante Africana é muito mais dependente da idade eritrocitária do que a enzima normal e poderiam explicar portanto, a redução mais acentuada nos valores de G-6-PD nos portadores de Gd A⁻, observada neste trabalho.

A comparação da atividade enzimática dos pacientes com doenças falciformes sem deficiência de G-6-PD com aqueles portadores de outras anemias hemolíticas demonstrou níveis maiores nos primeiros e isto ficou mais evidente após a redução do número de reticulócitos. Esse achado poderia advir em parte, de uma possível hiperatividade funcional da G-6-PD na anemia falciforme e que não seria apenas dependente da idade eritrocitária. Lachant e cols, em 1983, observaram um aumento significativo na atividade de G-6-PD de pacientes com doenças falciformes quando comparada a outros pacientes com reticulocitose. Como já é conhecido, hemácias falciformes produzem duas vezes mais superóxido, peróxido e radical hidroxil do

que hemácias normais e o acúmulo excessivo desses agentes oxidantes determinaria lesões no eritrócito (Hebbel e cols, 1982, 1985). Como resposta compensatória para proteção da membrana contra auto-oxidação ocorreria aumento da atividade da glutathione peroxidase (Zimmerman e Natta, 1981 e Beretta e cols, 1983). É possível portanto, que também a G-6-PD esteja envolvida nesta resposta, com conseqüente hiperatividade enzimática.

Este trabalho representa a primeira avaliação da freqüência deficiência de G-6-PD em portadores de doenças falciformes em populações brasileiras. Os resultados não mostraram diferença significativa na freqüência desta enzimopatia em indivíduos com doenças falciformes, quando comparados à população masculina negróide brasileira. Embora neste trabalho não tenham sido analisados concomitantemente controles negróides sem hemoglobinopatia, outros autores já haviam demonstrado prevalência de deficiência de G-6-PD nesta população em torno de 10%. (Lewgoy e Salzano, 1965; Beiguelman e cols, 1968; Marques e Campos, 1975; Ramalho e Beiguelman, 1976; Ramalho, 1979). A maior freqüência de deficiência de G-6-PD em portadores de anemia - falciforme, como relatado em vários trabalhos na literatura, só seria explicada por uma seleção pós-zigótica. O primeiro relato da associação entre deficiência de G-6-PD e anemia falciforme foi de Lewis e Hathorn (1963), em Gana, que encontraram prevalência de deficiência de G-6-PD 3 vezes maior em doenças falciformes (48% nos SS, 39% SC e 5 casos entre nove pacientes com S β -talassemia) do que na

população masculina negróide em geral (14%). Descreveram ainda uma maior atividade de G-6-PD durante crises vasooclusivas e aumento na sobrevivência das hemácias portadoras de defeito enzimático, além da hemoglobinopatia. Com fundamento nesses resultados foi proposto que a deficiência enzimática conferia vantagem seletiva sobre as hemácias com Hb S tendo como consequência, em última análise, aumento na sobrevivência dos pacientes com doenças falciformes e concomitante deficiência de G-6-PD (Lewis e cols, 1966). No entanto, a detecção da deficiência de G-6-PD foi realizada por meio do teste de redução da Metemoglobina, o que poderia acarretar resultados falso-positivos na presença de anemia (Brewer e cols, 1962). Vários estudos posteriores empregando metodologias diversas e em regiões distintas, como Arábia Saudita (El-Hazmi e Warsy, 1984; Warsy, 1985), New York (Piomelli e cols, 1972) e Chicago (Naylor e cols, 1960) também mostraram maior frequência de deficientes de G-6-PD entre indivíduos masculinos com anemia falciforme do que naqueles sem hemoglobinopatia.

Uma hipótese aventada para esta associação seria o efeito direto da deficiência de G-6-PD sobre as hemácias de pacientes com anemia falciforme. Nesse caso, a deficiência enzimática nas hemácias mais velhas poderia contribuir para o seu desaparecimento mais rápido da circulação. Entre essas haveria uma grande porcentagem de hemácias irreversivelmente falcizadas, uma vez que seu aparecimento na circulação ocorre vários dias após a liberação da medula óssea (Bertles e Milner, 1968). A destruição seletiva destas células poderia resultar em remoção de um dos fatores que determinaria

a oclusão vascular nas doenças falciformes. Essa hipótese entretanto não foi confirmada, pois alguns estudos não demonstraram diferenças nas manifestações clínicas dos doentes com anemia falciforme e deficiência de G-6-PD em relação àqueles com enzima normal (Steinberg e Dreiling, 1974; Gibbs e cols, 1980). A alternativa oposta, isto é, um efeito benéfico da anemia falciforme nas manifestações da deficiência de G-6-PD também foi proposto (Bernstein e cols, 1980). Esse efeito protetor seria decorrente do fato que nos deficientes de G-6-PD e concomitante anemia falciforme, a atividade enzimática encontra-se praticamente normal.

No entanto, o achado de frequência elevada de deficiência de G-6-PD em pacientes com doenças falciformes não é unânime, mesmo em estudos utilizando técnicas semelhantes para detecção desta enzimopatia. Diante disso, Beutler e cols (1974) propuseram que a grande miscigenação que ocorre em algumas regiões, seria responsável por uma diluição do gene para Hb S e Gd A⁻ num conjunto de genes da população negra. De fato, em outros trabalhos conduzidos com metodologia adequada e em diferentes regiões, não foram observadas diferenças entre as prevalências de G-6-PD nos pacientes com doenças falciformes e na população masculina negróide não selecionada (Marti e cols, 1965; Bienzle e cols, 1975; Milner e Serjeant, 1969; Steinberg e Dreiling, 1974). Os dados obtidos neste trabalhos são concordantes com esses relatos da literatura. Além disso, as frequências obtidas nos diferentes grupos de doenças falciformes não diferiram significativamente entre si. Mesmo no paciente S β -talassêmico e com deficiência de G-6-PD, a variante encontrada foi Africana, confir

mando a elevada prevalência dessa variante na população brasileira.

Em seu conjunto, os dados deste trabalho, apesar das limitações inerentes à população estudada como número reduzido, ausência de estratificação etária ou racial e população hospitalar, fornecem apoio adicional à hipótese que a prevalência de deficientes de G-6-PD entre portadores de doenças falciformes e a população negróide não selecionada talvez realmente não sejam diferentes. É importante ressaltar que os resultados aqui obtidos corroboram sobretudo a noção que a detecção de deficiência de G-6-PD na presença de doenças falciformes não deve ser realizada com os métodos discriminatórios habituais. Provavelmente, os dados conflitantes existentes na literatura se originem, em parte, da dificuldade técnica em se fazer o diagnóstico dessa associação e da seleção inadequada das populações a serem estudadas.

RESUMO E CONCLUSÕES

O estudo da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) foi realizado em 31 pacientes com anemia falciforme (SS), 14 portadores de hemoglobinopatia SC (SC) e 9 S β -talassêmicos (S β), todos do sexo masculino, através de teste de fluorescência e medida da atividade enzimática antes e após a redução do número de reticulócitos, além de eletroforese em acetato de celulose.

O teste de fluorescência, após a redução do número de reticulócitos, detectou 7 pacientes deficientes de G-6-PD (3 SS, 3 SC e 1 S β -tal). Antes da redução de reticulócitos esta deficiência foi detectada em apenas 3 pacientes (2 SC e 1 S β).

Não houve diferença significativa nos níveis da enzima entre os 3 grupos de pacientes estudados. No entanto, a atividade enzimática nestes doentes foi significativamente maior ($p < 0,002$) quando comparada a daqueles com anemia hemolítica exceto doenças falciformes e a dos controles normais ($p < 0,001$). Pode-se observar ainda que os pacientes com doenças falciformes estavam distribuídos em 2 grupos quanto à atividade de G-6-PD: aqueles com níveis superiores a 20 U.I./g Hb (N=47) e inferiores a 15 U.I./g Hb (N=7). A eletroforese em acetato de celulose demonstrou migração tipo A neste último grupo, sugerindo a presença da variante Africana (A⁻) de G-6-PD.

A redução do número de reticulócitos determinou diminuição significativa ($t < 0,001$) nos níveis da enzima nos 3 grupos de pacientes com doenças falciformes, mas esta foi mais acentuada nos 7 doentes com provável variante A⁻, atingindo valores abaixo dos normais.

Houve correlação positiva significativa dos níveis de G-6-PD e

número de reticulócitos apenas no grupo de pacientes com anemia falciforme antes da redução de reticulócitos.

Em seu conjunto, os dados deste trabalho demonstraram frequência de deficiência de G-6-PD na população estudada igual à da população masculina negróide não selecionada. Além disso, os resultados aqui obtidos corroboram a noção que a detecção de deficiência de G-6-PD na presença de doenças falciformes não deve ser realizada com métodos discriminatórios habituais.

SUMMARY

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) was studied in 54 male patients. From these, 31 presented sickle cell anemia(SS), 14 presented sickle cell-hemoglobin C disease(SC), and nine had S β thalassemia(S β). G-6-PD was determined, before and after the reduction of the reticulocytes number, by the fluorescence test and by the measurement of enzyme activity. All blood samples were also analyzed by electrophoresis in cellulose acetate.

After the reduction of reticulocytes, G-6-PD deficiency was detected by the fluorescence test in seven patients(3SS, 3SC, 1S β). However, before the reduction of reticulocytes, this deficiency was detected in three patients only (2SC, 1S β).

No significant differences in G-6-PD activity were observed among the three groups studied. The enzyme activity in these patients was significantly higher than in patients with other hemolytic anemias($p < 0.002$) and normal controls($p < 0.001$).

Regarding G-6-PD activity in patients with sickle cell disease, one group(N=47) with enzyme activity higher than 20U.I./gHb and another group(N=7) with enzyme activity lower than 15U.I./gHb were observed. The electrophoresis in cellulose acetate showed type A migration in the latter group, thus suggesting the presence of the G-6-PD African variant (A⁻) in these patients.

The reduction of the reticulocytes number determined a significant decrease($t < 0.001$) in enzyme activity in the three groups. However, the decrease in enzyme activity was higher in those seven patients with the possible presence of the G-6-PD A⁻;

these values were even lower than those observed for the normal controls.

A significant positive correlation between the G-6-PD activity and the reticulocytes number was only observed for the group of patients with sickle cell anemia, before the reduction of reticulocytes.

These results demonstrated that the frequency of G-6-PD deficiency in the population studied and in general negro male population are very similar. Moreover, these data show that the detection of G-6-PD deficiency in the presence of sickle cell disease should not be determined by the usual discriminatory methods.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, E.W. e JANDL, J.H.: Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action. J. Clin. Invest. 40: 454-460
- ALLISON, A.C.: G-6-PD deficiency in red blood cells of east Africans. Nature 186: 531-532.
- AZEVEDO, E. S. e AZEVEDO, T.F.S.: G-6-PD deficiency and neonatal jaundice in Bahia, Brazil. Ciência e Cultura 26:1044-1047, 1974.
- BAEHMER, R.L.; NATHAN, D.G. e CASTLE, W.B.: Oxidant injury of Caucasian G-6-PD deficient red blood cells by phagocytosing leukocytes during infection. J. Clin. Invest. 50: 2466-2472, 1971.
- BEIGUELMAN, B.: A deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose. In: Farmacogenética e sistemas sanguíneos eritrocitários. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.13-24, 1983.
- BEIGUELMAN, B.; PINTO, W.; DALL'AGLIO, F.F.; SILVA, E. e VOSSA, J. A.: G-6-PD deficiency among lepers and healthy people in Brazil. Acta Genet., basel 18:159-162, 1968.
- BENATTI, U.; MORELLI, A.; MELLONI, T.; SPARATORE, B.; SALAMINO, G.; MICHETTI, M.; MELLONI, E.; PENTREMOLLI, S. e DE FLORA, A.: Comparative patterns of "in vitro" oxidative hemolysis of normal and G-6-PD deficient erythrocytes. FEBS Lett. 128:225-229, 1981, citado em Luzzatto, L. e Battistuzzi, G.: Glucose -6-phosphate dehydrogenase. Adv. Hum. Genet. 14: 282, 1985.

- BERETTA, L.; GERLI, G.C.; FERRARESI, R.; AGOSTONI, A.; GUALANDRI, V. e ORSIN, G.P.: Antioxidant system in sickle red cells. Acta Haemat. 70: 194-197, 1983.
- BERNSTEIN, S.C.; BOWMAN, J.E. e NOCHE, L.K.: Interaction of sickle cell trait and G-6-PD deficiency in Cameroon. Hum. Hered. 30: 7-11, 1980.
- BERTLES, J.F. e MILNER, P.F.A.: Irreversibly sickled erythrocytes: a consequence of the heterogeneous distribution of hemoglobin types in sickle-cell anemia. J. Clin. Invest. 47: 1731-1741.
- BEUTLER, E.: Erythrocyte enzyme assays. em Williams, W.J.; Beutler, E.; Erslev, A.J.; Lichtman, M.A.: Hematology, pp. 1624-1625, 3rd ed. Mc Graw-Hill Book Comp., USA, 1983.
- BEUTLER, E.; BLUME, K.G.; KAPLAN, J.C.; Lohr, G.W.; RAMET, B. e VALENTINE, W.N.: International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Screening Test for G-6-PD deficiency. Br. J. Haemat. 43: 469-477, 1979.
- BEUTLER, E.; JOHNSON, C.; POWARS, D. e WEST, C.: Prevalence of G-6-PD deficiency in sickle-cell disease. N. Engl. J. Med. 290: 826-828, 1974.
- BIENZLE, U.; SODEINDE, O.; EFFIONG, C.E. e LUZZATTO, L.: G-6-PD deficiency and sickle cell anemia: frequency and features of the association in an African Community. Blood 46: 591-597, 1975.
- BORUN, E.R.; FIGUEROA, W.G. e PERRY, S.M.: The distribution of Fe⁵⁹

tagged human erythrocytes in centrifuged specimens as a function of cell age. J. Clin. Invest. 36: 676-679, 1957.

BREWER, G.J.; TARLOV, A.R. e ALVING, A.S.: The methemoglobin reduction test for Primaquine-type sensitivity of erythrocytes. JAMA 180: 386-388, 1962.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. e RANNEY, H.M.: Human hemoglobins, W.B. Saunders Company Philadelphia, London, Toronto, 1977.

COHEN, G. e HOCHSTEIN, P.: Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. Biochemistry 3: 895-900, 1964.

DACIE, J.V. e LEWIS, S.M.: Practical Haematology, 5th edition, pp. 32-34. Churchill Livingstone, 1975.

DEAN, J. e SCHECHTER, A.N.: Sickie-cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches. N. Engl. J. Med. 209: 752-763, 1978.

EL-HAZMI, M.A.F. e WARSY, A.S.: Aspects of sickle cell gene in Saudi-Arabia-interaction with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Hum. Genet. 68: 320-323, 1984.

ERLANDSON, M.E.; SCHULMAN, I. e SMITH, C.H.: Studies on congenital hemolytic syndromes. Rates of destruction and production of erythrocytes in sickle cell anemia. Pediatrics 25: 629-644, 1960.

FINCH, C.A.: Pathophysiologic aspects of sickle cell anemia. Am.

J. Med. 53: 1-6, 1972.

FRIEDMAN, M.J.: Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 1994-1997, 1978.

GIBBS, W.N.; WARDLE, J. e SERJEANT, G.R.: G-6-PD deficiency and homozygous sickle cell disease in Jamaica. Br. J. Haemat. 45: 73-80, 1980.

HEBBEL, R.P.: Auto-oxidation and a membrane-associated "Fenton reagent": a possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes. Clin. Haemat. 14: 129-140, 1985.

HEBBEL, R.P.; EATON, J.W.; BALASINGAM, M. e STEINBERG, M.H.: Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. J. Clin. Invest. 70: 1253-1259, 1982.

HERZ, F. e KAPLAN, E.: A microtechnic for the separation of erythrocytes in accordance with their density. Am. J. Clin. Pathol. 43: 181-183, 1965.

HERZ, F.; KAPLAN, E. e SCHEYE, E.S.: Diagnosis of erythrocyte G-6-PD deficiency in the negro male despite hemolytic crises. Blood 35: 90-93, 1970.

INGRAM, V.M.: Gene mutation in human hemoglobin. The chemical differences between normal and sickle cell haemoglobin. Nature 180: 326-328, 1957.

JAFFÉ, E.: Hereditary hemolytic disorders and enzymatic deficiencies of human erythrocytes. Blood 35: 116-134, 1970.

JANDL, J.H. e ALLEN, D.W.: Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. Heinz body anemia as an accelerated form of red cell aging. J. Clin. Invest. 39: 1000-1008, 1960.

KONOTEY-AHULU, F.I.D.: G-6-PD deficiency and sickle-cell anemia. N. Engl. J. Med. 287: 887-888, 1972.

KOSOWER, N.S.; SONG, K.R.; KOSOWER, E.M. e CORREA, W.: Glutathione II. Chemical aspects of azoester procedure for oxidation to disulfide. Biochim. Biophys. Acta 192: 8-17, 1969.

LACHANT, N.A.; DAVIDSON, W.D. e TANAKA, K.R.: Impaired pentose-phosphate shunt function in sickle cell disease: a potencial mechanism for increased Heinz body formation and membrane lipid peroxidation. Am. J. Haemat. 15: 1-14, 1983.

LEHMAN, H. e HUNTSMANN, P.G.: Man's Haemoglobins. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1974.

LEWGOY, F. e SALZANO, F.M.: Dinâmica do gene que condiciona a deficiência de G-6-PD na população de Porto Alegre. Ciência e Cultura 17: 152-155, 1965.

LEWIS, R.A. e HATHORN, M.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency correlated with S hemoglobin. Ghana Med. J. 2: 131, 1963 citado em Lewis, R.A. e Hathorn, M.: Correlation of S hemoglobin with G-6-PD deficiency and its significance. Blood 26: 176-180, 1965.

LEWIS, R.A.; HATHORN, M. e KAY, R.W.: Sickle cell disease and G-6-

PD deficiency. Acta Haemat. 36: 399-411, 1966.

LUZZATTO, L.: Genetics of red cells and susceptibility to malaria. Blood 54: 961-976, 1979.

LUZZATTO, L. e BATTISTUZZI, G.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Adv. Hum. Genet. 14: 217-329, 1985.

LUZZATTO, L. e BIENZLE, U.: The malaria/G-6-PD hypothesis. Lancet 2: 1183-1184, 1979.

MARKS, P.A.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase in nature erythrocytes. Am. J. Clin. Path. 47: 287-295, 1967.

MARQUES, J. e CAMPOS, G.O.: Incidência de deficiência de G-6-PD em negros de Minas Gerais. Rev. Ass. med. Brasil. 21: 111-112, 1975.

MARTI, H.R.; SCHOEPP, K. e GSELL, O.R.: Frequency of Hb S and G-6-PD deficiency in Southern Tanzania. Br. Med. J. 1: 1476-1477, 1965.

MILLER, A. e SMITH, H.C.: The intracellular and membrane effects of oxidant agents on normal red cells. Br. J. Haemat. 19: 417-428, 1970.

MILNER, P.F. e SERJEANT, G.R.: Laboratory studies in sickle cell anemia. Sickle cell anemia and G-6-PD deficiency. Blood 34: 729-732, 1969.

MOTULSKY, A.G.: Metabolic polymorphisms and the role of infectious disease in human evolution. Hum. Biol. 32: 26.62, 1960.

- NAYLOR, J.; ROSENTHAL, I.; GOSSMAN, A.; SCHULMAN, I. e HSIA, D.Y.: Activity of G-6-PD deficiency in erythrocytes of patients with various abnormal hemoglobins. Pediatrics 26: 285-292, 1960.
- OSKI, F.A. e NAIMAN, J.L.: Hematologic problems in the newborns. Philadelphia, Sunders, 1972.
- PASLOV, G.; WEATHERALL, D.J. e WILSON, R.J.M.: Cellular mechanism for the protective effect of Hb S against P.falciparum malaria. Nature 274: 701-703, 1978.
- PEMBREY, M.E.; MAC WADE, P. e WEATHERALL, D.J.: Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkaly desnaturation. J. Clin. Path. 25: 738-740, 1972.
- PIOMELLI, S.; CORASH, L.M.; DAVENPORT, D.D.; MIRAGLIA, J. e AMOROST, E.L.: "In vivo" lability of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Gd A⁻ e Gd Mediterranean deficienty. J. Clin. Invest. 47: 940-948, 1968.
- PIOMELLI, S.; REINDORF, C.A.; ARZANIAN, M.T. e CORASH, L.M.: Clinical and biochemical interactions of G-6-PD deficiency and sickle cell anemia. N. Engl. J. Med. 286: 213-217, 1972.
- RAMALHO, A.S.: Estudo médico de polimorfismos genéticos de importância clínica no Brasil - Deficiência de G-6-PD. Tese de Livre-Docência, UNICAMP, S.P. pp. 61-75, 1979.
- RAMALHO, A.S.: As hemoglobinopatias hereditárias. Um problema de saúde pública no Brasil. Rev.Brasil.Genet. Ribeirão Preto, 1986.

- RAMALHO, A.S. e BEIGUELMAN, B.: Deficiência de G-6-PD em doadores de sangue brasileiros. Folha Médica 73: 281-283, 1976.
- RINGELHAHN, B.: A simple laboratory procedure for the recognition of A⁻ (African type) G-6-PD deficiency in acute haemolytic crisis. Clin. Chim. Acta 36: 272-274, 1972.
- SENA, L.L.A.: Estudo médico da deficiência da desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) na região de Campinas, S.P. Tese de Doutorado, UNICAMP, S.P. pp. 45, 1983.
- SENA, L.L.A.; BARRETO, O.C.O. e RAMALHO, A.S.; Variantes de G-6-PD em uma população brasileira. Rev. Bras. Pat. Clin. 20: 113-115, 1984.
- SMITS, H.L.; OSKY, F.A. e BRODY, J.I.: The hemolytic crisis of sickle cell disease - The role of G-6-PD deficiency. J. Pediat. 74: 544-551, 1969.
- SPARKES, R.S.; BALLUDA, M.C. e TOWNSEND, D.E.: Cellulose acetate electrophoresis of human G-6-PD. J. Lab. Clin. Med. 73: 531-534, 1969.
- SRIVASTAVA, S.K. e BEUTLER, E.: Glutathione metabolism of the erythrocyte. The enzymic cleavage of glutathione reductase. Biochem. J. 119: 335-339, 1970.
- STEINBERG, M.H. e DREILING, B.J.: G-6-PD deficiency in sickle-cell anemia. Ann. Intern. Med. 80: 217-220, 1974.
- WARSY, A.S.: Frequency of G-6-PD deficiency in sickle-cell disease. Hum. Hered. 35: 143 - 147, 1985.

- YOSHIDA, A.; STAMATOYANNOPOULOS, G. e MOTULSKY, A.G.: Negro variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency(A⁻) in man. Science 155: 97-99, 1967.
- ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; FREITAS, T.C. e BOTTURA, C.: Clinical hematological and genetic features of sickle-cell anemia and sickle cell- thalassemia in a Brazilian population. Clin. Genet. 18: 58-64, 1980.
- ZAGO, M.A. e COSTA, F.F.: Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg. 79:385-388, 1985.
- ZAGO, M.A.; COSTA, F.F. e BOTTURA, C.: teste de solubilidade quantitativo modificado em hemolisados normais e em variantes da hemoglobina. Rev. Paul. Med. 100: 15-17, 1982.
- ZIMMERMAN, C.P. e NATTA, C.: Glutathione peroxidase activity in whole blood of patients with sickle cell anemia. Scand. J. Haematol. 26: 177-181, 1981.

TABELA X - Características hematológicas, estudo hemoglobínico, quantificação de G-6-PD e contagens de reticulócitos (antes e após centrifugação), dos pacientes com anemia falciforme.

nome	idade (anos)	Hb (g/dl)	Ht (%)	GV (x10 ⁶ /ml)	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	Solubi- lidade (%)	Padrão Ele- trofórico gHb de hemoglo- bina	G-6-PD(U.I./ antes	Reticulócitos (%) antes	Eletróforese de G-6-PD após		
CRC	37	8,1	28,3	2,85	92	28,3	3,4	3,6	7	A ₂ S	25,26	23,65	11,6	5,6	B
DAS	19	9,5	27	3,17	88	28,7	3,1	3,7	29,6	A ₂ S	24,02	19,52	16,5	13,7	B
LCKS	17	10,5	33,6	4,09	86	29,4	2,5	2,2	8,9	A ₂ S	26,51	23,10	13	4	B
DPF	21	8,1	25,4	3,34	79	27,8	2,7	2,3	1	A ₂ S	28,95	27,48	5,9	-	B
JPM	15	8,7	26,8	3,28	81,7	26,5	1,9	-	2,6	A ₂ S	29,06	25,51	11,3	4,3	B
CJA	8	7,1	23	2,9	79	24,5	2,17	2,78	2,6	A ₂ S	26,30	20,54	4,7	1,3	B
JEC	22	8,3	22,5	2,29	98	35,8	2	10,8	12,4	A ₂ S	23,41	23,10	16,2	5	B
ES	25	9,0	-	2,6	-	34,6	2,57	4,58	-	A ₂ S	29,61	23,45	9,6	4,9	B
EIM	7	8,2	28	3,12	89	26,5	2,5	2,9	12,5	A ₂ S	24,73	23,21	12	11,4	B
GR	9	7,8	22,9	2,2	103	35,6	2,5	5,7	10,2	A ₂ S	22,85	20,34	12,3	9,6	B
JQ	32	8,5	26,3	2,92	85	28,2	1,5	4,0	3	A ₂ S	27,28	23,53	10,8	5	B
ICM	15	7,9	24,7	2,65	93	30	1,9	6,2	4,6	A ₂ S	24,45	-	8,5	-	B
PRA	3	6,4	20	2,43	82	26,3	1,4	11,7	10,6	A ₂ S,F	25,41	-	9,5	9,3	B
WC	2	7,7	24	2,7	89	28,5	2,8	5,8	-	A ₂ S	40,15	28,89	30,2	9	B
SC	6	7,5	23,2	2,6	90	29,2	2,0	6,3	5,0	A ₂ S	28,28	22,81	5,4	3,8	B
AJS	2	6,5	23	2	115	32,5	2,4	15,6	9,0	A ₂ S,F	29,31	28,57	15,8	13,5	B
DFLM	4	8,7	28	3,4	82	25,5	3,0	17,7	7,4	A ₂ S,F	30,65	29,06	10,8	3	B
ALS	4	8,0	24,2	3,31	76	23,3	2,9	-	-	A ₂ S	26,73	20,31	5,9	1,4	B
CIC	18	11,3	31	3,8	81	29,7	2,5	1,3	13,8	A ₂ S	30,62	-	11,6	5,2	B
SMBC	21	8,1	24,5	2,93	83	28,8	2,6	3,2	9,3	A ₂ S	25,57	20,99	10	5,4	B
FM	5	9,0	27,5	3,4	81	25,3	2,5	7,7	-	A ₂ S,F	29,29	27,37	11,1	6,9	B
FAC	5	8,1	23,2	3,2	76	27,6	2,8	5,7	-	A ₂ S	23,83	22,51	20	5	B
FLS	3	8,6	27	3	90	28,7	2,4	10,6	-	A ₂ S,F	21,85	20,01	7,2	-	B
OBF	4	7,2	26,7	2,99	94	26,6	2,9	4,5	10,5	A ₂ S	31,31	23,58	11,4	4,8	B
ASN	15	7,6	23,5	2,8	84	27,1	2,4	4,3	5,8	A ₂ S	42,02	30,08	11,8	6,2	B
MCPA	4	11,6	35	4,2	83	27	1,8	14,4	37	A ₂ S,F	24,57	14,88	5	1,2	A
CPS	5	6,3	19	2,5	76	25,2	2,1	6,9	18,4	A ₂ S	25,52	24,63	5,6	2,9	A
WAL	10	7,6	23,7	2,51	93	30,3	2,1	7,2	9,6	A ₂ S	24,22	21,17	8,0	-	A
DAL	22	8,4	26,4	2,81	94	29,7	2,5	2,0	1,3	A ₂ S	13,76	6,11	11,6	5,8	A
AAN	28	6,9	22,1	2,73	81	25,2	1,9	1,0	3,2	A ₂ S	14,9	6,43	5,1	1,5	A
PCS	3	9,0	27	3,5	77	25,7	1,9	6,5	6,2	A ₂ S	8,72	5,31	19,6	4,3	A

TABELA XI - Características hematológicas, estudo hemoglobínico, quantificação de G-6-PD e contagens de reticulócitos (antes e após centrifugação) dos pacientes com hemoglobinopatia SC

pacientes com hemoglobinopatia SC													
nome	idade (anos)	Hb (g/dl)	Ht (%)	GV ($\times 10^6/\text{ml}$)	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb F (%)	Solubili- fidade (%)	Padrão da eletroforese da hemoglobina	G-6-PD(U.I./gHb) antes	reticulócitos (%) após	eletroforese de G-6-PD	
JAD	7	8,9	26,2	3,44	75	25,5	0,8	25,2	SC	24,81	22,02	2,8	1,6
MCS	10	8,0	25	3,0	82	27	1,4	21,8	SC	24,93	20,89	4,0	1,8
ATR	7	11,4	36	5,7	63	20	0,4	11,6	SC	26,65	22,88	3,2	-
CRA	28	12,4	37,8	4,56	82	28,1	0,9	70	SC	23,21	22,3	3,1	2,2
GEB	4	10,6	31,7	4	79	26,5	0,9	-	SC	32,03	26,42	3,45	2
WLM	43	9,7	29	2,7	107	35,9	1,3	24,7	SC	26,99	23,87	3	0,4
CAS	13	12,2	34	4,3	79	28,4	1,43	23,5	SC	23,52	15,24	3,6	-
DB	38	10,3	31,4	3,87	86	29,2	0,6	-	SC	24,67	19,78	7	4
RMS	22	8,8	30	3,2	94	27,5	1,2	-	SC	20,22	17,72	5,4	3,4
JMS	16	11,6	37	4,4	84	26,4	0,55	29,4	SC	22,15	20,23	2,4	0,1
RCC	13	9,7	30	3,4	88	28,5	1,78	20	SC	25,12	20,04	2,5	0,3
JAA	18	12,1	36,6	4,79	77	25	0,6	9,7	SC	9,03	4,01	4,2	1,3
FAD	2	7,4	23,9	4,05	58	18,1	1,0	53,7	SC	3,54	3,46	2,5	1,4
MJ	18	12,6	39,1	3,8	83	27,8	0,7	-	SC	2,73	0,29	2,9	-

TABELA XII - Características hematológicas, estudo hemoglobínico, quantificação de G-6-PD e contagens de reticulócitos (antes e após centrifugação) dos pacientes com S β -talassemia

nome	idade (anos)	Hb (g/dl)	Ht (%)	GV (x10 ⁶ /ml)	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	Solubi- lidade (%)	Padrão da eletrofore- se de hemo- globina	G-6-PD(U.I./ gHb) antes	reticulócitos (%) antes	reticulócitos eletroforese de G-6-PD após		
JES	42	12	35,6	4,9	75	26,3	3,8	0,4	6	A ₂ S,A	21,79	15,78	2,8	0,3	B
DSC	11	10,6	34	4,5	75	23	4,2	6,3	5,2	A ₂ S	20,19	-	12,5	6,3	B
CD	5	8,5	31	4,1	76	20,7	3,1	8,9	-	A ₂ S,F	23,46	13,58	8,8	5,4	B
RM	13	9,6	29	4	72	24	4,0	10	14,8	A ₂ S,F	42,04	24,63	15,7	5,2	B
JCS	11	7,0	27	3,1	87	21,7	4,2	10,7	10	A ₂ S,F	35,7	26,09	4	2,2	B
CAD	12	9,1	26,8	3,48	77	26	3,7	3,8	43	A ₂ S	27,57	25,61	10,3	1,3	B
VHG	1	8,6	30	4,2	70	20,4	4,3	31,2	-	A ₂ S,F	25,15	19,24	2,1	0	B
RZ	15	11,5	34,9	5,7	61	20,9	4,0	5,3	18	A ₂ S	31,28	18,83	3,3	0,3	B
SAB	16	7,6	26	3,7	70	20,5	5,0	1,42	4,8	A ₂ S	6,81	5,58	3	0,7	A

TABELA XIII - Características hematológicas, estudo hemoglobínico, quantificação de G-6-PD e contagens de reticulócitos (antes e após centrifugação) dos pacientes com outras anemias hemolíticas exceto doenças falciformes.

nome	diagnóstico	idade (anos)	Hb (g/dl)	Ht (%)	Gv ($\times 10^6/\text{ml}$)	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	Padrão da eletroforese de Hb	G-6-PD(U.I./gHb) antes	reticulócitos (%) antes	reticulócitos eletroforese de G-6-PD após		
SAL	anemia hemolítica auto-imune	28	7,7	25,2	2,6	96,9	29,61	2,4	1,2	A ₂ A	20,04	12,08	12,3	2,5	B
GV	esferocitose hereditária	6	5,7	16,8	2,1	80	27,14	2,8	0,9	A ₂ A	20,16	10,8	11,7	0,2	B
CMS	anemia hemolítica auto-imune	5	7,6	24,4	2,7	90,37	28,15	1,8	1,4	A ₂ A	21,53	11,15	9,8	-	B
MLR	talassemia intermédia	21	8,1	26	2,95	88	27,2	2,7	26,4	A ₂ ,F,A	19,34	12,78	13	2,3	B

TABELA XIV - Características hematológicas, estudo hemoglobínico, quantificação de G-6-PD e contagens de reticulócitos (antes e após centrifugação) dos controles normais

nome	idade (anos)	Hb (g/dl)	Ht (%)	GV (x10 ⁶ /ml)	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb A ₂ (%)	HbF (%)	Padrão da eletro- forese de hemo- globina	G-6-PD(U.I./ gHb)		reticulócitos (%)		eletroforese de G-6-PD
										antes	após	antes	após	
CAS	34	15,4	46,5	5,4	86	28,5	2,8	0,6	A ₂ ,A	12,08	9,77	1,2	0,3	B
FD	33	15,8	48,2	5,4	89	29,2	2,6	0,5	A ₂ ,A	12,11	9,07	1,3	0	B
JP	34	14,9	46,7	5,2	90	28,6	2,1	1,2	A ₂ ,A	11,15	9,28	1,6	0	B
MAS	30	16,3	48,4	6,0	81	27,2	3,0	0,7	A ₂ ,A	10,76	7,5	1,2	0,2	B
MS	27	14,7	45,4	4,9	92	30	2,7	0,4	A ₂ ,A	13,5	8,9	1,6	0,1	B
RM	20	16,5	49,3	5,9	84	28	2,8	0,8	A ₂ ,A	13,7	11,75	1,3	0	B
SL	26	15	45,8	5,3	86	28,3	3,2	0,4	A ₂ ,A	11,45	8,22	1,3	0,3	B
OC	28	14,7	46,2	5,4	85	27,2	2,1	1,0	A ₂ ,A	11,67	9,3	1,0	0,2	B
WL	22	15,7	47,3	5,6	84	28,1	2,4	0,3	A ₂ ,A	13,7	12,03	1,4	0,1	B
CAF	26	14,2	44,8	4,8	93	29,6	2,2	0,7	A ₂ ,A	11,35	8,94	1,5	0,2	B
ALC	28	16,0	47,0	5,8	82	27,6	2,5	0,5	A ₂ ,A	12,83	11,91	1,3	0	B

TABELA XV - Características hematológicas, estudo hemoglobínico, quantificação de G-6-PD e contagens de reticulócitos (antes e após centrifugação) dos controles com deficiência de G-6-PD

nome	idade (anos)	Hb (g/dl.)	Ht (%)	GV (x10 ⁶ /ml)	VCM (fl)	HCM (pg)	Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	Padrão de Ele- troforese de hemoglobina	G-6-PD(U.I./ gHb) antes	G-6-PD(U.I./ gHb) após	reticulócitos (%) antes	reticulócitos (%) após	eletroforese de G-6-PD
AJS	26	14,8	46,7	5,2	90	28,4	2,9	0,4	A ₂ ,A	1,31	0	1	0	A
AD	31	15,7	48	5,5	87	28,5	2,7	0,7	A ₂ ,A	1,33	0	1,1	0,2	A
JPS	36	15,3	47,6	5,7	83	26,8	2,3	0,8	A ₂ ,A	1,02	0	1,4	0,1	A
LF	23	14,7	45,2	5,4	84	27,2	—	—	A ₂ ,A	0,71	0	1,0	0	A
DAP	28	14,4	45,5	4,7	97	30,6	2,1	0,7	A ₂ ,A	0,79	0	1,3	0,1	A
OT	26	15,8	47	5,9	80	26,8	2,8	0,9	A ₂ ,A	1,98	0,5	1,2	0,3	A
RP	21	14,5	46,2	5,3	87	27,3	2,2	0,5	A ₂ ,A	1,16	0	1,4	0,1	A
JS	32	15,6	48,1	5,7	84	27,4	—	—	A ₂ ,A	2,17	0,3	1,5	0,4	A