SHEILA SERRA VIEIRA PINTO

**Estudo complementar da glicose-6-fosfato
desidrogenase eritrocitária do marsupial brasileiro**

Didelphis marsupialis

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Orlando César de Oliveira Barretto

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pinto, Sheila Serra Vieira

Estudo complementar da glicose-6-fosfato desidrogenase eritrocitária do marsupial brasileiro *Didelphis marsupialis* / Sheila Serra Vieira Pinto. -- São Paulo, 2008.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo**

para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Orlando César de Oliveira Barretto.

Descritores: 1.Glucose-6-fosfato desidrogenase 2.Glutationa peroxidase

3.*Didelphis* 4.Metabolismo energético 5.Ensaio enzimáticos clínicos

USP/FM/SBD-420/08

Agradeço a Deus pela força e coragem nos
momentos mais difíceis de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Inalda Serra (in memorian) pela determinação, perseverança, honestidade e amor dedicados durante toda uma vida à família, minha mais honrosa homenagem.

Ao meu irmão, Cristian Serra, pelo apoio, admiração e amizade demonstrados.

A Melissa pelo companheirismo, incentivo e compreensão.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Orlando César de Oliveira Barretto, pela confiança, apoio e esforço demonstrados na realização deste trabalho e na minha realização profissional. Seu exemplo e dedicação foram os maiores presentes que essa vida me trouxe.

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, Diretor Técnico-Científico da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, pela gentil permissão na obtenção das amostras de sangue dos marsupiais.

Ao Dr. José Daniel Luza Fedullo, médico veterinário, da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, pelo estímulo, boa vontade e colaboração durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Nairo Massakazu Sumita e Dra. Maria Elizabete Mendes, Diretor e Chefe do Laboratório de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo incentivo em minha carreira e apoio neste estudo.

Ao Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata, pela inspiração e generosidade ao ceder seu laboratório aos estudos complementares deste projeto.

À Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP pelos serviços prestados na realização dos exames laboratoriais.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Clínica do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela amizade, convivência e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo carinho como me receberam e apoio científico dados.

À FAPESP, pelo apoio financeiro durante estes anos. (Processo 05/53528-6)

A todos que de alguma forma contribuíram na elaboração deste trabalho.

“De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos recomeçando,
a certeza de que precisamos continuar
e a certeza de que podemos ser
interrompidos
antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,
fazer da queda um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
da procura, um encontro.
Fica a promessa do reencontro,
fica o desejo de boa sorte,
fica o desejo de lutar e vencer. ”

Fernando Sabino

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações gerais.....	2
1.2 Metabolismo oxidativo dos eritrócitos.....	3
1.3 Glicose-6-fosfato desidrogenase no <i>Didelphis marsupialis</i>	8
1.4 Enzimas da via glicotítica, ciclo das pentoses e outras enzimas..	10
2. OBJETIVOS.....	21
3. MÉTODOS.....	23
3.1 Seleção dos animais, coleta e conservação das amostras.....	24
3.2 Procedimento das determinações enzimáticas.....	26
3.2.1 Preparo do hemolisado.....	26
3.2.2 Determinação da concentração de hemoglobina do hemolisado.....	27
3.2.3 Determinação das atividades enzimáticas do eritrócito.	28
3.2.3.1 Hexoquinase.....	30
3.2.3.2 Glicose fosfato isomerase.....	31
3.2.3.3 Fosfofrutoquinase.....	33
3.2.3.4 Aldolase.....	34

3.2.3.5	Triose fosfato isomerase.....	35
3.2.3.6	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase.....	37
3.2.3.7	Fosfoglicerato quinase.....	38
3.2.3.8	Difosfoglicerato mutase.....	39
3.2.3.9	Monofosfoglicerato mutase.....	41
3.2.3.10	Enolase.....	43
3.2.3.11	Piruvato quinase.....	44
3.2.3.12	Lactato desidrogenase.....	46
3.2.3.13	Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	47
3.2.3.14	6-Fosfogliconato desidrogenase.....	48
3.2.3.15	Glutaciona redutase.....	49
3.2.3.16	Glutaciona peroxidase.....	50
3.2.3.17	Glutaciona S-transferase.....	51
3.2.3.18	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato diaforase.....	52
3.2.3.19	Nicotinamida adenina dinucleotideo meta- hemoglobina redutase.....	53
3.2.3.20	Superóxido dismutase.....	54
3.2.3.21	Aspartato aminotransferase.....	56
3.2.3.22	Adenilato quinase.....	58
3.2.3.23	Adenosina desaminase.....	59
3.2.3.24	Acetilcolinesterase.....	60
3.3	Eritrograma.....	61
3.4	Determinações bioquímicas e imunológicas.....	62

3.5 Aspectos éticos.....	63
3.6 Análise estatística.....	63
4.RESULTADOS.....	64
5.DISSCUSSÃO.....	72
6.CONCLUSÕES.....	77
7.ANEXOS.....	79
8.REFERÊNCIAS.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD	ácido cítrico-citrato-dextrose
Ach	acetilcolinesterase
AD	adenosina deaminase
ADP	adenosina-5'-difosfato
AK	adenilato quinase
Ald	aldolase
AMP	adenosina monofosfato
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina-5'-trifosfato
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DPGM	difosfoglicerato mutase
DTNB	5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico)
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
F-6-P	frutose-6-fosfato
F-1,6-diP	frutose-1,6-difosfato
D-GAP	d-gliceraldeido-3-fosfato
GAPD	gliceraldeido fosfato desidrogenase
G-6-P	glicose-6-fosfato
G-6-PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
GPI	glicose fosfato isomerase
GSSG	glutathiona oxidada
GSH	glutathiona reduzida

GSH Px	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
Hb	hemoglobina
Hx	hexoquinase
LDH	lactato desidrogenase
MPGM	monofosfoglicero mutase
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADH-met	nicotinamida adenina dinucleotídeo methemoglobina redutase
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NADPH-dia	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase
PEP	fosfoenol piruvato
PFK	fosfofrutoquinase
2-PGA	2-ácido-fosfoglicérico
3-PGA	3-ácido-fosfoglicérico
6-PGA	6-fosfogliconato
6-PGD	6-fosfogliconato desidrogenase
PGK	fosfoglicerato quinase
PK	piruvato quinase

PYR	piridoxal 5´-fosfato
SOD	superóxido dismutase
TPI	triose fosfato isomerase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Importância do ATP no eritrócito.....	3
Figura 2 - Metabolismo eritrocitário.....	4
Figura 3 - Via de Embden-Meyerhof e sua relação com outras vias metabólicas no eritrócito.....	6
Figura 4 - Ciclo Via das Pentoses.....	7
Figura 5 - O papel da coenzima FAD no metabolismo do eritrócito.....	17
Figura 6 - Interligação das funções das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.....	19
Figura 7 - Gráfico de dispersão com média amostral da G6PD.....	70
Figura 8 - Gráfico de dispersão com média amostral da GSH-Px.....	70
Figura 9 - Gráfico de dispersão com média amostral da GR sem FAD.....	71
Figura 10 - Gráfico de dispersão com média amostral da GR com FAD.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sobrevida do eritrócito para algumas espécies.....	3
Tabela 2 - Sistema reagente para determinação da atividade da hexoquinase.....	31
Tabela 3 - Sistema reagente para determinação da atividade da glicose fosfato isomerase.....	32
Tabela 4 - Sistema reagente para determinação da atividade da fosfofrutoquinase.....	34
Tabela 5 - Sistema reagente para determinação da atividade da aldolase..	35
Tabela 6 - Sistema reagente para determinação da atividade da triose fosfato isomerase.....	36
Tabela 7 - Sistema reagente para determinação da atividade da gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase.....	37
Tabela 8 - Sistema reagente para determinação da atividade da fosfogliceratoquinase.....	39
Tabela 9 - Sistema reagente para determinação da atividade da difosfoglicerato mutase.....	40
Tabela 10 - Sistema reagente para determinação da atividade da monofosfogliceromutase.....	42
Tabela 11 - Sistema reagente para determinação da atividade da enolase.	44
Tabela 12 - Sistema reagente para determinação da atividade da piruvatoquinase.....	45

Tabela 13 - Sistema reagente para determinação da atividade da lactato desidrogenase.....	46
Tabela 14 - Sistema reagente para determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase.....	47
Tabela 15 - Sistema reagente para determinação da atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase.....	48
Tabela 16 - Sistema reagente para determinação da atividade da glutationala redutase.....	49
Tabela 17 - Sistema reagente para determinação da atividade da glutationala peroxidase (GSH-Px).....	50
Tabela 18 - Sistema reagente para determinação da atividade da glutationala S-transferase (GST).....	51
Tabela 19 - Sistema reagente para determinação da atividade da NADPH diaforase.....	52
Tabela 20 - Sistema reagente para determinação da atividade da metahemoglobina redutase.....	53
Tabela 21 - Sistema reagente para determinação da atividade da superóxido dismutase.....	55
Tabela 22 - Sistema reagente para determinação da atividade da aspartato aminotransferase.....	57
Tabela 23 - Sistema reagente para determinação da atividade da adenilato quinase.....	59
Tabela 24 - Sistema reagente para determinação da atividade da adenosina deaminase.....	60

Tabela 25 - Sistema reagente para determinação da atividade da acetilcolinesterase.....	61
Tabela 26 - Atividades das enzimas eritrocitárias do <i>Didelphis marsupialis</i> e controles humanos em IU. gHb ⁻¹ .min ⁻¹ . a 37° C.....	65
Tabela 27 - Resultados do Intervalo de Confiança (IC) e teste estatístico entre marsupiais e humano.....	67
Tabela 28 - Eritrograma do <i>D. marsupialis</i> e valores humanos normais.....	68
Tabela 29 - Determinações Bioquímicas e Imunológicas do <i>D. marsupialis</i> valores humanos normais.....	69

RESUMO

Pinto SSV. *Estudo complementar da glicose-6-fosfato desidrogenase eritrocitária do marsupial brasileiro Didelphis marsupialis* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Sabe-se que a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase eritrocitária do marsupial brasileiro *Didelphis marsupialis* é cerca de 15 a 20 vezes a encontrada nos eritrócitos humanos. Pretendendo-se investigar se esta hiperatividade também se encontra ou não aumentada nas outras enzimas eritrocitárias, levou-se a efeito a dosagem das atividades das enzimas glicolíticas bem de outras enzimas relacionadas ao metabolismo óxido-redutor do eritrócito do marsupial. Alguns dados bioquímicos sorológicos, hematológicos e imunológicos foram também obtidos. Assim sendo, as seguintes enzimas eritrocitárias foram estudadas: hexoquinase, glicose fosfato isomerase, fosfofrutoquinase, aldolase, triose fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfogliceratoquinase, difosfoglicerato mutase, monofosfoglicerato mutase, enolase, piruvato quinase, lactato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase, glutatona redutase, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase, nicotinamida adenina dinucleotídeo meta-hemoglobina redutase, superóxido dismutase, aspartato aminotransferase, adenilato quinase, adenosina desaminase e acetilcolinesterase. Embora a maioria das enzimas estudadas tenham revelado atividades semelhantes às encontradas nos eritrócitos humanos, foram observados aumentos significativos da hexoquinase, piruvato quinase e glutatona S-transferase. Entretanto, a atividade da glutatona peroxidase apresentou grande aumento de atividade, cerca de dez a doze vezes a encontrada nos eritrócitos humanos, talvez agindo em conjunto com a hiperatividade da glicose-6-fosfato desidrogenase da ordem de dez a quinze vezes já descrita nos eritrócitos humanos.

Descritores: glucose-6-fosfato desidrogenase, glutatona peroxidase, *Didelphis*, metabolismo energético, ensaios enzimáticos clínicos.

SUMMARY

Pinto SSV. *Complementary study of glucose-6-phosphate dehydrogenase erythrocyte of brazilian marsupial Didelphis marsupialis* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

It is known that erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase specific activity of *Didelphis marsupialis* is about 15-20 times higher than human red cells. In order to investigate whether this hyperactivity is extended or not to other red cell enzymes, it was proposed to ascertain the activity of the glycolytic enzymes as well as other related to the redox metabolism of the opossum erythrocyte. Some biochemical, hematological and immunological data were also assayed as well. That being so, the following red cell enzymes were assayed: hexokinase, glucose phosphate isomerase, phosphofructokinase, aldolase, triose phosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, diphosphoglycerate mutase, monophosphoglycerate mutase, enolase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase, nicotinamide adenine dinucleotide metahemoglobin reductase, superoxide dismutase, aspartate amino-transferase, adenylate kinase, adenosine deaminase and acetylcholinesterase. Although most of the enzymatic activities disclosed to be similar to humans, some enzymes exhibited high activities as the hexokinase, pyruvate kinase and glutathione-S-transferase, about three to four times in relation to human. However the glutathione peroxidase presented overwhelming activity, at the order of ten-twelve times the human enzyme, perhaps working together the glucose-6-phosphate dehydrogenase hyperactivity at the order of ten-fifteen times already described in the marsupial erythrocytes.

Keywords: glucosephosphate dehydrogenase, glutathione peroxidase, *Didelphis*, energy metabolism, clinical enzyme tests.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Os eritrócitos maduros dos mamíferos são células anucleadas que normalmente circulam por alguns meses (Tabela 1) e diferem entre si em relação ao seu número, tamanho e forma. De maneira bem peculiar, o glóbulo vermelho experimenta profundas alterações no decorrer do seu desenvolvimento, e a mais expressiva se refere ao trabalho celular representado pela extrusão do núcleo. Esta dramática transformação celular é acompanhada por expressiva mudança do comportamento metabólico e biossintético como a perda da mitocôndria, eliminando a respiração celular. Estas alterações a tornam uma célula adequada ao transporte de oxigênio para os tecidos, pois o transporta sem consumi-lo. É esta a função primordial do eritrócito: transporte de oxigênio dos pulmões para as células do organismo e do dióxido de carbono no sentido inverso⁽¹⁾.

O desaparecimento das mitocôndrias e dos ribossomos condiciona a perda das enzimas, do ciclo de Krebs e de várias funções biossintéticas, como a formação de purina, pirimidina, proteínas, lípidos e síntese de heme. O eritrócito necessita de energia para a manutenção de suas funções, e assim lança mão do ciclo anaeróbico que permanece íntegro no citosol, a glicólise. Uma das funções da glicólise, é a geração de energia armazenada sob forma de ligações de alta energia da adenosina trifosfato (ATP). Este ATP formado será empregado na manutenção da forma da hemácia e

fornece a energia necessária ao funcionamento da bomba de sódio-potássio (Figura 1) ⁽²⁾.

Figura 1. Importância do ATP no eritrócito.

1.2 Metabolismo oxidativo dos eritrócitos

Estudos comparativos têm demonstrado que a sobrevivência do eritrócito está associada a uma série de parâmetros. Atualmente sabe-se que a sobrevivência do eritrócito varia com a taxa metabólica, que está intimamente ligada à taxa de estresse oxidativo que a célula sofre, e que é diretamente proporcional ao tamanho e à longevidade da espécie (Tabela 1) ⁽³⁾.

Tabela 1. Sobrevida do eritrócito para algumas espécies.

Espécie	Sobrevida do eritrócito (dias)
Cavalo	140 a 145
Vaca	130
Homem	120
Cão	100 a 115
Gato	73
Camundongo	43

Fonte: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000

A membrana celular, as enzimas necessárias ao metabolismo energético dos eritrócitos e a hemoglobina constituem um perfeito equilíbrio à sobrevivência do eritrócito (Figura 2).

Figura 2. Metabolismo eritrocitário

Uma vez que a glicose entra na célula, ela é fosforilada a glicose 6-fosfato (G6P) pela enzima hexoquinase (Hx). A G6P é então metabolizada pela via de Embden-Meyerhof (via glicolítica) ou pela via das pentoses ⁽⁴⁾.

Através da via de Embden-Meyerhof (Figura 3), aproximadamente 90% da glicose é metabolizada a lactato e neste processo são geradas duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato). A principal ação do ATP se dará

em manter o funcionamento da bomba de sódio-potássio (transporte ativo de íons). Haverá contínuo lançamento de sódio para fora e potássio para dentro, mantendo constantes as concentrações de íons. Desse modo, não haverá ingresso excessivo de água, o que provocaria turgor, rompimento de membrana e hemólise. Esta via também é responsável pela formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH). O NADH gerado nesta via é um importante agente redutor da metahemoglobina (forma oxidada da hemoglobina), onde o ferro está no estado férrico, impróprio para transportar oxigênio e por intermédio da enzima metahemoglobina redutase (citocromo b5 redutase), é transformada em hemoglobina ^(2,5,6).

A via glicolítica possui dois desvios: o ciclo de Rapaport-Luebering e o ciclo das pentoses. No ciclo de Rapaport-Luebering, as moléculas de 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG), produzidas pela reação da GAPD, podem ser utilizadas através da reação catalisada pela fosfogliceratoquinase (PGK) na via de Embden-Meyerhof ou podem ser convertidas em 2,3-DPG pela reação catalisada pela difosfoglicerato mutase (DPGM). Este ciclo mantém acúmulos de 2,3-DPG que exerce importante papel regulador na fixação de O₂ pela hemoglobina. A via do DPG (ciclo ou via de Rapoport-Luebering) desvia a glicólise do passo de geração de ATP, conseqüentemente, nenhum ATP é gerado quando a glicose é metabolizada por esta via ^(7,8).

Normalmente apenas uma porção (5 a 13%) da glicose metabolizada pelos eritrócitos é destinada para a via das pentoses (Figura 4), mas isto pode ser acelerado significativamente por oxidantes. Os eritrócitos circulantes são expostos a oxidantes endógenos, incluindo o superóxido (O₂⁻)

e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Como resultado, o dano causado por estes oxidantes pode desempenhar um papel importante no envelhecimento natural e na remoção de células da circulação pelos fagócitos mononucleares. É um ciclo eminentemente redutor, em que a nicotinamida dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) produzido ocupa papel central neste esquema⁽⁹⁾.

Figura 3. Via de Embden-Meyerhof e sua relação com outras vias metabólicas no eritrócito.

A NADPH gerada na via das pentoses é essencial na proteção contra oxidantes. É um importante agente redutor na célula juntamente com a

glutathione redutase (GR), reduz a glutathione oxidada (GSSG) em glutathione reduzida (GSH), que por sua vez desempenha importante papel na proteção do glóbulo vermelho frente aos processos oxidantes, através da redução dos níveis de peróxidos de hidrogênio, formados nos processos infecciosos e ingestão de certos alimentos ou drogas⁽¹⁰⁾.

Para que ocorra a formação da NADPH é necessária a transformação da glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconato, reação catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD), que promove a redução do NADP em NADPH. Portanto a principal enzima da Via das Pentoses é a glicose-6-fosfato desidrogenase⁽¹¹⁾.

Figura 4. Ciclo das Pentoses

1.3 Glicose-6-fosfato desidrogenase no *Didelphis marsupialis*

A classe Mammalia engloba os mamíferos placentários, que compreendem a grande maioria dentro desta classe, mas também os marsupiais e os monotremes (ornitorrincos)⁽¹²⁾. Os marsupiais caracterizam-se por terem dois úteros e uma bolsa, geralmente ventral, onde os filhotes são encontrados sugando o leite materno, e são animais extremamente resistentes, onívoros e prolíficos.

Quanto à classificação das 250 espécies de marsupiais existentes, eles são agrupados em 16 famílias⁽¹³⁾, dentro da super-ordem Marsupialia, onde se encontram as ordens Polyprotodontia, Paucituberculata e Diprotodonta. A ordem Polyprotodontia engloba, entre outras, a sub-ordem Didelphimorphia, onde está o *Didelphis marsupialis*, objeto deste presente estudo:

Super-ordem	Marsupialia
Ordem	Polyprotodontia
Sub-ordens	Didelphimorphia → <i>Didelphis marsupialis</i>
	Dasyuromorphia
	Peramelemorphia
	Notoryctemorphia
Ordem	Paucituberculata
Ordem	Diprodonta

A espécie *Didelphis marsupialis*, o prosaico gambá, se subdivide em três sub-espécies: o *D. virginiana* na América do Norte, o *D. marsupialis* na América Central e América do sul, e o *D. marsupialis albiventris* ou *aurita* na América do Sul⁽¹⁴⁾.

O *D. marsupialis* é animal encontrado praticamente em todo o território nacional tropical e sub-tropical, e tem sido considerado hospedeiro intermediário de uma série de micro-organismos, como o *Trypanosoma cruzi*⁽¹⁵⁾, *Leishmania donovani*⁽¹⁶⁾, *Histoplasma capsulatum*⁽¹⁷⁾, *Babesia ernestoi*⁽¹⁸⁾. Apresenta ainda a notável característica de ser resistente natural às picadas de cobras do gênero *Bothrops*⁽¹⁹⁾ devido à presença de dois inibidores plasmáticos não imunológicos DM40 e DM43⁽²⁰⁾.

Entre estas citadas características, juntou-se o achado da hiper-atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) eritrocitária por Barretto et al.⁽²¹⁾. Assim, sua atividade é cerca de 15-20 vezes a observada nos humanos, 6 vezes nos ratos Wistar, 4 vezes no canguru australiano⁽²²⁾. No trabalho em questão a enzima foi purificada até quase estado homogêneo e foram estabelecidas suas características físico-químicas: afinidade (Km) ao substrato glicose-6-fosfato e à nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADP), constante de inibição contra o NADPH, curva de pH, atividade com o análogo 2-deoxi-glicose-6-fosfato e com a deamino-NADP, termo-estabilidade, eletroforese.

A conclusão a que se chegou foi que a enzima tem características semelhantes à enzima humana, não sendo, portanto, uma molécula hiper-

ativa, de modo que a hiperatividade observada estaria ligada à síntese de número maior de cópias por célula ⁽²¹⁾.

1.4 Enzimas da via glicotítica, ciclo das pentoses e outras enzimas

🧬 Hexoquinase (EC 2.7.1.1). Esta enzima catalisa a transferência de um radical fosfato do ATP para o carbono 6 da glicose, formando glicose-6-fosfato (G-6-P) e requer Mg^{2+} porque o verdadeiro substrato não é ATP^{4-} (forma ionizada ao pH 7), mas o complexo $MgATP^{2-}$. É uma reação irreversível. Das principais formas, designada hexoquinase Ia, Ib e Ic, a Ib está presente em níveis mais baixos nos eritrócitos de adultos. Apresenta nos eritrócitos humanos atividade $1,78 \pm 0,38$ UI / gHb a $37^{\circ}C$ ⁽²³⁾. A deficiência desta enzima é uma causa rara de anemia hemolítica não esferocítica ^(24,25).

🧬 Glicose fosfato isomerase (EC 5.3.1.9). Catalisa a conversão de G-6-P a F-6-P e sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $60,8 \pm 11,0$ UI / gHb a $37^{\circ}C$ ⁽²³⁾. Sua deficiência é um resultado da anemia hemolítica congênita não-esferocítica. ^(2,25).

🧬 Fosfofruto quinase (EC 2.7.1.11). Esta enzima catalisa a reação de transferência de um grupo fosfato do ATP para a posição 1 da frutose 6-fosfato formando a frutose 1,6-difosfato. Esta reação depende da presença de Mg^{2+} e nas condições celulares esta reação é irreversível. É

o segundo ponto importante no controle da glicólise. A fosfofrutoquinase é uma enzima reguladora, como a hexoquinase e tem sua atividade acelerada sempre que as taxas de ATP tornam-se baixas ou há um excesso dos produtos de hidrólise do ATP, ADP e AMP. Ela é inibida sempre que as células estão bem supridas de ATP e outros compostos, tais como, citrato e os ácidos graxos ⁽²⁾. Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $11,01 \pm 2,33$ UI / gHb a 37°C ⁽²⁷⁾. A deficiência pode estar relacionada a uma leve anemia hemolítica ^(2,26).

🧪 Aldolase (EC 4.1.2.13). Catalisa uma reação de condensação aldólica reversível. A frutose 1,6-difosfato é clivada em duas trioses fosfato diferentes: gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e diidroxiacetona-fosfato (DHAP). A aldolase dos tecidos animais não requer Mg^{2+} e sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $3,19 \pm 0,86$ UI / gHb a 37°C ⁽²³⁾. A deficiência desta enzima é uma causa rara de anemia hemolítica não esferocítica ^(2,26).

🧪 Triose fosfato isomerase (EC 5.3.1.1). Cataliza a interconversão reversível de diidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, formadas por ação da aldolase. Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é 2111 ± 397 UI / gHb a 37°C ⁽²³⁾. A deficiência de TPI é uma doença rara inicialmente descrito em 1965 ⁽²⁸⁾. É caracterizada por anemia hemolítica crônica, cardiomiopatia, susceptibilidade a infecções, disfunções

neurológicas severas e, na maioria dos casos, provoca morte nos primeiros anos de infância ⁽²⁹⁾.

✚ Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12). Catalisa a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato pelo NAD⁺ (passa a NADH) e a fosforilação dando origem a 1,3-difosfoglicerato (1,3 DPG). Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $226 \pm 41,9$ UI / gHb a 37⁰C ⁽²³⁾. Não há investigações da relação entre deficiência desta enzima e a hemólise ^(2,26).

✚ Fosfoglicerato quinase (EC 2.7.2.3). Produz ATP junto com 3-fosfoglicerato (3PGA). Esta mesma quinase realiza a reação inversa, que é uma transferência de grupo fosfato do ATP para o 3PGA, formando 1,3-DPG. Pode ser desviada pela ação da difosfoglicero mutase, da via de Luebering-Rappaport, gerando o 2,3-DPG. Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $320 \pm 36,1$ UI / gHb a 37⁰C ⁽²³⁾. A deficiência é uma causa de anemia hemolítica não esferocítica, associada a anormalidades neuro-musculares ^(2,26).

✚ Difosfoglicerato mutase (EC 5.4.2.4). Catalisa a conversão de 1,3-DPG a 2,3-DPG e sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $4,78 \pm 0,65$ UI / gHb a 37⁰C ⁽²³⁾. A deficiência é rara onde a eritrocitose é mais acentuada que a hemólise ^(2,26).

🚦 Monofosfoglicerato mutase (EC 5.4.2.1). Catalisa o equilíbrio entre 3-PGA e 2-PGA e sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $37,71 \pm 5,56$ UI / gHb a 37°C ⁽²⁷⁾.

🚦 Enolase (EC 4.2.1.11). Catalisa o equilíbrio entre o 2-fosfoglicerato (2-PGA) e fosfoenolpiruvato (PEP) e sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $5,39 \pm 0,83$ UI / gHb a 37°C ⁽²³⁾. Sua deficiência provoca uma anemia hemolítica crônica ⁽²⁾.

🚦 Piruvato quinase (EC 2.7.1.40). Catalisa a fosforilação do ADP a ATP pelo fosfoenolpiruvato que se transforma em piruvato. Existem dois diferentes genes codificadores, num total de quatro isoenzimas de PK tecido específicas. O gene PKLR codifica a isoenzima eritrocitária (R-PK) e hepática (L-PK), enquanto os outros genes geram as isoenzimas musculares (M1-PK e M2-PK). A R-PK é expressa quase que exclusivamente em eritrócitos maduros. Entretanto, precursores eritróides expressam as isoenzimas M2-PK e muda para R-PK durante a diferenciação para eritrócitos maduros ⁽²⁶⁾. Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $15,0 \pm 1,99$ UI / gHb a 37°C ⁽²³⁾. A deficiência de PK é a mais prevalente anemia hemolítica não-esferocítica hereditária causada por uma enzimopatia glicolítica ^(25,26).

🚦 Lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27). Catalisa a redução de piruvato a lactato pelo NADH. Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é

200 $\pm$ 26,5 UI / gHb a 37⁰C ⁽²³⁾. Foram descritos alguns casos de deficiência hereditária da lactato desidrogenase ^(2,30).

✚ Glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49). Tem como finalidade auxiliar na produção de substâncias que as protegem de fatores oxidantes e sua atividade normal nos eritrócitos humanos é 12,1 $\pm$ 2,09 UI / gHb a 37⁰C ⁽²³⁾. Cataliza a primeira etapa da via das pentoses oxidando a glicose-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconato. Apesar de ser rico em catalase, que se mostra ineficiente em remover pequenas quantidades de peróxido, o eritrócito depende fundamentalmente do NADPH para exercer esta função antioxidante ^(31,32). Para se ter uma idéia da importância do NADPH no metabolismo em geral, sabe-se que o NADPH funciona como coenzima nas desidrogenases, na NADPH-citocromo C redutase, NADPH-citocromo p-450 redutase, NADPH-ferrodoxina redutase, NADPH-glutationa redutase, NADPH-lípides redutase, NADPH oxidase, NADPH-quinona redutase, NADPH-tioredoxina redutase, NADPH-metahemoglobina redutase, ou como co-substrato em reações de hidroxilação, e na cadeia fosforilativa intramitocondrial ⁽³³⁾.

✚ 6-Fosfogliconato desidrogenase (EC 1.1.1.44). Catalisa a oxidação de 6-PGA a ribulose-5-fosfato e dióxido de carbono. Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é 8,78 $\pm$ 0,78 UI / gHb a 37⁰C ⁽²³⁾. Deficiências

severas de 6-PGD são extremamente raras e os sinais clínicos não são bem esclarecidos⁽²⁷⁾.

✚ Glutationa redutase (EC 1.8.1.7). Catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG) pelo NADPH a glutathione reduzida (GSH). Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $7,18 \pm 1,09$ UI / gHb sem FAD e $10,4 \pm 1,50$ UI / gHb com FAD a 37°C ⁽²³⁾. A ativação da GR pela FAD tem sido utilizada como um acurado meio de investigação da deficiência de vitamina B2 ⁽³⁴⁾, oferecendo ainda a vantagem de indicar quantidades adequadas de riboflavina ingeridas ⁽³⁵⁾.

✚ Glutationa peroxidase (EC 1.11.1.9). Catalisa a oxidação da GSH a GSSG, reduzindo peróxidos (H_2O_2) em H_2O . A glutathione oxidada (GSSG) é utilizada pelo eritrócito da via das pentoses para gerar mais NADPH através da reação catalisada pela glutathione redutase dependente de FAD (Figura 5) ⁽³⁶⁾. Esta forma oxidada da glutathione (GSSG) contém duas moléculas de glutathione ligadas por uma ligação dissulfeto ⁽³⁷⁾. Segundo Peixoto⁽³⁸⁾, no citosol e em suas organelas, atua a glutathione peroxidase como mediadora em reações que destroem tais peróxidos. A atividade normal nos eritrócitos humanos é $30,8 \pm 4,73$ UI / gHb a 37°C ⁽²³⁾. A oxidação seletiva de um tiol renovável limita irreversivelmente o dano às proteínas e aos lipídeos eritrocitários, que poderia ocorrer se não houvesse esse sistema antioxidante⁽³⁹⁾. O selênio (Se) é um cofator essencial para a GSH-Px, sendo incorporado à

enzima assim que ela é sintetizada. Conseqüentemente a deficiência de Se pode ocasionar a deficiência de GSH-Px ⁽⁴⁰⁾. A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo composto de ácido glutâmico (glutamato), cisteína e glicina, o qual é sintetizado nos eritrócitos dos mamíferos por reações que requerem duas moléculas de ATP. A GSH possui um grupo sulfidril altamente reativo (facilmente oxidável) que, como outros tióis, pode agir como um receptor não-enzimático de radical livre para neutralizar o dano oxidativo, e é necessária à manutenção da integridade da membrana eritrocitária, evitando desta forma a oxidação da hemoglobina e a formação de corpos de Heinz. A formação de corpúsculos de Heinz no interior do eritrócito promove sequestro esplênico, com encurtamento da vida média do eritrócito, o que pode desencadear uma anemia hemolítica ⁽⁴¹⁾. A deficiência desta enzima resulta em anemia hemolítica não-esferocítica ^(2,25,26).

Figura 5. O papel da coenzima FAD no metabolismo do eritrócito.

✚ Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18). Catalisa a reação de CDNB com o grupo sulfidril (-SH) da glutathione. Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $6,66 \pm 1,81$ UI / gHb a 37°C ⁽²³⁾.

✚ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dehydrogenase (EC 1.6.99.1). Esta enzima catalisa a transferência de hidrogênio do NADPH para o azul de metileno reduzindo-o para azul de leucometileno. Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $2,26 \pm 0,16$ UI / gHb a 37°C ⁽²³⁾.

✚ Nicotinamide adenine dinucleotide reductase of metemoglobin (EC 1.6.2.2) Reduz a metahemoglobina a deoxyhemoglobina, eficiente no transporte de oxigênio. A determinação de NADH ferricyanide reductase pode ser usado para detectar deficiência desta enzima nos eritrócitos. Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $19,21 \pm 3,85$ UI / gHb a 30°C ⁽²³⁾.

✚ Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1). É uma enzima que tem como cofatores o zinco (Zn) e o cobre (Cu) e que catalisa a desmutação de duas moléculas de O_2 em H_2O_2 e O_2 (Figura 6). Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $2254,8 \pm 303$ UI / gHb a 25°C ⁽²³⁾. Embora geralmente se considere protetora, a SOD pode aumentar significativamente o dano oxidativo em condições em que o catabolismo do H_2O_2 está comprometido. Presume-se que indivíduos portadores de Síndrome de Down (doença cromossômica que consiste na presença e

expressão de três cópias de genes localizados no cromossomo 21 apresentam duplicação da região onde se localiza o gene que codifica a superóxido dismutase-1 (SOD-1). Estudos revelaram que estes indivíduos apresentam atividade desta enzima aumentada em 50% em diferentes tipos de células – eritrócitos, leucócitos, plaquetas e fibroblastos. O aumento da atividade enzimática resulta em um quadro de agressão endógena constante, devido à aceleração da reação de formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ao desequilíbrio entre a atividade da SOD-1 e da glutathione peroxidase (GSH-Px), com a conseqüente oxidação dos grupos sulfídricos e a peroxidação dos lipídios insaturados causando dano celular. Estes pacientes trissômicos geralmente possuem algumas características como envelhecimento precoce, dano cerebral e modificações bioquímicas que são secundárias ao dano oxidativo dentro da célula ⁽⁴²⁾.

Figura 6. Interligação das funções das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase.
FONTE: (Sigma-Aldrich Co, 2005)

🧪 Aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1). Transfere um grupo amina do glutamato para o oxaloacetato para formar aspartato e sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $3,02 \pm 0,67$ UI / gHb e $5,04 \pm 0,90$ UI / gHb quando estimulada com fosfato de piridoxina (cofator) a $37^{\circ}C$ ⁽²³⁾. Sua atividade é consideravelmente mais alta em eritrócitos jovens do que em maduros. O grau de ativação da AST pode dar uma indicação do estado nutricional do indivíduo com piridoxina⁽²⁷⁾.

✚ Adenilato quinase (EC 2.7.4.3). Catalisa a conversão de ADP para AMP e ATP e sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $258 \pm 29,3$ UI / gHb a 37°C ⁽²³⁾. Tem sido relatado que a deficiência de AK resulta em leve anemia hemolítica não-esferocítica⁽²⁷⁾.

✚ Adenosina desaminase (EC 3.5.4.4). Catalisa a deaminação de adenosina a inosina. Sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $1,11 \pm 0,23$ UI / gHb a 37°C ⁽²³⁾. A deficiência nesta enzima está associada com deficiências do sistema imunológico e o aumento com anemia hemolítica⁽²⁷⁾.

✚ Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7). Catalisa a hidrólise de acetiltiocolina a tiocolina e sua atividade normal nos eritrócitos humanos é $36,9 \pm 3,83$ UI / gHb a 37°C ⁽²³⁾. Está associada principalmente com células colinérgicas envolvidas na transmissão sináptica. Ela é também encontrado em algumas células não-neuronais como nos eritrócitos a qual sua função não está esclarecida ⁽⁴³⁾.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar o sistema óxido-redutor eritrocitário do *Didelphis marsupialis* comparado ao humano.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade de 24 diferentes enzimas eritrocitárias do marsupial *Didelphis marsupialis*, da Família Didelphidae.
- Investigar algumas determinações hematológicas, bioquímicas e imunológicas deste marsupial.

3. MÉTODOS

3.1 Seleção dos animais, coleta e conservação das amostras

Entre fevereiro de 2006 e março de 2007, foram capturados 15 exemplares machos adultos de *Didelphis marsupialis* provenientes do Parque do Estado, vizinho a Fundação Zoológico de São Paulo, SP, sob aprovação segundo ofício FPZSP nº 131/2005. Anexo A.

A captura foi realizada através de armadilha de metal, utilizando-se como iscas, frutas e vegetais. A contenção dos animais foi efetuada através do uso de luvas de couro, agarrando-se firmemente a nuca do animal. A coleta de sangue foi realizada por uma punção cardíaca, veia femural ou caudal após tricotomia, esta última, servindo como uma forma de “marcação” dos animais. Após a coleta e passado o efeito anestésico do medicamento, os animais eram devolvidos ao seu habitat natural. Para cada animal foram verificados o peso e o sexo, sendo descartadas fêmeas, na maioria das vezes, prenhas, sendo devolvidas imediatamente ao Parque do Estado de São Paulo.

Foram colhidas amostras de sangue para a determinação das atividades enzimáticas em tubo contendo anticoagulante ACD, mas invariavelmente o volume de sangue obtido não ultrapassava 1,5 a 2,0 mL. Das 15 amostras coletadas do marsupial, apenas 6 apresentaram volumes de sangue suficientes para as demais determinações hematológicas, bioquímicas e imunológicas.

Para efeito de comparação, foram também utilizados 5 humanos, voluntários, adultos, de ambos os sexos, saudáveis, funcionários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Foram colhidas amostras de sangue para a determinação das concentrações de hemoglobina desses indivíduos que serviram como controle das atividades enzimáticas do eritrócito.

O sangue colhido em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) da marca BD[®], foi utilizado para determinação da dosagem de hemoglobina e aquele colhido em ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose (ACD), foi utilizado para o estudo das enzimas do eritrócito. O sangue colhido em tubo seco, sem anticoagulante, foi utilizado para o estudo bioquímico e imunológico do *D.marsupialis*.

As amostras foram conservadas sob refrigeração a 4⁰C, por um período máximo de 2 semanas. Neste período, eram feitas as determinações das atividades enzimáticas, embora as amostras pudessem ser utilizadas até 20 dias sem sofrer alterações consideráveis, com exceção de três: a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPD), a triose fosfato isomerase (TPI) e a superóxido dismutase (SOD). Essas enzimas podiam ser determinadas até 6 dias após a coleta, homogeneizando o tubo por inversão pelo menos uma vez ao dia para favorecer a manutenção da integridade dos eritrócitos. A glicose contida no ACD é utilizada para manter o equilíbrio energético do metabolismo das células vermelhas ⁽²⁷⁾.

3.2 Procedimento das determinações enzimáticas

Todos os procedimentos utilizados nas análises das determinações enzimáticas foram de acordo com Beutler ⁽²⁷⁾, em conformidade com os Métodos Recomendados para Análise das Enzimas em Células Vermelhas do ICSH, 1977 ⁽²³⁾.

Utilizou-se para a determinação da hemoglobina do hemolisado e as determinações das atividades enzimáticas do eritrócito, o espectrofotômetro da marca Varian (Varian, Austrália) modelo Cary 50 Bio[®], programa computacional Enzyme Kinetics Cary winUV[®].

Os reagentes químicos utilizados nas determinações como: tampões, substratos, enzimas auxiliares e coenzimas provieram da marca Sigma[®], os quais foram adicionados em cubetas de quartzo, juntamente com as amostras (hemolisados) até completar o volume total de 1 mL. As determinações para cada amostra foram feitas em duplicata.

3.2.1 Preparo do hemolisado

O sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos a 4⁰C, em centrífuga refrigerada marca Sorvall (Sorvall Instruments, EUA) modelo Legend RT[®], para a remoção do plasma e da camada de leucócitos ("buffy coat"). Foram realizadas 3 lavagens sucessivas com aproximadamente 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,154 M gelado, centrifugando a 2500 rpm por 10 minutos a 4⁰C. Tomou-se o cuidado de retirar, em cada lavagem,

os leucócitos para isentar o concentrado de hemácias das enzimas séricas e leucocitárias, as quais poderiam interferir nas análises.

As hemácias assim obtidas foram lisadas na proporção de 1:20 (100µL de concentrado de hemácias + 1900 µL de solução hemolisante) e o tubo contendo o hemolisado foi submetido ao congelamento em banho de acetona em freezer a -20°C por aproximadamente 5 minutos e degelo em temperatura ambiente ("freeze-and-thaw"). Após o degelo, o tubo contendo o hemolisado, assim como todos os reagentes do sistema, foram mantidos em banho de gelo até a realização das atividades enzimáticas.

A solução hemolisante ou solução estabilizante de β -mercaptoetanol-EDTA, foi assim preparada:

β -mercaptoetanol	0,05 mL
EDTA 0,27 M (neutralizado).....	10 mL
Água milli-Q® q.s.p.....	1000 mL

3.2.2 Determinação da concentração de hemoglobina do hemolisado

A concentração de hemoglobina do hemolisado 1:20 foi determinada pelo método da cianometahemoglobina⁽⁴⁴⁾. Transferiu-se 100µL do hemolisado 1:20 para 5 mL de solução de Drabkin (300 mg de ferricianeto de potássio e 100 mg cianeto de potássio em 1 litro de solução) seguindo a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540nm.

A concentração de hemoglobina foi obtida utilizando a seguinte expressão matemática:

$$\text{Hb/mL} = \frac{\Delta\text{DO} \times F}{5}$$

onde:

ΔDO = densidade óptica em 540 nm

F = fator de calibração da hemoglobina

5 = fator de diluição

3.2.3 Determinação das atividades enzimáticas do eritrócito

O sistema reagente utiliza as coenzimas piridinanucleotídicas reduzidas (NADH ou NADPH) ou oxidadas (NAD ou NADP) que absorvem luz no comprimento de onda de 340 nm. A variação de absorbância por minuto obtida pela oxidação das coenzimas NADH a NAD e de NADPH a NADP ou a redução de NAD a NADH e de NADP a NADPH, reflete diretamente a atividade de cada enzima, que é expressa em unidades internacionais por grama de hemoglobina a 37°C (UI.g Hb⁻¹.min⁻¹ a 37°C), onde 1 unidade (UI) pode ser definida como sendo a quantidade de enzima que oxida 1 M de NADH ou NADPH por minuto a 37°C ou 1 unidade (UI) pode ser definida como sendo a quantidade de enzima que reduz 1 M de NAD ou NADP por minuto a 37°C.

As atividades enzimáticas foram obtidas (com exceção da superóxido dismutase) utilizando a seguinte expressão matemática:

$$AE = \frac{\Delta D.O./min. \times 10^5}{\epsilon \times V_H \times []_{Hb}} = UI.g Hb^{-1}.min^{-1} \text{ a } 37^{\circ}C$$

onde:

AE = atividade enzimática

$\Delta D.O./min.$ = variação da densidade óptica por minuto

10^5 = correção de hemoglobina em g/dL e correção do volume em microlitros do hemolisado adicionado

ϵ = coeficiente de extinção molar das coenzimas (NADP, NAD, NADPH ou NADH) sendo 6,22 na reação em que 1 mol é reduzido ou oxidado e 12,44 na reação em que 2 moles são reduzidos ou oxidados

V_H = volume do hemolisado em μL utilizado no sistema de reação de 1 mL

$[]_{Hb}$ = concentração de hemoglobina no hemolisado em gramas por 100 mL de sangue

$1U = 1\mu mol \times min^{-1} \times mL^{-1}$

Foram determinadas as atividades das seguintes enzimas eritrocitárias: hexoquinase, glicose fosfato isomerase, fosfofruto quinase, aldolase, triose fosfato isomerase, gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase, fosfogliceratoquinase, difosfoglicerato mutase, monofosfoglicerato mutase, enolase, piruvato quinase, lactato desidrogenase, glicose-6-fosfato

desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase, glutatona redutase, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase, nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato diaforase, nicotinamida adenina dinucleotideo meta-hemoglobina redutase, superóxido dismutase, aspartato aminotransferase, adenilato quinase, adenosina deaminase e acetilcolinesterase.

3.2.3.1 Determinação da atividade da hexoquinase (Hx)

A. Princípio

O aumento da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37°C, sem pré-incubação, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução de 1 mol de NADP⁺ em NADPH para cada mol de glicose-6-P, sendo o coeficiente de extinção molar (ε) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

B. Técnica

Tabela 2 – Sistema reagente para determinação da atividade da hexoquinase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1 M	100	100
Glicose 0,02 M	100	100
ATP (neutralizado) 0,02M	—	500
NADP 2 mM	100	100
Hemolisado 1:20	50	50
G6PD 10U/mL ⁽¹⁾	10	10
H ₂ O milli-Q [®]	540	40

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em solução hemolisante

3.2.3.2 Determinação da atividade da glicose fosfato isomerase (GPI)

A. Princípio

Glicose fosfato isomerase converte a glicose-6-P e frutose-6-P:

O aumento da densidade óptica é medido de 10 a 20 minutos a 37°C, com pré-incubação de 1 hora, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução de 1 mol de NADP⁺ em NADPH para cada mol de frutose-6-P convertido a glicose-6-P, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

B. Técnica

Tabela 3 - Sistema reagente para determinação da atividade da glicose fosfato isomerase

REAGENTES	BRANCO (μ L)	SISTEMA (μ L)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1 M	100	100
NADP 2 mM	100	100
G6PD 10U/mL ⁽¹⁾	10	10
Frutose-6-P 0,02 M	—	100
H ₂ O milli-Q [®]	685	585

Incubou-se a 37°C por 1 hora e adicionou-se:

Hemolisado 1:20	5	5
-----------------	---	---

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em solução hemolisante

3.2.3.3 Determinação da atividade da fosfofrutoquinase (PFK)

A. Princípio

O decréscimo da densidade óptica é medido de 10 a 20 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 2 mols de NADH em NAD⁺ para cada mol de frutose-6-P, sendo o coeficiente de extinção molar (ε) desta coenzima igual a 12,44 ⁽²⁷⁾.

B. Técnica

Tabela 4 - Sistema reagente para determinação da atividade da fosfofrutoquinase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1 M	200	200
Frutose-6-P 0,02 M	—	100
NADH 2 mM	100	100
Solução auxiliar enzima ⁽¹⁾	100	100
Hemolisado 1:20	10	10
H ₂ O milli-Q®	390	290

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

ATP (neutralizado) 0,02M	100	100
--------------------------	-----	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Solução auxiliar: 50 U/mL de cada enzima (aldolase, triose fosfato isomerase e α -glicerofosfato desidrogenase) dissolvida em solução de (NH₄)₂SO₄ saturada. Esta é diluída 1:15 em solução hemolisante e utilizada no sistema reagente

3.2.3.4 Determinação da atividade da aldolase

A. Princípio

O decréscimo da densidade óptica é medido de 10 a 20 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 2 mols de NADH em NAD⁺ para cada mol de frutose-1,6-diP convertido a triose fosfato, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 12,44 ⁽²⁷⁾.

B. Técnica

Tabela 5 - Sistema reagente para determinação da atividade da aldolase

REAGENTES	BRANCO (μ L)	SISTEMA (μ L)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
NADH 2 Mm	100	100
Solução auxiliar enzima ⁽¹⁾	100	100
Hemolisado 1:20	10	10
H ₂ O milli-Q [®]	690	590

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

Frutose-1-6-diP 0,01 M	—	100
------------------------	---	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Solução auxiliar: 50 U/mL de cada enzima (triose fosfato isomerase e α -glicerofosfato desidrogenase) dissolvida em solução de (NH₄)₂SO₄ saturada. Esta é diluída 1:15 em solução hemolisante e utilizada no sistema reagente

3.2.3.5 Determinação da atividade da triose fosfato isomerase (TPI)

A. Princípio

α-glicerofosfato desidrogenase

O decréscimo da densidade óptica é medido de 15 a 20 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ para cada mol de D- gliceraldeído-3-P convertido a DHAP, sendo o coeficiente de extinção molar (ε) desta coenzima igual a 6,22 ⁽²⁷⁾.

B. Técnica

Tabela 6 - Sistema reagente para determinação da atividade da triose fosfato isomerase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
NADH 2 mM	100	100
Hemolisado 1:2000	10	10
α-Glicerofosfato desidrogenase 2 U/mL ⁽¹⁾	50	50
H ₂ O milli-Q®	740	640

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

D-GAP 30 mM	—	100
-------------	---	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em água milli-Q®

3.2.3.6 Determinação da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPD)

A. Princípio

B. Técnica

Tabela 7 - Sistema reagente para determinação da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1 M	100	100
NADH 2 mM	100	100
ATP (neutralizado) 0,02 M	400	400
PGK 50 U/mL ⁽¹⁾	100	100
Hemolisado 1:200	10	10
H ₂ O milli-Q [®]	190	90

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

3-PGA 100 mM	—	100
--------------	---	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em água milli-Q[®]

O decréscimo da densidade óptica é medido de 10 a 20 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ para cada mol de 1,3-DPG convertido a GAP, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

3.2.3.7 Determinação da atividade da fosfogliceratoquinase (PGK)

A. Princípio

O decréscimo da densidade óptica é medido de 10 a 20 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ para cada mol de 3-PGA convertido a 1,3-DPG, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

B. Técnica

Tabela 8 - Sistema reagente para determinação da atividade da fosfogliceratoquinase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1 M	100	100
ATP (neutralizado) 0,02 M	400	400
GAPD 40 U/mL ⁽¹⁾	100	100
NADH 2 mM	100	100
Hemolisado 1:200	10	10
H ₂ O milli-Q [®]	190	90

Incubou-se a 37⁰C por 10 minutos e adicionou-se:

3-PGA 100 mM	—	100
--------------	---	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em solução hemolisante

3.2.3.8 Determinação da atividade da difosfoglicerato mutase (DPGM)

A. Princípio

B. Técnica

Tabela 9 - Sistema reagente para determinação da atividade da difosfoglicerato mutase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
NAD 10 mM	100	100
F-1,6-diP 100 mM	—	50
3-PGA 10 mM	100	200
KH ₂ PO ₄ 100 mM	20	20
GAPD 50 U/mL ⁽¹⁾	20	20
Aldolase 5 U/mL ⁽²⁾	20	20
TPI 60 U/mL ⁽²⁾	20	20
H ₂ O milli-Q®	600	550

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

Hemolisado 1:20	20	20
-----------------	----	----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em solução hemolisante

⁽²⁾ Diluído em água milli-Q®

O aumento da densidade óptica é medido de 10 a 15 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução de 1 mol de NAD^+ em NADH para cada mol de 1,3-DPG convertido a 2,3-DPG, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

3.2.3.9 Determinação da atividade da monofosfogliceromutase (MPGM)

A. Princípio

B. Técnica

Tabela 10 - Sistema reagente para determinação da atividade da monofosfogliceromutase

REAGENTES	BRANCO (μ L)	SISTEMA (μ L)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1 M	20	20
KCl 1 M	100	100
NADH 2 mM	100	100
ADP (neutralizado) 30 mM	50	50
2,3-DPG 1 mM	10	10
LDH 60 U/mL ⁽¹⁾	10	10
PK 50 U/mL ⁽¹⁾	10	10
Enolase 10 U/mL ⁽¹⁾	10	10
Hemolisado 1:20	20	20
H ₂ O milli-Q [®]	570	470

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

3-PGA 10 mM	—	100
-------------	---	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em água milli-Q[®]

O decréscimo da densidade óptica é medido de 10 a 20 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ para cada mol de PEP formado e para cada mol de 2-PGA utilizado, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

3.2.3.10 Determinação da atividade da enolase

A. Princípio

O decréscimo da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ para cada mol de PEP formado e para cada mol de 2-PGA utilizado, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

B. Técnica

Tabela 11 - Sistema reagente para determinação da atividade da enolase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1 M	100	100
KCl 1 M	100	100
NADH 2 mM	100	100
ADP 30 mM	50	50
LDH 60 U/mL ⁽¹⁾	10	10
PK 50 U/mL ⁽¹⁾	10	10
Hemolisado 1:20	20	20
H ₂ O milli-Q [®]	510	410

Incubou-se a 37⁰C por 10 minutos e adicionou-se:

2-PGA 10 mM	—	100
-------------	---	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em água milli-Q[®]

3.2.3.11 Determinação da atividade da piruvatoquinase (PK)

A. Princípio

O decréscimo da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ para cada mol de PEP defosforilado, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

B. Técnica

Tabela 12 - Sistema reagente para determinação da atividade da piruvatoquinase

REAGENTES	BRANCO (μ L)	SISTEMA (μ L)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
KCl 1 M	100	100
MgCl ₂ 0,1 M	100	100
NADH 2 mM	100	100
ADP (neutralizado) 30 mM	—	50
LDH 60 U/mL ⁽¹⁾	100	100
Hemolisado 1:20	20	20
H ₂ O milli-Q®	380	330

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

PEP 50 mM	100	100
-----------	-----	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em água milli-Q®

3.2.3.12 Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH)

A. Princípio

B. Técnica

Tabela 13 - Sistema reagente para determinação da atividade da lactato desidrogenase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
NADH 2 mM	100	100
Hemolisado 1:200	20	20
H ₂ O milli-Q [®]	780	680

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

Piruvato de sódio 10 mM	—	100
-------------------------	---	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

O decréscimo da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ para cada mol de Piruvato reduzido, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

3.2.3.13 Determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

A. Princípio

B. Técnica

Tabela 14 - Sistema reagente para determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1 M	100	100
NADP 2 mM	100	100
Hemolisado 1:20	20	20
H ₂ O milli-Q®	680	580

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

G-6-P 6 mM	—	100
------------	---	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

O aumento da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução de 1 mol de NADP⁺ em NADPH para cada mol de glicose-6-P, sendo o coeficiente de extinção molar (ε) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

3.2.3.14 Determinação da atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase (6-PGD)

A. Princípio

B. Técnica

Tabela 15 - Sistema reagente para determinação da atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1 M	100	100
NADP 2 mM	100	100
Hemolisado 1:20	20	20
H ₂ O milli-Q [®]	680	580

Incubou-se a 37⁰C por 10 minutos e adicionou-se:

6-PGA 6 mM	—	100
------------	---	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

O aumento da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37⁰C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução de 1 mol de NADP⁺ em NADPH para cada mol de 6-PGA oxidado, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

3.2.3.15 Determinação da atividade da glutathiona redutase (GR)

A. Princípio

GR

B. Técnica

Tabela 16 - Sistema reagente para determinação da atividade da glutathiona redutase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	50	50	50	50
Hemolisado 1:20	10	10	10	10
H ₂ O milli-Q [®]	890	790	790	690
FAD 10 μM	—	—	100	100

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

GSSG 0,033 M (neutralizado)	—	100	—	100
-----------------------------	---	-----	---	-----

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

NADPH 2 mM	50	50	50	50
------------	----	----	----	----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

O decréscimo da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37°C, com 2 pré-incubações de 10 minutos cada, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADPH em NADP⁺ para cada mol de GSSG reduzido, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾. A GR é ativada pela adição de FAD.

3.2.3.16 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px)

A. Princípio

B. Técnica

Tabela 17 - Sistema reagente para determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px)

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
GSH 0,1 M	20	20
Glutathiona redutase 10 U/mL ⁽¹⁾	100	100
NADPH 2 mM	100	100
Hemolisado 1:20	10	10
H ₂ O milli-Q [®]	670	660

Incubou-se a 37⁰C por 10 minutos e adicionou-se:

<i>t</i> -Butil hidroperóxido 7 mM	—	10
------------------------------------	---	----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em água milli-Q[®]

O decréscimo da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37°C, com uma pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADPH em NADP⁺ para cada mol de *t*-butil hidroperóxido reduzido, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

3.2.3.17 Determinação da atividade da glutathione S-Transferase (GST)

A. Princípio

B. Técnica

Tabela 18 - Sistema reagente para determinação da atividade da glutathione S-transferase (GST)

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 0,5 M pH 6,5	200	200
CDNB em 95% etanol 25 mM	20	20
H ₂ O milli-Q [®]	730	680

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

GSH 20 mM	50	50
-----------	----	----

Homogeneizou-se bem e adicionou:

Hemolisado 1:20	—	50
-----------------	---	----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

O aumento da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da formação de CDNB-glutationa, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) deste complexo igual a 9,6⁽²⁷⁾.

3.2.3.18 Determinação da atividade da NADPH diaforase

A. Princípio

B. Técnica

Tabela 19 - Sistema reagente para determinação da atividade da NADPH diaforase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
NADPH 2 mM	—	20
Hemolisado 1:20	50	50
H ₂ O milli-Q [®]	840	820

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

Azul de metileno 0,8 mM	10	10
-------------------------	----	----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

O decréscimo da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37°C, com uma pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADPH em NADP⁺, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

3.2.3.19 Determinação da atividade da NADPH metahemoglobina redutase

A. Princípio

ferricianido redutase

B. Técnica

Tabela 20 - Sistema reagente para determinação da atividade da metahemoglobina redutase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
NADH 2 mM	100	100
H ₂ O milli-Q [®]	700	690

Incubou-se a 30°C por 10 minutos e adicionou-se:

K ₃ Fe(CN) ₆ 2 mM + hemolisado 1:20 ⁽¹⁾	100	110
--	-----	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ 200 μL de K₃Fe(CN)₆ 2 mM e 20 μL de hemolisado 1:20

O decréscimo da densidade óptica é medido de 10 a 20 minutos a 30°C, com uma pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ para cada mol de ferricianido reduzido, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

3.2.3.20 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A. Princípio

O pirogalol é um composto que se auto-oxida rapidamente em solução aquosa. Em meio básico, sua auto-oxidação gera superóxido. A técnica utilizada para determinar a atividade da SOD se baseia na inibição da auto-oxidação do pirogalol pela catálise da reação do radical superóxido⁽²⁷⁾. Uma vez não sendo possível determinar a concentração da enzima nem sua atividade na forma de "substrato consumido/tempo", utiliza-se uma unidade relativa. Define-se uma unidade (U) de SOD como a quantidade necessária desta enzima para inibir em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. A oxidação do pirogalol forma um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. Determina-se a atividade da SOD através da velocidade de formação do pirogalol oxidado.

B. Técnica

Preparo do hemolisado e extrato: Após serem realizadas 3 lavagens sucessivas conforme descrito em 3.2.1, o hemolisado foi preparado pipetando-se num tubo de vidro 250µL de hemácias e 375µL de H₂O milli-Q[®] gelada do qual determinou-se a hemoglobina (Hb) pelo método da cianometahemoglobina ⁽⁴⁴⁾ conforme descrito em 3.2.2. Do volume de hemolisado restante (525µL), foi transferido 500µL para outro tubo de vidro juntamente com 3,5 mL de água gelada. Homogeneizou e adicionou-se 1 mL de etanol absoluto. Foi adicionado 600µL de clorofórmio, homogeneizado no vórtex por 1 minuto e, em seguida, centrifugou-se a 2300g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato para a determinação da atividade da SOD.

Tabela 21 - Sistema reagente para determinação da atividade da superóxido dismutase

Reagentes	Branco	A1*	A2*	A3*	A4*	A5*	A6*
	(µL)	(µL)	(µL)	(µL)	(µL)	(µL)	(µL)
Tris,HCl1M,EDTA5mM,pH8,0	100	100	100	100	100	100	100
Extrato	—	20	40	60	80	100	300
H ₂ O milli-Q [®]	880	860	840	820	800	780	580

Incubou-se a 25°C por 10 minutos e adicionou-se:

Pirogalol 10 mM	20	20	20	20	20	20	20
-----------------	----	----	----	----	----	----	----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

(*) : quantidades variáveis do sobrenadante límpido do extrato.

A fórmula utilizada para a determinação da atividade da superóxido dismutase é dada abaixo:

$$AE = \frac{5,6}{0,5 \times mL_{50\%} \times 0,01 \times []_{Hb}} = \frac{1120}{mL_{50\%} \times []_{Hb}}$$

onde:

AE = atividade enzimática

5,6 = volume final do extrato

0,5 = quantidade de hemolisado no extrato

$mL_{50\%}$ = quantidade de extrato necessário para inibir oxidação de pirogalol pela metade (50%).

$[]_{Hb}$ = concentração de hemoglobina no hemolisado em gramas por 100 mL de sangue

3.2.3.21 Determinação da atividade da aspartato aminotransferase (AST)

A. Princípio

B. Técnica

Tabela 22 - Sistema reagente para determinação da atividade da aspartato aminotransferase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100	100	100
NADH 2 mM	100	100	100	100
L-Aspartato 0,1 M pH 8,0	100	100	100	100
Málico desidrogenase 1U/mL (1)	10	10	10	10
Piridoxal 5-fosfato 0,4 mM	—	—	50	50
H ₂ O milli-Q®	670	570	620	520
Hemolisado 1:20	20	20	20	20

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

α - Cetoglutarato 0,1 M	—	100	—	100
--------------------------------	---	-----	---	-----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

(1) Diluído em água milli-Q®

O decréscimo da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37°C, com uma pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de

1 mol de NADH em NAD^+ , sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 6,22⁽²⁷⁾.

3.2.3.22 Determinação da atividade da adenilato quinase (AK)

A. Princípio

O decréscimo da densidade óptica é medido de 10 a 20 minutos a 37⁰C, com uma pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 2 mols de NADH em NAD^+ para cada mol de ATP e AMP formados, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) desta coenzima igual a 12,44⁽²⁷⁾.

B. Técnica

Tabela 23 - Sistema reagente para determinação da atividade da adenilato quinase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
ATP (neutralizado) 0,02 M	50	50
NADH 2 mM	100	100
PEP 0,05 M	50	50
KCl 1 M	20	20
LDH 60 U/mL ⁽¹⁾	50	50
MgCl ₂ 0,1 M	50	50
PK 50 U/mL ⁽¹⁾	20	20
Hemolisado 1:2000	50	50
H ₂ O milli-Q®	510	460

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

AMP (neutralizado) 0,02 M	—	50
---------------------------	---	----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

⁽¹⁾ Diluído em água milli-Q®

3.2.3.23 Determinação da atividade da adenosina deaminase (AD)

A. Princípio

AD

B. Técnica

Tabela 24 - Sistema reagente para determinação da atividade da adenosina deaminase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
Hemolisado 1:20	20	20
H ₂ O milli-Q [®]	880	860

Incubou-se a 37⁰C por 10 minutos e adicionou-se:

Adenosina 4 mM	—	20
----------------	---	----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

O decréscimo da densidade óptica é medido por 10 minutos a 37⁰C, com uma pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 265 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da formação de inosina para cada mol de adenosina, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) igual a 8,1⁽²⁷⁾.

3.2.3.24 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (Ach)

A. Princípio

acetilcolinesterase

Acetiltiocolina iodada $\longrightarrow$ Tiocolina + Acetato

Tiocolina + DTNB $\longrightarrow$ ácido 5-tio-2-nitrobenzóico + tiocolina oxidada

B. Técnica

Tabela 25 - Sistema reagente para determinação da atividade da acetilcolinesterase

REAGENTES	BRANCO (μL)	SISTEMA (μL)
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
DTNB 0,5 mM em citrato sódio 1%	50	50
Hemolisado 1:20 diluído em H ₂ O 1:10	10	10
H ₂ O milli-Q [®]	840	790

Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:

Acetilcolina iodada	—	50
---------------------	---	----

FONTE: Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.

O aumento da densidade óptica é medido de 10 a 15 minutos a 37°C, com pré-incubação de 10 minutos, no comprimento de onda de 412 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da reação de tiocolina com DTNB, sendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) igual a 13,6⁽²⁷⁾.

3.3 Eritrograma

Foram determinados de seis exemplares do *Didelphis marsupialis*, a contagem global de eritrócitos, a concentração de hemoglobina, o

hematócrito, o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e os reticulócitos em analisador hematológico da marca Sysmex (Sysmex America Corporation, Illinois, EUA), modelo XT 2000i que utiliza o princípio de citometria de fluxo fluorescente.

3.4 Determinações bioquímicas e imunológicas

Foram determinados de seis exemplares do *Didelphis marsupialis*, machos, a uréia, a creatinina, o ácido úrico, o colesterol e suas frações, os triglicérides, a glicose, as proteínas totais e frações, o ferro e a ferritina em analisador bioquímico da marca Roche, modelo Modular[®] PP (Roche Diagnostics Corp., Mannheim, Alemanha) que utiliza o princípio de ensaio enzimático colorimétrico. As análises de ácido fólico e B12 foram realizadas em analisador bioquímico da marca Roche, modelo Elecsys[®] (Roche Diagnostics Corp., Mannheim, Alemanha) que utiliza o princípio imunoensaio de eletroquimioluminescência e as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM em analisador bioquímico da marca Roche-Hitachi, modelo Modular[®] P 800 que utiliza o princípio de imunoturbidimetria.

As determinações bioquímicas e imunológicas, bem como o eritrograma, foram realizadas na Divisão de Laboratório Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DLC-HCFMUSP).

3.5 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela CAP/PESQ número 1082/04. Anexo B. A autorização de acesso de amostras foi obtida pelo ofício nº 455/05 emitindo a licença nº 074/2005 pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Anexo C.

3.6 Análise estatística

Os valores das atividades das enzimas dos eritrócitos (hexoquinase, glicose fosfato isomerase, fosfofruto quinase, aldolase, triose fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfogliceratoquinase, difosfoglicerato mutase, monofosfoglicerato mutase, enolase, piruvato quinase, lactato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, glutathiona S-transferase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase, nicotinamida adenina dinucleotídeo meta-hemoglobina redutase, superóxido dismutase, aspartato aminotransferase, adenilato quinase, adenosina deaminase e acetilcolinesterase) dos animais da espécie *Didelphis marsupialis* foram comparadas com as determinações enzimáticas do eritrócito humano utilizando-se o teste "t-student" com nível de significância crítico de 5%. Nos eritrogramas e nas determinações bioquímicas e imunológicas dos animais da espécie *Didelphis marsupialis* foram comparados com os valores de referência humanos. Anexos D, E e F.

5. DISCUSSÃO

Os exemplares do *Didelphis marsupialis* deste estudo provieram de ambiente silvestre. A exploração do potencial do *Didelphis marsupialis* como animal de laboratório e como reservatório na disseminação de zoonoses necessita de desenvolvimento e divulgação de técnicas de manejo, visto que sua utilização em pesquisas é muito limitada, principalmente pela falta de bibliografia sobre captura, manejo e reprodução em cativeiro ⁽⁴⁵⁾.

À medida que o sangue foi coletado para várias determinações (enzimas eritrocitárias, eritrogramas e análises bioquímicas e imunológicas), direcionamos as amostras, preferencialmente, para os ensaios enzimáticos dos eritrócitos devido à obtenção de um pequeno volume sangüíneo da espécie *Didelphis marsupialis*. Sendo assim, poucos animais foram estudados em relação aos estudos bioquímicos, hematológicos e imunológicos.

A glicose-6-fosfato desidrogenase está diretamente ligada ao sistema de óxido-redução dos glóbulos vermelhos ^(2,46), através da redução da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) à sua forma reduzida NADPH, que é um grande fornecedor elétrons nos processos de redução de substratos oxidados e proteínas das células, em geral, e particularmente nos eritrócitos. A glicose-6-fosfato desidrogenase é uma enzima constitutiva e assim está presente em todos os tecidos ⁽⁴⁷⁾.

Interessante notar-se que os humanos deficientes desta enzima também apresentam atividades diminuídas em outros tecidos ^(48,49).

Há assim um sistema eficiente que provê a defesa da célula contra agressões oxidativas que agridem as células. Portanto, é intrigante saber qual seria o papel da G6PD nos eritrócitos do *D. marsupialis*, e a razão desta hiperatividade e seus efeitos no metabolismo. A atividade da G6PD no ciclo das pentoses fornece a conversão de NADP a NAPH, e esta forma reduzida da coenzima é crucial para o metabolismo de oxi-redução das células e particularmente dos eritrócitos ⁽²⁾.

Os eritrócitos são constantemente agredidos pelo oxigênio molecular dissolvido no citosol e por radicais livres, que atacam suas proteínas e outros constituintes. O oxigênio molecular é incorporado a uma variedade de substratos pela ação de oxigenases, e é de grande interesse a formação de peróxidos tóxicos e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio pode ser metabolizado por peroxidases com o auxílio de receptores de elétrons ^(2,46).

A glutathione peroxidase (GSH-Px) eritrocitária metaboliza o peróxido de hidrogênio e peróxidos de lípidos, e lança mão da glutathione reduzida (GSH) como substrato também. A GSH protege os lípidos da membrana, proteínas e hemoglobina da oxidação. Através da ação da G6PD, o NADP é reduzido a NADPH, e esta coenzima é largamente utilizada para reduzir vários substratos ⁽⁵⁰⁾.

Como se pode observar na figura 5, o NADPH é utilizado para reduzir a glutathiona oxidada (GSSG) pela glutathiona redutase a GSH^(50,51,52). Este tripeptídeo, em sua forma reduzida, é substrato para a GSH-Px, que promove a redução de peróxidos e hidroperóxidos, uma vez que os peróxidos de hidrogênio são preferencialmente reduzidos pela GSH-Px.

Ambas as enzimas, G6PD e GSH-Px, parecem trabalhar em conjunto, e o NADPH é usado para reduzir GSSG a GSH. Além de confirmar a alta atividade de G6PD, já publicada⁽²¹⁾, o sistema de oxirredução foi estudado através da determinação das atividades da glutathiona redutase e da glutathiona peroxidase.

A disponibilidade de GSH é garantida pela atividade da glutathiona redutase (Figura 5), mas sua atividade não se encontra aumentada nos eritrócitos do *D. marsupialis* (Tabela 26).

É interessante notar-se que o aumento da atividade da G6PD garante o fornecimento de NADPH, e a NADPH é utilizada pela GR para reduzir a GSSG oxidada à sua forma reduzida GSH, a qual por sua vez é empregada pela GSH-Px, cuja atividade foi encontrada neste trabalho grandemente aumentada no *D. marsupialis*.

Se o aumento da atividade da G6PD levaria ao aumento do fornecimento de NADPH, e o aumento da atividade da GSH-Px usaria a GSH na redução de peróxidos, na realidade o passo crucial neste metabolismo dependeria da atividade da glutathiona redutase (Figura 1).

No entanto, a atividade desta enzima não revelou aumento (Tabela 26), e assim poder-se-ia sugerir que a glutathione redutase é o passo limitante no metabolismo de oxi-redução do eritrócito do marsupial brasileiro, e os aumentos das atividades da G6PD e da GSH-Px não induziria a um hipotético aumento do metabolismo de oxi-redução nesta espécie animal.

Entretanto, a velocidade de conversão de GSSG a GSH poderia estar aumentada através de uma possível maior afinidade ao seu substrato GSSG, já que ocorre nos eritrócitos humanos uma curiosa diferença de concentração destes tripeptídeos, de 6570 ± 1040 nmoles/g Hb de GSH e $12,3 \pm 4,5$ nmoles/ g Hb de GSSG ⁽²⁷⁾.

Pode-se sugerir que a utilização de GSH seja muito rápida, e a velocidade de utilização de GSSG a GSH estaria muito aumentada.

Embora a maioria das enzimas estudadas tenham exibido atividades específicas semelhantes às humanas, alguma delas, como a hexoquinase, piruvato quinase e glutathione S-transferase mostraram aumentos da ordem de três a quatro vezes em relação às humanas. A glutathione S-transferase exibiu aumento de três vezes a humana, mas o papel desta enzima não tem sido bem estabelecido nos eritrócitos ^(2,46).

A superóxido dismutase, também ligada ao metabolismo de oxi-redução, não apresentou aumento significativo de atividade.

Duas enzimas exibem grande aumento de atividade, a G6PD, já descrita ⁽²¹⁾, e a GSH-Px, que neste trabalho está sendo relatada estar cerca de 10 a 12 vezes a humana, possivelmente trabalhando juntas no eritrócito do *D. marsupialis*.

6. CONCLUSÕES

- Duas enzimas exibem grande aumento de atividade, a G6PD, já descrita ⁽²¹⁾, e a GSH-Px, que neste trabalho está sendo relatada estar cerca de 10 a 12 vezes a humana.

- As enzimas que apresentaram médias iguais entre marsupiais e humanos foram aldolase (ALD), fosfoglicerato quinase (PGK), difosfoglicerato mutase (DPGM), enolase (ENOL), 6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGD), nicotinamida dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-dia), superóxido dismutase (SOD), alamina aminotransferase com piridoxal (AST com Pyr) , adenosina deaminase (AD), todos ao nível de 5% de significância.

7. ANEXOS

ANEXO A. Aprovação da Fundação Parque Zoológico de São Paulo

ZOOLOGICO DE SÃO PAULO Ofício FPZSP n.º 131/2005-Dir-TC/mjc	Governo do Estado de São Paulo Secretaria do Meio Ambiente São Paulo, 19 de maio de 2005.	
---	--	--

Prezado Professor

É com satisfação que informamos que o projeto de pesquisa intitulado "Estudo da glicose-6-fosfato desidrogenase eritrocitária do marsupial brasileiro *Didelphis marsupialis*" foi analisado e aprovado pelas instâncias técnico-científicas da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Cumpramos porém ressaltar alguns pontos que necessariamente devem ser considerados quando da execução do projeto nos próprios da Fundação Parque Zoológico de São Paulo:

- 1) a disposição dos animais em relação aos recintos atenderá prioritariamente as necessidades operacionais da Fundação Parque Zoológico de São Paulo;
- 2) O agendamento e designação de funcionários/colaboradores da FPZSP para o acompanhamento das atividades dos pesquisadores deve ser feito considerando a rotina, disponibilidade e capacidade operacional dos membros da Fundação
- 3) A Fundação Parque Zoológico de São Paulo não tem disponibilidade financeira para arcar com custos diretos do projeto, excetuando-se aqueles casos em que houver clara manifestação neste sentido por parte de sua Diretoria Executiva.

Pedimos que o acerto de detalhes seja efetuado com o Médico Veterinário José Daniel Luzes Fedullo, através do telefone 5073-0811, ramal 2025 ou 2130.

Aproveitamos a oportunidade para apresentar protestos de estima e consideração.

Prof. José Luiz Catão Dias
Diretor Técnico-Científico

Ilustríssimo Professor
Doutor Orlando Cesar de Oliveira Barreto
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
Av. Miguel Stéfano, 4241 - CEP: 04301-905 - Caixa Postal 12.954 - CEP: 04010-970
Tel.: (0xx11) 5073-0811 - Fax: (0xx11) 5058-0564 - 5073-7238
São Paulo - SP - Brasil
[http:// www.zoologico.sp.gov.br](http://www.zoologico.sp.gov.br)

GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
RESPEITO POR VOCÊ

ANEXO B. Protocolo de pesquisa nº 1082/04

Recebido: 07/03/05, às 12h22
Departamento de Psiquiatria de FMUSP

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 23.02.05, APROVOU, *ad-referendum* o Protocolo de Pesquisa nº 1082/04 - intitulado "Estudo complementar da glicose-6-fosfato desidrogenase eritrocitária do marsupial brasileiro *Didelphis marsupialis*", apresentado pelo DEPARTAMENTO PSIQUIATRIA, condicionado ao recebimento de manifestação favorável por parte da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: Prof.Dr. Orlando César de Oliveira Barretto

Aluna: Sheila Serra Vieira Pinto

CAPPesq, 23 de Fevereiro de 2005.

Encaminhe-se à CPG-FMUSP
para as devidas providências.
S.P. 23.108.105

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Prof.ª Dra. Elia Garcia Caldini
Vice-Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiopatologia Experimental

RECEBIDO SFG

ASS: _____

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br

ANEXO C. Autorização de acesso do IBAMA nº 074/2005

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS**AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO
PATRIMÔNIO GENÉTICO
Nº 074/2005**

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA), no uso das competências que lhe foram conferidas pela Deliberação nº 040/CGEN, de 24 de setembro de 2003 — que o credencia junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA) para autorizar outras instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico — autoriza:

A UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, FACULDADE DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRIA (FMUSP), CNPJ nº 63.025.530/0018-52, representado pelo Vice-Reitor Sr. Hélio Nogueira da Cruz, RG nº 4307068, SSP/SP, CPF nº 202.708.958-68, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético no âmbito dos projetos de pesquisa “Estudo da Hiper-Atividade da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase eritrocitária do marsupial brasileiro *Didelphis marsupialis*”, sob a coordenação do Professor Associado Dr. Orlando César de Oliveira Barreto.

Descrição das amostras:

Espécie(s): *Didelphis marsupialis***Tipo de material:** amostras de sangue e tecidos;**Quantidade de cada amostra (unidade de medida):** 50 ml de sangue e 100g de tecidos;**Uso pretendido:** Caracterização bioquímica, imunoquímica, biológica e enzimática; Sequenciamento da região promotora do gene da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase eritrocitária;**Destino do material:** Departamento de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;**Local de depósito de sub-amostra:** Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo;

Validade da Autorização: 30 de setembro de 2005 a 30 de março de 2007. A UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, FACULDADE DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRIA (FMUSP) enviará ao IBAMA relatório anual sobre a execução do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003. Endereço para envio do(s) relatório(s): IBAMA/ DIFAP/GTPG, SCEN L4 Norte, Bloco B, CEP 70.818-900, Brasília, DF.

Esta autorização vincula-se às informações, formulários e termos constantes do Processo nº 02027.000194/2005. Atividades de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade de bioprospecção, desenvolvimento tecnológico, uso comercial e/ou industrial, assim como atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados **não** estão autorizadas.

Caso seja identificado potencial de uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras acima discriminadas, obriga-se a instituição contemplada por esta autorização a adotar as providências cabíveis junto ao CGEN, com vistas à formalização de Contrato de Utilização do Patrimônio Genético e de Repartição de Benefícios, nos termos da Medida Provisória nº 2.186-16/2001 e dos Decretos nº 3.945/2001 e nº 4.946/2003.

MARCUS LUIZ BARROSO BARROS
Presidente do Ibama

Brasília, 30 de setembro de 2005

ANEXO D. Análise estatística da tabela 26

Teste T - HEXOQUINASE

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	4,020	0,332	0,086
controle humano	5	2,068	0,352	0,16

Difference = mu (marsupial) - mu (controle humano)
 Estimate for difference: 1,95200
 95% CI for difference: (1,58672; 2,31728)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = 11,23 P-Value = 0,000 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 0,3367

Teste T – GPI

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	86,9	12,9	3,3
controle humano	5	61,70	5,73	2,6

Difference = mu (marsupial) - mu (controle humano)
 Estimate for difference: 25,2400
 95% CI for difference: (12,5196; 37,9604)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = 4,17 P-Value = 0,001 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 11,7248

Teste T – PFK

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	4,100	0,936	0,24
controle humano	5	10,430	0,980	0,44

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: -6,33000
 95% CI for difference: (-7,35599; -5,30401)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -12,96 P-Value = 0,000 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 0,9457

Teste T – ALDOLASE

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	3,227	0,795	0,21
controle humano	5	3,320	0,415	0,19

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: -0,093333
 95% CI for difference: (-0,883050; 0,696384)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -0,25 P-Value = 0,807 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 0,7279

Teste T - TPI

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	1664	240	62
controle humano	5	2369	191	86

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: -705,000
 95% CI for difference: (-954,727; -455,273)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -5,93 P-Value = 0,000 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 230,1817

Teste T - GAPD

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	85,9	13,6	3,5
controle humano	5	192,8	14,7	6,6

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: -106,933
 95% CI for difference: (-121,963; -91,904)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -14,95 P-Value = 0,000 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 13,8535

Teste T - PGK

```
Two-sample T for marsupial vs controle humano
      N   Mean  StDev  SE Mean
marsupial      15  308,2   19,9     5,1
controle humano   5  308,6   16,1     7,2
Difference = mu (marsupial) - mu (controle humano)
Estimate for difference:  -0,393333
95% CI for difference:  (-21,127997; 20,341330)
T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -0,04  P-Value = 0,969  DF = 18
Both use Pooled StDev = 19,1118
```

Teste T - DPGM

```
Two-sample T for marsupial vs controle humano
      N   Mean  StDev  SE Mean
marsupial      15  4,027  0,744     0,19
controle humano   5  4,110  0,667     0,30
Difference = mu (marsupial) - mu (controle humano)
Estimate for difference:  -0,083333
95% CI for difference:  (-0,872802; 0,706135)
T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -0,22  P-Value = 0,827  DF = 18
Both use Pooled StDev = 0,7277
```

Teste T - MPGM

```
Two-sample T for marsupial vs controle humano
      N   Mean  StDev  SE Mean
marsupial      15  15,71   4,41     1,1
controle humano   5  33,66   4,02     1,8
Difference = mu (marsupial) - mu (controle humano)
Estimate for difference:  -17,9467
95% CI for difference:  (-22,6404; -13,2530)
T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -8,03  P-Value = 0,000  DF = 18
Both use Pooled StDev = 4,3263
```

Teste T -ENOLASE

```
Two-sample T for marsupial vs controle humano
      N   Mean  StDev  SE Mean
marsupial      15  6,020  0,973     0,25
controle humano   5  5,960  0,623     0,28
Difference = mu (marsupial) - mu (controle humano)
Estimate for difference:  0,060000
95% CI for difference:  (-0,924291; 1,044291)
T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = 0,13  P-Value = 0,900  DF = 18
Both use Pooled StDev = 0,9073
```

Teste T – PK

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	40,42	8,33	2,2
controle humano	5	16,06	3,00	1,3

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: 24,3600
 95% CI for difference: (16,2426; 32,4774)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = 6,30 P-Value = 0,000 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 7,4821

Teste T - LDH

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	138,8	18,3	4,7
controle humano	5	211,2	29,3	13

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: -72,4000
 95% CI for difference: (-95,4701; -49,3299)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -6,59 P-Value = 0,000 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 21,2645

Teste T – 6PGD

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	9,29	1,68	0,43
controle humano	5	9,480	0,873	0,39

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: -0,193333
 95% CI for difference: (-1,864029; 1,477362)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -0,24 P-Value = 0,811 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 1,5399

Teste T – GST

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	18,33	2,87	0,74
controle humano	5	5,080	0,657	0,29

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: 13,2467
 95% CI for difference: (10,4826; 16,0107)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = 10,07 P-Value = 0,000 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 2,5477

Teste T - NADPH diaforase

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	2,553	0,642	0,17
controle humano	5	2,560	0,152	0,068

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: -0,006667
 95% CI for difference: (-0,626183; 0,612849)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -0,02 P-Value = 0,982 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 0,5710

Teste T - NADH metahemoglobina redutase

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	22,93	6,15	1,6
controle humano	5	15,48	2,18	0,97

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: 7,45333
 95% CI for difference: (1,46782; 13,43885)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = 2,62 P-Value = 0,017 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 5,5171

Teste T – SOD

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	Se Mean
marsupial	15	2489	205	53
controle humano	5	2326	157	70

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: 163,467
 95% CI for difference: (-48,017; 374,950)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = 1,62 P-Value = 0,122 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 194,9319

Teste T – AST sem piridoxal

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	3,540	0,739	0,19
controle humano	5	2,700	0,579	0,26

Difference = μ (marsupial) - μ (controle humano)
 Estimate for difference: 0,840000
 95% CI for difference: (0,073875; 1,606125)
 T-Test of difference= 0 (vs not =): T-Value = 2,30 P-Value = 0,033 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 0,7062

Teste T – AST com piridoxal

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	6,133	0,925	0,24
controle humano	5	5,980	0,415	0,19

Difference = mu (marsupial) - mu (controle humano)
 Estimate for difference: 0,153333
 95% CI for difference: (-0,756575; 1,063242)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = 0,35 P-Value = 0,727 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 0,8387

Teste T – AK

Two-sample T for marsupial vs controle humano

	N	Mean	StDev	SE Mean
marsupial	15	198,4	29,2	7,5
controle humano	5	235,4	13,2	5,9

Difference = mu (marsupial) - mu (controle humano)
 Estimate for difference: -37,0000
 95% CI for difference: (-65,7095; -8,2905)
 T-Test of difference=0 (vs not =): T-Value = -2,71 P-Value = 0,014 DF = 18
 Both use Pooled StDev = 26,4626

ANEXO E. Análise estatística da tabela 27

ANEXO F. Análise estatística da tabela 28

8. REFERÊNCIAS

1. Jain NC. *Essentials of veterinary hematology*. 6th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.
2. Beutler E. Energy metabolism and maintenance of erythrocytes. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kippis TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.319-332
3. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
4. Luzzatto L, Smith ECG. Inherited haemolytic anemias. In: Hoffbrand, AV, editors. *Postgraduate haematology*. 4th ed. Oxford: Butterworth Heinemann; 1999. p.120-143
5. Telen MJ, Kaufman RE. The mature erythrocyte. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p.193-227
6. Zago, MA. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Haematologia Fundamentos e Prática*. São Paulo: Atheneu; 2001. p.265-268
7. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other enzyme abnormalities. In: Beutler E, editors. *Hematology*. New York: McGraw-Hill; 1995. p.564-580.
8. Lee R, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p.196-217.

9. Lukens JN. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e deficiências relacionadas que envolvem a via da pentose fosfato e metabolismo da glutatona. In: Lee RG, editors. *Wintrobe Hematologia Clínica*. São Paulo: Manole; 1998. p.1101-1113.
10. Grimes AT. *Human red cell metabolism*. Oxford: Blackwell; 1980.
11. Beutler E. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS. *Bases metabólicas das doenças hereditárias*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1981.
12. Dawson T. *Monotremes and marsupials: the other mammals*. London: Edward Arnold Limited; 1983.
13. Kirsch JAW. The classification of Marsupials. In: Hunsaker, D. *The Biology of Marsupials*. New York: Academic Press; 1977. p 1-50.
14. Kirsch JA, Pettigrew JD. Base-compositional biases and the bat problem. II. DNA-hybridization trees based on AT- and GC-enriched tracers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1998; 29:381–388.
15. Deane MP, Jansen AM, Lenzi HL. *Trypanosoma cruzi*: Vertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1984;79:513-515.
16. Yoshida EL, Silva RL, Cortez LS JR., Correa FM. Finding of leishmania species in *Didelphis marsupialis aurita* in the state of São Paulo, Brazil. Preliminary Note. *Revista Instituto Medicina Tropical*. 1979; 21:110-113.

17. Naiff RD, Mok WY, Naiff MF. Distribution of *Histoplasma capsulatum* in Amazonia wildlife. *Mycopatologia*. 1985; 89:165-168.
18. Da Serra-Freire NM. *Babesia ernestoi* sp.n. in *Didelphis marsupialis* and *D. albiventris* in Brazil. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1979;26:614-622.
19. Melo PA, Suarez-Kurtz G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of south American marsupials. *Toxicon*. 1988;26:87-95.
20. Neves-Ferreira AG, Cardinale N, Rocha SL, Perales J, Domont GB. Isolation and characterization of Dm40 and Dm43, two snake venom metallo-protease inhibitors from *Didelphis marsupialis*. *Biochimica Biophysica Acta*. 2000; 1474:309-320.
21. Barretto OCO, Oshiro M, Oliveira RAG, Fedullo JDL, Nonoyama K. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase from brazilian Opossum *Didelphis marsupialis*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006;39:611-614.
22. Parkinson AL, Whittington AT, Spencer PB, Grigg G, Hinds L, Gallagher C, Kuchel P, Agar NS. Comparative erythrocyte metabolism in marsupials and monotremes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology , Toxicology & Endocrinology*. 1995;110: 261-265.
23. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Lohr GW, Ramot B, Valentine WN. Internation Committee for Standardization in Haematology:

- recommended methods for red-cell enzyme analysis. *B J.Haematol.* 1977; 331-340.
24. Stocchi V, Magnani M, Canestrari F, Dachà M, Fornaini G. Multiple forms of human red blood cell hexokinase. Preparation, characterization, and age dependence. *J Biol Chem.* 1982; 257(5):2357-64.
25. Valentine NW, Tanaka KR, Paglia DE. Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. *Annals of internal medicine.* 1985;245-257.
26. Glader BE, Lukens JN. Hereditary hemolytic anemias associated with abnormalities of erythrocyte glycolysis and nucleotide metabolism. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. *Wintrobe's clinical hematology.* 10 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p1160-1175.
27. Beutler, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods.* 3rd ed. New York: Grune & Stratton; 1984.
28. Schneider AS, Valentine WN, Hattori M, Heins HL Jr.. Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency. *N Engl J Méd.* 1965;229-35.
29. Schneider AS. Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 2000;13(1):119-40.

-
30. Wakkabayashi H, Tsuchiya M, Yoshino K, Kaku K, Shigei H. Hereditary deficiency of lactate dehydrogenase h-subunit. *Internal Medicine*. 1996;550-554.
31. Morelli A, Benatti U, Giuliano F, De Flora A. Human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase. Evidence for competitive binding of NADP and NADPH. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976; 70(2):600-6.
32. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*. 1989; 334-9
33. Mahler HR, Cordes EH. *Biological Chemistry*. New York: Harper & Row; 1971.
34. Prentice AM & Bates CJ. A biochemical evaluation of the erythrocyte glutathione reductase test for riboflavin status. *Br J Nutr*. 1981;37-52.
35. Nichoalds GE. Assessment of status of riboflavin nutritive by assay of erythrocyte glutathione reductase acticity. *Clin Chem*. 1974;624-28.
36. Harvey JW, Stockham SL, Scott MA, Johnson PJ, Donald JJ, Chandler CJ. Methemoglobinemia and eccentrocytosis in equine erythrocyte flavin adenine dinucleotide deficiency. *Veterinary Pathology*. 2003;632-42.
37. Lehninger AL. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier. 1995;532.
38. Peixoto RR. *Nutrição e Alimentação Animal*. Pelotas: Ufpel; 1998.

-
39. Hendler SS. *A enciclopédia de vitaminas e minerais*. Rio de Janeiro: Campus;1997.
40. Gan L, Liu Q, Xu HB, Zhu YS, Yang XL. Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expressions and activities. *Biol Trace Elem Res*. 2002;89(2):165-75.
41. Harvey JW, Beutler E. Binding of heme by glutathione S-transferase: a possible role of the erythrocyte enzyme. *Blood*. 1982;1227-30.
42. Aguiar Da Silva RH, Moraes TP, Moraes G. Implications of the oxidative stress on the erythrocyte metabolism of Down Syndrome individuals. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2003; 231-237.
43. Rosenberry TL, Scoggin DM. Structure of human erythrocyte acetylcholinesterase. Characterization of intersubunit disulfide bonding and detergent interaction. *J Biol Chem*. 1984;259(9):5643-5652.
44. Dacie JV, Lewis SM. *Practical hematology*. 8th ed. Endinburgh: Churchill Livingstone;1996.
45. Paiva MGS, Chaplin EL, Stobbe NS, Araújo FAP, Da Silva NRS. Utilização do *Didelphis marsupialis* como animal de laboratório. *Pesq agropec bras*. 1992;27(1):213-16.
46. Beutler E. Composition of the erythrocyte. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill. 2001; p.289-293.

47. Luzzatto L, Battistuzzi G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Adv Hum Genet.* 1985; 14: 217-329/386-388.
48. Bresolin N, Bet L, Moggio M, Meola G, Fortunato F, Comi G, Adobbati L, et al. Muscle glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Journal of Neurology* 1989; 236: 193-198.
49. Ninfali P, Baronciani L, Bardoni A, Bresolin N. Muscle expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in different variants. *Clinical Genetics* 1995; 48:232-237.
50. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *N Engl J Med.* 1991;169-174.
51. Beutler E. Study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: History and Molecular Biology. *Am. J. Hem.* 1993;53-58.
52. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood.* 1994;3613-36.