

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE EMMER FERREIRA FURMAN

**NÍVEIS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLICOSE 6-FOSFATO
DESIDROGENASE EM CRIANÇAS, NO LABORATÓRIO ESCOLA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

CURITIBA

2013

ALINE EMMER FERREIRA FURMAN

**NÍVEIS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLICOSE 6-FOSFATO
DESIDROGENASE EM CRIANÇAS, NO LABORATÓRIO ESCOLA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

Artigo apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Especialista em Análises
Clínicas, pela Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Paulo Henrique da Silva

CURITIBA

2013

Níveis de atividade enzimática da glicose 6-fosfato desidrogenase em crianças, no Laboratório Escola da Universidade Federal do Paraná

FURMAN*, A.E.F¹; HENNEBERG, R.¹; NASCIMENTO, A.J.²; SILVA, P.H.³

¹ Laboratório-Escola de Análises Clínicas, UFPR

² Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR

³ Laboratório de Citologia e Hematologia, UFPR

RESUMO - O objetivo do trabalho foi estabelecer média, desvio padrão e intervalo de referência da atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) em crianças saudáveis atendidas no Laboratório Escola da Universidade Federal do Paraná. Foram analisadas amostras de 100 crianças (9 a 11 anos) consideradas normais após análise do hemograma e eletroforese de hemoglobinas. A atividade enzimática foi determinada quantitativamente nas hemácias utilizando-se os reagentes do kit G6-PD da Randox, em analisador automático Cobas Mira (Roche). A média da atividade da G6-PD em crianças foi de $6,16 \pm 1,14$ U/g Hb, e o valor de referência estabelecido foi de 3,84 a 8,51 U/g Hb. O intervalo de referência encontrado foi menor do que os valores estabelecidos na bula do kit.

Palavras-chaves: Glucosefosfato Desidrogenase. Valores de Referência. Criança.

INTRODUÇÃO

A enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) fornece aos eritrócitos proteção crucial contra o dano oxidativo. A enzima converte glicose 6-fosfato em 6-fosfogluconato, com conversão acoplada de NAD a NADPH. Essa reação é a única fonte de NADPH no eritrócito, que é necessário para um grande número de reações metabólicas redutoras, incluindo a regeneração da hemoglobina oxidada, através da enzima metahemoglobina redutase, a redução da glutathiona oxidada, através da enzima glutathiona redutase e finalmente, a conversão do H_2O_2 a H_2O através da enzima glutathiona peroxidase ⁽¹⁾.

A descrição da deficiência da G6-PD deu-se a partir das investigações dos efeitos hemolíticos da droga primaquina, utilizada em pacientes com malária. Esses estudos foram realizados na década de 50 ^(2,3) e definiu a deficiência de G6-PD como sendo uma deficiência enzimática e hereditária que afeta os eritrócitos. Mostrou-se, também, que a doença é mais prevalente em indivíduos da África, Mediterrâneo e de origem asiática, mas pode ser encontrada em qualquer população. A forma mais comum da doença está associada com anemia hemolítica em determinadas condições de estresse, tais como a administração de drogas oxidantes, processos infecciosos e período neonatal. É a doença enzimática eritrocitária mais comum: a prevalência global é estimada em 4.9%, o que significa cerca de 330 milhões de pessoas afetadas ⁽⁴⁾.

A enzima normal ou o tipo selvagem é designado pela sigla G6-PD B. A Organização Mundial de Saúde classifica a deficiência da G6-PD em 5 classes variantes, baseadas na atividade enzimática e nas manifestações clínicas ⁽⁵⁾. A classe I inclui os pacientes que apresentam deficiência enzimática severa e anemia hemolítica crônica. Os pacientes com deficiência enzimática severa - mas com hemólise intermitente - pertencem à classe II. Os da classe III possuem deficiência enzimática moderada, com hemólise intermitente associada a medicamentos e drogas. Os pacientes da classe IV são mutantes para G6-PD, mas não tem deficiência enzimática e nem hemólise. Os da classe

V apresentam uma concentração aumentada da enzima. Tanto os pacientes da classe IV como a V são assintomáticos.

A fisiopatologia da deficiência de G6-PD está correlacionada com o tempo de meia-vida da enzima, que em situações fisiológicas é de 62 dias ⁽⁶⁾ e garante a produção de NADPH para o tempo de meia-vida do eritrócito. O tempo de meia-vida da enzima, quando deficiente, é de apenas 13 dias ⁽⁶⁾, o que não garante o suprimento de NADPH necessário para a meia-vida eritrocitária. Na medida em que a concentração de NADPH diminui, caem também os níveis de GSH e estabelece-se um quadro de estresse oxidativo, com degradação da hemoglobina em hemicromos ou subprodutos do grupo heme, e a precipitação da globina oxidada sob a forma de corpos de Heinz na membrana, tornando o eritrócito rígido e sem maleabilidade ⁽⁷⁾. A consequência desta alteração é a fagocitose pelo sistema mononuclear fagocitário, caracterizando o quadro de hemólise. Os corpos de Heinz formam-se durante os episódios de hemólise e não são revelados pelos corantes hematológicos, podendo ser pesquisados por coloração supravital com metilvioleta ⁽⁸⁾.

Os pacientes são sintomáticos somente nos episódios de crise de hemólise e durante estas crises a hemoglobina pode cair entre 3 e 4 g/dl ⁽⁷⁾. A anemia que se instala é normocítica e normocrômica, com policromatofilia, esferócitos e corpos de Heinz. Pode ocorrer hemólise intravascular com presença de hemoglobinúria e hemosiderinúria ⁽⁷⁾. O quadro de hemólise inicia entre 2 a 4 dias após a ingestão ou presença do agente oxidante, e a reticulocitose está presente após o quinto dia de exposição, atingindo seu pico máximo entre o sétimo e o décimo dia ⁽⁶⁾. O diagnóstico laboratorial definitivo é a dosagem da enzima G6-PD, já que a presença de corpos de Heinz não é exclusiva desta deficiência.

Na associação da deficiência de G6-PD com hemoglobinopatias, a indução de uma crise hemolítica gera um quadro desastroso, uma vez que esses pacientes já apresentam uma predisposição ao estresse oxidativo. Portanto, principalmente nesses pacientes, o diagnóstico da deficiência enzimática é de grande importância para o clínico.

O diagnóstico da deficiência enzimática é realizado através da determinação quantitativa da atividade da enzima G6-PD. Para isso, o laboratório necessita adotar um intervalo de referência adequado a sua

população. A bula do kit utilizado não especifica a idade, sexo, nem localização geográfica da população utilizada para definir seu intervalo de referência. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi estabelecer os valores de referência para a população atendida pelo Laboratório Escola de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

MÉTODO

Foram coletadas amostras de sangue de 60 crianças saudáveis com idade variando entre 9 e 11 anos, de vários grupos étnicos, no período de tempo compreendido entre outubro e dezembro de 2011. As amostras foram coletadas em anticoagulante EDTA K₃. Foram realizados hemograma (T-890, Coulter, EUA) e eletroforese alcalina de hemoglobina. Como critérios de inclusão, foram definidos hemograma e eletroforese de hemoglobina normal.

Para a dosagem da atividade enzimática foi utilizado o teste quantitativo para determinação de G6-PD da Randox (Randox Laboratories, Crumlin, UK) em analisador automático Cobas Mira (Roche Diagnostics, Suíça). O método baseia-se na redução do NADP⁺ pela enzima G6-PD presente nos eritrócitos. O NADPH formado gera fluorescência sob luz ultravioleta a 340 nm diretamente proporcional à atividade enzimática. A atividade encontrada pelo analisador foi dividida pela concentração de hemoglobina da amostra (g/l), resultando em U/g Hb. Foram utilizados controles normais e deficientes, fornecidos pela Randox.

O projeto foi registrado na Pró-reitoria de Extensão e Cultura (PROEC) da Universidade Federal do Paraná sob o número 472/08 e a amostra foi coletada após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos participantes do projeto ou por seus responsáveis.

O cálculo da média, desvio padrão, percentis acumulados e o teste de normalidade foram realizados no programa Prism 5 (GraphPad, Inc). A significância estatística foi estabelecida para $p < 0,05$.

RESULTADOS

O valor médio encontrado para a atividade da G6-PD em crianças foi $6,16 \pm 1,14$ U/g Hb. O intervalo de referência estabelecido foi de 3,84 a 8,51 U/g Hb, para percentis acumulados de 2,5 a 97,5%. O teste de normalidade “D'Agostino & Pearson omnibus” para a amostra estudada mostrou distribuição gaussiana ($p=0,4704$) (Tab 1).

Número de valores	100
Mínimo	3,81
Percentil 25%	5,33
Mediana	6,15
Percentil 75%	6,77
Máximo	8,62
Percentil 2.5%	3,84
Percentil 97.5%	8,51
Média	6,16
Desvio Padrão	1,14
Desvio Padrão da Média	0,114
Valor mínimo 95% CI da média	5,93
Valor máximo 95% CI da média	6,38
D'Agostino & Pearson omnibus - teste de normalidade	
K2	1,51
Valor de P	0,4704
Passa no teste de normalidade ($\alpha=0.05$)?	Sim

Tabela 1. Tabulação dos resultados obtidos pelo programa GraphPad Prism.

DISCUSSÃO

A dosagem quantitativa da atividade da G6-PD realiza o diagnóstico definitivo da deficiência enzimática, sendo, portanto, um exame laboratorial muito importante no esclarecimento de anemias hemolíticas agudas, icterícia neonatal ou anemias hemolíticas não esferocíticas crônicas. A metodologia utilizada, após padronização, mostrou-se simples e reprodutível. Porém, os

valores de referência encontrados na literatura são muito divergentes.

Segundo o International Committee for Standardization in Haematology⁽⁹⁾, o valor de referência da atividade da enzima em adultos é de $8,83 \pm 1,59$ U/g Hb. Greer *et al.*⁽¹⁰⁾ relatam valores até três vezes maiores como sendo normais. Aliado a isso, a atividade da enzima varia conforme a idade. Os recém-natos têm valores cerca de 150% maiores do que em adultos⁽¹¹⁾.

A fabricante do kit recomenda que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência em relação à idade, sexo, regime alimentar e localização geográfica da população atendida. Outros autores fazem a mesma recomendação⁽⁸⁾. Essa informação é realmente muito relevante, já que utilizando o intervalo de referência do fabricante⁽¹²⁾, muitos de nossos pacientes seriam enquadrados como deficientes. Os valores de atividade da G6-PD em crianças encontrados nesse trabalho são bem semelhantes aos encontrados por Muller⁽¹³⁾, que avaliou a atividade da enzima em 201 crianças de duas creches da cidade de São Paulo.

O quadro 1 mostra alguns valores de referência para a atividade da G6-PD encontrados na literatura:

Valor de referência	Idade
8.83 ± 1.59 U/g Hb ⁽⁹⁾	Adultos
24.8 ± 9.8 (N=10) U/g Hb ⁽¹⁰⁾	Adultos
45.2 ± 8.7 (N=10) U/g Hb ⁽¹⁰⁾	Recém nato
66.8 ± 34.8 (N=11) U/g Hb ⁽¹⁰⁾	Prematuro
6.97 a 20.5 U/g Hb ⁽¹²⁾	Não se refere à idade
4.49 ± 1.38 (N=201) U/g Hb ⁽¹³⁾	18 meses a 13 anos
12.1 ± 2.09 U/g Hb ⁽¹⁴⁾	Não se refere à idade

Quadro 1. Alguns valores de referência para a G6-PD encontrados na literatura.

CONCLUSÃO

A média de atividade da enzima G6-PD nas crianças analisadas foi de 6,16 U/g Hb, com um desvio padrão de 1,14. O valor de corte em crianças foi de 3,84 U/g Hb. Valores abaixo deste podem ser considerados deficientes para a população estudada. Devido à grande discrepância entre os intervalos de referência encontrados na literatura, sugere-se que cada laboratório estabeleça o valor de corte para a população atendida.

Glucose 6-phosphate dehydrogenase activity levels in children, in School Laboratory of Universidade Federal do Paraná

FURMAN*, A.E.F¹; HENNEBERG, R.¹; NASCIMENTO, A.J.²; SILVA, P.H.³

¹ Laboratório-Escola de Análises Clínicas, UFPR

² Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR

³ Laboratório de Citologia e Hematologia, UFPR

ABSTRACT: In order to establish mean, standard error and threshold inferior values for glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6-PD) in healthy children in School Laboratory of Universidade Federal do Paraná, blood sample was analyzed from 100 children aging from 9 to 11 years old, considered normal based on hemogram and hemoglobin electrophoresis. The method for G6-PD measurement was the quantitative G6-PD Randox kit, in Cobas Mira analyser. Mean activity of G6-PD in children was 6.16 ± 1.14 U/g Hb, and reference values was 3.84 a 8.51 U/g Hb. In conclusion, the reference range was found to be lower than the values established in the kit label.

Keywords: Glucosephosphate Dehydrogenase. Reference values. Child.

REFERÊNCIAS

1. Bridges KR, Pearson HA. Anemias and other red cell disorders. New York: Mac Graw Hill, 2008.
2. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood*. 1994; 84:3613.
3. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A historical perspective. *Blood*. 2008; 111:16.
4. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A systematic review and meta-analysis. *Blood Cell Mol Dis*. 2009; 42:267.
5. WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ*. 1989; 67:601.
6. Greer JP, Foerster J, Lukens JN. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2004. 2800p.
7. Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. *Clinical Hematology principles, procedures, correlations*. 2nd ed. New York: Lippincott, 1998. 848p.
8. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. *Hematologia Prática de Dacie e Lewis*. 9^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 571p.
9. International Committee for Standardization in Haematology. Recommended methods for red-cell enzyme analysis. *British Journal of Haematology*, 1977; 35:331.
10. Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, Means RT. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2009. 3232p.
11. Oski FA. Red cell metabolism in the newborn infant: V. Glycolytic intermediates and glycolytic enzymes. *Pediatrics*. 1969; 44:84-91.
12. Glicose 6-fosfato desidrogenase. Gisele Pedrosa Barros. São Paulo: Randox Brasil, 2010. Bula de kit.
13. Muller R. Use of a simplified spectrophotometric method for quantitative determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in normal children from two day-care centers of the city of São Paulo. *Einstein*, 2003; 1:89-94.
14. Oliveira RAG, Neto AP. *Anemias e Leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais*. São Paulo: Roca; 2004. 436p.