

Associação de metemoglobinemia e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária tratados com primaquina

Association of methemoglobinemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria patients treated with primaquine

Marli Stela Santana^{1,2}, Marcos Antonio Ferreira da Rocha¹, Ana Ruth Lima Arcaño^{1,2}, José Felipe Jardim Sardinha^{1,2}, Wilson Duarte Alecrim¹ e Maria das Graças Costa Alecrim^{1,2,3}

RESUMO

Este estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de metemoglobinemia em indivíduos deficientes da glicose-6-fosfato desidrogenase durante o tratamento da infecção malárica com primaquina. Foram selecionados pacientes com diagnóstico para malária por Plasmodium vivax ou mista V+F (Plasmodium vivax + Plasmodium falciparum), Grupo 1: com 74 indivíduos com diagnóstico clínico de metemoglobinemia e Grupo 2: 161 indivíduos sem diagnóstico clínico de metemoglobinemia. Quanto à deficiência da G6PD, nos Grupos 1 e 2, houveram 51,3% (38) e 8,7% (14) de indivíduos enzimpênicos, respectivamente, demonstrando através de tais dados, significância estatística na associação com a metemoglobinemia somente nos indivíduos do Grupo 1 (p<0,05). A comparação da relação da metemoglobinemia à deficiência da G6PD mostrou haver uma possível associação de indivíduos enzimpênicos desenvolverem metemoglobinemia com maior frequência.

Palavras-chaves: Metemoglobinemia. Deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase. Malária.

ABSTRACT

This study had the aim of investigating occurrences of methemoglobinemia among individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency during treatment for malaria infection using primaquine. Patients with a diagnosis of malaria caused by Plasmodium vivax or the V+F mixture (Plasmodium vivax + Plasmodium falciparum) were selected. Group 1 consisted of 74 individuals with a clinical diagnosis of methemoglobinemia and Group 2 consisted of 161 individuals without a clinical diagnosis of methemoglobinemia. The glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency rates (numbers of enzymopenic individuals) in Groups 1 and 2 were 51.3% (38) and 8.7% (14) respectively. These data demonstrated a statistically significant association with methemoglobinemia only among the individuals in Group 1 (p<0.05). Investigation of the relationship between methemoglobinemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency showed that there was a possible association such that enzymopenic individuals may develop methemoglobinemia more frequently.

Key-words: Methemoglobinemia. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Malaria.

Cerca de 350 a 500 milhões de novos casos de malária ocorrem anualmente nas áreas tropicais e subtropicais do globo, sendo a maioria destas infecções causadas pelo *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*³³. No Brasil, aproximadamente 99,5% dos casos de malária ocorrem na região Amazônica, cujas áreas de maior transmissão são aquelas onde há condições precárias de habitação e trabalho, e encontram-se próximas a florestas e a coleções de água²³.

A primaquina é a única droga antimalárica efetiva contra as formas exoeritrocitárias das quatro espécies de *Plasmodium* capazes de infectar o homem, assim como efetuar cura radical, eliminando as formas latentes teciduais da infecção pelo *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*¹⁴. Apesar de sua efetividade, muitas reações adversas têm sido relatadas que incluem desordens gastrointestinais, leucopenia, desenvolvimento de metemoglobinemia com cianose e anemia hemolítica em

1. Gerência de Malária, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus, AM. 2. Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM. 3. Centro Universitário Nilton Lins, Manaus, AM.

Apoio: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

Endereço para correspondência: Dr^a Marli Stela Santana Maciel. Gerência de Malária/FMTAM. Av. Pedro Teixeira 25, Bairro D. Pedro I, 69040-000 Manaus, AM.

Tel: 55 92 2127-1243

e-mail: marli.maciel@uol.com.br

Recebido para publicação em: 24/04/2007

Aceito em: 20/08/2007

indivíduos com deficiência hereditária da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Portanto, é contra-indicada para gestantes e indivíduos deficientes da G6PD³¹.

Metemoglobinemia refere-se à oxidação do ferro da hemoglobina em estado ferroso (Fe⁺⁺) ao estado férrico (Fe⁺⁺⁺), impedindo desta forma a hematose²². Os eritrócitos contêm uma taxa normal de metemoglobina (1-2%), mantida por mecanismos redutores fisiológicos, resultantes da oxidação espontânea. No entanto, a presença de metemoglobina em quantidades elevadas torna-se incompatível com a vida³⁴. Há um grande número de agentes capazes de produzir a metemoglobina, como as aminoquinolinas, nitritos, cloratos, fenacetina, acetanilida, sulfanilamida, nitrobenzeno, anilina¹⁰, assim como compostos endógenos, nitratos, nitritos e óxido nítrico^{21 30}. Outros fatores podem ser associados à metemoglobinemia: acidose metabólica, principalmente em infantes^{16 27 36}; deficiência enzimática da citocromo-*b* 5 redutase, citocromo *b*-5, NADPH-MHb redutase^{19 20}, e a hemoglobina M ainda pode apresentar um grupo de moléculas de hemoglobina anormais²⁰.

A toxicidade da primaquina, em relação ao seu efeito hemolítico e promoção da condição de metemoglobinemia, foi primeiramente estudada em caucasóides e negros em 1952^{8 17}. Fletcher e cols¹³ relataram elevação dos níveis de metemoglobina em 30 indivíduos caucasóides após um regime diário de 15mg de primaquina, durante 14 dias, numa média de 6%, que também foi observada em 151 indivíduos que receberam 30mg diárias num período de 20-52 semanas³. O propósito deste estudo foi verificar a associação entre metemoglobinemia e deficiência da G6PD durante o tratamento da infecção malárica com primaquina.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes. O estudo foi conduzido na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM), Manaus, Amazonas - Brasil, onde foram selecionados pacientes da demanda espontânea de atendimento da Gerência de Malária, com diagnóstico para malária *vivax* ou mista V+F (*vivax* + *falciparum*) e da unidade hospitalar "Dr. Nelson Antunes", após concordarem com o termo de consentimento livre e esclarecido. Dois grupos de indivíduos foram recrutados: Grupo 1: 74 indivíduos com diagnóstico clínico de metemoglobinemia, em tratamento com primaquina, dentre os quais 73 com malária *vivax* e 1 com malária mista; Grupo 2: 161 indivíduos sem diagnóstico clínico de metemoglobinemia, em tratamento com primaquina (D10), dentre os quais 158 com malária *vivax* e 3 com malária mista. O critério de diagnóstico clínico de metemoglobinemia seguiu os sinais e sintomas: cianose, cefaléia, tontura, dispnéia, torpor, depressão respiratória e sangue cor de chocolate^{28 34}.

Obtenção de amostras e métodos de laboratório. Foram coletadas amostras de sangue por punção venosa de cada indivíduo: 4,5mL em tubo contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para dosagem da hemoglobina, contagem de reticulócitos, com procedimentos realizados usando-se um contador Coulter (modelo STKS) e dosagem da metemoglobina pela técnica descrita

por Evelyn e Malloy¹², porém modificada por Naoum²⁶; 4mL em tubo com gel para dosagem da bilirrubina indireta, utilizando-se aparelho DADE Behring (modelo Dimension AR) e 6mL em tubo com ACD (ácido citrato dextrose) para a dosagem qualitativa da G6PD. A atividade da G6PD foi avaliada através do teste de redução da metemoglobina, descrita por Brewer e cols⁵.

Análise estatística. Utilizou-se o teste de Spearman²⁹ para verificar a correlação entre os níveis de metemoglobina e de hemoglobina. Houve busca de associações estatísticas entre a metemoglobinemia e as demais variáveis, usando os testes: qui-quadrado, exato de Fisher e Kruskal-Wallis. Também foram utilizadas medidas de força da associação - risco relativo (RR) e *odds ratio* (OR), com utilização da tabela 2X2 simples - entre metemoglobinemia/não - metemoglobinemia e deficiência da G6PD/não - deficiência. As análises estatísticas foram realizadas em nível de significância de 5% ($p < 0,05$), intervalo de confiança de 95% e processadas com auxílio dos softwares Epi-Info versão 6.04d⁷ e MINITAB versão 13²⁴.

RESULTADOS

Foram analisadas amostras de 235 indivíduos, compondo os dois grupos de estudo (Tabela 1). Os níveis de metemoglobina estiveram elevados em todos os indivíduos do Grupo 1, alcançando média de 11,1%, tendo todos os indivíduos apresentado cianose. Após comparação da média do nível de metemoglobina sanguínea do Grupo 1, foi significativamente mais elevada que no Grupo 2 ($p < 0,05$). Em 20% dos indivíduos com metemoglobinemia, apresentando menos que 8g/dL, a metemoglobina apresentou-se em níveis acima de 10%, havendo moderada correlação positiva na combinação de indivíduos com metemoglobinemia e suas respectivas taxas de hemoglobina ($r = 0,54$). O número de reticulócitos esteve aumentado em 92% dos 74 indivíduos do Grupo 1 e a bilirrubina indireta aumentada de forma significativa nos indivíduos que eram deficientes da G6PD, havendo significância na relação destas variáveis com a metemoglobinemia ($p < 0,05$). A diminuição dos valores do hematócrito e hemoglobina, quando relacionada à metemoglobinemia também apresentou significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Características dos grupos de estudo.

	Grupo 1 (74)*	Grupo 2 (161)*
Idade (anos)**	23 (3-67)	39,3 (4-77)
Sexo (%)	masc (81,1)/fem (18,9)	masc (68,9)/fem (31,1)
Espécie de malária (%)	V (98,6)/M (1,4)	V (98,1)/M (1,9)
Hemoglobina (g/dL)**	9 (4,4-15,2)	11,7 (6,7-15,5)
Reticulócitos (%)**	5,3 (1,5-15)	2,4 (0,4-13,8)
Bilirrubina Indireta (mg/dL)**	1,6 (0,08-9,5)	0,6 (0,09-6,6)
Metemoglobina (%)**	11,1 (2,3-38)	1,8 (0,4-5)
G6PD deficiente (%)	51,3 (38)	8,7 (14)

*número de indivíduos incluídos em cada grupo

** média (escala entre parênteses)

masc: masculino, fem: feminino

V: malária *vivax*

M: malária mista (*vivax* + *falciparum*)

Quanto à deficiência da G6PD, nos Grupos 1 e 2 (Figura 1), houve 38 e 14 indivíduos enzimpopênicos, respectivamente, demonstrando através de tais dados, significância estatística na associação com a metemoglobinemia somente nos indivíduos do Grupo 1 ($p < 0,05$). Os indivíduos com deficiência da G6PD apresentaram um *odds ratio* de 11,8 para metemoglobinemia, quando comparados com os que não eram deficientes. Os indivíduos com deficiência da G6PD apresentaram risco para metemoglobinemia 3,71 vezes maior do que os não deficientes. No momento da inclusão e análise dos indivíduos, não foram relatadas quaisquer evidências de associação da clínica de metemoglobinemia à infecção pelo *Plasmodium*.

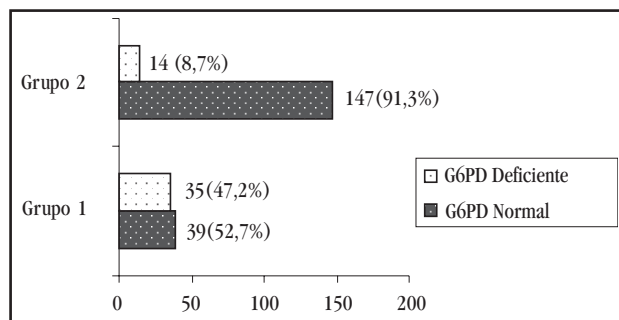


Figura 1 - Frequência de indivíduos que apresentaram deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase.

DISCUSSÃO

A metemoglobinemia aguda, embora rara, pode tornar-se uma complicação potencialmente fatal, se atingir níveis acima de 70%³⁴. Todos os agentes potencialmente causadores devem ser suspensos imediatamente. No entanto, freqüentemente, o agente metemoglobinizante pode não ser prontamente identificado.

Estudos têm demonstrado a toxicidade da primaquina, que dentre uma variedade de efeitos adversos encontram-se a formação de metemoglobina e anemia hemolítica em indivíduos suscetíveis. Muitos esforços em substituir a primaquina por antimaláricos análogos em seu efeito gametocida e hipnozoicida, têm sido desprendidos por mais de quatro décadas. Anstey e cols² demonstraram que a ingestão de cloroquina não é capaz de promover a elevação dos níveis de metemoglobina, podendo, no entanto, haver aumento significativo durante a infecção por *Plasmodium*, no caso da malária em seus padrões de gravidade³². Radicais oxidantes gerados em hemácias parasitadas também podem causar a elevação dos níveis de metemoglobina. Um estudo *in vitro* demonstrou haver elevação dos níveis de metemoglobina em hemácias parasitadas pelo *Plasmodium falciparum*¹⁵. O fato dos sujeitos desta pesquisa serem indivíduos com malária não interferiu nos resultados relacionados à metemoglobina circulante, pois nenhum destes apresentou malária grave.

Neste trabalho, a verificação da relação da metemoglobinemia e deficiência da G6PD mostrou haver uma possível associação de indivíduos enzimpopênicos serem mais susceptíveis ao desenvolvimento de metemoglobinemia ($p < 0,05$). Em relação à verificação de risco para a metemoglobinemia, encontrou-se uma forte associação entre essa condição clínica e a deficiência da G6PD, como a maioria da literatura aponta^{6,9,35}. Por outro lado, cabe

ressaltar que apesar de apresentarem clínica de metemoglobinemia, nem todos os indivíduos do Grupo 1 tiveram seus níveis de metemoglobina acima da concentração mínima esperada, relatada na literatura científica, para início das manifestações clínicas, ou seja, valores acima de 15%³⁴. Observou-se que na presença de nível de metemoglobina três vezes acima do normalmente circulante (2,3% de metemoglobina num indivíduo com taxa normal de 0,5%) há possibilidade de ocorrer a uma condição de metemoglobinemia clínica. Há, no entanto, necessidade de investigar a possibilidade de fatores não inerentes à toxicidade da primaquina estarem envolvidos, como fatores fisiológicos e genéticos.

A triagem da deficiência da G6PD realizada pelo método de Brewer⁵ pode ter limitado a freqüência de indivíduos enzimpopênicos, principalmente nos indivíduos do Grupo 1, visto que a aplicação do mesmo em condição de reticulocitose pode interferir no diagnóstico da deficiência da G6PD, pois os reticulócitos são ricos em G6PD²⁵, podendo apresentar um resultado de falsa atividade da G6PD. O mesmo resultado pode ter ocorrido nos indivíduos transfundidos com hemácias de atividade normal, após crise hemolítica, que foi o caso de alguns indivíduos do Grupo 1.

Em relação à hiperbilirrubinemia indireta encontrada nos indivíduos do presente estudo, representa um achado importante, quando associado à metemoglobinemia. Resultados de uma investigação realizada em neonatos demonstraram que a intensa formação de óxido nítrico, liberação de ferritina - ferrosa (Fe^{+2}) e acúmulo de metemoglobina no sangue intensificam o estresse oxidativo, levando a uma fragilidade da membrana dos eritrócitos, induzindo hemólise e tendo como principal consequência, uma condição clínica de hiperbilirrubinemia¹.

Dados importantes da literatura têm demonstrado que a deficiência da G6PD também deve ser considerada quando relacionada a outros fatores hereditários como a mutação no gene codificador uridinodifosfoglucuronato glucuronosiltransferase 1 (UDPGT1) afetada na síndrome de Gilbert, diante de um processo de estresse oxidativo, quando há maior risco de ocorrência de hiperbilirrubinemia grave^{4,11,18}.

Quanto aos indivíduos do Grupo 2, não ocorreram alterações significativas, nem mesmo naqueles que eram deficientes enzimáticos, quando tratados com primaquina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todos que cooperaram na execução desta produção científica, à Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM), através da Gerência de Malária e Programa de Apoio à Iniciação Científica (PAIC), que atuou como entidade executora e financiadora, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Abzhadadze Ttu, Kvezereli-Kopadze AN, Dzhaparidze ESh, Tkhilava NG, Sanikidze TV. The role of oxidative metabolism in pathogenesis of hyperbilirrubinemia in infants. Georgian Medical News 136:77-80, 2006.

2. Anstey NM, Hassanali MY, Mlasi J, Manyenga D, Mwaikambo ED. Elevated levels of methaemoglobin in Tanzania children with severe and uncomplicated malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90: 147-151, 1996.
3. Baird JH, Fryauff DJ, Hoffman SL. Primaquine for prevention of malaria in travelers. *Clinical Infection Disease*, 37:1659-1667, 2003.
4. Beutler E, Gelbart T, Miller W. Severe jaundice in a patient with a previously undescribed glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutation and Gilbert syndrome. *Blood Cells Molecules and Diseases* 28:104-107, 2002.
5. Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. The methemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. A simplified procedure for detecting a specific hypersusceptibility to drug hemolysis. *Journal of American Medicine Association* 180: 386-388, 1962.
6. Browning LA, Kruse JA. Hemolysis and methemoglobinemia secondary to rasburicase administration. *The Annals of Pharmacotherapy* 39:1932-1935, 2005.
7. Centers for Disease Control & Prevention. Epi-Info version 6.04d. CDC, Atlanta, 2001.
8. Clayman CB, Arnold J, Hockwald RS, Yount Jr EH, Edgcomb JH, Alving AS. Toxicity of primaquina in Caucasians. *Journal of the American Medical Informatics Association* 149:1563-1568, 1952.
9. Coleman MD, Coleman NA. Drug-induced methaemoglobinemia. Treatment issues. *Drug Safety: an International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience* 14:394-405, 1996.
10. Coleman MD, Coleman NA. Drug-induced methaemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management. *Annals of Emergency Medicine* 34:646-656, 1999.
11. Edwards CQ. Anemia and the liver. Hepatobiliary manifestations of anemia. *Clinics in Liver Disease* 6:891-907, 2002.
12. Evelyn KA, Malloy HT. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *Journal of Biological Chemistry* 126:655-657, 1938.
13. Fletcher KA, Evans DA, Gilles HM, Greaves J, Bunnag D, Harinasuta T. Studies on the pharmacokinetics of primaquine. *Bull World Health Organization* 59:407-412, 1981.
14. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Terapêutica da Malária. Vigilância Epidemiológica, Brasília 12: 30-33, 2001.
15. Golenser J, Kamil M, Tsafack A, Marva E, Cohen A, Kitrossky N, Chevion M. Correlation between destruction of malarial parasites by polymorphonuclear leucocytes and oxidative stress. *Free Radical Research Communication* 17:249-262, 1992.
16. Hjelt K, Lund JT, Scherling B, Bendixen S, Lundstrom K, Stovring S, Voldsgaard P, Linnet K. Methemoglobinemia among neonates in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatrica* 84:365-370, 1995.
17. Hockwald RS, Arnold J, Clayman CB, Alving MD. Toxicity of primaquine to negroes. *Journal of American Medicine Association* 149:1568-1570, 1952.
18. Huang CS, Huang MJ, Lin MS, Yang SS, Teng HC, Tang KS. Genetic factors related to unconjugated hyperbilirubinemia amongst adults. *Pharmacogenetics and Genomics* 15:43-50, 2005.
19. Jaffe ER. Enzymopenic hereditary methemoglobinemia: a clinical/biochemical classification. *Blood Cells* 12:81-90, 1986.
20. Jaffe ER, Hultquist DE. Cytochrome b5 Redutase Deficiency and Enzymopenic Hereditary Methemoglobinemia. *In: Scriver CR, Beaudet AB, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic Basis of Inherited Disease*, McGraw Hill, New York, p.2267-2280, 1989.
21. Lukens JN. Metemoglobinemia e Outros Distúrbios Acompanhados por Cianose. *In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN (eds) Wintrobe Hematologia Clínica, 1ª edição*, Manole, São Paulo, p.1386-1395, 1998.
22. Mansouri A, Lurie AA. Concise review. Methemoglobinemia. *American Journal of Hematology* 42:7-12, 1993.
23. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Disponível na URL: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf, Acessado em 20 de fevereiro de 2007. Brasília, 2005.
24. Meet Minitab. MINITAB, INC. Release 13 for Windows. State College, PA, 2000.
25. Miyazono Y, Hirono A, Miyamoto Y, Miwa S. Erythrocyte enzyme activities in cord blood of extremely low-birth-weight infants. *American Journal of Hematology* 62:88-92, 1999.
26. Naoum PC. Eletroforese, Técnicas e Interpretação. 2ª edição, Editora Santos, São Paulo, p.89-91, 1999.
27. Pollack ES, Pollack Jr V. Incidence of subclinical methemoglobinemia in infants with diarrhea. *Annals Emergency of Medicine* 24:652-656, 1994.
28. Rodriguez LF, Smolik LM, Zbehlík AJ. Benzocaine-induced methemoglobinemia: report of a severe reaction and review of the literature. *Annals of Pharmacotherapy* 28:643-649, 1994.
29. Sachs L. The comparison of independent data. *In: Sachs L (ed) Applied Statistics A Handbook of Techniques*. 2nd edition, Verlag Spring, New York, p. 299-303, 1984.
30. Wennmalm A, Bentin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson A, Waagstein F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. *Circulation Research* 73:1121-1127, 1993.
31. World Health Organization. Practical chemotherapy of malaria. The technical report series 805. Geneva, p. 34-35, 1990.
32. World Health Organization. Management of Severe Malaria. A practical handbook, 2nd edition. Disponível na URL: http://who.int/malaria/docs/hbsm_toc.htm. Acessado em 20 de setembro de 2005. Geneva, 2000.
33. World Health Organization. Roll Back Malaria. World Malaria Report. Disponível na URL: <http://www.rbm.who.int/wmr2005/html>. Acesso em 20 fevereiro de 2007, 2005.
34. Wright R, Lewander W, Woolf A. Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management. *Annals of Emergency Medicine* 34:646-655, 1999.
35. Yang CC, Wu ML, Deng JE. Prolonged hemolysis and methemoglobinemia following organic copper fungicide ingestion. *Veterinary and Human Toxicology* 46:321-323, 2004.
36. Yano SS, Danish EH, Hsia YE. Transient methemoglobinemia with acidosis in infants. *Journal Pediatric* 100:415-418, 1982.