



## Comunicação/Communication

### Metemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* em uso oral de primaquina

Methemoglobinemia in patients with *Plasmodium vivax* receiving oral therapy with primaquine

Michelli Erica Souza Ferreira<sup>1</sup>, Margarete do Socorro Mendonça Gomes<sup>2</sup> e José Luiz Fernandes Vieira<sup>3</sup>

#### RESUMO

**Introdução:** A primaquina pode acarretar sérios eventos adversos, com destaque para a toxicidade ao sangue. O objetivo deste trabalho é determinar a metemoglobinemia de 20 pacientes com malária por *Plasmodium vivax* tratados com primaquina, comparando-os segundo o sexo e a expressão da glicose-6-fosfato desidrogenase. **Métodos:** Quantificação da metemoglobina por espectrofotometria visível e avaliação qualitativa da glicose-6-fosfato desidrogenase. **Resultados:** A metemoglobinemia variou de 2,85 a 5,45% nos pacientes do sexo masculino e de 3,77 a 7,34% no feminino. **Conclusões:** A instituição da terapia aumentou de maneira significativa os teores de metemoglobina, sem manifestação clínica evidente e independente do sexo e da atividade enzimática.

**Palavras-chaves:** Metemoglobina. Primaquina. Malária.

#### ABSTRACT

**Introduction:** Primaquine can produce adverse reactions as toxicity to blood when used in the treatment of vivax malaria. This work aimed to determine methemoglobinemia in patients with vivax malaria receiving oral therapy with primaquine. **Methods:** Spectrophotometric quantification of methemoglobinemia and qualitative assay for glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Results:** Methemoglobinemia ranged from 2.85 to 5.45% in male patients and 3.77 to 7.34% in female patients. **Conclusions:** A statistically significant increase in methemoglobinemia was observed following oral therapy with primaquine, with no clinical manifestations, and independent of sex and the qualitative expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase.

**Keywords:** Methemoglobinemia. Primaquine. Malaria.

A primaquina (8-(4-amino-1-metilpropilamino)-6-metoxiquinolona), é efetiva contras as formas exoeritrocitárias das espécies de *Plasmodium* capazes de infectar o homem<sup>1,2</sup>. Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido, mas se acredita que atue intercalando-se entre os pares de bases do DNA (ácido desoxirribonucleico), impedindo a replicação do material genético, ou através dos mecanismos de oxirredução, tanto na produção das espécies reativas de oxigênio, quanto na interferência no transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial<sup>1,3,4</sup>.

A primaquina nas doses terapêuticas empregadas é segura e bem tolerada. Dentre os principais eventos adversos se destaca a toxicidade ao sistema hematopoiético, cujos primeiros relatos dataram de 1952, em voluntários caucasianos e negroides<sup>5,6</sup>. A oxidação da hemoglobina à metemoglobina, após o uso do fármaco no tratamento da malária *vivax*, já foi descrita em diversos estudos clínicos, inclusive no Brasil<sup>7</sup>. Está associada tanto ao composto original, quanto a 6-metoxi-8-hidroxi-aminoquinolina, resultante da dealquilação e posterior hidroxilação da primaquina<sup>8</sup>. Outro efeito significativo é a anemia hemolítica nos indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, cuja severidade relaciona-se a dose administrada e a variante da enzima, e se deve a deficiência de NADPH, levando ao acúmulo de metemoglobina, estresse oxidativo e hemólise<sup>7,8</sup>.

A metemoglobinemia pode ser congênita ou adquirida. A primeira se manifesta sob duas formas distintas, a saber: tipo I, na qual há deficiência do gene responsável pela expressão da NADHcitocromo b5 redutase apenas nos eritrócitos e tipo II, na qual a deficiência desta enzima se distribui por vários tecidos. A forma adquirida resulta da exposição aos agentes oxidantes como nitratos, sulfonas dentre outros, ou seus produtos de biotransformação<sup>7</sup>.

O equilíbrio entre a formação e a redução da metemoglobina é mediado pela metemoglobina redutase ou diaforase I, NADH dependente, estabelecendo-se valor de referência entre 1 a 2%. Entretanto, quando os níveis dos oxidantes presentes no organismo exacerbam a capacidade deste sistema, é ativado a diaforase II, NADPH dependente<sup>9</sup>.

Ao se considerar a ausência de estudos no Brasil, referentes aos teores de metemoglobina, no decorrer do tratamento da malária *vivax*, este trabalho objetivou determinar os teores de metemoglobina durante o seguimento clínico e laboratorial de pacientes com malária *vivax*, em uso de primaquina, considerando o sexo e a expressão qualitativa da glicose-6-fosfato desidrogenase.

Foi realizado estudo prospectivo na Unidade Básica de Saúde Brasil Novo, Macapá-AP, no período de julho a setembro de 2009. Foram selecionados 20 pacientes com idade entre 15 a 60 anos, ambos os sexos, com diagnóstico positivo pelo exame da gota espessa, para malária por *P. vivax*, em tratamento com cloroquina 150mg base via oral em três dias, no primeiro 10mg/kg de peso, e 7,5mg/kg nos demais, obtendo-se dose total de 25mg/kg, associada a primaquina, sob a forma de fosfato, via oral contendo 15mg de substância base, na dose de 0,5mg/kg/dia por sete dias. O seguimento clínico-laboratorial foi de 35 dias<sup>1</sup>. Os pacientes que apresentaram agravamento do quadro, com insuficiência renal ou hepática, lesões graves que representaram risco à vida ou em tratamento para tuberculose, AIDS e neoplasias foram excluídos do estudo.

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 2. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 3. Laboratório de Toxicologia, Curso de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

**Endereço para Correspondência:** Prof. José Luiz Fernandes Vieira. Laboratório de Toxicologia/Faculdade de Farmácia/UFPA. Rua Augusto Corrêa 1, Campus Universitário do Guamá, 66075-110 Belém, PA.

Tel: 55 91 3201-7733.

e-mail: jvieira@ufpa.br

**Recebido para publicação em** 05/03/2010

**Aceito em** 13/07/2010

Foram realizadas quatro avaliações clínicas e laboratoriais, sendo a primeira para inclusão no estudo (D0), e três subsequentes, após três (D3), sete (D7) e quatorze (D14) dias da instituição da terapia. Procedeu-se ao preenchimento de formulário clínico-epidemiológico, contemplando as seguintes variáveis: sexo, parasitemia inicial e dose de antimaláricos instituída. A evolução clínica, os registros das reações adversas, a determinação da metemoglobinemia e a parasitemia foram realizadas em D0, D3, D7 e D14. Já a avaliação qualitativa da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase em D0.

As amostras de sangue, em volume de 2,5mL foram coletadas por punção venosa e transferidas para tubos de 3mL contendo EDTA como anticoagulante. Cerca de 1mL foi empregado para determinação dos índices hematimétricos em contador automático de células KX-21, Sysmex®. O restante, cerca 1,5mL, para quantificação da metemoglobina, empregando-se o método proposto por Hegesh cols<sup>9</sup>, que consiste na leitura da absorbância diferencial entre a quantidade de metemoglobina presente em relação a 100% de oxidação da hemoglobina, a qual é, a seguir convertida a cianometemoglobina<sup>9</sup>. A leitura das absorbâncias foi realizada em 632nm empregando-se espectrofotômetro (UV-visível, DR5000-HACH, HEXIS®). Os resultados foram expressos em porcentagem de metemoglobina. Para a avaliação qualitativa da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, foi empregado o procedimento proposto por Brewer cols<sup>10</sup>, que consiste na avaliação da redução da metemoglobina formada por ação do nitrito de sódio<sup>10</sup>.

Para comparação das variáveis avaliadas nos dois grupos foram utilizados a análise de variância e o teste t de Student, com auxílio do programa *Biostat 5.0*. O nível de significância aceito foi de 5%.

Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto obedeceu à resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, recebendo o número 093/09 CEP-ICS/UFPa.

Participaram do estudo 15 pacientes do sexo masculino, com idade média de  $34,6 \pm 15,26$  anos e parasitemia inicial média de  $1501 \pm 2917$ . E cinco do sexo feminino, com idade média de  $35,3 \pm 6,1$  e parasitemia inicial média de  $1782,60 \pm 9,1517$  (Tabela 1). Não foi observada diferença significativa na média da idade dos pacientes e na média geométrica da parasitemia inicial ( $p > 0,05$ ). O seguimento clínico e laboratorial demonstrou parasitemia negativa em todos os participantes a partir de D3.

Os índices hematimétricos encontraram-se no intervalo dos valores de normalidade para ambos os sexos no decorrer do seguimento (Tabela 1). A avaliação qualitativa da expressão da glicose-6-fosfato

desidrogenase apresentou resultados positivos em seis indivíduos do sexo masculino. Os principais efeitos adversos relatados em D3 foram tontura (40%) e cefaleia (90%), e em D7 apenas cefaleia (10%).

Após instituição da terapia, o teor de metemoglobina variou de  $2,85 \pm 1,13\%$  a  $5,45 \pm 2,73\%$  nos pacientes do sexo masculino e de  $3,77 \pm 2,31\%$  a  $7,34 \pm 2,99\%$  no feminino. Não foi observada diferença significativa entre os teores médios de metemoglobina dos indivíduos dos sexos masculino e feminino nos diversos dias de estudo ( $p > 0,05$ ). Contudo, a comparação da metemoglobinemia antes e após a instituição da terapia com primaquina demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

Ao se comparar os teores de metemoglobina dos indivíduos do sexo masculino, considerando a expressão qualitativa da glicose-6-fosfato desidrogenase, não foi observada diferença significativa entre os grupos nos diversos dias de estudo ( $p > 0,05$ ), os quais variaram de  $1,12 \pm 1,13\%$  a  $5,25 \pm 1,52\%$  naqueles com expressão normal da enzima e de  $2,90 \pm 1,53$  a  $5,76 \pm 1,67\%$  nos enzimpênicos. Por outro lado, a comparação dos teores de metemoglobina em ambos os grupos considerando a instituição da terapia demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3).

**TABELA 2 - Metemoglobinemia (%), expressa como média e desvio-padrão, nos diferentes dias de estudo, conforme o sexo do paciente.**

Sexo	n <sup>o</sup>	D0	D3	D7	D14	P valor*
Masculino	15	1,28 ± 0,99	3,89 ± 1,93	5,45 ± 2,73	2,85 ± 1,13	<0.001
Feminino	5	0,75 ± 0,32	4,98 ± 2,24	7,34 ± 2,99	3,77 ± 2,31	<0.01
P valor**		0.0955	0.1513	0.0900	0.1071	-

n<sup>o</sup>= número de indivíduos, D: dias de estudo, \*análise de variância, \*\*teste T de student.

**TABELA 3 - Teor de metemoglobina (%), expressa como média e desvio-padrão, nos diferentes dias de estudo, em pacientes do sexo masculino, considerando a presença ou ausência da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase.**

Expressão da G-6-PD	n <sup>o</sup>	D0	D3	D7	D14	P valor*
Normal	9	1,16 ± 3,87	3,98 ± 1,63	5,25 ± 1,52	1,12 ± 1,13	<0.05
Enzimpênico	6	1,47 ± 1,82	3,76 ± 1,54	5,76 ± 1,67	2,90 ± 1,53	<0.001
P valor**		0.2813	0.4196	0.3679	0.4234	

n<sup>o</sup>= número de indivíduos; D: dias de estudo, G-6-PD: glicose-6-fosfato desidrogenase, \*análise de variância, \*\*teste t de student.

A primaquina permanece como fármaco de escolha no tratamento da malária no Brasil, e na ausência de investimentos para síntese de novas moléculas é fundamental a monitorização de sua eficácia e dos eventos adversos. A parasitemia inicial e a idade média dos pacientes foram semelhantes, indicando a homogeneidade do grupo selecionado para estudo. Os índices hematimétricos demonstraram valores considerados normais, o que se associa à baixa parasitemia e o não agravamento do quadro nos participantes do estudo.

Ocorreu aumento significativo da metemoglobinemia dos participantes do estudo, em ambos os sexos, corroborando outros achados da literatura, os quais relataram teores médios de 5% a 18%<sup>11-13</sup>. Estudo realizado no Brasil, com pacientes com malária *vivax* ou mista, demonstrou metemoglobinemia média de 11,1%. A oxidação da hemoglobina foi autolimitada nos participantes deste estudo, o que pode estar associado à meia vida biológica do fármaco e de seu principal metabólito oxidante, cerca de 24h, os quais não se acumulam nos compartimentos orgânicos<sup>12,13</sup>. Tal achado ratifica estudos que indicaram que as taxas de metemoglobina induzidas por doses terapêuticas de primaquina são pequenas e toleráveis, sem sinais e sintomas de cianose nos indivíduos com

**TABELA 1 - Índices hematimétricos dos participantes do estudo, segundo o sexo, juntamente com os valores de normalidade.**

Eritrograma	n <sup>o</sup> =5 Mulher		n <sup>o</sup> =15 Homem	
	VR	X	VR	X
Eritrócito (milhões/mm <sup>3</sup> )	4,8	4,0 a 5,6	4,4	4,5 a 6,5
Hemoglobina (g/dl)	12,0	12 a 16	13,0	13 a 18
Hematócrito (%)	39,0	35 a 47	40,0	40 a 54
VCM (fl)	84,0	81 a 101	89,0	82 a 101
HCM (pg)	27,0	27 a 34	30,0	27 a 34
CHCM (%)	32,5	31,5 a 36	34,0	31,5 a 36

n<sup>o</sup>: número de indivíduos, VR: valor de referência, X: média, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

expressão genética normal das enzimas envolvidas na redução da hemoglobina, particularmente a diaforase I, bem como os riscos de metemoglobinemia não se associam a duração do tratamento<sup>9,11</sup>.

Neste sentido, não foram observados durante o seguimento clínico laboratorial dos participantes deste estudo sinais e sintomas associados à metemoglobinemia, pois os eventos adversos relatados nas avaliações clínicas, isto é, tontura e cefaléia, podem ser creditados tanto a manifestação da doença quanto ao uso da primaquina<sup>14</sup>.

Não foi observada diferença significativa no teor de metemoglobina entre os pacientes com deficiência da expressão da glicose-6-fosfato desidrogenase e normais, no decorrer do tratamento com primaquina, não corroborando achado prévio em estudo realizado no Brasil, no qual o teor de metemoglobina foi significativamente superiores nos indivíduos enzimopênicos. Tal discrepância de resultados pode estar associada tanto ao elevado número de indivíduos participantes do referido estudo, quando comparado a este, quanto à possibilidade de isoformas com atividade diferente da referida enzima, pela diversidade étnica dos grupos estudados. A ausência de correlação entre o teor de metemoglobina e a expressão enzimática corrobora estudo realizado na Colômbia, no qual foi demonstrada ausência de significância estatística na correlação entre a metemoglobinemia e a atividade qualitativa desta enzima, corroborando achados que demonstraram que apesar da metemoglobinemia ser um importante marcador de toxicidade sanguínea, pode não se correlacionar à resposta hemolítica nos pacientes enzimopênicos<sup>11,15</sup>.

Os resultados deste estudo permitiram concluir que o uso de primaquina elevou as taxas de metemoglobina nos pacientes com malária *vivax*, independente do sexo e da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, contudo sem manifestações clínicas significativas. Sugerem-se estudos adicionais para avaliação quantitativa da atividade desta enzima nos diversos grupos étnicos na Amazônia.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Manual de Terapêutica da Malária. 6ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001. p. 23-61.
2. Vale N, Nogueira F, Rosário VE, Gomes P, Moreira R. Primaquine dipeptide derivatives bearing an imidazolidin-4-one moiety at the N-terminus as potential antimalarial prodrugs. *Eur J Med Chem* 2009; 44:2506-2516.
3. Lopez-Antuñano FJ. Is primaquine useful and safe as true exo-erythrocytic merontocidal, hypnozoitocidal and gametocidal antimalarial drug? *Salud Publica Mex* 1999; 41:410-419.
4. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revised six decades after its discovery. *Eur J Med Chem* 2009; 44:937-953.
5. Clayman CB, Arnold J, Hockwald RS, Yount-Jr EH, Edgcomb JH, Alving AS. Toxicity of primaquine in Caucasians. *J Am Med Assoc* 1952; 149:1563-1568.
6. Hockwald RS, Arnold J, Clayman CB, Alving MD. Toxicity of primaquine to negroes. *J Am Med Assoc* 1952; 149:1568-1570.
7. Santana MS, Rocha MAF, Arcanjo ARL, Sardinha JFJ, Alecrim WD, Alecrim MGC. Associação de metemoglobinemia e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária tratados com primaquina. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:533-536.

8. Bolchoz LJC, Budinsky RA, Mcmillan DC, Jollow DJ. Primaquine-Induced Hemolytic Anemia: Formation and Hemotoxicity of the Arylhydroxylamine Metabolite 6-Methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297:509-515.
9. Hegesh E, Gruener RN, Cohen S, Bochkovsky R, Shuval HI. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. *Clin Chim Acta* 1970; 30:679-682.
10. Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. The methemoglobin Reduction test for primaquine-type sensitive of erythrocytes. *J Am Med Assoc* 1962; 180:386-388.
11. Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ. Primaquine: Report From CDC Expert Meeting on Malaria Chemoprophylaxis I. *Am J Trop Hyg* 2006; 65:402-415.
12. Fletcher KA, Evans DAP, Gilles HM, Greaves J, Bunnag D, Harinasuta T. Studies on the Pharmacokinetics of Primaquine. *J Public Health: Bull World Health Organ* 1981; 3:407-412.
13. Bangchand KN, Songsaeng W, Thanavibul A, Choroenlarp P, Karbwang J. Pharmacokinetics of Primaquine in G6PD deficient and G6PD normal patients with vivax malaria. *J Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1994; 88:220-222.
14. Krudsood S, Tangpukdee N, Wilairatana P, Phophak N, Baird K, Brittenham MG, et al. High-dose Primaquine Regimens Against Relapse of *Plasmodium vivax* Malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78:736-740.
15. Carmona-Fonseca J, Álvarez G, Maestre A. Methemoglobinemia and Adverse Events in *Plasmodium vivax* Malaria Patients Associated with High Doses of Primaquine Treatment. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80:188-193.