

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KELY FRANCINI RECHETZKI

VALORES DE NORMALIDADE DA METAHEMOGLOBINA EM CRIANÇAS

CURITIBA - 2011

KELY FRANCINI RECHETZKI

VALORES DE NORMALIDADE DA METAHEMOGLOBINA EM CRIANÇAS

Artigo apresentado como requisito para obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. MsC. Railson Henneberg

CURITIBA - 2011

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi estabelecer valores de referências para metemoglobina em crianças de 6 a 10 anos de idade. **Métodos:** A Concentração metemoglobina foi estudada pelo método descrito por Naoum *et al.*, 2004 [Naoum *et al.*, RBHH; 2004;19-22], em crianças clinicamente saudáveis. O método para determinação de metemoglobina não usa compostos químicos altamente tóxicos ou métodos enzimáticos caros, que o torna facilmente viável para uso na dosagem de rotina do laboratório. **Discussão:** O aumento da concentração da metehemoglobina em crianças pode ser explicada pela menor quantidade do co-fator citocromo b5 solúvel e da atividade diminuída da citocromo b5-redutase nos eritrocitos o que torna a população infantil particularmente susceptível ao desenvolvimento de metahemoglobinemia. **Resultados:** Os resultados obtidos mostraram valor de referência mais altos, de 3,61 a 6,44%, quando comparado com adultos normais (1,9 para 3,8%). **Conclusão:** Isso mostra que a concentração de metemoglobina normal em crianças é maior do que na população adulta normal.

Palavras chave: metemoglobina; metahemoglobinemia; valores de referências.

ABSTRACT

Objective: the aim of this work was to establish reference values for methemoglobin in children aging from 6 to 10 years old. Methods: methemoglobin concentration was studied using the method described by Naoum *et al.* [Naoum *et al.*, RBHH 2004;19-22], in clinically healthy children. The method for methemoglobin determination does not use either highly toxic chemical compounds or expensive enzymatic methods, which makes it easily feasible for use in routine laboratory dosage. Results: the results obtained showed higher reference value, from 3.61 to 6.44%, when compared with normal adults (1.9 to 3.8%). This shows that normal methemoglobin concentration in children is greater than in normal adult population. Discussion: increased concentration of methemoglobin in children can be explained by the smallest amount of soluble cofactor cytochrome b5 and lesser activity of the cytochrome b5 reductase in erythrocytes which makes children particularly susceptible to the development of methemoglobinemia. Conclusion: methemoglobin concentration in children is higher than in normal adult subjects thus, adult reference values cannot be used in interpretation of children methemoglobinemia.

Key words: Methemoglobina, methemoglobinemia, reference values

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1. Médias e valores de referência de parâmetros hematológicos e metahemoglobina em crianças com idade variando entre 6 a 10 anos 11
- Tabela 2. Médias e valores de referência de parâmetros hematológicos e metahemoglobina em adultos. 12
- Figura 1. Frequência de distribuição da porcentagem de metahemoglobina na população infantil estudada. 12

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3	RESULTADOS.....	10
4	DISCUSSÃO.....	12
5	REFERÊNCIAS.....	14

1 – INTRODUÇÃO

Durante a vida média dos eritrócitos, há uma exposição a vários agentes endógenos e exógenos que são capazes de oxidar a hemoglobina. Na ausência de um sistema enzimático eficiente para a redução da metahemoglobina, ocorre um acúmulo deste pigmento em níveis diários de 2 a 3 por cento, porém, quando estes sistemas são eficientes os eritrócitos humanos acumulam menos que 0,6% de metahemoglobina (BUNN, 1993).

A metahemoglobina é um derivado da hemoglobina na qual o íon ferro está na sua forma oxidada (Fe^{+3}) (PRCHAL, 2005). A formação espontânea da metahemoglobina é normalmente neutralizada por sistemas de proteção enzimáticos, sendo que, sua via de redução mais importante utiliza a catalisação do NADPH pela citocromo-b5-redutase para a transferência de um elétron de NADPH para o heme. Outro mecanismo para redução da metehemoglobina envolve a transferência direta do ácido ascórbico e glutatona para o grupamento heme (LEE, 2003). Apesar dos mecanismos existentes para reduzir a metahemoglobina, apenas a reação dependente de NADPH catalisada pela citocromo-b5-redutase é fisiologicamente importante (PRCHAL, 2005).

O excesso de metahemoglobina ocorre quando o ferro do grupamento heme é oxidado a forma férrica, em uma velocidade superior a redução do ferro para a forma ferrosa, caracterizando o estado de metahemoglobinemia. As principais causas do aumento da metahemoglobina podem ser devidas a deficiência de enzimas eritrocitárias específicas para as atividades redutoras da oxidação do ferro do grupo heme, a indução oxidativa da hemoglobina por compostos químicos oxidantes e a defeitos moleculares na hemoglobina, o que causa contínua auto-oxidação (NAOUM, 2004). As hemoglobinas instáveis também são causa de cianose, como a Hb Zurich ($\beta 63\text{His} \rightarrow \text{Arg}$), Hammersmith ($\beta 42\text{Phe} \rightarrow \text{Ser}$) e Freiburg ($\beta 23\text{Val} \rightarrow 0$).

A rapidez da produção da metahemoglobina, por agentes exógenos, depende de vários fatores, como: a quantidade do composto que entra na circulação, o metabolismo destes compostos no organismo, a extensão com que o composto é convertido em formas intermediárias com alto potencial

oxidante, a excreção do composto e a taxa com que os eritrócitos conseguem reduzir a metahemoglobina em hemoglobina. Vários compostos químicos utilizados em casa ou na indústria e vários agentes terapêuticos são capazes de aumentar a taxa de oxidação do heme em até 1000 vezes, ultrapassando portanto a capacidade dos eritrócitos em manter a hemoglobina no estado reduzido.

A metahemoglobinemia também pode ser de causa genética, a mais comum é a deficiência da enzima citocromo-b5-redutase, na sua ausência a concentração de metahemoglobina pode chegar a valores acima de 40% (PRCHAL,2005). Outra causa genética rara, são as hemoglobinas mutantes, conhecidas como hemoglobina M, que são caracterizadas por uma permanência do ferro, no estado oxidado (CORRONS, 1994). Várias hemoglobinas anormais, coletivamente denominadas de hemoglobinas M, têm sido descritas. Na maioria delas, a anormalidade genética acontece pela substituição das histidinas proximal e distal pela tirosina. Destas, a Hemoglobina M Boston é a mais comum, sendo descrita em vários países, inclusive no Brasil (NAOUM, 1987).

Deve-se suspeitar de metahemoglobinemia em todo paciente com cianose inexplicada (HOFFMAN, 2005). Nos quadros de intoxicação aguda, como consequência da ingestão de drogas ou exposição tóxica, além da cianose o paciente apresenta os sintomas clínicos de anemia (KAUSHANSKY, 2011).

A avaliação da metahemoglobina é um importante marcador biológico de processos oxidativos, porém sua determinação é pouco solicitada na rotina laboratorial. Este fato pode ser explicado pelo desconhecimento do quadro hematológico de metahemoglobinemia como, também, por fatores técnicos (NAOUM, 2004). A técnica proposta por Evelyn & Maloy (1938) utiliza compostos químicos altamente tóxicos, o que desencoraja sua utilização. Os métodos enzimáticos possuem um custo elevado, o que dificulta a realização da dosagem na rotina laboratorial.

Com a publicação por Naoum e colaboradores (2004) de um teste quantitativo de metahemoglobina por meio da absorção espectrofotométrica e sem a utilização de compostos tóxicos, abriu-se uma nova perspectiva para o diagnóstico da metahemoglobinemia. Neste trabalho (Naoum, 2004) ficou

estabelecido os valores de referência para uma população normal adulta, que variou de 1,9 a 3,8%. O presente trabalho visa estabelecer um valor de referência, para a metahemoglobina, em uma população com idade compreendida entre 6 e 10 anos, utilizando a técnica proposta por Naoum (2004).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sangue utilizadas neste trabalho foram coletadas de crianças que participam do Projeto de Extensão “Incidência de parasitoses e anemias em crianças com idade escolar na Escola Municipal Ayrton Senna – Cidade de Curitiba – PR” com registro na Pro-Reitoria de Extensão e Cultura (PROEC) da Universidade Federal do Paraná, sob o registro 472/08. As coletas foram realizadas após a assinatura pelos pais ou pelos responsáveis legais, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) proposto especificamente para este trabalho.

Foram coletadas 78 amostras de sangue com anticoagulante EDTA K₃, de crianças com idade entre 6 a 10 anos, para a obtenção de dados hematológicos (eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas) em analisador hematológico Coulter T-890 e para a dosagem espectrofotométrica da metahemoglobina. Todas as crianças incluídas neste estudo foram consideradas clinicamente saudáveis por apresentarem hemograma normal e nenhum histórico clínico de cianose. Paralelamente, foi feita a dosagem de metahemoglobina em uma população adulta, com idade variando entre 21 e 60 anos, também considerada clinicamente saudável pelos mesmos critérios (hemograma normal e sem histórico de clínico de cianose).

A técnica proposta para a dosagem de metahemoglobina, em valores percentuais, se fundamenta na avaliação da solução previamente estabilizada em tampão fosfato 60 mol/L, em dois comprimentos de onda específicos para metahemoglobina (630 nm) e oxihemoglobina (540 nm), após hemólise com saponina a 1% (NAOUM, 2004). As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro CINTRA 10.

3 - RESULTADOS

As médias e os valores de referência dos parâmetros hematológicos e da dosagem de metahemoglobina estão descritos na tabela 1 e a figura 1 ilustra a distribuição da porcentagem de metahemoglobina para a população infantil.

TABELA 1. Médias e valores de referência de parâmetros hematológicos e metahemoglobina em crianças com idade variando entre 6 a 10 anos.

ANALITOS	MÉDIA	LIMITES DE REFERÊNCIAS	
RBC (/mm ³)	4,83	4,05	5,60
HGB (g/dl)	13,57	10,70	15,60
HCT (%)	38,99	33,70	44,20
VCM (fl)	81,19	63,40	90,70
HCM (pg)	28,29	20,20	31,30
CHCM (g/dl)	34,62	31,30	37,20
PLA (x10 ⁹ /l)	310,09	148.000	583.000
META* (%)	4,61	3,61	6,44

* - Dosagem em duplicata. Tamanho amostral: 78 crianças.
RBC – eritrócitos; HGB – hemoglobina; HCT – volume globular; VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; PLA – plaquetas; WBC – leucócitos; META – metahemoglobina

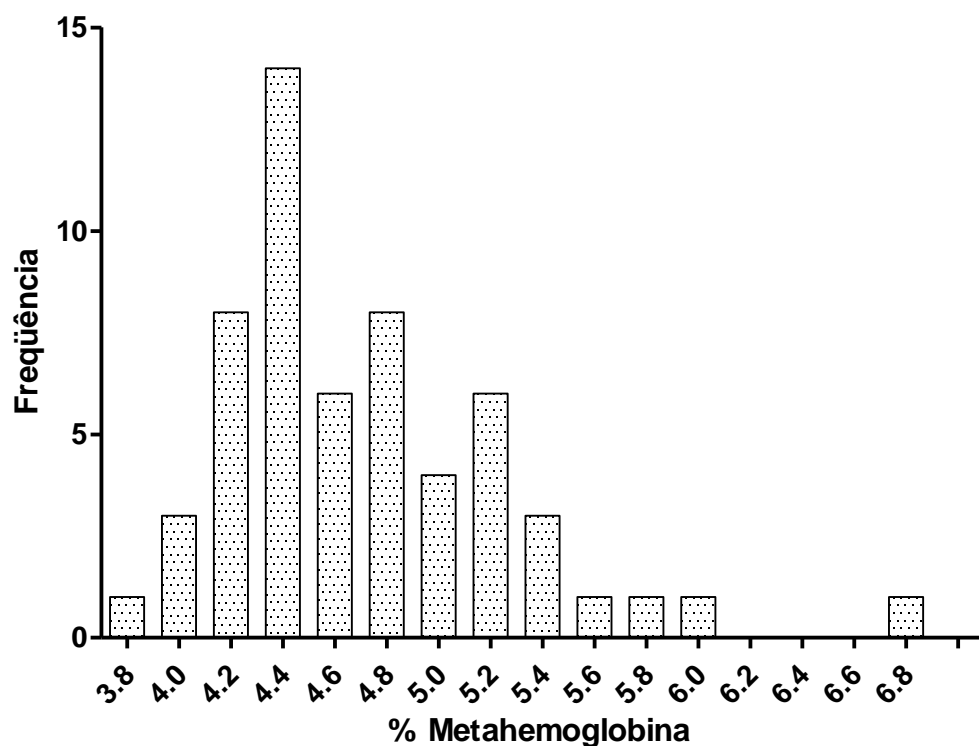


FIGURA 1 – Frequência de distribuição da porcentagem de metahemoglobina na população infantil estudada.

Na tabela 2, estão descritos as médias e os valores de referência de parâmetros hematológicos e metahemoglobina na população adulta.

TABELA 2 - Médias e valores de referência de parâmetros hematológicos e metahemoglobina em adultos.

ANALITOS	MÉDIA	LIMITES DE REFERÊNCIAS	
RBC (/mm ³)	4,90	4,55	5,27
HGB (g/dl)	15,4	14,34	16,38
HCT (%)	42,60	40,04	45,16
VCM (fl)	87,20	85,47	88,83
HCM (pg)	31,30	30,58	31,94
CHCM (g/dl)	35,70	35,16	36,22
PLA (x10 ⁹ /l)	246,2	212,6	279,7
META* (%)	3,44	2,5	3,9

* - Dosagem em duplicata. Tamanho amostral: 15 crianças.
RBC – eritrócitos; HGB – hemoglobina; HCT – volume globular; VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; PLA – plaquetas; WBC – leucócitos; META – metahemoglobina

Todos os cálculos para a determinação dos valores de referências foram baseados nas orientações do guia, *National Council of Clinical Laboratory Services* (TETRAULT, 2000). Os Intervalos de referências foram obtidos com 2,5 e 97,5 da percentagem acumulada, com o uso do pacote de estatística Statistica 8.0 (StatSoft).

4 - DISCUSSÃO

A interpretação correta de um resultado laboratorial depende do estabelecimento de valores confiáveis de referência. Desta forma, os serviços laboratoriais, sejam eles públicos ou privados, devem estabelecer valores de referencia para a população que ele atende, utilizando técnicas e instrumentação próprias (BAIN, 2004). Apesar da dosagem da metahemoglobina ser conhecida desde a década de 1940 e ser um importante marcador do metabolismo oxidativo, sua introdução na rotina laboratorial sempre foi complicada, principalmente pelo potencial tóxico, da técnica idealizada por Evelyn & Maloy (1938) e pelo elevado custo das técnicas baseadas na quantificação enzimática.

Com a publicação da técnica desenvolvida por Naoum e colaboradores (2004), sem o uso de ferrocianeto de potássio e baseada nas absorbâncias específicas das moléculas de oxihemoglobina e metahemoglobina, a dosagem da metahemoglobina tornou-se mais acessível a rotina laboratorial, melhorando o estudo de condições associadas a cianose. Na comparação realizada entre a técnica de Naoum e o método de Evelyn & Maloy, o coeficiente de correlação ($r=0,903$) mostrou uma correlação positiva entre as duas metodologias (NAOUM, 2004).

Comparando as duas populações adultas avaliadas por Naoum (2004) e no presente trabalho, os intervalos de referencia encontrados foram próximos.

Nossos resultados mostraram que os limites encontrados em crianças são maiores que os intervalos de referência para os adultos, os quais variaram de 3,61 a 6,44%. Desta forma, nossos resultados apresentam uma informação importante para a correta avaliação da dosagem de metahemoglobina na população infantil estudada.

Nossos resultados são válidos, mesmo sem a avaliação da concentração de nitratos e nitritos na água, por que tanto a população adulta quanto a infantil são abastecidas com água da mesma origem, e os adultos apresentaram resultados semelhantes aos já descritos na literatura.

Além das causas genéticas e das deficiências enzimáticas, a causa mais frequente de elevação da metahemoglobina é a ingestão de agentes oxidantes, principalmente em crianças. Na infância, o risco do desenvolvimento de metahemoglobinemia tóxica é maior, o que pode ser explicado pela menor quantidade do co-fator citocromo-b5-solúvel e da quantidade da citocromo-b5-redutase nos eritrocitos (LO, 1986). A concentração da enzima citocromo-b5-redutase é cerca de 60% da concentração encontrada nos eritrocitos dos adultos (BARTOS, 1966; ROSS, 1963), isto torna a população infantil particularmente susceptível ao desenvolvimento de metahemoglobinemia (KAUSHANSKY, 2011). Desta forma, a susceptibilidade a oxidação da hemoglobina nas crianças poderia ser explicada pelo sistema redutor ainda não totalmente eficaz. Este trabalho demonstrou que os intervalos de referência dos adultos não podem ser utilizados para a interpretação da concentração de metahemoglobina em crianças. Porém, é necessário o estudo de populações infantis de outra procedência com o objetivo de estabelecer, de modo definitivo, que a concentração de metahemoglobina é mais elevada, de modo persistente, em crianças.

5 - REFERÊNCIAS

- BAIN, B.J. **Células Sangüíneas**. 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.
- BARTOS, H.R.; DESFORGES, J.F. Erythrocytes DPNH-dependent diaphorase levels in infants. **Pediatrics**, 37:991-993, 1966.
- BEUTLER, E. Methemoglobinemia and other causes of cianosis. In: LICHTMAN, M.A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. **Williams Hematology**. Seventh edition, McGraw-Hill Medical, 2006. p. 701-708.
- BUNN, F.H. Human hemoglobins: Normal and abnormal; methemoglobinemia. In: NATHAN, D.G.; OSKI, F.A. **Hematology of infancy and childhood**. 4th Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1993. volumen 1, p.698-731.
- CORRONS, J.L.V. Introducción al estudio de la anemia. Aspectos generales del diagnostico. In: J. Sans-Sabrafen. **Hematologia Clinica**, 3 ed., Madrid, España: Mosby-Doyma S.A., 1994.
- EVELYN, K.A.; MALLOY, H.T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in single sample of blood. **Journal Biological Chemistry**, 1938, 126:655-657.
- HOFFMAN, R., BENZ JR, E.J., SHATTIL, S.J., FURIE, B., COHEN, H.J., SILBERSTEIN, L.E., MCGLAVE, P. **Hematology Basic Principles and Practice**, 4th ed., Elsevier, Philadelphia, 2005.
- KAUSHANSKY, K., LICHTMAN, M.A., BEUTLER, E., KIPPS, T.J., SELIGSOHN, U., PRCHAL, J. **Williams Hematology**, 8th ed., McGraw Hill, New York, 2011.
- LEE, R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.; RODGERS, G. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
- LO, S.C.; AGAR, N.S. NADH-methemoglobin reductase activity in the erythrocytes of newborn and adult mammals. *Experientia* 42:1264, 1986.
- NAOUM, P.C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M.S. Dosagem espectrofotométrica de metahemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2004(1):19-22.
- NAOUM, P.C. **Diagnóstico das hemoglobinopatías**. Editora Sarvier, São Paulo, 1987.
- PRCHAL, J.T., GREGG, X.T. - Red cell enzymes. **Hematology**, 2005:19-23.

ROSS, J.D. Deficient activity of DPNH-dependent methemoglobin diaphorase in cord blood erythrocytes. **Blood**, 21:51-62, 1963.

SOLBERG, H.E. Estabelecimento e Uso de Valores de Referência. In: **Fundamentos de Química Clínica**, BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. Editora Guanabara Koogan, 4ª Edição, 1998, p.179-88.

TETRAULT, GA. "Laboratory statistics." In: Harry, JB. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 20th ed. Philadelphia: Saunders; p. 138-147, 2000.

.