

VITAMINA E COMO AGENTE PROTECTOR DE HEMOLISIS EN PACIENTES DE LEPROSIA TRATADOS CON DAPSONA

MARTA M. LARDO¹, NORMA B. DIAZ¹, JORGE ROMERO ARTAZA¹, CLAUDIO D. CARBIA¹,
RAQUEL NAZER², RAUL VALDEZ²

¹ Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica; ² Cátedra de Dermatología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen La dapsona (4,4'-diamino difenilsulfona) (DDS) utilizada en el tratamiento de pacientes con lepra, produce como efecto secundario una hemólisis intravascular debida a una comprobada lesión oxidativa a nivel de la membrana del eritrocito. Con el objeto de evaluar el efecto protector de la vitamina E sobre la hemólisis producida por la droga se estudiaron 16 pacientes durante cuatro meses, divididos en dos grupos: Grupo 1 (n = 7) inicia tratamiento con dapsona por administración oral: 100 mg/día y Grupo 2 (n = 9) dapsona más vitamina E: 800 U/día. Al inicio del tratamiento se determinó el nivel enzimático de Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6PD), siendo excluidos aquéllos que presentaban bajos niveles de dicha enzima dada su sensibilidad al fármaco. Todos los pacientes presentaban una anemia normocítica normocrómica, con un marcado descenso de Haptoglobina (menos de 5 mg/dl). El análisis estadístico demuestra que los valores de reticulocitos no presentan diferencias significativas entre los grupos y a lo largo del tiempo de estudio. En el caso de la metahemoglobina (Hi) se observó en el grupo 1 un aumento significativo entre el mes de inicio y al final del tratamiento, no obteniéndose los mismos resultados para el grupo 2, no obstante ser el parámetro más sensible a la agresión oxidativa. En la formación de cuerpos de Heinz se obtuvo los mismos resultados que en el caso de la Hi. Se concluye que si bien la vitamina E no corrige todos los parámetros de laboratorio valorados, evitaría la formación de metahemoglobina producida como resultado del tratamiento con dapsona.

Palabras clave: dapsona, vitamina E, G-6 PD (glucosa 6-fosfato dehidrogenasa)

La dapsona (4,4'-diamino difenilsulfona) (DDS), es un fármaco de elección en el tratamiento de la Lepra y diversas dermatosis, tal el caso de la Dermatitis herpetiforme de Durhing¹, pero su uso se halla limitado por la acción hemolítica que ejerce. Los glóbulos rojos (GR) son especialmente sensibles al daño oxidativo por: a) estar expuestos a altas concentraciones de oxígeno, b) su membrana es rica en ácidos grasos poliinsaturados y c) no poder resintetizar sus componentes dañados². El mecanismo por el cual se pro-

duce la hemólisis no está totalmente aclarado pero se relaciona con procesos de oxidación a nivel de la membrana celular y del transporte de electrones que llevan a la producción de metahemoglobina^{3, 4}. El uso de drogas oxidantes afecta los mecanismos enzimáticos tanto anaeróbicos como aeróbicos, a través de la vía de la hexosamonofosfato⁵ tal como se observa en los pacientes deficientes de G-6 PD^{6, 7}. El sistema del Glutathion (GSSG) dependiente de NADPH es la principal vía de detoxificación de radicales superóxidos y peróxido de hidrógeno con que cuenta el eritrocito y su deficiencia provoca la disrupción en los puntos de contacto entre dímeros de globina con formación de Cuerpos de Heinz⁸. Sin embargo, en pacientes tratados con

Recibido: 9-IV-1996

Aceptado: 13-XI-1996

Dirección postal: Dra. Norma B. Díaz de Domingo, Palpa 3387, 1426 Buenos Aires, Argentina

DDS los niveles de glutathion peroxidasa y glutathion reductasa se encuentran dentro del rango de normalidad, indicando que dicho sistema no se encuentra afectado¹. Según Spielberg⁹ la vitamina E ejerce cierto efecto protector previniendo la producción de radicales libres que inducen cambios en la membrana, a través de la formación de complejos aductores como malonil-dialdehído, disminuyendo así, la deformabilidad del GR y la pérdida de la permeabilidad selectiva de K¹⁰.

Por ello centramos nuestro interés en comprobar si la hemólisis intravascular se halla más relacionada a complejos oxidativos que afectan al sistema de las catalasas y su prevención con la vitamina E.

Material y métodos

Entre las condiciones para ingresar al estudio se estableció como criterio de inclusión pacientes con Leprosia, y de exclusión que los pacientes debían tener al inicio del tratamiento un valor normal de G-6PD y no recibir salicilatos ni contraceptivos orales.

De los 20 pacientes que iniciaron el protocolo, varones (n = 9), mujeres (n = 11), con una edad media \bar{x} = 42 años (rango 35-60) con diagnóstico de Leprosia; uno no continuó y tres fueron descartados, mujeres (n = 2), varones (n = 1); dado que el nivel inicial de G-6PD se encontraba por debajo del límite inferior respecto de la actividad enzimática total, (\bar{x} = 78 U x 10¹² RBC) (rango 62- 109 U/10¹² RBC) para un valor normal de 146-376 U/10¹² RBC. Se realizó el test de Brewer como método de screening para deficiencias de G-6PD¹¹, con una sensibilidad del 75% de pacientes detectados y 25% de falsos negativos. Similares resultados son informados por el equipo de C. Yeung en 1970^{12, 8}.

Los pacientes restantes fueron agrupados según el siguiente protocolo: *Grupo 1*: pacientes de inicio con dapsona a razón de 100 mg/día (n = 7); *Grupo 2*: pacien-

tes de inicio con dapsona 100 mg/día más vitamina E (acetato -alfa tocoferol) 800 U/día (n = 9). Se estudiaron durante 4 meses consecutivos, en los cuales se midieron los siguientes parámetros de hemólisis intravascular: Hto, Hb, GR, realizados con un contador Hematológico Cell-Dyn 1600; recuento de reticulocitos según Dacie-Lewis, determinación de metahemoglobina por formación de cianometahemoglobina con pico de absorción a 630 nm (Método de Evelyn-Malloy)¹³, cuerpos de Heinz (test de Motulsky)^{14, 15}, basado en la inducción de cuerpos de Heinz mediante acetilfenilhidracina y revelados con Violeta de Genciana, haptoglobina por Inmunodifusión radial (IDR), LDH y bilirrubina total por técnicas convencionales. La actividad enzimática total de glucosa -6 PD se midió por método cinético¹⁶. Los valores obtenidos en el 1er. mes fueron considerados como basales para cada paciente en particular. El estudio estadístico se realizó aplicando el Test de MANOVA (test para diseños mixtos).

Resultados

Los resultados de los parámetros de hemólisis evaluados fueron analizados individualmente sobre un total de 16 pacientes estudiados obteniéndose los siguientes resultados tal como se observa en Tabla 1 y 2. Los valores obtenidos de Hto mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo 1 y 2 (F = 7,48; p = 0,016), no así cuando se comparó intragrupo a lo largo del tiempo.

Con respecto a los niveles de Hb se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupo 1 y 2 (F = 6,79; p = 0,021). Estos valores se acompañan de un volumen corpuscular medio (VCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) normales, lo que permite definir que estos pacientes presentaban en todos los casos una anemia de tipo normocítica normocrómica.

TABLA 1.- Valores obtenidos en Grupo 1 ($\bar{X} \pm SD$) n = 7 a lo largo del tiempo

	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4
Hto	33,57 \pm 1,99	32,14 \pm 2,27	32,14 \pm 3,02	32,29 \pm 1,11
Hb	11,13 \pm 0,69	10,63 \pm 0,73	10,66 \pm 0,96	10,56 \pm 0,69
Ret	1,50 \pm 0,67	1,66 \pm 0,54	1,73 \pm 0,96	1,79 \pm 0,96
MetalHb	1,54 \pm 0,56	1,70 \pm 0,48	1,87 \pm 0,69	2,91 \pm 1,76
CDH	6,14 \pm 4,26	5,71 \pm 5,44	9,29 \pm 4,89	13,14 \pm 4,74

TABLA 2.— Valores obtenidos en Grupo 2 ($\bar{X} \pm SD$) $n = 9$ a lo largo del tiempo

	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4
Hto	36,78 \pm 3,90	36,56 \pm 4,10	36,11 \pm 3,59	36,44 \pm 3,92
Hb	12,29 \pm 1,41	12,19 \pm 1,48	11,90 \pm 1,38	12,09 \pm 1,44
Ret	2,30 \pm 1,28	1,92 \pm 0,61	1,69 \pm 0,83	1,80 \pm 1,34
MetalHb	0,80 \pm 0,49	0,96 \pm 1,24	1,31 \pm 1,15	1,55 \pm 1,54
CDH	9,0 \pm 4,36	9,0 \pm 5,29	10,33 \pm 4,21	9,89 \pm 5,21

Los valores de haptoglobina presentaban un marcado descenso (< 5 mg/dl) que no corrigió con la administración de vitamina E, mientras que los valores de bilirrubina total y LDH estaban dentro del rango de normalidad.

En el análisis de los resultados obtenidos de reticulocitos se encontró que no existen diferencias significativas intergrupo (grupo 1 y 2) ($F = 0,69$; $p = 0,42$), así como tampoco cuando se estableció la relación intragrupo ($F = 0,14$; $p = 0,94$).

Los valores medios de metahemoglobina en cada grupo estudiado y a su seguimiento durante los meses establecidos en ambos grupos se muestran en Tablas 1 y 2. En el grupo 1 se observan diferencias significativas ($F = 3,50$; $**p = 0,037$) a lo largo del tiempo. En el grupo 2 en cambio, no hubo diferencias significativas ($F = 1,39$; $p = 0,27$) en el mismo lapso. Cuando se comparó el grupo 1 con el grupo 2 no mostró diferencias estadísticamente significativas ($F = 4,37$; $p = 0,05$). Estos resultados podrían atribuirse al pequeño número de muestras analizadas. (Fig. 1). Los valores medios en la formación de CDH en cada grupo y durante los meses estudiados se muestran en Tablas 1 y 2. Se observa

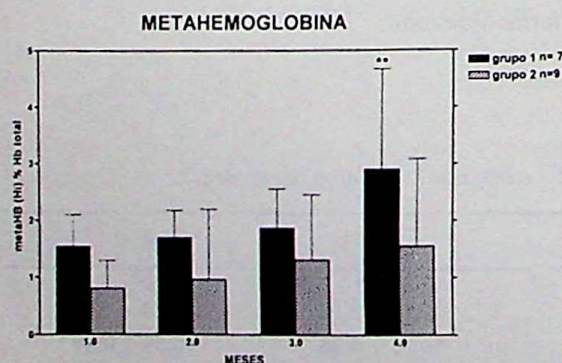


Fig. 1.— Comparación de los valores medios de Metahemoglobina en los dos grupos estudiados a lo largo del tiempo (4 meses).

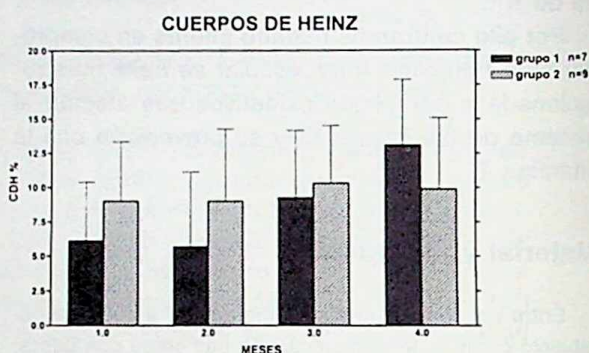


Fig. 2.— Comparación de los valores medios de Cuerpos de Heinz en los dos grupos estudiados a lo largo del tiempo (4 meses).

que en el grupo 1 hay diferencias significativas a lo largo del tiempo ($F = 3,37$) y $p = 0,026$), no así en el grupo 2. Cuando se comparan los grupos 1 y 2 tampoco existen diferencias significativas entre sí ($F = 0,30$ y $p = 0,59$). (Fig. 2).

Discusión

Las injurias ocasionadas por drogas oxidativas se asocian a anemias predominantemente normocíticas normocrómicas, con la observación en sangre periférica de ocasionales «Bite cell» (células en mordida) en su variante hemolítica, acompañados de metahemoglobinemia y/o cuerpos de Heinz¹⁷. En el presente trabajo no se encontró diferencias de hematocrito y hemoglobina en el grupo de pacientes tratados con DDS, así como en el grupo que recibió dapsona más vitamina E tanto al iniciar el tratamiento como al finalizar el mismo, datos que resultan coincidentes con los comunicados por el grupo de Prussick R¹⁸, acompañado esto por una falta de modificación significativa en el recuento reticulocitario. La

persistencia en los valores descendidos de haptoglobina confirmarían el efecto hemolítico de origen intravascular causado por la dapsona a las dosis terapéuticas empleadas de 100 mg/día, que no corrigen con el agregado de acet. de alfa-tocoferol (Vit E). El estrés oxidativo puede generarse por un desequilibrio entre el aumento en la concentración de sustancias oxidantes con el consiguiente aumento de la velocidad de producción de radicales libres, y/o a una disminución en la actividad enzimática de catalasas, superóxido dismutasa, o glutatión peroxidasa con formación de CDH¹⁹.

Se observa que la formación de cuerpos de Heinz sufre variaciones a lo largo del tratamiento con DDS, pero no alcanza a ser significativo en el grupo que recibió (800 U/día). Los valores hallados no resultaron mayores del 40% en el modelo de inducción con acetil fenilhidracina⁸ como sería de esperar en una verdadera deficiencia enzimática, esto revelaría que el sistema enzimático dependiente de NADPH, como lo es la actividad de glutatión peroxidasa no se encuentra disminuida.

Los cambios observados en los niveles de Hi en los pacientes tratados con DDS reflejan la mayor actividad de metahemoglobina-reductasa, que normalmente es responsable del 5% de la actividad reductora fisiológica del eritrocito. Este aumento no se observó en los pacientes que recibían vitamina E; lo que indicaría cierto efecto protector de dicha vitamina.

En el período de evaluación de los parámetros estudiados los valores de recuento leucocitario fueron normales, descartándose episodios infecciosos o inflamatorios como posibles mecanismos generadores de superóxidos y peróxidos¹⁰.

Se concluye que la administración de vitamina E en los pacientes tratados con DDS a la dosis de 100 mg/día no mejora significativamente los parámetros de Hto y Hb, pero sí disminuye la formación de metahemoglobina. Estos valores podrían modificarse analizando un mayor número de pacientes. Además sería necesario rever la terapia en cuanto a dosis y tiempo de administración de vitamina E, dado que dosis superiores a 800 U/día no están exentas de riesgo por producir hemorragia por deficiencia de vitamina K, alteraciones inmunitarias o disturbios en el metabolismo hormonal²¹.

Agradecimiento: A La Licenciada E. Libhaber y al Dr. V. Castiglia por la asesoría científica y a la Dra. Mónica Ferrini por la colaboración prestada en la confección de los gráficos.

Summary

Vitamin E as protective agent against hemolysis in leprosy patients under dapsone treatment

Dapsone (4,4'-diaminodiphenyl-sulphone) commonly used in the treatment of patients who suffer from leprosy, is a strongly oxidative drug, producing damage to the red cell membrane. This study investigated whether Vitamin E would have a protective effect on the red cell membrane from oxidant damage caused by Dapsone in patients with leprosy. We have studied 16 patients for 4 months, divided into two groups. Group 1 (n = 7) dapsone (DDS): 100 mg/day; Group 2 (n = 9) dapsone: 100 mg/day in addition with Vitamin E: 800 U/day. We did not include patients with low levels of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G-6-PD) because of their sensibility to this drug. At the beginning of the treatment we determined the level of G-6-PD.

All patients showed a normocytic normochromic anemia with a decrease in Haptoglobine levels (below 5mg/dl). Statistical analyses showed that reticulocyte counts did not present significant differences between groups all through evolution. As for methemoglobin (Hi) we observed in Group 1 an increase between the first and the fourth month, which was not seen in group 2.

Statistical analyses of the results suggest that oral Vitamin E confers partial protective effect and does not correct the hemolysis parameters produced by Dapsone treatment except for Hi levels which were more sensitive to the oxidant damage.

Bibliografía

1. Kelly JW, Scott J, Sandland M. Vitamin E and Dapsone induced hemolysis. *Arch Dermatol* 1984; 120: 1582-1684.
2. Feher J, Csomos G, Vereckei A. Free Radical Reactions in Medicine. Berlin: Springer-Verlag, 1987.
3. Rosen JP, Cage J, McGee W, Beutler E. Failure of methylene blue treatment in toxic methemoglobinemia. Association with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Ann Intern Med* 1971; 75: 83-6.
4. Erstad B, et al. Dapsone induced metahemoglobinemia and hemolytic anemia. *Clin Pharm* 1992; 11: 800.

5. Beutler E, Maroose R, Kramer L, Gelbart T, Forman L. Gamma-glutamylcysteine synthetase deficiency and hemolytic anemia. *Blood* 1990; 75: 271-3.
6. Beutler E. Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism. New York: Plenum Press, 1978.
7. Beutler E. The genetics of glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency. *Sem Hematol* 1990; 27: 137-64.
8. Lukens J, Lee R, Bithell T, et al. Wintrobe-Hematología Clínica. Novena Edición, Buenos Aires: El Ateneo, 1994.
9. Spielberg SP, Boxer A, Corash LM, Schulman JD. Improved erythrocyte survival with high dose vitamin E in chronic hemolyzing G-6PD and Glutathione Synthetase deficiencies. *Ann Inter Med* 1979; 90: 53-4.
10. Rasbrigde MR, Scott GL. The haemolytic action of dapsone changes in the red cell membrane. *Br J Haem* 1973; 24: 183-93.
11. Brewer G, Tarlov A, Alving A. The methemoglobin reduction test for primaquine type sensitivity of erythrocytes. A simplified procedure for detecting specific hypersusceptibility drug hemolysis. *JAMA* 1986; 180: 386.
12. Yeung CY, Edin CP, Glasg AC, et al. Brief fluorescent spot test for screening erythrocyte glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency in newborn babies. Brief clinical and laboratory observations. *J Pediatr* 1970; 76: 931-4.
13. Evelyn E, Malloy T. Microdetermination of oxyhemo-globin, methemoglobin and sulfahemoglobin in a single sample of blood. *J Biol Chem*, 1938; 126: 655.
14. Beutler E, Dorn RJ, Alving AS. An in vitro test for sensitivity of erythrocytes to primaquine. *J Labor Clin Med* 1955; 45: 40.
15. Lynnel M, Schwab ML, Lewis AE. An improved stain for Heinz bodies. *Am J Clin Path*, 1968; 51: 673-5.
16. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Lohr GW, Ramot B, Valentine N. International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Screening test for Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (G-6PD) *Br J Haemat* 1979; 43: 465-8.
17. Dal Y, Lessin L. Drug Associated «Bite Cell» Hemolytic Anemia. *Am J Med* 1992; 92: 243-8.
18. Prussik R, Mahmoud AM. The protective effect of Vitamin E on the hemolysis associated with dapsone treatment in patients with Dermatitis Herpetiformis. *Arch Dermatol* 1992; 128: 210-3.
19. Feher J, Csomos G, Vereckei A. Free Radical Reactions in Medicine, Berlin: Springer-Verlag, 1987.
20. Samuel T. Effect of tumor necrosis factor on the generation of chlorinated oxidants by adherent human neutrophils. *J Leuk Biol* 1991; 50: 131-9.
21. Roberts HJ. Perspective of Vitamin E as therapy. *JAMA*, 1981; 246: 129.

When you are courting a nice girl an hour seems like a second. When you sit on a red cinder a second seems like an hour. That's relativity.

Cuando le hace la corte a una linda muchacha una hora parece un segundo. Cuando se está sentado sobre un carbón al rojo un segundo parece una hora. Esto es relatividad.

Alberto Einstein (1879-1955)

News Chronicle, 1949