

Meta-hemoglobinemia

Methemoglobinemia

António Murinello*, Manuel Bicho**, Rosa Estrela Inácio***, M^a Conceição Loureiro[§]

Resumo

O termo meta-hemoglobinemia refere-se à existência de uma concentração excessiva de meta-hemoglobina no sangue, resultante da oxidação do ferro ferroso a ferro férrico na molécula de hemoglobina. Nesta revisão, começa-se por focar os mecanismos enzimáticos fisiológicos de oxidação/redução da hemoglobina, e sua eficácia em caso de meta-hemoglobinemia patológica. A meta-hemoglobinemia, ao causar hipóxia tissular, determina uma cianose típica cor de chocolate, agravando-se os sintomas acompanhantes e as funções cardíaca e respiratória, à medida que se atingem concentrações cada vez maiores de meta-hemoglobina no sangue, quando o tratamento se torna uma emergência.

A etiologia é genética ou adquirida, sendo esta a mais comum, determinada por um grande número de agentes oxidantes, químicos ou fármacos. A causa genética mais frequente é o déficit da redutase do citocromo-b₅, enzima de que se conhecem três variantes genéticas.

A confirmação laboratorial da meta-hemoglobinemia faz-se por co-oximetria, mas a clínica é fundamental na indução do pensamento diagnóstico.

Os agentes oxidantes, além de causarem meta-hemoglobinemia, podem ser responsáveis por algum grau de hemólise, nomeadamente se houver deficiência associada de desidrogenase da glucose-6-fosfato. Neste último caso, será preferível não medicar os doentes com azul de metileno, já que, se em doses elevadas, a substância é em si mesma

um agente oxidante indutor da formação de meta-hemoglobina, no caso do déficit da referida enzima a sua acção hemolítica far-se-á sentir em doses mais baixas.

A exsanguíneo-transfusão é a terapêutica alternativa em casos graves e, recentemente, a N-acetilcisteína tem sido considerada como terapêutica alternativa ao azul de metileno

Palavras chave: Meta-hemoglobinemia; azul de metileno; redutase do citocromo-b₅

Abstract

Methemoglobinemia refers to the existence of high blood concentrations of methemoglobin, resulting from the oxidation of ferrous iron to ferric iron within the hemoglobin molecule. An extensive review of methemoglobinemia is done, initially focusing on physiological enzymatic mechanisms of oxidation/reduction of hemoglobin, referring its efficacy in pathologic methemoglobinemia. Methemoglobinemia causes tissue hypoxia, being responsible for chocolate colour type of cyanosis, and other progressive symptoms, including abnormalities of respiratory and cardiac function as the concentration of methemoglobin grow up.

Etiology can be genetic or acquired. Acquired form is much more common, and there are a great number of oxidizing agents causing it, namely drugs. The most common genetic cause is deficiency of enzymatic system of cytochrome-b₅ reductase, from which we know three different genetic variations with weak activity.

Laboratory confirmation of methemoglobinemia requires co-oxymetry, but clinical diagnosis is essential.

Oxidizing agents besides causing methemoglobinemia can be responsible for some degree of hemolysis, mostly if there is concomitant deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase, in which case it is better not to use methylene blue in the treatment of methemoglobinemia. In high doses methylene blue is an oxidizing agent, causing induction of methemoglobin. If there is deficiency of the referred enzyme, the haemolytic action of methylene blue will happen with lower doses of the drug. Exchange transfusions are alternative therapy in serious cases. Recently N-acetylcysteine is being considered as alternative therapy to methylene blue.

Key words: Methemoglobinemia, methylene blue, cytochrome-b₅ reductase

* Chefe de Serviço de Medicina Interna. Hospital de Curry Cabral. Serviço de Medicina 1

** Prof. Associado de Genética. Faculdade de Medicina de Lisboa

*** Chefe de Serviço de Patologia Clínica. Laboratório de Hematologia. Hospital de Santa Maria

§ Assistente Hospitalar de Medicina Interna. Hospital de Curry Cabral. Serviço de Medicina 1

Trabalho realizado no Serviço de Medicina 1 do Hospital de Curry Cabral e nos Laboratórios de Genética e de Hematologia do Hospital de Santa Maria

Recebido para publicação a 11/09/2001

Introdução

A meta-hemoglobina (Mhb) é uma hemoglobina (Hb) anormal, na qual a molécula de ferro se encontra no estado férrico (Fe^{3+}) em vez do estado ferroso normal (Fe^{2+}), como resultado da oxidação do estado ferroso ao estado férrico, o que torna o ferro hémico incapaz de captar oxigénio. Ao mesmo tempo, a afinidade da Hb normal pelo oxigénio aumenta, por desvio à esquerda da curva de dissociação do oxigénio, impedindo o fornecimento adequado de oxigénio aos tecidos¹. Se ocorrer uma acumulação excessiva de Mhb, o estado de doença é chamado de meta-hemoglobinemia e tem como resultado a ocorrência de hipóxia tissular².

No entanto, o termo meta-hemoglobinemia é de facto erróneo, porquanto a hemoglobina alterada tem localização intracelular, não se encontrando livre no plasma³, ocorrendo a oxidação do estado ferroso ao estado férrico no interior da própria molécula de hemoglobina⁴.

Clínica

A Mhb é mais escura que a hemoglobina não oxigenada e pode produzir cianose intensa, mesmo em concentrações que não ameaçam a vida. A meta-hemoglobinemia deve ser considerada no diagnóstico diferencial de qualquer doente cianótico que vá a uma urgência hospitalar, e, dada a sua raridade, pode criar dificuldades de diagnóstico. Em muitos doentes, o grau de coloração azul-acastanhada da pele e mucosas (cianose cor de chocolate castanho) está em contradição com a falta de sinais clínicos de hipóxia, os quais se detectam habitualmente noutras causas de cianose. Na meta-hemoglobinemia, quando as concentrações de Mhb não são muito elevadas, os doentes parecem mais azuis que doentes. No entanto, as concentrações muito elevadas de Mhb podem ser fatais, obrigando a diagnóstico e tratamento rápidos⁵.

Seja qual for a etiologia da meta-hemoglobinemia, a gravidade dos sintomas depende dos níveis da Mhb, sendo estes referidos como percentagem da hemoglobina total. A cianose causada pela Mhb torna-se clinicamente aparente a um nível de Mhb de 1,5 g/dl, o que, numa pessoa normal, corresponde a cerca de 10% da Hb total, assumindo-se como normal um valor de hemoglobina de 15 g/dl. Acima de 3,0-4,5 g/dl de Mhb (20-30% da Hb total), os doentes referem ansiedade, tonturas, cefaleias e taquicardia. Entre 4,5 e 7,5 g/dl (30-50% da Hb total) ocorrem fadiga, confusão, vertigens e tonturas, taquipneia crescente ao menor esforço, e aumento da taquicardia. Em níveis de 7,5-10,5 g/dl de Mhb (50-70% da Hb), os doentes podem ter convulsões, arritmias, bradicardia, acidose, e entrar em coma. Acima de 10,5 g/dl (>70% da Hb total) ocorre, geralmente, a morte do doente⁶.

Há que referir que um doente anémico pode ter maior intensidade sintomatológica a níveis de Mhb mais baixos que um doente não anémico, e isto porque a capacidade de

transporte de oxigénio no doente anémico é menor e mais facilmente comprometida. De igual modo, doentes que tenham concomitantemente problemas comprometedores do fornecimento de oxigénio aos tecidos (doentes cardíacos e pulmonares, intoxicações por monóxido de carbono), terão sintomatologia mais precocemente⁶.

Etiologia

Causas adquiridas

A meta-hemoglobinemia pode ter várias etiologias, incluindo genéticas, dietéticas, idiopáticas e toxicológicas^{7,8} (*Quadro I*). Na maioria dos casos, é adquirida, por exposição a uma grande variedade de químicos e fármacos, dos quais salientamos os nitratos, nitrito de amilo, óxido nítrico, anestésicos locais como a benzocaína e a lidocaína, dapsona, primaquina, cloroquina, corantes anilínicos, fenazopiridina, sulfonamidas, fenacetina, corantes e polidores de sapatos⁵.

Fármacos e químicos que induzem a formação de Mhb, podem ter toxicidades separadas da propriedade de induzirem a formação de Mhb. A hemólise induzida por agentes oxidantes segue-se frequentemente à meta-hemoglobinemia, embora o início da hemólise ocorra com um atraso de 12-24 horas em relação à exposição ao agente oxidante⁶. Alguns deles, tais como a dapsona e a anilina, podem produzir meta-hemoglobinemia tipo "recorrente", na qual os níveis de Mhb podem aumentar quatro a 12 horas após a terapêutica "eficaz" com azul de metileno⁹.

Se incluirmos os casos de meta-hemoglobinemia em crianças, aliás os mais frequentes, a segunda causa mais frequente é idiopática, mas relacionada com acidose sistémica; a terceira é, em geral, dietética e devida à ingestão de nitratos contaminando águas de poços ou de furos de água de irrigação agrícola. Os produtos agrícolas mais frequentemente incriminados têm sido os espinafres, cenouras e beterrabas¹⁰.

Causas genéticas

A quarta causa mais frequente é genética, apresentando-se o doente, à nascença ou pouco tempo depois, com cianose. Duas deficiências enzimáticas diferentes podem estar presentes: a deficiência da redutase do citocromio- b_5 ou a deficiência do citocromio- b_5 ^{11,12} (*Quadro I*). Ambas são transmitidas de modo autossómico recessivo. Os níveis de Mhb são, em geral, moderadamente elevados e bem tolerados.

Foram descritos casos de alterações intra-eritrocitárias determinando produção deficiente de NADH, atribuídas a défice de glutatíon eritrocitário¹³. Outro defeito genético causal possível, é o dos doentes que são heterozigotos e portadores de hemoglobina M, transmitidos de forma autossómica dominante. A forma homozigótica não é presumivelmente compatível com a vida¹¹.

Os indivíduos que são homozigóticos para a deficiência

Quadro I – Etiologia da Meta-hemoglobinemia

Causas Adquiridas:

- Exposição a Químicos e Fármacos (mais frequentes):

Acetanilida	Hidroxilamina	Nitroprussiato
Aloxano	Lidocaína	Paraquat
Anilina (corantes, tintas)	Menadiona	Fenacetina
Antipirina	Metoclopramida	Fenazopiridina
Arsénio	Azul de metileno	Fenol
Derivados do benzeno	Naftaleno	Fenilhidrazina
Benzocaína	Nitratos*	Fenitoína
Cloratos	Óxido nítrico	Prilocaina
Clorobenzeno	Nitritos	Prim aquina
Cloroquina	Nitroalcanos	Inalação de fumos
Dapsona	Nitroclorobenzeno	Sulfonamidas
Dinitrofenol	Nitrofurano	Trinitrotolueno
Dinitrotolueno	Nitroglicerina	

*Fontes químicas e alimentares.

- Acidose (em recém-nascidos até aos 6 meses)

Causas Genéticas:

- Deficiência da redutase do citocromo-b₅
- Deficiência do citocromo-b₅
- Heterozigotia da hemoglobina M
- Défice de glutatíon eritrocitário

do sistema enzimático redutase do citocromo-b₅ têm pouca ou nenhuma actividade enzimática, servindo-se de outros mecanismos para manterem níveis de Mhb em redor dos 10-50% da Hb total. Em indivíduos heterozigotos, as concentrações de Mhb são quase normais, com níveis de hemoglobina normal atingindo os 98-99%¹⁴ e níveis enzimáticos da ordem dos 50-60% da actividade normal¹². A actividade enzimática nos eritrócitos do sangue do cordão umbilical e nos recém-nascidos é normalmente 50-60% da actividade no adulto, e a actividade nos prematuros é ainda menor, mas, alguns meses depois do nascimento, os níveis já alcançam valores iguais aos do adulto¹². Como seria de esperar, indivíduos heterozigotos para a deficiência deste sistema enzimático são muito mais susceptíveis que os indivíduos normais a desenvolverem meta-hemoglobinemias clinicamente aparentes após exposição a agentes oxidantes. Assim, a intensidade da meta-hemoglobinemia depende, não só da dose do agente oxidante, mas também da susceptibilidade do indivíduo exposto.

Tal como o défice da desidrogenase da glucose-6-fosfato corresponde a um grupo de doenças moleculares heterogéneas, com mobilidades electroforéticas e níveis de estabilidade e actividade enzimática variáveis, e com diferen-

tes mutações no gene determinante, podendo implicar expressões clínicas dissimilares ainda que subtis, a mesma variabilidade é, hoje em dia, atribuída ao sistema enzimático redutase do citocromo-b₅¹⁵.

Classificação das meta-hemoglobinemias hereditárias

As meta-hemoglobinemias hereditárias enzimopénicas são causadas, na maioria das vezes, por deficiência da redutase do citocromo-b₅ somente ao nível dos eritrócitos (tipo I). A deficiência generalizada da redutase do citocromo-b₅ demonstrável em todos os tecidos, ocorre em 10-15% dos casos e é acompanhada de meta-hemoglobinemia e perturbações neurológicas graves, progressivas e letais (tipo II). Y. Yawata *et al.*¹⁶ relataram o caso de um rapaz japonês com meta-hemoglobinemia hereditária enzimopénica, cujo fenótipo clínico incluía estatura pequena, deformação de grandes e pequenas articulações, cianose e atraso mental ligeiro. Foi demonstrado défice parcial da redutase do citocromo-b₅ nos eritrócitos, plaquetas, linfócitos, e fibroblastos da pele em cultura, mas o defeito(s) molecular não foi descrito. A deficiência isolada do citocromo-b₅ pode induzir igualmente meta-hemoglobinemia (tipo III). O diagnóstico de meta-

hemoglobinemia hereditária enzimopénica pode ser feito por determinações laboratoriais relativamente simples, mas a definição do defeito específico requer estudos mais sofisticados¹².

Diagnóstico clínico e laboratorial

A confirmação laboratorial do diagnóstico de meta-hemoglobinemia, não é muitas vezes possível em laboratórios de Urgência, por inexistência de aparelhagem adequada. Mas há testes simples fortemente indicativos da possibilidade desse diagnóstico. O primeiro objectivo no diagnóstico dum doente com cianose é diferenciar entre doentes com desoxi-hemoglobina e Mhb. O sangue contendo concentrações elevadas de Mhb tem cor de chocolate castanho, em oposição ao vermelho escuro/violeta do sangue desoxigenado. Um teste simples de fazer à cabeceira do doente é o de colocar uma ou duas gotas de sangue do doente num papel de filtro branco. A cor da Mhb não muda com o tempo, enquanto que a desoxi-hemoglobina se torna mais clara após exposição ao ar atmosférico. Fazendo “soprar” suavemente oxigénio suplementar sobre o papel de filtro, acelera-se a reacção com a desoxi-hemoglobina, mas a meta-hemoglobina não é afectada⁶.

pode ocorrer em outros órgãos, tais como os pulmões e fígado⁶. Contudo, ao contrário de outras células, os eritrócitos não têm núcleo e não podem sintetizar proteínas novas. As enzimas que habitualmente desintoxicam os agentes oxidantes, degradam-se com o tempo. Por conseguinte, células mais velhas são mais susceptíveis à oxidação, uma vez que não podem desintoxicar agentes oxidantes tão bem quanto as células novas. Além disso, os eritrócitos também não possuem mitocôndrias, sendo menos eficientes que outras células na geração de energia e co-factores necessários para a desintoxicação química. Estas propriedades explicam por que a toxicidade sanguínea, manifestada por hemólise e meta-hemoglobinemia, ocorre mais frequentemente que a toxicidade oxidativa noutros tecidos⁶.

Mecanismos protectores intracelulares

O eritrócito possui dois mecanismos que o ajudam a manter os níveis de Mhb abaixo de 1%, no indivíduo normal: 1) reduzindo compostos oxidantes como o peróxido de hidrogénio, antes que eles tenham oportunidade de reagir com a hemoglobina e originar Mhb; 2) pela redução da Mhb a Hb normal, à medida que é formada.

Mecanismos endógenos indirectos

O primeiro mecanismo é geralmente pouco importante na manutenção de concentrações baixas de Mhb no eritrócito, nele participando a glicólise, a via do "shunt" hexose-monofosfato, a desidrogenase da glucose-6-fosfato através da produção de NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) e actuando a NADPH na produção de glutatião reduzido, útil na redução de compostos oxidados. Também a catalase eritrocitária, o ácido ascórbico e compostos sulfidrílicos, flavina, tetra-hidropterina, cisteamina e cisteína, podem ter uma acção benéfica. Se a importância deste mecanismo é escassa no indivíduo normal, pode, no entanto, ter importância alternativa, quando há um défice congénito enzimático completo da redutase do citocromio-b₅, conseguindo-se manter níveis de Mhb abaixo dos 50% e, por vezes, até 10%¹².

Mecanismos endógenos directos

Citocromio-b₅ e redutase do citocromio-b₅

O segundo mecanismo é responsável pela redução de pelo menos 99% da Mhb a Hb normal, o que acontece à custa do sistema enzimático redutase do citocromio-b₅ (antes denominada redutase da Mhb dependente de NADH)^{6,17} (Fig. 1). Nesta reacção, a NADH combina-se com a Mhb na presença da redutase do citocromio-b₅, formando-se Hb normal e NAD⁺. Na realidade, esta via enzimática é um sistema bi-enzimático. Uma enzima, contendo flavina, chama-se redutase do citocromio-b₅ e é fundamental na redução da Mhb¹². Intermediários glicolíticos que produzem NADH, servem como dadores originais de electrões. A NADH

é um co-factor da redutase do citocromio-b₅. A outra enzima, o citocromio-b₅, é uma enzima citosólica que, em concentrações fisiológicas, aumenta muito a capacidade da redutase do citocromio-b₅ para catalizar a transferência de electrões da NADH para a Mhb¹².

Nos eritrócitos existe normalmente um equilíbrio fisiológico entre Hb e Mhb, já que a Mhb é produzida constantemente em pequenas quantidades, com rápida reconversão ao estado reduzido. A meta-hemoglobinemia ocorre quando a concentração sanguínea de Mhb é superior a 1%⁵. A Mhb é produzida a um ritmo lento e previsível *in vivo* pela perda de um electrão do heme para o oxigénio libertado (Fig. 2). A seguir à perda de um electrão, a fixação de O₂ pelo ferro hémico (oxidado) não pode ocorrer, a não ser que se recupere um electrão através de mecanismos redutores intracelulares. Porque a capacidade redutora dos eritrócitos para reduzir o heme oxidado excede a oxidação em várias centenas de vezes, menos de 1% da Hb total será encontrada habitualmente na forma férrica¹⁷.

A deficiência de redutase do citocromio-b₅ é transmitida de modo recessivo. Esta enzima é uma flavoproteína que participa na transferência de electrões da NADH para o citocromio-b₅, usando o dinucleótido de adenina flavina como grupo protético. A redutase do citocromio-b₅ é uma proteína de 32000 Daltons, compreendendo uma única cadeia peptídica e um resíduo de dinucleótido de adenina flavina. O gene b₅R regulando a síntese da redutase do citocromio-b₅ tem um tamanho de 31 kb, nove exões e oito intrões, e foi localizado no cromossoma 22q13-qter, já tendo sido encontradas várias mutações do gene^{12,15}. A heterogeneidade alélica é suficiente para explicar as diferenças fenotípicas dos vários tipos de doença¹².

Redutase dependente da NADPH

Outra enzima que reduz a Mhb é a redutase dependente da NADPH [reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) reductase], mas que em condições normais tem um papel negligenciável na redução da Mhb. Na verdade, trata-se sobretudo de uma redutase generalizada com afinidade para corantes, tal como o azul de metileno (AM)¹⁸. Na presença do co-factor NADPH, esta enzima reduz o corante, o qual, actuando como agente catalizante exógeno, reduz por sua vez rapidamente a Mhb a Hb normal, daí advindo a sua utilidade no tratamento da meta-hemoglobinemia. Nesta reacção, o corante, na sua forma azul (oxidada), é reduzido a azul de leucometileno, ao aceitar um electrão da NADPH na presença de redutase dependente da NADPH. Por sua vez, o azul de leucometileno actua como dador de um electrão e reduz não-enzimaticamente a Mhb a Hb¹⁹.

Se um indivíduo tiver uma deficiência congénita desta enzima, no caso de ocorrência de uma meta-hemoglobinemia química, ele não é capaz de responder à terapêutica convencional com AM, ou só o faz de forma incompleta se

porque a este nível ocorrem os efeitos tóxicos descritos do AM.

De salientar que a falta de resposta à dose inicial deve obrigatoriamente levar o médico a pensar num défice associado de desidrogenase da glucose-6-fosfato, caso em que não se deverá repetir o AM. Quando a deficiência desta enzima é previamente conhecida, se a deficiência for tão só parcial, o AM ainda poderá ser capaz de baixar os níveis de Mhb, sem desencadear uma hemólise grave, reservando-se a exsanguíneo-transfusão para os casos em que se prova a ineficácia do AM. Mas há que ter o cuidado de iniciar o tratamento com doses mais baixas de AM, da ordem dos 0,3-0,5 mg/kg, doseando por titulação doses um pouco mais elevadas, em ordem a reduzir mais eficazmente os níveis de Mhb⁶.

Outra causa de falta de resposta ao tratamento com AM poderá ser a sulfa-meta-hemoglobinemia, porventura mal diagnosticada em favor do diagnóstico de meta-hemoglobinemia.

Terapêutica alternativa

Em casos graves ou refractários de meta-hemoglobinemia à terapêutica com AM, transfusões sanguíneas, exsanguíneo-transfusões e mesmo terapêutica com oxigénio hiperbárico, poderão ser a única alternativa²³.

Uma advertência adicional é necessária em doentes com meta-hemoglobinemia "recorrente", nos quais, após uma descida dos níveis de Mhb depois do tratamento com AM, se assiste subsequentemente a uma subida de novo a níveis tóxicos. É o caso da anilina, da dapsona e da benzocaina. Poderá dar-se o caso de ter havido uma descontaminação inadequada, mas o factor produção cíclica de Mhb é importante de considerar nestes casos. Estes agentes são metabolizados em metabolitos reactivos que oxidam a Hb. A reacção redox para formar Mhb regenera o composto-pai original, o qual pode ser remetabolizado a metabolito oxidativo⁹.

Uma alternativa potencial ao AM parece ser a N-acetilcisteína (NAC). A cisteína é uma componente do glutatião, e contém um grupo sulfidrílico reduzido. Ao contrário do glutatião, a cisteína é permeável às membranas celulares. Estudos *in vivo* demonstraram acção eficaz da cisteína na redução da Mhb, sendo igualmente demonstrada a eficácia da cisteína durante a inibição da desidrogenase da glucose-6-fosfato *in vitro*. Acredita-se que a NAC actuará como precursor da síntese do glutatião e como um dador de electrões, reduzindo directamente o metabolito reactivo. Porque a síntese de glutatião não é dependente da NADPH, é possível que a NAC possa ser um antídoto mais eficaz e seguro no tratamento da meta-hemoglobinemia em doentes com deficiência da desidrogenase da glucose-6-fosfato⁶.

Bibliografia

1. Darling R, Roughton S. Effects of methemoglobinemia on equilibrium between oxygen and hemoglobin. *Am J Physiol* 1942; 137: 56-62.

2. Mansouri A, Luri A. Concise review: Methemoglobinemia. *Am J Hematol* 1992; 42: 7-12.

3. Jaffé E. Hereditary methemoglobinemia associated with abnormalities in the metabolism of erythrocytes. *Am J Med* 1966; 41: 786-798.

4. Stryver L. Oxygen transporting proteins. In *Biochemistry* 3rd ed. Ed. Freeman WH. New York. 1988: 143-171.

5. Curry S. Methemoglobinemia. *Ann Emerg Med*. 1982; 11: 214-221.

6. Wright R, Lewander W, Woolf A. Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management. *Ann Emerg Med* 1999; 34: 646-656.

7. Beutler E. Methemoglobinemia and other causes of cyanosis. In *William's Hematology* 5th ed. Ed. Beutler E, Lichtman MA, Coller RS, et al. McGraw-Hill, Inc 1995: 654-663.

8. Tauher A, Blanchard R. Congenital methemoglobinemia with cytochrome-b₅ deficiency. *N Engl J Med* 1986; 315: 894.

9. Harvey J, Keitt A. Studies of the efficacy and potential hazards of methylene blue therapy in aniline-induced methemoglobinemia. *Br J Haematol* 1983; 54: 29-41.

10. Sanchez-Echaniz J, Benito-Fernández J, Miguel-Raso S. Consumo de vegetais e metahemoglobinemia infantil. *Pediatrics* (ed. Port.) 2001; 9: 249-253.

11. Jaffé E. Enzymogenic hereditary methemoglobinemia. A clinical/biochemical classification. *Blood Cells* 1986; 12: 81-90.

12. Jaffé E, Hulquist D. Cytochrome-b₅ reductase deficiency and enzymogenic hereditary methemoglobinemia. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* 8th ed. Ed. Scriver C, Beaudet A, Sly WS, Valle D. New York. McGraw-Hill 2001: 4555-4570.

13. Townes PL, Morrison M. Investigation of the defect in a variant of hereditary methemoglobinemia. *Blood* 1962; 19: 60-74.

14. Cohen R, Sachs J, Wicker D et al. Methemoglobinemia provoked by malarial chemoprophylaxis in Vietnam. *N Engl J Med* 1968; 279: 1127-1131.

15. Higasa K, Manabe JI, Yubisui T et al. Molecular basis of hereditary methemoglobinemia, types I and II. two novel mutations in the NADH-cytochrome-b₅ reductase gene. *Brit J Hematol* 1998; 103: 922-930.

16. Yawata Y, Ding L, Tanishim K et al. New variant of cytochrome-b₅ reductase deficiency (b₅R^{kurashiki}) in red cells, platelets, lymphocytes and cultured fibroblasts with congenital methemoglobinemia, mental and neurologic retardation and skeletal anomalies. *Am J Hematol* 1992; 40: 299.

17. Scott E. Congenital methemoglobinemia due to DPNH-diaphorase. In *Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism*. Ed. Beutler E. Grune and Stratton. New York 1968: 102.

18. Methemoglobinemia and other Disorders usually accompanied by cyanosis. In *Wintrobe's Clinical Hematology* 8th ed. Ed. Wintrobe M, Lee OR, Boggs DR, et al. Lea and Febiger. Philadelphia 1981: 1011-1015.

19. Metz E, Balcerzak S, Sagon L. Mechanism of methylene blue stimulation of the hexose monophosphate shunt in the erythrocyte. *J Clin Invest* 1976; 58: 797-802.

20. Beutler E, Baluda M. Methemoglobin reductase. Studies in the interaction between cell populations and of the role of methylene blue. *Blood* 1963; 22: 323-333.

21. Rosen P, Johnson C, McGehee, et al. Failure of methylene blue treatment in toxic metemoglobinemia. Association with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Ann Int Med* 1971; 75: 83-86.

22. Nadler J, Green H, Rosenbaum A. Intravenous injection of methylene blue in man with reference to its toxic symptoms and effect on the electrocardiogram. *Am J Med Sci* 1934; 188: 15-21.

23. Golden P, Weinstein R. Treatment of high-risk, refractory acquired methemoglobinemia with automated red blood cell exchange. *J Clin Apheresis* 1998; 13: 28-31.