



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITO PROTETOR DE ANTIOXIDANTES NA FORMAÇÃO DE
METEMOGLOBINA INDUZIDA PELO METABÓLITO DAPSONA-
HIDROXILAMINA *IN VITRO***

EVERTON LUIZ POMPEU VARELA

**BELÉM-PA
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO PROTETOR DE ANTIOXIDANTES NA FORMAÇÃO DE
METEMOGLOBINA INDUZIDA PELO METABÓLITO DAPSONA-
HIDROXILAMINA *IN VITRO***

Autor: Everton Luiz Pompeu Varela

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Chagas Monteiro.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará (PPGCF-UFGPA) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área: Fármacos e medicamentos.

Linha de Pesquisa: Avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos.

BELÉM-PA
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde / UFPA

Varela, Everton Luiz Pompeu.

Efeito protetor de antioxidantes na formação da metemoglobina induzida pelo metabólito dapsona-hidroxilamina in vitro / Everton Luiz Pompeu Varela; orientadora, Marta Chagas Monteiro. – Belém, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2017.

1. Antioxidantes. 2. Dapsona-hidroxilamina. 3. Ebselen. 4. Glutathione. 5. Metemoglobina. I. Título.

CDD: 22. ed. : 613.286

EVERTON LUIZ POMPEU VARELA

**EFEITO PROTETOR DE ANTIOXIDANTES NA FORMAÇÃO DE
METEMOGLOBINA INDUZIDA PELO METABÓLITO DAPSONA-HIDROXILAMINA
*IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área: Fármacos e medicamentos.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro (PPGCF/UFPA) – Orientadora

Profa. Dra. Patrícia Dutra Sauzem (UNIPAMPA/UFPA) – Examinadora

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira (PPGCF/UFPA) - Examinador

BELÉM-PA
2017

RESUMO

VARELA, E.L.P. **Efeito Protetor de antioxidantes na formação de metemoglobina induzida pela dapsona-hidroxilamina *in vitro***. 116 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

A dapsona, utilizada na terapia da hanseníase, e seu metabólito, dapsona-hidroxilamina são potentes agentes pró-oxidantes que causam a metemoglobinemia adquirida. Para o tratamento desta doença é utilizado o Azul de Metileno, no entanto em altas doses este antídoto se torna pró-oxidante. Nesse sentido, antioxidantes podem ser alternativas potenciais ao AM para o tratamento da metemoglobinemia. Dessa forma, investigamos a capacidade de proteção do Ebselen, N-acetilcisteína, ácido R-lipóico e L-lipóico contra a oxidação da hemoglobina induzida por DDS-NOH em eritrócitos humanos *in vitro*. Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com os antioxidantes Ebselen, N-acetilcisteína, ácido R-lipóico e ácido S-lipóico preveniu a formação de metemoglobina, a redução da glutatona e a peroxidação lipídica induzida pelo metabólito dapsona-hidroxilamina em eritrócitos humanos *in vitro*. Estas substâncias foram capazes de aumentar a capacidade antioxidante do eritrócito associado ao aumento da concentração de glutatona. Dessa forma, os antioxidantes atuaram reduzindo a oxidação da hemoglobina e/ou impediram direta ou indiretamente a ação do metabólito dapsona-hidroxilamina. Nossos resultados indicam que os antioxidantes testados podem proteger os eritrócitos contra o dano oxidativo nas condições experimentais, sugerindo que os antioxidantes podem servir como antídoto mais eficaz e seguro no tratamento da metemoglobinemia.

Palavras-Chave: Antioxidante; Dapsona-Hidroxilamina; Ebselen; Glutaciona; Metemoglobina.

ABSTRACT

VARELA, E.L.P. **Protective effect of antioxidants on the formation of methaemoglobin induced by dapsone-hydroxylamine in vitro.** 116 f. Dissertation (Master's) - Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2017.

Dapsone used in leprosy therapy its metabolite dapsone-hydroxylamine are potent pro-oxidant agents that cause acquired methemoglobinemia. For the treatment of this disease is used as antidote the Methylene Blue, however in high doses this antidote becomes pro-oxidant. In this sense, antioxidant substances may be potential alternatives to methylene blue for the treatment of methemoglobinemia. In this study we investigated the effect of antioxidants Ebselen, N-acetylcysteine, R-lipoic acid and L-lipoic acid on oxidative damage induced by dapsone-hydroxylamine in human erythrocytes, in vitro. Our results demonstrated that pre-treatment with antioxidants Ebselen, N-acetylcysteine, R-lipoic acid and S-lipoic acid prevented the formation of methemoglobin, reduction of glutathione and lipid peroxidation induced by the metabolite dapsone-hydroxylamine in human erythrocytes, In vitro. These substances were able to increase the antioxidant capacity of the erythrocyte associated with increased concentration of glutathione. Thus, antioxidants acted to reduce the oxidation of hemoglobin and / or directly or indirectly impeded the action of the metabolite dapsone-hydroxylamine. Our results indicate that the antioxidants tested can protect erythrocytes against oxidative damage under experimental conditions, suggesting that antioxidants may serve as the most effective and safe antidote in the treatment of methemoglobinemia.

Keywords: Antioxidant; Dapsone-Hydroxylamine; Ebselen; Glutathione; Methemoglobin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular da dapsona	16
Figura 2	Mecanismo de ação da dapsona	17
Figura 3	Mecanismos de biotransformação da dapsona	19
Figura 4	Mecanismos de formação da MetHb, por ação da DDS-NOH e do ciclo redox que recupera o composto nitrosoareno até o precursor DDS-NOH	20
Figura 5	Arquitetura da membrana eritrocitária mostrando a disposição de importantes proteínas integrais e também proteínas que formam o citoesqueleto celular	22
Figura 6	A hemoglobina A é formada por duas cadeias de globina α e duas cadeias de globina β . Cada cadeia contém uma molécula heme	25
Figura 7	Representações da estrutura do grupo heme, que é o sítio de ligação do oxigênio a hemoglobina	26
Figura 8	Mecanismo de formação de metemoglobina pelo processo de auto-oxidação da hemoglobina	27
Figura 9	(A) Redução da hemoglobina em circunstâncias normais e (B) após administração de azul-de-metileno	28
Figura 10	Mecanismo de proteção do sistema antioxidante dos eritrócitos a partir da produção de espécies reativas de oxigênio e produção de metemoglobina	31
Figura 11	Estrutura molecular do ebselen	34
Figura 12	Ação antioxidante do ebselen via glutathione	36
Figura 13	Ação antioxidante do ebselen via sistema de tioredoxinas	37
Figura 14	Ação anti-inflamatória do ebselen	38
Figura 15	Mecanismo catalítico do ebselen na redução de peroxinitrito para nitrito	39
Figura 16	Estrutura molecular da N-acetilcisteína	41
Figura 17	Mecanismo de ação da N-acetilcisteína	42
Figura 18	Estrutura do ácido R- α -lipóico e do S- α -lipóico	45
Figura 19	Representação esquemática da obtenção da suspensão de hemácias a 50%	49
Figura 20	Representação esquemática do pré-tratamento da suspensão de eritrócitos a 50%	50
Figura 21	Representação esquemática da determinação da metemoglobina	52
Figura 22	Representação esquemática da determinação de glutathione	53
Figura 23	Representação esquemática da determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox	54
Figura 24	Representação esquemática da dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico	55
Figura 25	Efeito do EbSe na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos	57

Figura 26	Efeito da NAC na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos	58
Figura 27	Efeito do R-ALA na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos	59
Figura 28	Efeito do S-ALA na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos	60
Figura 29	Efeito do EbSe nos níveis de GSH em eritrócitos estimulados com DDS-NOH	61
Figura 30	Efeito da NAC nos níveis de GSH em eritrócitos estimulados com DDS-NOH	62
Figura 31	Efeito do pré-tratamento com R-ALA nos níveis de GSH em eritrócitos estimulados com DDS-NOH	63
Figura 32	Efeito do pré-tratamento com S-ALA nos níveis de GSH em eritrócitos estimulados com DDS-NOH	64
Figura 33	Efeito do pré-tratamento com o EbSe sobre a capacidade antioxidante de eritrócitos tratado com DDS-NOH	65
Figura 34	Efeito do pré-tratamento com a NAC sobre a capacidade antioxidante de eritrócitos tratado com DDS-NOH	66
Figura 35	Efeito do pré-tratamento com R-ALA sobre a capacidade antioxidante de eritrócitos tratado com DDS-NOH	67
Figura 36	Efeito do pré-tratamento com o S-ALA sobre a capacidade antioxidante de eritrócitos tratado com DDS-NOH	68
Figura 37	Efeito do pré-tratamento com EbSe sobre os níveis de TBARS em eritrócitos tratado com DDS-NOH	69
Figura 38	Efeito do pré-tratamento com a NAC sobre os níveis de TBARS de eritrócitos tratado com DDS-NOH	70
Figura 39	Efeito do pré-tratamento com o R-ALA sobre os níveis de TBARS de eritrócitos tratado com DDS-NOH	71
Figura 40	Efeito do pré-tratamento com o S-ALA sobre os níveis de TBARS de eritrócitos tratado com DDS-NOH	72
Figura 41	Efeito do pré-tratamento com EbSe sobre a atividade da catalase de eritrócitos tratados com DDS-NOH	73
Figura 42	Efeito do pré-tratamento com NAC sobre a atividade de catalase de eritrócitos estimulados com DDS-NOH	74
Figura 43	Efeito do pré-tratamento com R-ALA sobre a atividade de catalase de eritrócitos estimulados com DDS-NOH	75
Figura 44	Efeito do pré-tratamento com S-ALA sobre a atividade de catalase de eritrócitos estimulados com DDS-NOH	76
Figura 45	Efeito do pré-tratamento com o EbSe na atividade da SOD de eritrócitos tratados com DDS-NOH	77
Figura 46	Efeito do pré-tratamento com NAC na atividade da SOD de eritrócitos tratados com DDS-NOH	78
Figura 47	Efeito do pré-tratamento com R-ALA na atividade da SOD de eritrócitos tratados com DDS-NOH	79
Figura 48	Efeito do pré-tratamento com S-ALA na atividade da SOD de eritrócitos tratados com DDS-NOH	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%MetHb	Porcentagem de Metemoglobina
•OH	Radical hidroxila
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
AE1	Banda 3 ou <i>ânion exchanger 1</i>
ALA	Acido α -lipóico
AM	Azul de metileno
Ar-N=O	Arilnitroso
AR-NH ₂	Grupo aril amina
ASC	Sistema de transporte alanina-serina-cisteína
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Enzima catalase
Cis	Cisteína
CO ₂	Gás carbônico
COX	Ciclooxygenase
CYP2C	Citocromo P450 2C
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DDS	Dapsona
DDS-NO	Dapsona nitrosoareno
DDS-NOH	Dapsona-hidroxilamina
DDT	Ditiotreitol
DTNB	Ácido 5,5'- ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EbSe	Ebselen
EbSe-H	Selenol
EbSe-O	Óxido de selênio
EbSe-OH	Ácido seleninico
EbSe-S-GSH	Selenenil sulfeto
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
Gli	Glicina
GPx	Glutaciona peroxidase
GPx 1	GPx clássica ou citosólica
GPx 2	GPx gastrointestinal

GPx 3	GPx plasmática ou extracelular
GPx 4 ou GPx-PH	GPx fosfolipídio hidroperóxido
GPx 5	GPx epididimal
GPx 6	GPx epitélio olfativo
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H ⁺ -K ⁺ -ATPase	H ⁺ -K ⁺ -Adenosina Tri-Fosfatase ou bomba de prótons
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HClO	Ácido hipocloroso
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
L•	Radical lipídico
LH	Ácido graxo poli-insaturado
LO•	Radicais alcóxil
LOO•	Radical peróxil
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MADDS	Monoacetildapsona
MADDS-NOH	Monoacetildapsona-hidroxilamina
MDA	Malondialdeído
MetHb	Metemoglobina
MetHba	Metemoglobinemia
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH-MR	NADH metemoglobina redutase
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH oxidase	Oxidase nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAT	N-acetiltransferase
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
O ₂ Hb	Oxiemoglobina
ONO ⁻	Nitrito
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzoico
PBS	Tampão fosfato salina

PGE ₂	Prostaglandina E ₂
Ph	Potencial hidrogeniônico
PQT	Poliquimioterapia
RAM	Reação Adversa a Medicamentos
ROH	Álcool
ROO	Peróxido orgânico
ROO [•]	Radical peroxila
ROOH	Hidroperóxido orgânico
Se	Selênio
SOD	Enzima superóxido dismutase
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao trolox
TNB	Ácido nitrobenzóico
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase
γ-GCS	γ-glutamil cisteína sintetase

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Dapsona e Dapsona-hidroxilamina	16
2.2 Eritrócitos humanos	21
2.2.1 MEMBRANA DO ERITRÓCITO	21
2.2.2 HEMOGLOBINA (Hb)	24
2.2.3 FORMAÇÃO E REDUÇÃO DA METEMOGLOBINA.....	26
2.2.4 IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS <i>IN VITRO</i> COM ERITRÓCITOS.....	29
2.3 Tratamento da Metemoglobinemia adquirida	33
2.3.1 AZUL DE METILENO	33
2.4 Terapias alternativas com antioxidantes para tratamento da metemoglobinemia	33
2.4.1 EBSELEN	34
2.4.2 N-ACETILCISTEÍNA	41
2.4.3 ÁCIDO α -LIPÓICO	44
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Obtenção e preparação das amostras	48
4.2 Preparação das substâncias de trabalho	49
4.3 Pré-tratamento das amostras.....	50
4.4 Determinação de metemoglobina.....	51
4.5 Determinação de Glutathiona reduzida.....	52
4.7 Dosagem de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico	54
4.8 Determinação da superóxido dismutase	55
4.9 Determinação da atividade da catalase	56
4.10 Análise estatística.....	56
5 RESULTADOS	57

5.1 Efeito do Ebselen, da N-acetilcisteína, do Ácido R-lipóico e do Ácido S-lipóico na formação de metemoglobina induzida por DDS-NOH em eritrócitos	57
5.2 Efeito do pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, Ácido R-lipóico ou Ácido S-lipóico sobre os níveis de glutatona em eritrócitos tratados com DDS-NOH	61
5.3 Efeito do pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, Ácido R-lipóico ou Ácido S-lipóico sobre capacidade antioxidante total em eritrócitos tratados com DDS-NOH	65
5.4 Efeito do pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, Ácido R-lipóico ou Ácido S-lipóico sobre os níveis de TBARS em eritrócitos tratados com DDS-NOH	69
5.5 Efeito do pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, Ácido R-lipóico ou Ácido S-lipóico sobre a atividade da enzima catalase em eritrócitos tratados com DDS-NOH	73
5.6 Efeito do pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, Ácido R-lipóico ou Ácido S-lipóico sobre a atividade da enzima superóxido dismutase de eritrócitos tratados com DDS-NOH	77
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

A metemoglobina é uma forma de hemoglobina caracterizada pela presença do ferro no estado férrico, incapaz de se ligar ao oxigênio. Quando a concentração de metemoglobina ultrapassa os valores de 2% considerados normais, podem surgir sintomas decorrentes de uma entrega inadequada de oxigênio aos tecidos. Doentes com níveis inferiores a 10% são geralmente assintomáticos. Níveis de 10-30% provocam sintomas como cefaleias, alteração do estado de consciência, tonturas ou síncope e níveis superiores a 50% podem ser fatais (ASH-BERNAL et al. 2004). A metemoglobinemia é uma forma de anemia funcional que pode ser causada por fármacos comumente prescritos, como a dapsona (KIM et al. 2016). Estudos retrospectivos demonstraram que a etiologia mais comum da metemoglobinemia adquirida foi a dapsona, representando a maioria de todos os casos (ASH-BERNAL et al. 2004; PARK et al. 2010).

A dapsona é utilizada principalmente para o tratamento da hanseníase e é um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento da metemoglobinemia, mesmo em doses terapêuticas (COLEMAN, 1995; DIÓRIO et al. 2005). Além da metemoglobinemia, outras reações adversas estão relacionados a dapsona, tais como anemia hemolítica, neuropatias periféricas reversíveis, entre outros (VYAS et al. 2005). Para o tratamento da metemoglobinemia é indicada, a administração intravenosa do azul de metileno, que através de mecanismos não-enzimáticos reduz a metemoglobina à hemoglobina (GIBSON, 2002; HAYMOND et al. 2005). Como o efeito do azul de metileno é relativamente breve, e a meia-vida da dapsona, prolongada, é comum a recorrência da metemoglobinemia, sendo eventualmente necessária a aplicação de doses adicionais do azul de metileno. No entanto, doses elevadas de azul de metileno podem agravar a metemoglobinemia e hemólise devido ao seu efeito oxidante (SHIHANA et al. 2010).

Uma alternativa adjuvante para as reações adversas da dapsona, com base na sua circulação enteroepática e a reação oxirredução com a hemoglobina consiste na utilização de substâncias antioxidantes que podem promover a redução dos efeitos tóxicos causados pelo metabolito dapsona-hidroxilamina, principalmente em

eritrócitos. Como estas substâncias atuam por vias diferentes da do azul de metileno, é possível que possam servir como antídotos mais eficazes e seguros para o tratamento da metemoglobinemia. Além disso, é importante investigar os parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes envolvidos no equilíbrio redox celular e melhorar a adesão dos pacientes com hanseníase durante a terapia com a dapsona.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dapsona e Dapsona-hidroxilamina

A 4,4'-diaminodifenilsulfona (DDS, dapsona) é um pó cristalino branco, inodoro, pouco solúvel em água e de fórmula molecular $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ (Figura 1; GRUNWALD e AMICHAÏ, 1996; GOULART et al. 2002). Esse fármaco foi sintetizado em 1908 (FROMM e WITTMAN, 1908), e em 1937 teve sua atividade antibacteriana contra o *Mycobacterium leprae* estabelecida devido a sua similaridade com as sulfonamidas (BUTTLE et al. 1937; FORNEAU et al. 1937). Além disso, apresenta efeitos contra o *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii* e *Pneumocystis jirovecii* (DHOPLÉ, 1999; AMUKOYE et al.1997).

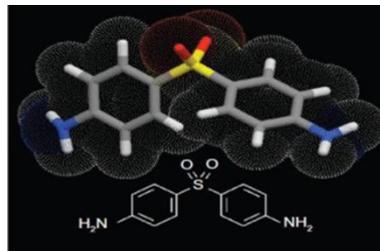


Figura 1 - Estrutura molecular da Dapsona. Este fármaco possui grupo sulfonil (SO_2) e grupo arilamina ($AR-NH_2$). Fonte: Monteiro et al. 2012.

A DDS é um fármaco pertencente à classe das sulfonas e, por ser análogo estrutural do ácido *p*-aminobenzoico (PABA), age inibindo a enzima diidropteroato sintetase, impedindo a síntese de ácido fólico (Figura 2). A ausência de ácido fólico impede a síntese bacteriana de purinas, pirimidinas e alguns aminoácidos, e a formação de RNA e DNA, resultando na interrupção do crescimento bacteriano (WOLVERTON, 1992; COLEMAN et al. 1993; FARHI et al. 2005). Este mecanismo explica o fato da DDS ser um agente antimicrobiano de amplo espectro com efeitos

antibacterianos, antiprotozoários e antifúngicos (AMUKOYE et al.1997; DHOPLE, 1999).

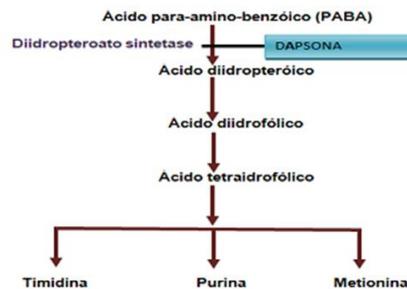


Figura 2 - Mecanismo de ação da Dapsona (DDS). A DDS inibe a enzima diidropteroato sintetase e impede a síntese de ácido fólico e a formação de RNA e DNA, resultando na interrupção do crescimento bacteriano. Fonte: Adaptado de Farhi et al. 2005.

Além dessas propriedades, a DDS apresenta efeitos anti-inflamatórios, não relacionados à sua ação antibacteriana. Por isso, este fármaco é indicado para o tratamento de inflamações na pele, como a dermatite herpetiforme, apesar desta atividade ainda não ser bem compreendida (COLEMAN et al. 1993; THUONG-NGUYEN et al. 1993; WOLF et al. 2001). No entanto, sabe-se que o tratamento de doenças inflamatórias com DDS leva à diminuição da infiltração de neutrófilos no tecido afetado (LANG, 1979), devido a sua ação em bloquear os mecanismos de adesão mediados pelas integrinas (BOOTH et al. 1992). Além disso, a DDS inibe a atividade de mieloperoxidase, a explosão respiratória e a atividade das enzimas lisossomais dos neutrófilos. Portanto, a ação anti-inflamatória da DDS parece estar relacionada à sua ação nas funções dos neutrófilos (WOLF et al. 2001; OLIVEIRA et al. 2014).

Até a década de 80 a DDS era o fármaco de escolha para o tratamento da hanseníase (DHOPLE, 1999). No entanto, a resistência do *M. leprae* à monoterapia que está associada às mutações nos genes que codificam a diidropteroato sintetase, fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconizasse a PQT como novo esquema terapêutico (CAMBAU et al. 1997). Com isso, outros quimioterápicos como a rifampicina (RMP) e a clofazimina (CFZ) passaram a ser associados à DDS,

favorecendo o controle da transmissão e evolução da doença em países considerados endêmicos (DIÓRIO et al. 2005).

Por outro lado, a utilização da DDS acarreta alguns problemas relacionados a reações adversas (SCHALCHER et al. 2014). Mesmo em doses consideradas terapêuticas, a DDS pode causar metemoglobinemia (MetHba), hemólise, anemia hemolítica e diminuição do tempo de vida dos eritrócitos (COLEMAN, 1995; LANDERS et al. 1996; QUEIROZ et al. 1997; WARD e MCCARTHY, 1998; SALAMAT e WATSON, 2003). Agranulocitose, problemas hepáticos e renais, dermatite esfoliativa, neuropatia periférica, febre, cefaleias, psicoses e foto dermatite, são outros efeitos adversos que podem ocorrer, em menor frequência (COLEMAN, 1995; PAVITHRAN e SATISH, 1997; LESLIE et al. 2003).

A DDS é absorvida rapidamente, principalmente pelo trato gastrointestinal e o pico de concentração plasmático é alcançado dentro de 2-8 horas. A meia vida de eliminação é de cerca de 20-30 horas, sendo que 24 horas após a ingestão oral de 100 mg, a concentração no plasma alcança de 0,4-1,2 µg/mL, e uma dose de 100 mg por dia produz uma concentração constante de 0,1-0,3 µg/mL de DDS livre (ZUIDEMA et al. 1986; ELLARD 1966). Cerca de 70% da droga se encontra ligada a proteínas plasmáticas. A DDS é distribuída por todo o corpo e está presente em todos os tecidos. Com tudo, a DDS acumula-se na pele, nos músculos e especialmente no fígado e rins. Traços da droga podem ser encontrados nestes órgãos até 3 semanas após a interrupção da terapia. Cerca de 70-80% de uma dose de DDS são excretados na urina como um mono-*N*-glicuronídeo e mono-*N*-sulfamato (WOLF et al. 2000).

A DDS é metabolizada no fígado por dois mecanismos distintos: *N*-acetilação e *N*-hidroxilação. Na *N*-acetilação, a enzima *N*-acetiltransferase (NAT) biotransforma a DDS formando monoacetildapsona (MADDS), um metabólito pouco reativo que após conjugação é facilmente excretado (ZUIDEMA et al. 1986). Já na *N*-hidroxilação a DDS e a MADDS são metabolizadas pelo citocromo P450, isoenzimas CYP2E1 e CYP2C (WINTER et al. 2000), formando dapsona hidroxilamina (DDS-NOH) e monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH) como mostrado na figura 3 (MITRA et al. 1995). Estes metabólitos, são considerados agentes pró-oxidantes e responsáveis por reações adversas à terapia com DDS, principalmente a formação

de metemoglobina (MetHb; ELLARD et al. 1972; VAGE et al. 1994; SCHIFF et al. 2006).

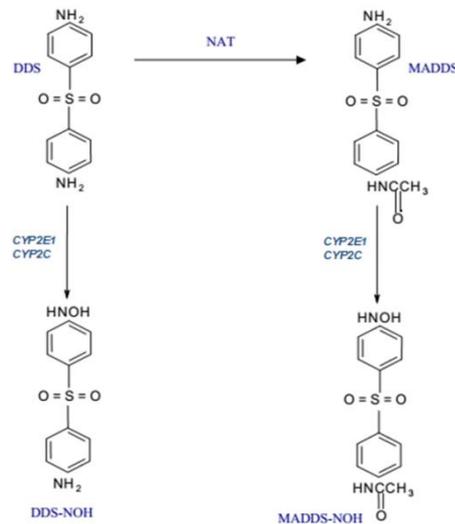


Figura 3 - Mecanismos de biotransformação da dapsona. P450, citocromo P450; DDS, dapsona; DDS-NOH, dapsona-hidroxilamina; MADDS, monoacetildapsona; MADDS-NOH, monoacetildapsona-hidroxilamina; NAT, N-acetiltransferase. Fonte: Adaptado de GILL et al.1995.

Estudos foram realizados para identificar, qual dos metabólitos seria o principal responsável pelos efeitos hematotóxicos apresentados pelos pacientes durante a terapia com DDS (HJELM e DEVERDIE, 1965; GLADER e CONRAD, 1973). Nesse sentido, estudo *in vitro* utilizando modelo com eritrócitos humanos relatou que ambos os metabólitos foram tóxicos aos eritrócitos (ISRILLI et al. 1973). Outros estudos *in vitro* e em modelos animais corroboram com estes resultados (VAGE et al. 1994; COLEMAN et al. 1996). Por outro lado, como a DDS-NOH apresenta maior potencial reativo com a hemoglobina (Hb), acredita-se que este metabólito seria o principal responsável pelos efeitos hematotoxicos provocados pela ingestão da DDS (EVELO et al. 1998; REILLY et al. 1999).

Nesse sentido, a ação metemoglobinizante da dapsona parece estar relacionada, à sua conversão metabólica a dapsona-hidroxilamina (Figura 4). Esse metabólito ao oxidar hemoglobina a metemoglobina é oxidado a dapsona-

nitrosoareno que pode reagir com os sistemas NADH metemoglobina redutase (NADH-MR) ou glutaciona (GSH), formando novamente a dapsona-hidroxilamina este ciclo pode contribuir para permanência da droga *in vivo* favorecendo a hematotoxicidade (COLEMAN et al. 1993).

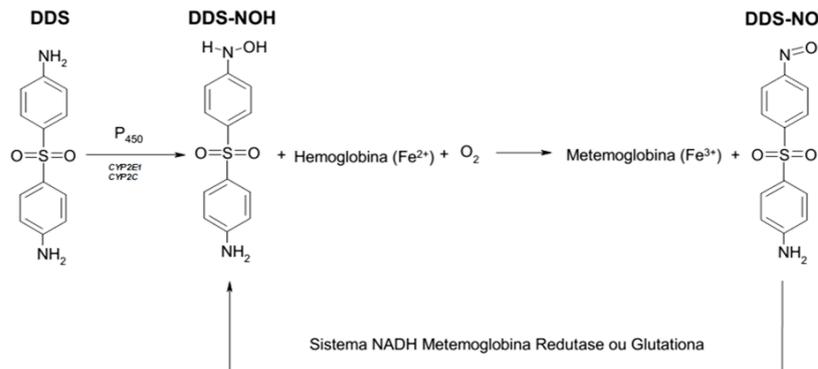


Figura 4 - Mecanismos de formação da metemoglobina, por ação da dapsona hidroxilamina e do ciclo redox que recupera o composto nitrosoareno até o precursor dapsona-hidroxilamina. DDS, Dapsona; DDS-NOH, Dapsona-Hidroxilamina; DDS-NO, Dapsona Nitrosoareno, P450, Citocromo P450; NADH-metemoglobina redutase. Fonte: Adaptado de GILL et al.1995.

A DDS-NOH tem sido estudada com intuito de se verificar a relação com os distúrbios hematológicos e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO; WOLF et al. 2000). Nesse sentido, observa-se que a DDS-NOH induz aumento da formação de MetHb (TIMOTHY et al. 1997) e redução da concentração de glutaciona, deixando o eritrócito susceptível ao estresse oxidativo (CICCOLI et al. 1999; REILLY et al. 2000). Estudo recente demonstrou que após a terceira dose supervisionada da PQT, os níveis de MetHb e número de corpos de Heinz aumentam, sugerindo que a DDS seria a responsável por este efeito. Adicionalmente, outro estudo comprovou que o metabolito da dapsona induziu a formação de 19% de MetHb, além de aumentar a produção intracelular de ERO (SCHALCHER et al. 2014; ALBUQUERQUE et al. 2015).

Como o potencial da DDS-NOH em induzir MetHb em eritrócitos está intimamente relacionado com o ciclo de oxidação-redução (REILLY et al. 1999), esta

reação pode provocar desnaturação oxidativa da membrana dos eritrócitos (COLEMAN, 1993). Além disso, pode induzir alterações progressivas no domínio citosólico das proteínas de membrana dos eritrócitos, impedindo as interações da membrana, levando a agregação das proteínas banda 3 e a circulação de anticorpos autólogos na circulação e a remoção prematura dos eritrócitos (BORDIN et al. 2010).

2.2 Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos são células anucleadas que apresentam a função vital de transportar O_2 aos tecidos através da Hb (DACIE e LEWIS, 1995). Os eritrócitos maduros não possuem mitocôndria, portanto, não realizam a respiração celular, nem o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, fazendo com que as hemácias não consumam O_2 , passando a desempenhar eficientemente sua função de transporte de Hb (ÇIMEN, 2008). Cerca de 1% da população de eritrócitos é substituída diariamente, visto que, o período de vida do eritrócito normal corresponde a 120 dias (MURRAY et al. 2006).

2.2.1 MEMBRANA DO ERITRÓCITO

A membrana plasmática tem como função mediar transportes e, ainda, fornecer ao eritrócito resistência e flexibilidade (MURADOR et al. 2007), sendo essencialmente constituída de uma bicamada lipídica com 42% de lipídios, 52% de proteínas e 7% de carboidratos (Figura 5; PINTO et al. 2013).

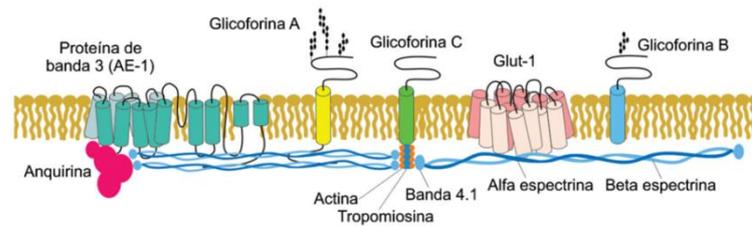


Figura 5 - Arquitetura da membrana eritrocitária mostrando a disposição de importantes proteínas integrais e também proteínas que formam o citoesqueleto celular. Fonte: Adaptado de PINTO et al. 2013.

Os fosfolipídios (FL) distribuídos na bicamada dos eritrócitos e encontrados do lado externo da membrana são principalmente, esfingomiélin (EM) e a fosfatidilcolina (FC), ambas redutoras da fluidez da membrana. Já a fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilserina (FS) e fosfatidilinositol (FI), responsáveis por membranas mais fluidas, são encontrados no lado citosólico da membrana. A distribuição destes lipídios pode estar relacionada a curvatura da membrana (LODISH, 2004). As proteínas de membrana eritrocitária são estruturalmente classificadas em integrais ou transmembranas e periféricas ou extramembranas. Estas proteínas compõem o citoesqueleto e são responsáveis pela forma bicôncava normal, ou anormal em caso de defeitos genéticos, pela deformidade de sua membrana, fluidez de seu citoplasma e complexidade da superfície de sua membrana. Além disso, estas proteínas asseguram as funções de transporte de O_2 aos tecidos e remoção do dióxido de carbono (CO_2) para os pulmões (MURRADOR et al. 2007).

A banda 3 ou proteína de troca aniônica (*anion exchanger 1, AE1*), a principal proteína integral da membrana do eritrócito é dividida em três regiões: um domínio externo, domínio transmembrana e o domínio citosólico (BORDIN et al. 2010). O domínio externo, provavelmente permite que a proteína banda 3 seja reconhecida como antígeno específico (BRATOSIN et al. 1998). O domínio transmembrana, atravessa de 12 a 13 vezes a bicamada lipídica, tem a função de mediar a troca de cloreto (Cl^-) e ânions de bicarbonato (HCO_3^-) através da membrana plasmática. Este processo leva ao aumento da capacidade eritrocitária de transportar CO_2 , visto que

mais de 60% desse gás é transportado no interior do eritrócito na forma de HCO_3^- , assegurando a homeostase e o equilíbrio ácido-básico (ZHANG et al. 2000).

O domínio citosólico contém os locais de fosforilação de proteínas que são responsáveis por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade celular (WANG, 1994). A fosforilação de grupos específicos de serina e treonina do domínio citosólico da banda 3 regula a taxa de fluxo de ânions (BAGGIO et al. 1993), enquanto, a fosforilação da tirosina está envolvida em várias funções, incluindo regulação da glicólise (LOW et al. 1993), alteração da morfologia do eritrócito, volume e senescência do eritrócito (BORDIN et al. 1995; MUSCH et al. 1999; BORDIN et al. 2009; PANTALEO et al. 2009).

A segunda proteína integral mais abundante é a sialoglicoproteína glicoforina A (GPA), que possui alto conteúdo de ácido siálico. A GPA contribui com a rede de carga negativa na superfície da membrana do eritrócito, minimizando a interação célula-célula e prevenindo, assim, sua agregação. Além disso, esta proteína estabiliza o citoesqueleto através de ligações com as proteínas periféricas, principalmente, espectrina, actina, anquirina, proteína 4.1 na face interna da membrana plasmática (GALLAGER et al. 1998; AUFRAY et al. 2001).

2.2.2 METABOLISMO DO ERITRÓCITO

Por não possuírem mitocôndrias, os eritrócitos maduros são dependentes do catabolismo da glicose para seu suprimento de adenosina trifosfato (ATP). Esta atividade metabólica ocorre principalmente pela via de Embden-Meyerhof e pela via da hexose monofosfato, sendo importantes para a manutenção da forma e função celular (CIESLA, 2007).

A via de Embden-Meyerhof ou glicólise é a principal fonte de energia metabólica para os eritrócitos. Mais de 90% da glicose consumida pelo eritrócito é metabolizada por esta via, gerando o ATP, como fonte de energia, o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e o nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH; TELEN e

KAUFMAN, 1999). As moléculas de ATP produzidas liberam energia para a manutenção do volume do eritrócito, da sua forma discóide e da sua flexibilidade (LORENZI et al. 2003). O 2,3-DPG é uma substância que modula a afinidade da Hb pelo O₂. A via da hexose monofosfato metaboliza aproximadamente 10% da glicose em condições normais. O produto mais importante dessa via é a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). A NADPH é gerada a partir da oxidação da glicose-6-fosfato (G6P), pela glicose 6-fosfato deidrogenase (G6-PD). O consumo de NADPH é o principal estímulo para a utilização de G6PD pela via da hexose monofosfato (HILLMAN, 2001). O NADPH além de ser consumido na via de síntese da GSH, também é essencial para manutenção dos níveis normais desse antioxidante (GREER et al. 2003), assim como pode ser utilizado por alguns agentes redutores, como o azul de metileno, na redução da MetHb a Hb (HAYMOND et al. 2005).

2.2.2 HEMOGLOBINA (Hb)

A Hb é a principal proteína do eritrócito e tem alta afinidade pelo O₂ e, por isso, pode transportá-lo para os tecidos (Figura 6). A Hb é formada por quatro subunidades, compostas de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, sendo um par denominado de cadeias do tipo alfa (alfa- α ou zeta- ξ) e o outro de cadeias do tipo não-alfa (beta- β , delta- δ , gama- γ ou epsilon- ϵ). Cada cadeia polipeptídica da globina possui uma sequência de aminoácidos, tendo as cadeias alfa 141 aminoácidos e as cadeias não-alfa 146. Combinações entre essas cadeias de proteínas são responsáveis por formar as diferentes Hbs presentes nos eritrócitos desde o período embrionário até a fase adulta (GALIZA NETO e PITOMBEIRA, 2002).

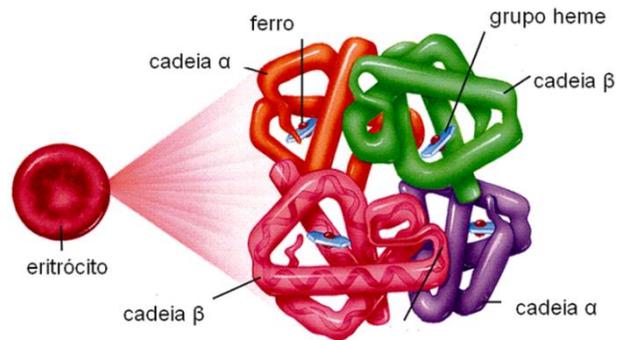


Figura 6 - A hemoglobina A é formada por duas cadeias de globina α e duas cadeias de globina β . Cada cadeia contém uma molécula heme (azul). Fonte: Mader (1997).

No adulto, as Hbs constituem arranjos tetraméricos de cadeias alfa e beta ($\alpha_2\beta_2 = \text{Hb A}_1$, principal nos adultos), alfa e delta ($\alpha_2\delta_2 = \text{Hb A}_2$). A hemoglobina Fetal (Hb F), predominante ao nascer, é substituída gradativamente até aproximadamente a vigésima oitava semana de vida, quando as concentrações das hemoglobinas chegam às proporções do adulto, de 96 a 98% para Hb A₁, de 2,0 a 3,7% para Hb A₂ e de até 1% para Hb F (STAMATOYANNOPOULOS, 1992).

A molécula de Hb é constituída por uma cadeia de globina e um grupo heme que consiste numa porfirina complexada a um átomo de ferro ferroso (Fe^{2+} ; PERCY et al. 2005). O Fe^{2+} pode formar duas interações adicionais, no plano do anel porfirínico. Uma com a cadeia lateral de um resíduo de histidina da molécula da globina, e a outra com o O_2 (Figura 7). Dessa forma, a Hb mantém o ferro no seu estado reduzido, Fe^{+2} , permitindo a ligação reversível do O_2 no grupo heme, além de facilitar a troca do CO_2 produzido pelos tecidos com os pulmões (NOHL e STOLZE, 1998; ÇIMEN, 2008).

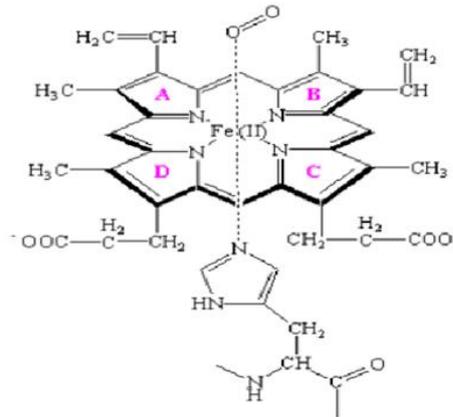


Figura 7 - Representações da estrutura do grupo heme, que é o sítio de ligação do oxigênio a hemoglobina. Cada molécula de hemoglobina carrega quatro moléculas de oxigênio. Fonte: Peñuela (2005).

A estrutura tetramérica da Hb permite ligação de quatro moléculas de O_2 por tetrâmero. Esta ligação é favorecida por interações que são fundamentais para o funcionamento da Hb como a “ligação cooperativa” e o 2,3-DPG. Na “ligação cooperativa” o O_2 se liga mais rapidamente se outras moléculas de O_2 já estiverem ligadas. Isto permite que a Hb maximize tanto a quantidade de O_2 transportada sob a pressão parcial de O_2 (pO_2) dos pulmões quanto a quantidade de O_2 liberada sob pO_2 típica dos tecidos periféricos. Já o fosfato orgânico, 2,3-DPG, promove a liberação eficiente de O_2 nos tecidos periféricos através da estabilização da estrutura quaternária da Hb (MURRAY et al. 2006).

2.2.3 FORMAÇÃO E REDUÇÃO DA METEMOGLOBINA

Durante a formação da oxihemoglobina (O_2Hb) a partir da desoxihemoglobina (HHb) e de moléculas de O_2 , um elétron é transferido do Fe^{2+} para o O_2 , formando-se um complexo férrico/ânion superóxido ($Fe^{3+}/O_2^{\bullet-}$). Na reação de desoxigenação, o elétron que havia sido “emprestado” regressa ao átomo de ferro, liberando o O_2 para ser consumido pelo organismo. No entanto, cerca de 2% de O_2 é convertido em $O_2^{\bullet-}$, deixando o ferro no estado férrico (Fe^{3+} ou MetHb). Este processo de auto-

oxidação (Figura 8) ocorre espontaneamente em indivíduos normais, convertendo, diariamente, cerca 2% da Hb em MetHb (MISRA e FRIDOVICH, 1972; GREGG e PRCHAL, 2005).



Figura 8 - Mecanismo de formação de metemoglobina pelo processo de auto-oxidação da hemoglobina. HHb, desoxihemoglobina; O_2^- , ânion superóxido; MetHb, Metemoglobina; Fe^{2+} , ferro ferroso; Fe^{3+} , ferro férrico; O_2 , oxigênio. Fonte: adaptado de CARVALHO et al. (2008).

O acúmulo de MetHb é prevenido pela ação de vários mecanismos que reduzem o Fe^{3+} a Fe^{2+} , numa cadeia de transferência de elétrons (Figura 9). O mecanismo fisiológico mais importante, responsável por 95% da redução da MetHb, é realizado pela citocromo b_5 redutase (CB_5R ou diaforase I), numa reação dependente de NADH que atua como aceptor de elétrons. Assim, o NADH, gerado pela glicólise, reduz a NAD que por sua vez reduz a CB_5R . A CB_5R transfere o elétron para o Fe^{3+} da MetHb reduzindo-o a Fe^{2+} (PASSON, P. G. e HULTQUIST, 1972).

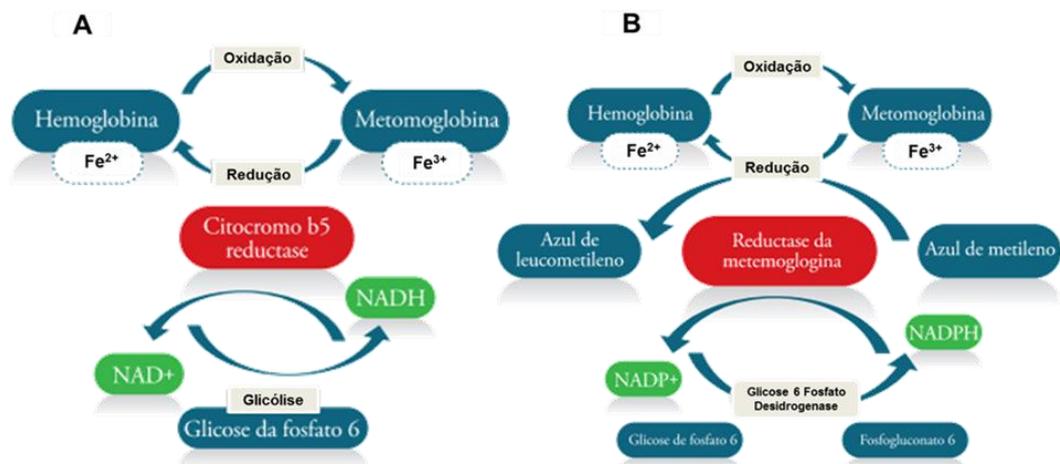


Figura 9 - (A) Redução da hemoglobina em circunstâncias normais e **(B)** após administração de azul de metileno. Em circunstâncias normais o sistema citocromo b5 reductase dependente de NADH reduz a metemoglobina em hemoglobina. O azul de metileno é uma via de redução alternativa, dependente de NADPH. NADH-MR, nicotinamida adenina dinucleotídeo metemoglobina reductase; NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo; MetHb, metemoglobina; Hb, hemoglobina; AM, azul de metileno; G6P, glicose 6 fosfato; G6PD, glicose 6 fosfato desidrogenase. Fonte: Adaptado de CARVALHO et al. (2008).

Uma via alternativa para a redução da MetHb é mediada pela MetHb reductase. Nesta reação é utilizada a NADPH, gerado na via das pentoses, como fonte de elétron, porém não existem aceptores fisiológicos para estes elétrons, por isso esta reação depende de aceptores exógenos, como o azul de metileno (AM; MANSOURI, A. e LURIE, 1993; GIBSON, 2002). Em condições normais, os mecanismos de formação e de redução descritos mantêm os níveis fisiológicos de MetHb no sangue entre 0 a 2 % (YAWATA et al. 1992; REHMAN, 2001). No entanto, quando ocorre um desequilíbrio na produção ou na redução da MetHb, surge a síndrome clínica, metemoglobinemia (MetHba), levando a um estado de anemia funcional.

A MetHba pode ser congênita ou adquirida. Embora rara, a MetHba hereditária, ocorre quando a uma deficiência da CB₅R ou uma mutação na cadeia globina no caso da doença da hemoglobina M (REHMAN, 2001). A principal causa de MetHba é a adquirida, que é provocada por mecanismos iatrogênicos, ou seja,

por fármacos comumente prescritos, como a DDS e seu metabólito, o DDS-NOH, primaquina, clofazimina, cloroquina, benzocaína, corantes de anilina, azul de metileno (REHMAN, 2001, BOLCHOZ et al, 2001; ASH-BERNAL et al. 2004). Nesta síndrome, concentrações abaixo de 10% de MetHb podem ser bem toleradas, porém níveis acima são frequentemente associados a sintomas, como dispneia, náuseas e taquicardia. Níveis próximos a 55% provocam letargia e perda da consciência e níveis mais elevados que 60% podem causar arritmias cardíacas e insuficiência circulatória, enquanto acima de 70% levam a morte (COLEMAN, 1995; REHMAN, 2001).

2.2.4 IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS *IN VITRO* COM ERITRÓCITOS

Os eritrócitos são as células mais abundantes e altamente especializadas no corpo humano. Além do seu papel específico no transporte dos gases respiratórios, O_2 e CO_2 , estas células também desempenham um papel importante no estado oxidativo dos constituintes do sangue total. Em vista de uma combinação de fatores, como a exposição à alta concentração de O_2 , a presença do forte catalisador oxidativo, a hemoglobina (Hb), os glóbulos vermelhos são altamente suscetíveis ao dano oxidativo. Nesse sentido, para inibir o dano oxidativo, o sistema antioxidante enzimático e a GSH estão presentes, predominantemente, no meio intracelular, daí importância da utilização de eritrócitos em ensaios *in vitro* (FURMAN, 2011; HENNEBERG, 2013).

Dessa forma, modelos experimentais com eritrócitos humanos são comumente utilizados para investigar o potencial antioxidante de diferentes substâncias. A suspensão de eritrócitos é um sistema eficaz para a investigação do efeito protetor de substâncias antioxidantes, visto que as drogas oxidantes podem levar a alterações em lipídios, proteínas e DNA eritrocitário (SHIVA et al. 2007). Nesse sentido, a utilização de eritrócitos humanos para o modelo experimental *in vitro*, para avaliar a ação antioxidante, constitui uma ótima estratégia para avaliar o efeito de fármacos, sobre parâmetros do estresse oxidativo, que levam a

citotoxicidade, dano no DNA, peroxidação lipídica entre outros (ALBUQUERQUE et al. 2015).

2.2.5 SISTEMA ANTIOXIDANTE DO ERITRÓCITO

O estresse oxidativo pode resultar de uma alteração na homeostase celular caracterizada por um aumento da produção de ERO e/ou diminuição das defesas celulares antioxidantes responsáveis pela neutralização destas espécies oxidantes (SIES, 2015). O resultado deste fenômeno é o dano celular pela oxidação de moléculas, como proteínas e lipídios que ainda podem gerar outras ERO, ampliando o dano celular (TEDESCO et al. 2000; RAHAL et al. 2014).

A produção de ERO ocorre naturalmente por fontes endógenas, como resultado do metabolismo celular (POLI et al. 2004). Além disso, sistemas enzimáticos, como o da NADPH oxidase, NOS, hipoxantina/xantina oxidase podem gerar ERO, como o $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , óxido nítrico (NO^{\cdot}) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$; IRANI et al. 1997; HARRISON, 2002). No entanto, $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 são pouco reativos com biomoléculas, contudo na presença de metais de transição, como ferro ou cobre, podem gerar espécies muito reativas, como radical hidroxila (OH^{\cdot}), através da reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+}$) e reação de Haber-Weiss ($H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$; DIZDAROGLU et al. 1991, MELLO-FILHO e MENEGHINI, 1984; VALKO et al. 2007). Além disso, a produção de radicais livres, pode ser induzida por fontes exógenas, como luz ultravioleta, radiação ionizante, drogas ou exposição a contaminantes ambientais (RAHAL et al. 2014).

Na circulação, os eritrócitos são continuamente expostos a fontes endógenas e exógenas de substâncias oxidantes (MOHANTY et al. 2014). Além disso, possuem elementos, como ferro, O_2 e lipídios insaturados, que contribuem para a formação de ERO que podem causar estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos celulares que podem ser irreversíveis (HEBBEL, 1986; ASLAN et al. 2000). Para o controle dos efeitos das ERO, os eritrócitos têm um sistema antioxidante envolvendo tanto antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular, como GSH e ácido

ascórbico, quanto antioxidantes enzimáticos incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutiona peroxidase (GPx), entre outros (GONZALES et al. 1984; NAGABABU et al. 2003).

As defesas antioxidantes enzimáticas do eritrócito são representadas, principalmente, pelos seguintes enzimas: i) NADH-MR que converte a MetHb em Hb; ii) superóxido dismutase cobre-zinco (SOD Cu-Zn) dependente que converte $O_2^{\cdot-}$, formado na auto-oxidação da Hb, à H_2O_2 , o qual tem reatividade limitada; iii) CAT, uma enzima citoplasmática, que decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2 e realiza a oxidação de doadores de H^+ , como metanol, ácido fórmico e formóis, com o consumo de peróxidos; iv) glutiona redutase (GR) NADPH dependente, uma enzima citoplasmática que reduz a glutiona oxidada (GSSG) em glutiona reduzida (GSH); e v) pela GPx (Figura 10; HARRIS, 1991; COLEMAN, 1995; CIESLA, 2007; ÇIMEN, 2008).

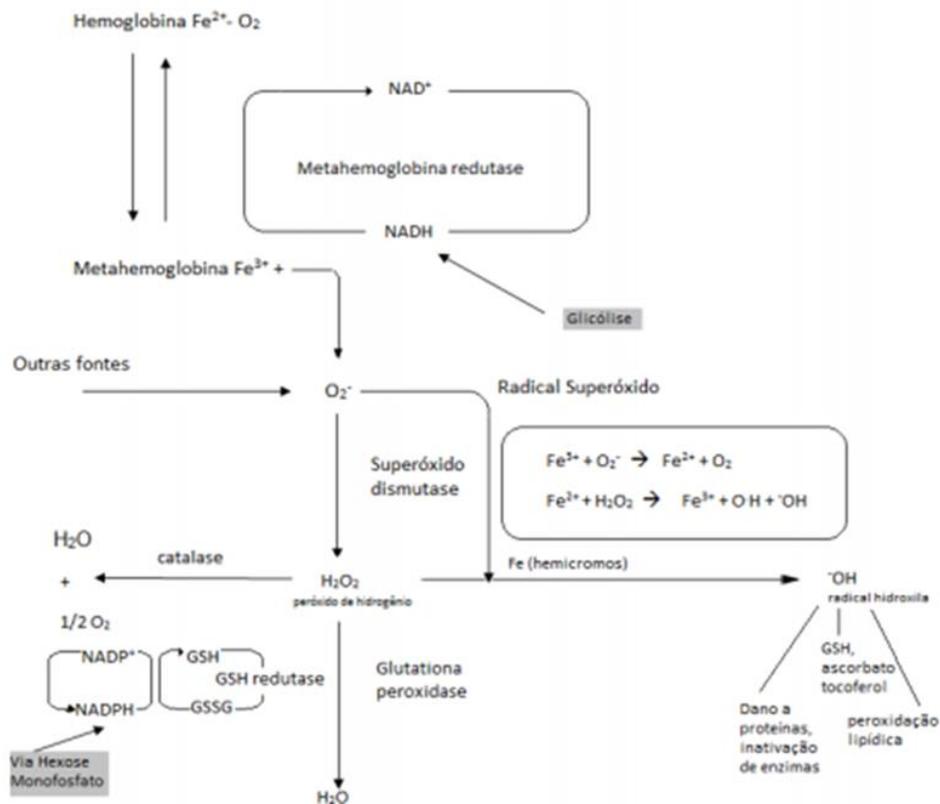


Figura 10 - Mecanismo de proteção do sistema antioxidante dos eritrócitos a partir da produção de espécies reativas de oxigênio e produção de metemoglobina. Fonte: HARRIS (1991).

A GPx catalisa a redução de H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) a H_2O e ao álcool (ROH) correspondente, utilizando a GSH como cofator. A família da GPx é dividida em seis classes de acordo com a sequência de aminoácidos, o substrato específico e a localização subcelular: i) a clássica ou citosólica (GPx 1), a primeira GPx identificada; ii) a gastrointestinal (GPx 2); iii) a plasmática ou extracelular (GPx 3); iv) a fosfolípido hidroperóxido (GPx-PH ou GPx 4); v) a epididimal (GPx 5); vi) e a do epitélio olfativo (GPx 6). Exceto a GPx 5 e GPx 6, todas as selenoproteínas contêm em seu sítio ativo, o selênio (Se; AMAYA-FARFAN et al. 2001; HERBETTE et al. 2007).

O sistema antioxidante não-enzimático do eritrócito é formado por substâncias como NADPH, NADH e algumas vitaminas provenientes da dieta, como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e substâncias fenólicas, como flavonoides (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al. 2007; COTINGUIBA et al. 2013), com destaque para a GSH, principal antioxidante intracelular.

A GSH é um tripeptídeo formada a partir de glutamato, cisteína e glicina (ROVER JUNIOR et al. 2001) que exerce funções essenciais na célula, destacando-se sua função como cofator da família de enzimas GPx, com a qual protege as células contra danos oxidativos mediante a remoção de agentes pró-oxidantes. A GSH mantém a Hb e outras proteínas do eritrócito, no estado reduzido. Além disso, por ser o único tiol não proteico presente em espécies aeróbias, seu papel intracelular antioxidante inclui a eliminação de ERO (HERBETTE et al. 2007).

Problemas na síntese e/ou metabolismo da GSH e das enzimas que participam do seu ciclo catalítico estão associados a alterações do sistema de defesa antioxidante e dos agentes oxidante (VASCONCELOS et al. 2007). Além disso, a presença de ERO tem sido correlacionada com várias doenças, como cardiovasculares, degeneração neuronal, câncer e no processo de envelhecimento (ROVER JUNIOR et al. 2001; RAHAL et al. 2014). Assim, o equilíbrio entre a formação e a remoção desses agentes no organismo deve ser regulado, para que as reações e processos metabólicos possam ocorrer em nível adequado para a manutenção da fisiologia celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

2.3 Tratamento da Metemoglobinemia adquirida

2.3.1 AZUL DE METILENO

Para o tratamento da MetHba adquirida pela exposição a agentes oxidantes, a primeira linha de defesa consiste em uma infusão de azul de metileno, na dose de 1-2 mg/kg em solução de 1-2 g/dl, em tempo de infusão de 5 minutos. O AM apresenta efeito rápido na redução da MetHb tanto *in vivo*, como também *in vitro* (GIBSON, 2002). Estudos já confirmaram o efeito do AM como redutor da MetHb em modelos *in vitro* (MALCHER et al. 2014; ALBUQUERQUE et al. 2015). No entanto, doses de azul de metileno superiores a 4 mg/kg podem desencadear sintomas como dispnéia, dor precordial, cianose persistente, anemia hemolítica e metemoglobinemia devido ao seu potencial oxidante (SILLS e ZINKHAM, 1994; SHIHANA et al. 2010). Em seu mecanismo de ação, o azul de metileno atua como um cofator para a NADPH-MR, acelerando a atividade e aumentando a taxa de conversão do Fe^{3+} da MetHb a Fe^{2+} (Figura 9; HAYMOND et al. 2005).

2.4 Terapias alternativas com antioxidantes para tratamento da metemoglobinemia

A MetHba adquirida provocada pela DDS em pacientes hansenianos que utilizam esse medicamento como terapia para a eliminação do vírus, pode ser recorrente, ou seja, pode aumentar mesmo após o tratamento com o AM. Este efeito metemoglobinizante da dapsona parece ser dependente da conversão metabólica a dapsona-hidroxilamina, pois o metabólito ao oxidar hemoglobina a MetHb regenera a dapsona, que pode ser novamente metabolizada ao metabólito oxidativo. Dessa forma, eventualmente é necessária a aplicação de doses adicionais de AM. No

entanto, doses elevadas do AM podem agravar a oxidação da hemoglobina e a lesão celular, devido sua capacidade oxidante.

Assim, substâncias antioxidantes podem ser alternativas potenciais ao AM para o tratamento da MetHba adquirida. Os antioxidantes podem atuar como doadores de elétrons para reduzir o Fe^{3+} da MetHb ou impedir direta ou indiretamente a ação do metabolito DDS-NOH, sendo assim um antídoto mais eficaz e seguro no tratamento da MetHba.

2.4.1 EBSELEN

O Ebselen (EbSe ou 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona; Figura 11) é uma substância orgânica de selênio com propriedades antioxidantes, cuja formula molecular é $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NOSe}$ (NOGUCHI et al. 1992; ZHAO e ARNE HOLMGREN, 2002). Esta substância foi originalmente sintetizada durante a procura por substâncias com ação semelhante à enzima GPx (MULLER et al. 1984). Uma vez que ambos compartilham a presença de um Se cataliticamente ativo, o EbSe pode ser um modelo para o mecanismo enzimático da GPx. Nesse sentido, um estudo cinético de reação catalítica do EbSe concluiu que o mecanismo é cineticamente idêntico ao da reação da enzima (MAIORINO et al. 1988). Assim, na década de 80, EbSe foi descrito e caracterizado como um mimético da GPx e da GPx-PH (MULLER et al. 1984; WENDEL et al. 1984; MAIORINO et al. 1988; TIEGS et al. 1998).

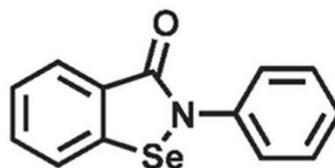


Figura 11 - Estrutura molecular do Ebselen (EbSe).

O EbSe foi uma das primeiras substâncias sugeridas para terapia de inativação de peróxidos orgânicos (ROO; PARNHAM e KINDT, 1984). A partir de então, o EbSe passou a ser considerado como possível agente terapêutico útil em situações clínicas envolvendo o estresse oxidativo (FARINA et al. 2004). Suas propriedades biológicas como um agente antioxidante, anti-inflamatório, antiaterosclerótico, citoprotetor e neuroprotetor tem sido descritas em modelos animais *in vitro* e *in vivo* e em humanos (SIES, 1993; SCHEWE, 1995; OZAKI et al. 1997; SAITO et al. 1998; YAMAGUCHI et al. 1998; PORCIUNCULA et al. 2001; ZHAO e HOLMGREN, 2002; ZHANG et al. 2002; FARINA et al. 2003; MORETTO et al. 2004; BURGER et al. 2005; MORETTO et al. 2005; XU et al. 2006; POSSER et al. 2009).

Diferente de outras substâncias contendo o Se em sua estrutura tais como selenito, ácido metil-selenínico, Se-metilselenocisteína (SPALLHOLZ, 1994; MISRA et al. 2015), o EbSe possui uma toxicidade muito baixa, porque sua porção selênio não é liberada durante a biotransformação, impedindo o seu acúmulo no organismo (WENDEL et al. 1984; ZHAO e ARNE HOLMGREN, 2002; PARNHAM e GRAF, 1987). Esta estabilidade estrutural é uma consequência energética favorecida pelo seu anel de cinco membros (SCHEWE, 1995). Além disso, sua característica lipofílica assegura uma melhor interação com os lipídeos de membrana, levando, assim, uma menor concentração necessária para alcançar o efeito protetor contra o dano oxidativo (MULLER et al. 1984; AZAD e TOMAR, 2014).

Como EbSe é quimicamente um eletrófilo, para iniciar seu mecanismo de ação, é necessário um sistema eficiente que funcione como doador de elétrons (RUFFMANN e WENDEL, 1991; SAKURAI et al. 2006). Estudos demonstraram que a GSH, por possuir características nucleofílicas (RUFFMANN e WENDEL, 1991), atua como doador de elétrons para iniciar a atividade do EbSe (MULLER et al. 1984; WENDEL et al. 1984). Assim, a GSH, reage com o átomo de selênio do EbSe para formar sulfeto de selenenil (EbSe-S-GSH). Este reage com um segundo equivalente de GSH e forma o selenol (EbSe-H) e GSSG. O EbSe-H reage com H_2O_2 e/ou ROOH, reduzindo-os a H_2O , e a seu álcool (ROH) correspondente, respectivamente.

O ácido selenínico (EbSe-OH) espontaneamente produz outra molécula de H₂O, regenerando o EbSe (Figura 12; HAENEN et al. 1989; COTGREAVE et al. 1992; NOGUCHI et al. 1992; MAULIK et al. 1998). Dessa forma, assim como a GPx, o EbSe catalisa a redução de hidroperóxidos inorgânicos, incluindo fosfolipídios ligados à membrana e hidroperóxidos de colesterol reduzindo-os a ROH (SAKURAI et al. 2006).

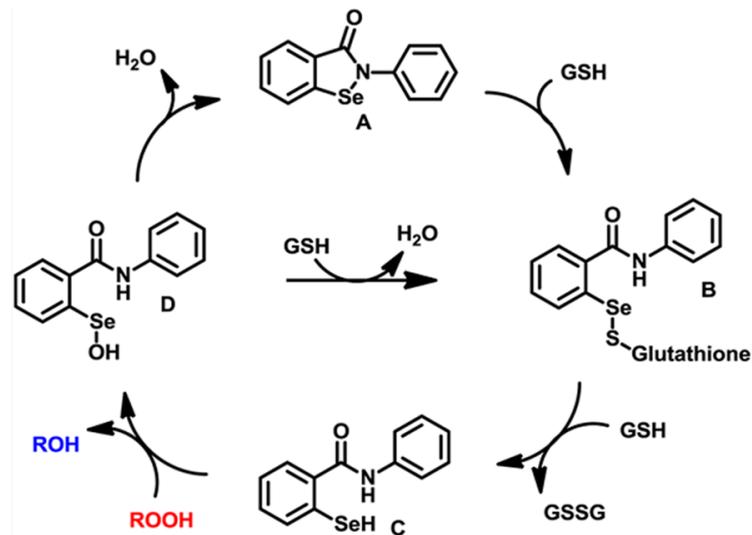


Figura 12 - Ação antioxidante do ebselen via glutatona. No primeiro passo, o selenio do ebselen [EbSe] (A) interage com uma molécula de glutatona [GSH] para formar o selenenil sulfeto [EbSe-S-GSH] (B). Este interage com outra GSH produzindo o selenol [EbSe-H] (C), que, em seguida interage com hidroperóxidos orgânicos [ROOH], formando ácido selenínico [EbSe-OH] (D). Este, por sua vez pode interagir com a GSH para regenerar EbSe-S-GSH (B) ou via a formação de água, o ebselen (A) é regenerada. GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; ROOH hidroperóxidos orgânicos; EbSe ebselen; EbSe-S-GSH, selenenil sulfeto; EbSe-H, Selenol, EbSe-OH, ácido selenínico. Fonte: Adaptado de Tan et al. (2013).

Por outro lado, o EbSe exibe um padrão único de reações químicas que não se restringe a presença de GSH (MULLER et al. 1984). Já foi reportado que tióis sintéticos tais como *N*-acetilcisteína (COTGREAVE et al. 1987) e ditiotreitól (MULLER et al. 1985) podem substituir a GSH, sendo doadores de elétrons para a atividade de peroxidase do EbSe (HAENEN et al. 1989). Isto pode ser a razão para a sua diversidade de ação em modelos *in vitro* e *in vivo* (SCHEWE, 1995). Além

disso, Zhao et al. (2002) demonstraram a reatividade do EbSe com o sistema de tioredoxina (Trx), um poderoso sistema dissulfeto redutase de proteínas celulares que está presente em todos os organismos vivos (FANG et al. 2005).

Nesse sentido, estudos mostraram que o EbSe utiliza o sistema de Trx de forma mais eficiente que a GSH, sugerindo que este é um importante mecanismo de ação antioxidante. Assim, o sistema de Trx, em particular a tioredoxina redutase (TrxR), um excelente ditiol redutor da célula, se comporta como um doador de elétrons para o EbSe. Conseqüentemente, o EbSe é reduzido por NADPH catalisado por TrxR, formando o EbSe-H. Este reage com o H_2O_2 e/ou ROOH reduzindo-os a H_2O , e ao ROH correspondente. O ácido selênico (EbSe-OH) formado elimina H_2O e regenera o EbSe para o outro ciclo catalítico (Figura 13). Assim, o EbSe age como uma Trx peroxidase, potencializa a ação da TrxR e aumentando a atividade catalítica de redução de H_2O_2 e ROOH (ZHAO e HOLMGREN, 2002; ZHAO et al. 2002; FANG et al. 2005).

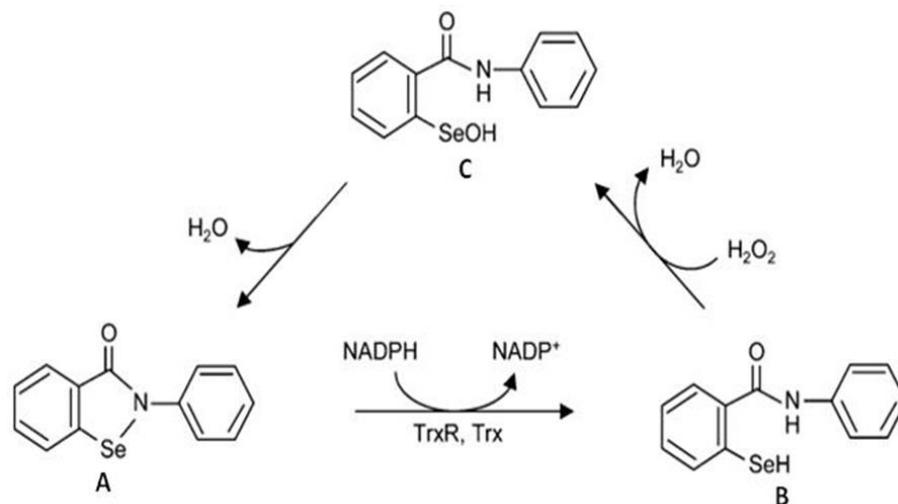


Figura 13 - Ação antioxidante do Ebselen via sistema de tioredoxinas. No primeiro passo, o ebselen [EbSe] é reduzido por NADPH catalisado por TrxR, formando o selenol [EbSe-H]. Este reage com o peróxido de hidrogênio [H_2O_2] e/ou hidroperóxido orgânico [ROOH] reduzindo-os a água [H_2O], e ao álcool [ROH] correspondente. O ácido selênico [EbSe-OH] formado elimina H_2O e regenera o EbSe para o outro ciclo catalítico. Trx, tioredoxina; TrxR, tioredoxina redutase; ROOH hidroperóxido orgânico; EbSe ebselen; EbSe-S-GSH, selenenil sulfeto; EbSe-H, Selenol, EbSe-OH, ácido selênico. Fonte: Adaptado de Zhao et al. (2002).

Além de atenuar e prevenir a formação de ERO, o EbSe também inibe enzimas que estão implicadas em processos inflamatórios (Figura 14) e que são fontes de ERO envolvidas na inflamação, como lipoxigenase (LOX; SCHEWE et al. 1994; WALTHER et al. 1999), NADPH oxidase, proteína kinase C, ciclooxigenase (COX; COTGREAVE et al. 1989; MIORELLI et al. 2008), óxido nítrico sintase (NOS; HATTORI et al. 1996), bomba de H^+/K^+ ATPase (SCHEWE et al. 1994; SAKURAI et al. 2006), prostaglandina E_2 (PARNHAM e KINDT, 1984) e leucotrieno B_4 (LTB_4). O LTB_4 é um potente mediador da ação dos neutrófilos, convertendo-o em um isômero 6-*trans* biologicamente inativo (SAFAYHI et al. 1985; KUHLE et al. 1986). Adicionalmente, o EbSe inibe a formação de ERN, como óxido nítrico (NO) e impede a reação com ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e a consequente formação de peroxinitrito ($ONOO^-$; WANG et al. 1992) que é um agente oxidante potente, mediador da toxicidade em estados inflamatórios (MASUMOTO et al. 1996).

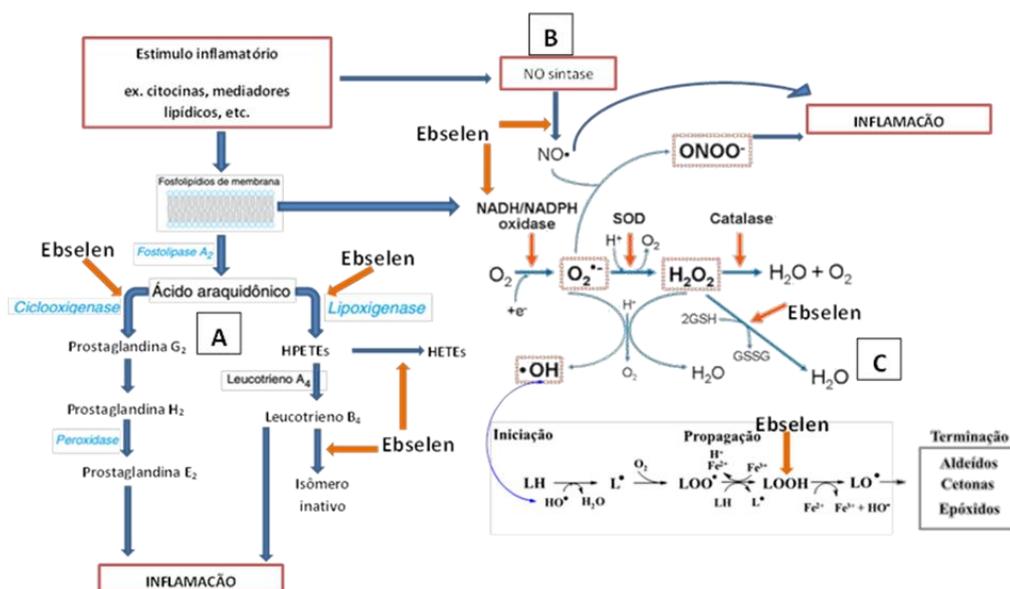


Figura 14 - Ação anti-inflamatória do Ebselen. (A) Na formação produtos intermediários do ácido araquidônico produzidos durante a inflamação. (B) Na formação de NO. (C) Na formação de hidroperóxidos. EbSe, Ebselen; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; NOS, óxido nítrico sintase; NO, óxido nítrico; $ONOO^-$, peroxinitrito; NADPH oxidase, oxidase nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; O_2 , oxigênio singlet; $O_2^{\bullet -}$, ânion superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; OH^{\bullet} , radical hidroxila; H_2O , água; LH, ácido graxo poli-insaturado; L^{\bullet} , radical lipídico; LOO^{\bullet} , radical peroxil; $LOOH$, hidroperóxido lipídico; LO^{\bullet} , radicais alcóxil; Fe^{2+} , ferro ferroso; Fe^{3+} , ferro férrico. Fonte: adaptado de Schewe et al. (1995).

Do mesmo modo, O EbSe também pode reagir, com outra ERN, o ONOO^- formando óxido de selênio (EbSe-O) e nitrito (ONO^-) como pode ser observado na figura 15. O EbSe-O na presença de tióis pode ser reconvertido à EbSe. Este forma EbSe-S-GSH pode reagir novamente com o ONOO^- para formando EbSe-O e ONO^- . Outra possibilidade é a conversão do EbSe-S-GSH , na presença de tiol, formando EbSe-H , que formará o EbSe-Se (MASUMOTO et al. 1996; DAIBER et al. 2000). Com isso, o EbSe diminui a oxidação e a nitração induzidas por ONOO^- (BRIVIDA et al. 1996; SIES et al. 1997), prevenindo processos oxidativos desencadeados durante a inflamação (PARNHAM e SIES, 2000).

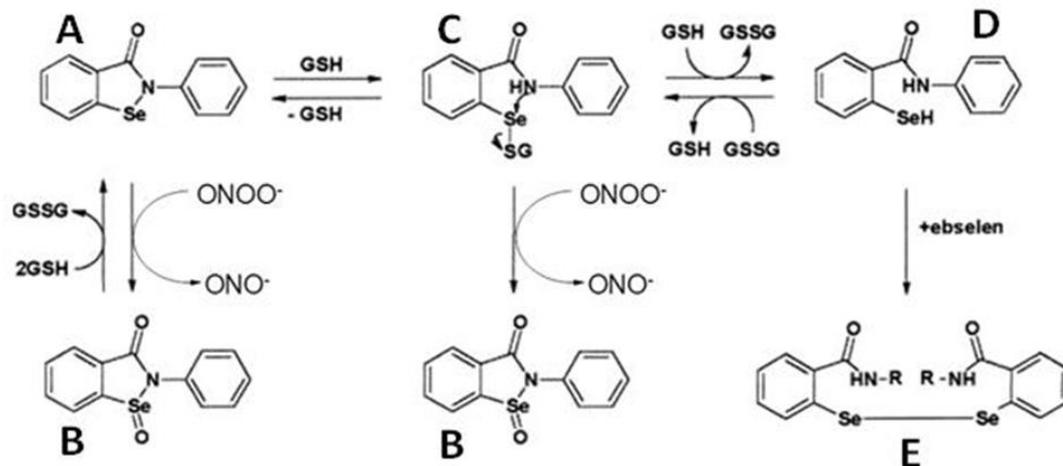


Figura 15 - Mecanismo catalítico do Ebselen na redução de peroxinitrito para nitrito. (A) EbSe reage com o ONOO^- formando óxido de selênio (EbSe-O) e nitrito (ONO^-). (B) EbSe-O na presença de tióis regenera o EbSe. Esta forma selenenil sulfeto (EbSe-S-GSH) na presença de GSH. (C) EbSe-S-GSH reage com o ONOO^- formando EbSe-O e ONO^- , e na presença de tiol, forma selenol (EbSe-H). Este por sua vez, formará diseleneto (EbSe-Se). EbSe, Ebselen; ONOO^- , peroxinitrito; EbSe-O , óxido de selênio; ONO^- , nitrito; EbSe-S-GSH , selenenil sulfeto; EbSe-H , selenol; EbSe-Se , diseleneto. Fonte: Adaptado de Daiber et al. (2000).

Além da ação anti-inflamatória, estudos evidenciaram a capacidade do EbSe em inibir a peroxidação lipídica (OZAKI et al. 1997; KONO et al. 2001), através da prevenção da formação de ERO (MAULIK et al. 1998; UEDA, et al. 1990). Com esses efeitos, o EbSe se mostrou útil como neuroprotetor em modelo de isquemia

cerebral *in vitro* e *in vivo* (PORCIÚNCULA et al. 2001; DAWSON, et al. 1995; GABRYEL e MALECKI, 2006). Adicionalmente, o EbSe protegeu o cérebro contra a lesão isquêmica e reperfusão focal aguda (DAWSON et al. 1995; IMAI et al. 2003). Em cultura de astrócitos, Gabryel e Malecki (2006) observaram que o EbSe preveniu a apoptose induzida por isquemia (HARDEJ e TROMBETTA et al. 2002; GABRYEL et al. 2006). Em um estudo feito por Namura et al. (2001) o EbSe diminuiu a fragmentação do DNA no cérebro de ratos após isquemia (NAMURA et al. 2001). Além disso, o EbSe apresentou efeitos benéficos em ensaios clínicos para o tratamento de pacientes com déficit neurológico tardio, após hemorragia subaracnóidea aneurismal (SAITO et al. 1998) e acidente vascular cerebral isquêmico agudo (YAMAGUCHI et al. 1998; MOUSSAOUI et al. 2000).

Nesse sentido, estudos apontam que o EbSe pode modificar a função do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), e neutralizar as ERO que são produzidas após a ativação dos receptores de NMDA (HERIN et al. 2001; LAPCHAK et al. 2003). Adicionalmente, já foi demonstrado que o EbSe impediu neurotoxicidade induzida pela diminuição da captação do glutamato induzida tanto por metilmercurio, quanto pelo ácido quinolinico. Desta forma, demonstrou-se a eficácia do EbSe na prevenção do estresse oxidativo provocada pela toxicidade do glutamato, através do redução de ERO, evitando a cascata de reações que pode culminar na peroxidação de lipídeos em membrana neuronal (PORCIÚNCULA et al. 2001; ROSSATO et al. 2002; FARINA et al. 2003).

Além disso, foram investigados os efeitos mutagênico e anti-mutagênico, assim como o perfil genotóxico e anti-genotóxico do EbSe. Nestes estudos o EbSe protegeu contra a citotoxicidade, a mutação, e o dano em DNA induzidos por H₂O₂ através da redução da formação de ERO causados por H₂O₂ (MIORELLI et al. 2008). Além de proteger as células da linhagem V79, o EbSe protegeu as células da linhagem HepG₂ e HL-60 contra o estresse oxidativo (YANG et al. 1999). A razão desta proteção reside, provavelmente, na proteção antioxidante adicional, em virtude da sua ação mimética da GPx. Demonstrando-se que o EbSe é capaz de suprimir a formação intracelular de H₂O₂, podendo ser usado como um potente antioxidante para proteger as células contra o dano oxidativo, associado com o aumento na produção de ERO (YANG et al. 1999; MIORELLI et al. 2008).

2.4.2 N-ACETILCISTEÍNA

A N-acetilcisteína (NAC; Figura 16) é uma substância tiólica que contém um grupo sulfidril e fórmula química $C_5H_9NO_3S$. A NAC é amplamente utilizada na clínica como fármaco mucolítico (ZIMENT 1988) e, no tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção (DODDS et al. 2008; TUMUR, 2010). Além disso, a NAC pode servir como antídoto em casos de intoxicação pelo paracetamol (acetaminofeno), reduzindo o grau de lesão hepática e sendo bastante efetivo quando administrada dentro de 8 a 10 horas previamente à ingestão do fármaco (ALGREN, 2008).

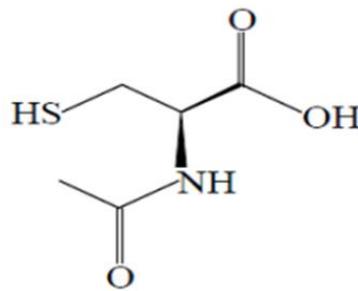


Figura 16 - Estrutura molecular da N-acetilcisteína (NAC).

Em relação à atividade antioxidante, a NAC contribui para a síntese da GSH, promovendo assim a homeostase celular, visto que a redução dos níveis de GSH apresenta associação com alterações do estado antioxidante e com o aumento do estresse oxidativo (DE FLORA et al. 2001; PINHO et al. 2005). Nesse sentido, a atividade antioxidante da NAC pode ocorrer através da redução direta de ERO a espécies menos reativas formando radical sulfúrico e cisteína ou através da promoção da biossíntese de GSH que funciona como sequestrador de radicais livres ou como substrato no ciclo redox da GPx (ARUOMA et al. 1989).

Em seu mecanismo de ação, a NAC, é hidrolisada, liberando a cisteína no meio extracelular (RUFFMANN e WENDEL, 1991). A cisteína é transportada pelo sistema de transporte de aminoácidos alanina-serina-cisteína (ASC), dependente de Na^+ , presente em várias células. No entanto, a NAC é uma substância lipofílica, precursora de cisteína e que não necessita de transporte ativo para atravessar a membrana (LAUTERBURG et al. 1983). Já no meio intracelular, a NAC é rapidamente hidrolisada para liberar a cisteína, um precursor de GSH. A GSH é sintetizada pelas ações consecutivas de γ -glutamil cisteína sintetase e GSH-sintetase (Figura 17). Desse modo, a NAC é capaz de regenerar e/ou aumentar os níveis de GSH intracelular, componente importante para a remoção de ERO que são capazes de proteger as células contra o estresse oxidativo (MARMOLINO e MANTO, 2010; SHAHRIPOUR et al. 2014).

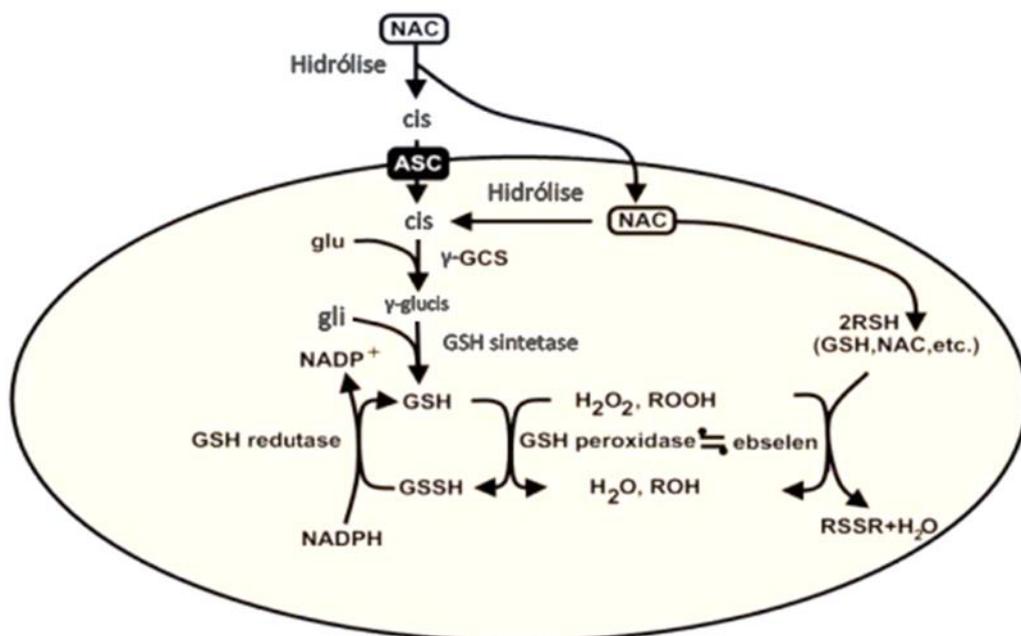


Figura 17 - Mecanismo de ação da N-acetilcisteína (NAC). ASC, alanina-serina-cisteína (ASC) sistema de transportes; Cis, cisteína; γ -GCS, γ -glutamil cisteína sintetase; γ -Glucis, γ -glutamil cisteína; Glu, glutamato; Gli, glicina; GSH, glutathione. Fonte: Adaptado de Marmolino e Manto, 2010.

Após a administração oral, a NAC é rapidamente absorvida e metabolizada e cerca de 10% da quantidade ingerida permanece na circulação por um tempo razoável, sendo a maior parte da droga consumida na produção de GSH. O pico de concentração plasmática é atingido em 2 a 3 horas após a administração e a meia-vida plasmática é de 5 a 6 horas em adultos e 11 horas em neonatos. A NAC sofre o processo de metabolismo de primeira passagem no fígado, resultando em baixa biodisponibilidade (VINCENZINI et al. 1998; DEKHUIJZEN, 2004).

Em relação à intervenção com antioxidantes na reversão de MetHb, estudos já evidenciaram a capacidade da NAC em prevenir o estresse oxidativo em eritrócitos (WRIGHT et al. 1996), através da redução da formação de MetHb (WRIGHT et al. 1998; COLEMAN e TAYLOR, 2003). Além disso, a NAC apresentou propriedades citoprotetoras através do aumento dos mecanismos de defesa pulmonar, devido suas propriedades antioxidantes diretas e indiretas, como precursor da síntese da GSH (DEKHUIJZEN, 2004). Adicionalmente, a NAC também apresentou um efeito atenuante e até preventivo na produção de ERO, como o ácido hipocloroso (HClO), o $\cdot\text{OH}$ e o H_2O_2 , devido ao grupo sulfidrílico presente em sua estrutura química (SHAIK e MEHVAR, 2006).

Devido a potente capacidade antioxidante, a NAC tem-se mostrado bastante eficiente como protetor em doença renal crônica (IVANOVSKI, 2005), câncer, insuficiência pulmonar, e outras doenças sistêmicas (NOLIN, 2007). Pode também melhorar a função endotelial e atenuar a doença inflamatória vascular (aterosclerose), antagonizando os efeitos da geração de substâncias reativas intracelulares (TUMUR, 2010). Adicionalmente, a NAC apresenta efeitos benéficos sobre complicações cardiovasculares, através da habilidade em reduzir a concentrações de homocisteína e lipoproteínas. Além disso, a NAC aumenta a capacidade de reparo no DNA e promove a indução de apoptose seletiva de células em transformação. Estudos também indicam que NAC reduz disfunção endotelial, inflamação e fibrose em pacientes renais crônicos, com evidente de melhora clínica (MASSY, 2009).

2.4.3 ÁCIDO α -LIPÓICO

O ácido α -lipóico (ALA; ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico) é uma substância sintetizada em pequenas quantidades por plantas e animais (REED, 2001). Estudos mostram que o ALA apresenta algumas propriedades antioxidantes, como capacidade de sequestrar diretamente ERO e, indiretamente, através da capacidade de regenerar antioxidantes endógenos, como GSH, vitamina E e C (MAITRA et al. 1995; ROY et al. 1997; HAGER et al. 2001). Além disso, o ALA é capaz de quelar metais, como o ferro, prevenindo a produção de ERO (PACKER et al. 1995; MATSUGO et al. 1996). Além disso, o ALA funciona como cofator para complexos multienzimáticos importante para mitocôndria, como a piruvato desidrogenase (BRAMANTI et al. 2010). Adicionalmente, o ALA participa de processos metabólicos, incluindo o metabolismo de glicose, em diferentes tipos celulares (GRASSO et al. 2014). Devido a essas propriedades, o ALA foi capaz de proteger contra o dano oxidativo em vários processos patológicos, incluindo diabetes, síndrome de isquemia e reperfusão e doenças neurodegenerativas (PACKER et al. 1995; EVANS e GOLDFINE, 2000).

O ALA é sintetizado endogenamente pela enzima ácido lipóico sintetase a partir do ácido octanóico (MORIKAWA et al, 2001). O ALA pode se ligar covalentemente a proteínas específicas, como resíduos de lisina. Além das funções fisiológicas do ALA ligado a proteínas, há um crescente interesse médico e científico na potencial utilização terapêutica de outras formas desta substância (UCHIDA et al. 2015). O ALA apresenta dois grupos tiol (-SH), um em cada um dos átomos de carbono, C6 e C8, que estão conectados por ponte dissulfeto, que pode ser oxidado ou reduzido. A forma oxidada, ALA, pode ser rapidamente reduzida no organismo resultando na formação do ácido dihidrolipóico (ADHL; KRAMER e PACKER, 2001; MOINI et al. 2002). Além disso, o ALA também contém um carbono quiral, C6, existindo como dois enantiômeros ou estereoisômeros: ácido R-(+)-lipóico (R-ALA) e S-(-)-lipóico (S-ALA; Figura 18; CARLSON et al. 2007).

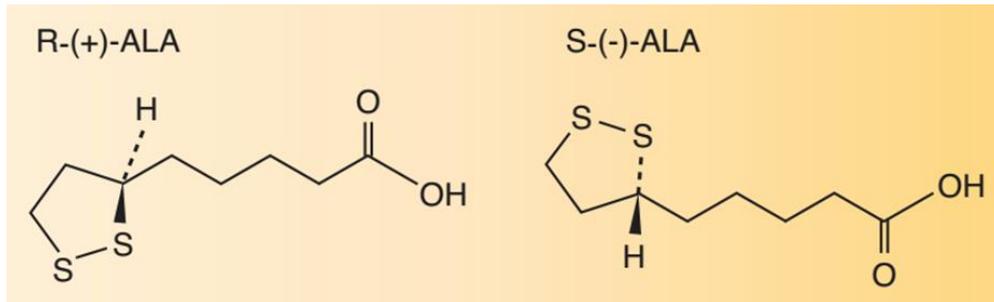


Figura 18 - Estrutura do ácido R- α -lipóico e do S- α -lipóico. Fonte: Carlson et al. 2007.

O R-ALA é o enantiômero de ocorrência natural, sintetizado no organismo pela enzima mitocondrial dihidrolipoamida desidrogenase a partir do ALA, enquanto o S-ALA é um subproduto da síntese química (SOHAL et al. 1994). Além disso, a GSH também pode catalisar a redução do ALA, de forma mais lenta, formando preferencialmente o S-ALA, com consumo de NADPH (HARAMAKI et al. 1997). O R-ALA, assim como o ALA, é um cofator essencial de várias enzimas do complexo mitocondrial que catalisam reações relacionadas à produção de energia e o catabolismo de α -cetoácidos e aminoácidos (BUSTAMANTE et al. 1998; REED, 1998). Este composto se liga covalentemente ao grupo amino de um resíduo de lisina, através de uma ligação amida e, portanto, apresenta-se como lipoamida (MOINI et al. 2002).

Por outro lado, o S-ALA apresenta menor afinidade de ligação a enzimas mitocondriais. Anteriormente, Hagen et al. (1999) já haviam demonstrado que a função mitocondrial de ratos aumentava com suplementação com R-ALA, enquanto o S-ALA, por ser incapaz de se ligar a enzimas mitocondriais, provocava uma redução na produção de ATP (HAGEN et al. 1999). Além disso, o R-ALA também aumenta ou mantém os níveis de antioxidantes como a GSH e o ácido ascórbico (SUH et al. 2001). Em estudo *in vitro*, o R-ALA foi mais efetivo em quelar metais em eritrócitos humanos e impedir a formação de ERO do que o ALA e o S-ALA (OU et al. 1995). Em modelo animal, o R-ALA foi capaz de melhorar o transporte, a absorção e o metabolismo de glicose em ratos deficientes de insulina, sendo mais

eficaz que S-ALA (YAWORSKY et al. 2000; KONRAD et al. 2001; MOINI et al. 2002).

Diante do exposto, é importante avaliar o efeito das substâncias previamente apresentadas na prevenção e/ou reversão da formação da MetHb, visto que ambos estão envolvidos direta ou indiretamente com o sistema de defesa antioxidante da GSH. Dessa forma, essas substâncias podem atuar no sequestro de ERO, desempenhando assim um papel importante na defesa antioxidante dos eritrócitos contra o estresse oxidativo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor dos antioxidantes Ebselen, N-acetilcisteína, ácido R e S-lipóico na metemoglobinemia induzida pelo metabólito dapsona-hidroxilamina em eritrócitos *in vitro*, correlacionando à proteção ou reversão do estresse oxidativo.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do Ebselen, da N-acetilcisteína e dos ácidos R e S-lipóico na metemoglobinemia induzida pelo metabólito DDS-NOH em eritrócitos *in vitro*.
- Determinar a concentração de GSH nos eritrócitos expostos à DDS-NOH na presença ou não de Ebselen, N-acetilcisteína e ácidos R e S-lipóico *in vitro*.
- Determinar os níveis de capacidade antioxidante total (TEAC) nos eritrócitos expostos à DDS-NOH na presença ou não de Ebselen, N-acetilcisteína, ácido R-lipóico e S-lipóico *in vitro*.
- Determinar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos eritrócitos expostos à DDS-NOH na presença ou não de Ebselen, N-acetilcisteína, ácido R-lipóico e S-lipóico *in vitro*.
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT nos eritrócitos expostos à DDS-NOH na presença ou não de Ebselen, N-acetilcisteína, ácido R-lipóico e S-lipóico *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e preparação das amostras

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFGPA), sob parecer nº 1.898.698 e CAAE 60044516.9.0000.0018 (ANEXO B). Amostras de sangue venoso foram obtidas de voluntários mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE; ANEXO A).

Amostras de sangue venoso humano de 21 voluntários saudáveis (ambos os sexos e idades de 20-25 anos) foram obtidas por punção venosa, após uma noite de jejum. Os critérios de exclusão utilizados foram: uso recente de algum medicamento e/ou vitamina, doenças crônicas, menor de 20 anos e maiores de 25 anos e uso de tabaco. Após a coleta, o sangue total foi armazenado em tubos de ensaio contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 5%) [adquirido da NewProv] (50 µL/mL) por no máximo 4 horas a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min a 37°C. Após isto, o plasma e a camada de Buffy coat (leucócitos e plaquetas) foram removidos e o concentrado de hemácias (eritrócitos), isolado, foi lavado três vezes com solução fisiológica (NaCl 0,9%). Em seguida, os eritrócitos foram diluídos em NaCl 0,9% na proporção 1:1, resultando em uma suspensão de eritrócitos de aproximadamente 50% (Figura 20). A suspensão de eritrócitos a 50% foi usada para os procedimentos experimentais.

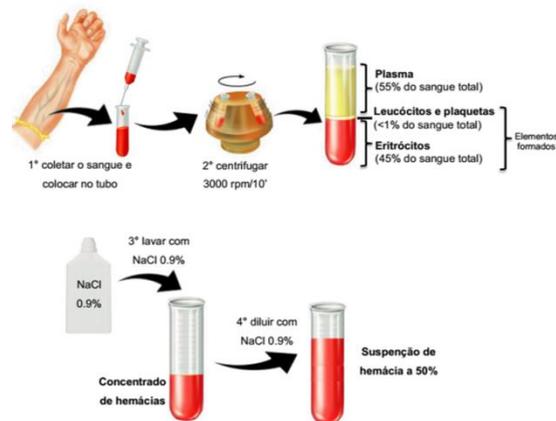


Figura 19 - Representação esquemática da obtenção da suspensão de hemácias a 50%.

4.2 Preparação das substâncias de trabalho

Ebselen ou 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona (EbSe) [adquirido da Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, Mo)] foi dissolvido em dimetilsulfoxido (DMSO; $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) [adquirido da Dinâmica] antes da adição de solvente aquoso para preparação das concentrações de trabalho [0,1; 1; 5; 10 μM];

N-acetilcisteína (NAC; $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$) [adquirido da Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, Mo)] foi dissolvido em solução salina com tampão fosfatos 1x (PBS 1x) para preparação da concentração de trabalho [10 μM];

Ácido R-lipóico (R-ALA) e Ácido S-lipóico (S-ALA) [adquiridos da Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, Mo)] foram dissolvidos em dimetilsulfoxido (DMSO; $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) [adquirido da Dinâmica] antes da adição de solvente aquoso para preparação das concentrações de trabalho [0,1; 1; 5; 10 μM];

Azul de metileno (AM; $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCL}_3\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) [adquirido da Nuclear] foi dissolvido em solvente aquoso para preparação da concentração de trabalho [0,04 μM]. O AM foi utilizado no estudo como o controle positivo na prevenção da MetHb induzida pela DDS-NOH em eritrócitos *in vitro*, uma vez que clinicamente este agente redutor é considerado o único tratamento para a MetHb (REILLY et al. 1999; ALBURQUEQUE, 2013).

Dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH) [adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)] foi dissolvido em Álcool Metílico (CH_3OH) [adquirido da Dinâmica] para preparação das concentrações de trabalho [2,5 e 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$].

4.3 Pré-tratamento das amostras

Inicialmente, 0.5 mL da suspensão de eritrócitos a 50% obtido conforme o item 4.1.1, foi distribuído para cada tubo de ensaio de vidro, de acordo com os grupos estudados. Após isto, os eritrócitos foram pré-tratados com 0.1 mL de PBS 1x, de EbSe, de NAC, R-ALA, S-ALA e de AM, de acordo com seus grupos, e incubados por 60 minutos a 37°C. Após este período, foi adicionado as amostra 0.1 mL de PBS 1x ou metanol ou DDS-NOH, de acordo com seus grupos, e novamente incubados por 60 minutos a 37°C (Figura 21). Após o período de incubação, as amostras foram imediatamente preparadas para os procedimentos experimentais.

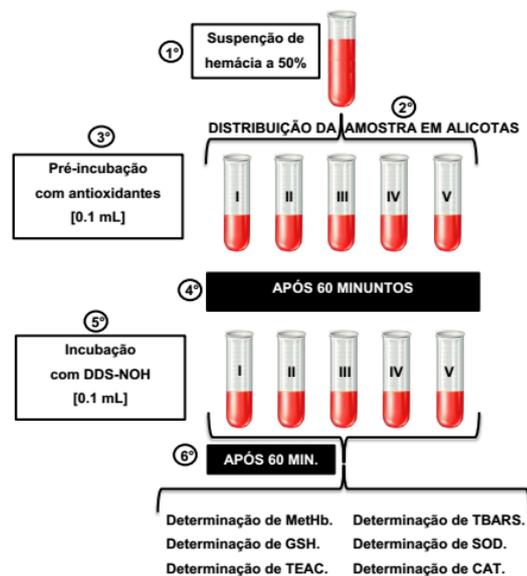


Figura 20 - Representação esquemática do pré-tratamento da suspensão de eritrócitos a 50%. **I) controle metanol** (solvente da DDS-NOH) - esse grupo foi pré-tratado com solução tampão fosfato salina (PBS) e após 60 minutos foi exposto ao metanol. **II) controle negativo** (DDS-NOH) - esse grupo foi pré-tratado com PBS e após 60 minutos foi

exposto à DDS-NOH na concentração de 2,5 µg/mL. **III) controle positivo** (AM) - esse grupo foi pré-tratado com o azul de metileno (0,04 µM) e, após 60 minutos de incubação foi exposto à DDS-NOH na concentração de 2,5 µg/mL. **IV) antioxidante + agente oxidante** [EbSe + DDS-NOH; NAC + DDS-NOH; R-ALA + DDS-NOH; S-ALA + DDS-NOH; AM + DDS-NOH] - esses grupos foram pré-tratados com EbSe ou NAC ou R-ALA ou S-ALA nas suas diferentes concentrações e após 60 minutos de incubação foram expostos à DDS-NOH (2,5 µg/mL).

4.4 Determinação de metemoglobina

A metemoglobina (MetHb) foi determinada pelo método de Evelyn e Malloy (1938). O percentual de MetHb foi determinado em triplicata, e os valores inferiores a 2% foram considerados normais.

Inicialmente, para a obtenção do hemolisado, 500 µL da suspensão de hemácias a 50% pré-tratada conforme item 4.1.2, foi adicionado em tubos de ensaio, seguido pela adição de 2.5 mL de água destilada e agitadas por inversão três vezes e mantidas em repouso por 3 min. Em seguida, foi adicionado ao tubo 1 mL de solução tampão-fosfato 0,5 mol/L e 3 gotas de t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100) [adquirido da Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, Mo)], e após isto, o tubo foi agitado no vórtex por 30 segundos, obtendo-se uma hemólise completa. Deste tubo, foram transferidos 2.4 mL para cubeta (A1) e 0.2 mL para outra cubeta (A2), esta contendo 2,2 mL do reativo ferricianeto-fosfato. Seguiu-se a leitura das amostras em $\lambda = 632$ nm em espectrofotômetro, para obtenção das absorvâncias de A1 e A2. Após as leituras, foi adicionado 100 µL da solução neutralizada de cianeto de sódio a 10% nos tubos A1 e A2, e após 1 minuto, foi realizada nova leitura das absorvâncias para obtenção do A3 e A4 (Figura 22).

Após a leitura das absorvâncias, o cálculo do percentual de % MetHb foi feito pela seguinte equação.

$$\% \text{ MetHb} = \frac{A1-A3}{12 \times (A2-A4)} \times 100$$

Onde:

12: fator de correção;

A1: % de metemoglobina na amostra;

A2: % de cianometemoglobina da amostra;

A3: 100% de metemoglobina na amostra;

A4: 100 % de cianometemoglobina na amostra.

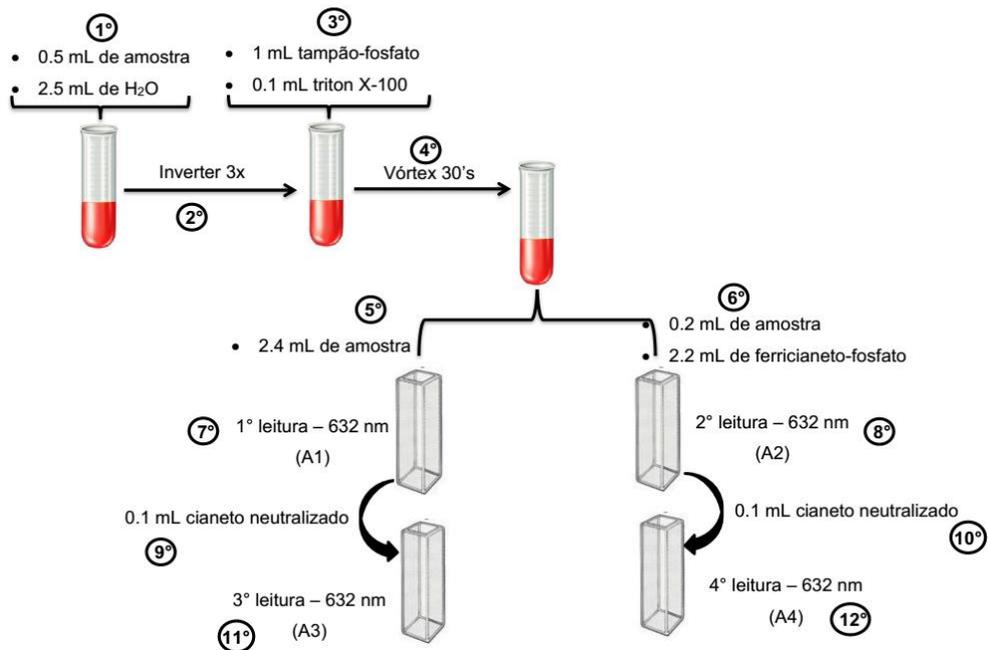


Figura 21 - Representação esquemática da determinação da metemoglobina.

4.5 Determinação de Glutathiona reduzida

A glutathiona reduzida foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de Ellman (1959). Inicialmente, foi retirada da suspensão de eritrócitos a 50% pré-tratados (item 4.1.2), uma alíquota de 200 µL e transferidos para um tubo de ensaio contendo 1800 µL de água. Em seguida, 20 µL deste hemolisado foi transferido para tubo de ensaio contendo 20 µL de água destilada e 4 mL de solução tampão de SOD. Deste tubo, foram retirados 3 mL de amostras e transferidos para a cubeta, seguida da 1ª leitura da amostra (T0) a 412 nm. Logo depois, foram adicionados, na

amostra, 100 μL da solução de DTNB e após 3 minutos, foi realizada a 2ª leitura (T3) para a determinação da concentração de GSH expressa em $\mu\text{g/ml}$ (Figura 23).

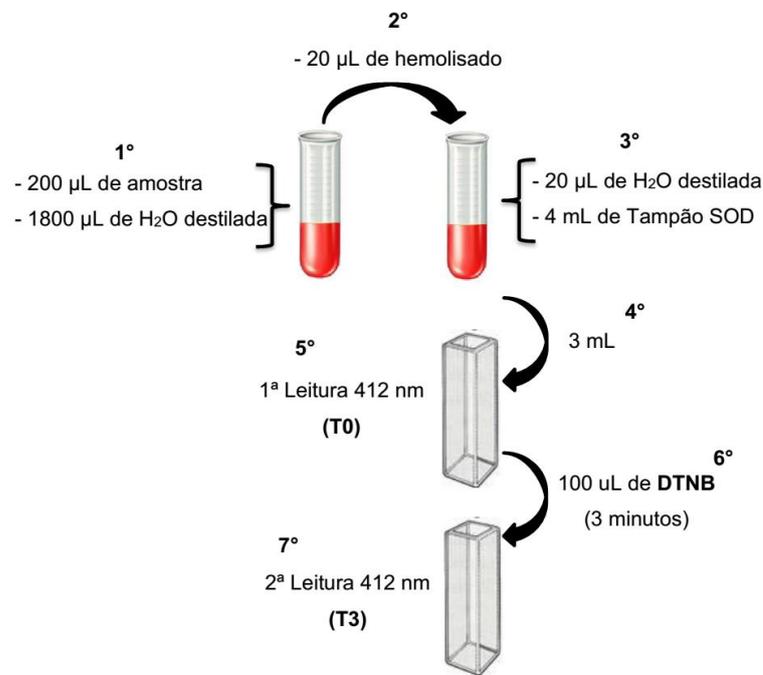


Figura 22 - Representação esquemática da determinação de glutatona.

4.6 Determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox

A capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) foi determinado de acordo com a metodologia adaptada de Miller et al. (1993) e modificado por Re et al. (1999). Inicialmente, foi colocado 2970 μL da solução de trabalho de ABTS^{•+} para a cubeta, seguido da primeira leitura (T0). Depois, foi retirada da suspensão de eritrócitos a 50% pré-tratada (item 4.1.2), uma alíquota de 100 μL e transferidos para um tubo de ensaio contendo 900 μL de água. Em seguida, 30 μL deste hemolisado foi transferidos para a cubeta contendo o radical, e após 5 minutos foi realizada a segunda leitura (T5; Figura 24). A reação foi mensurada em espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante cinco minutos. Assim,

foi determinada a atividade antioxidante total da amostra, sendo calculada a sua relação com a reatividade do Trolox como padrão, através da realização de curva padrão sob as mesmas condições.

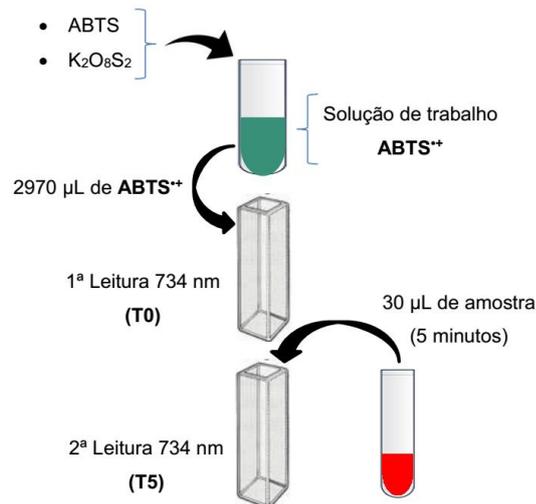


Figura 23 - Representação esquemática da determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC).

4.7 Dosagem de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

A dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um método utilizado para avaliar a peroxidação lipídica. Neste estudo o método foi utilizado como um indicador do estresse oxidativo. O procedimento técnico foi realizado de acordo com fundamentos propostos por Percário et al. (1994).

Inicialmente, foi retirada da suspensão de hemácias a 50% pré-tratada (item 4.1.2), uma alíquota de 100 µL, e transferidos para um tubo de ensaio contendo 900 µL de água. Em seguida, 0.5 mL deste hemolisado foram transferidos para tubo de ensaio contendo 1 mL da solução de TBA (10 nM). Em seguida, este tubo foi

colocado no banho-maria a 94°C por 60 min. Após este período foi adicionado ao tubo 4 mL de álcool n-butílico (adquirido da Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, Mo)), que em seguida foi agitado em agitador tipo vórtex, seguido de centrifugação a 175 x g (15 min). Após isto, 3 mL do sobrenadante foram transferidos para cubeta, e em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica a 535 nm (Figura 25).

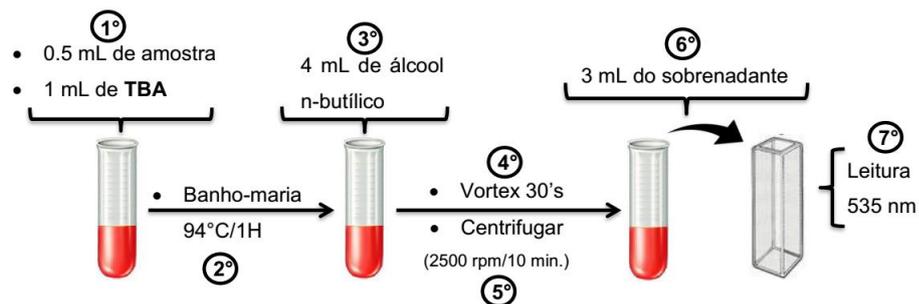


Figura 24 - Representação esquemática da dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

4.8 Determinação da superóxido dismutase

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de McCord e Fridowich (1969). Após os processos descritos no item 4.1.2, foi obtido um hemolisado a partir de 50 µL dos grupos estudados. Uma alíquota foi adicionada a uma mistura de tampão, citocromo *c* 0,075 mM, hipoxantina 1,5 mM e xantina oxidase 56 mM; a solução resultante foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 15 min, seguida de leitura na faixa de 550 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimatzu). Os valores de absorbância foram aplicados em curva padrão de citocromo *c* para determinação da concentração enzimática, expressa em Unidade SOD/mg proteína: uma unidade de SOD é a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a velocidade de redução do citocromo *c* a 550 nm.

4.9 Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada conforme, o método descrito por Aebi (1984). Inicialmente, as suspensões de eritrócitos foram hemolisadas em água (1:3) para em seguida serem diluídas em tampão TRIS base (Tampão Tris 1 M/EDTA 5mM pH8,0). No entanto, para verificar o decaimento do H_2O_2 (Merck), alíquotas das amostras diluídas foram adicionados a 900 μ L de solução de reação (Tampão TRIS base, H_2O_2 30% e água ultrapura) pH 8. A diminuição da concentração de H_2O_2 foi verificada a $\lambda=240$ nm a 25°C durante 60 segundos. A atividade de catalase foi definida como a atividade necessária para degradar um 1 mol H_2O_2 em 60 seg, em pH 8 a 25°C, sendo expressa como U/mg Hb nos eritrócitos (BUKOWSKA e KOWALSKA, 2004). O coeficiente de extinção molar H_2O_2 utilizado para o cálculo foi de 39,4 cm^2/mol .

4.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por análise de variância uma via (ANOVA) seguida por teste de Tukey múltiplas comparações. Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do Ebselen, da N-acetilcisteína, do Ácido R-lipóico e do Ácido S-lipóico na formação de metemoglobina induzida por DDS-NOH em eritrócitos

A DDS-NOH (2,5 µg/mL) induziu aumento nos níveis de MetHb de forma significativa ($p \leq 0,05$), em relação ao grupo controle metanol. O pré-tratamento com EbSe impediu, parcialmente a formação de MetHb quando comparado ao grupo DDS-NOH sem tratamento ($p \leq 0,05$). Além disso, não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações de EbSe. O pré-tratamento com AM (0,04 µM) foi capaz de impedir a formação de MetHb (Figura 25).

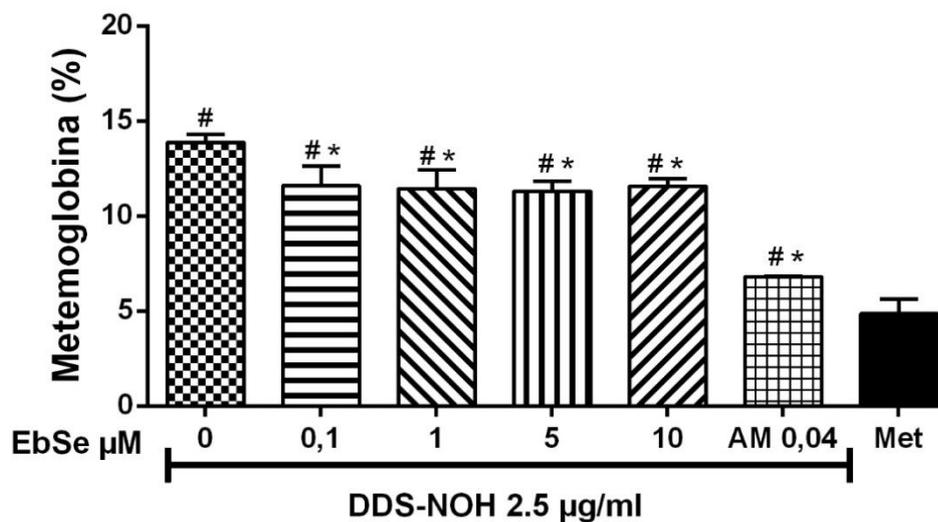


Figura 25 - Efeito do EbSe na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicata. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. EbSe, Ebselen; AM, azul de metileno; DDS-NOH, dapsona-hidroxilamina; MetHb, Metemoglobina; Metemoglobina (%), percentual de formação de metemoglobina.

Adicionalmente, a NAC preveniu de maneira significativa ($p \leq 0,05$) a formação da MetHb em relação a DDS-NOH. Não houve diferenças significativa entre a NAC e o controle positivo, o AM (Figura 26).

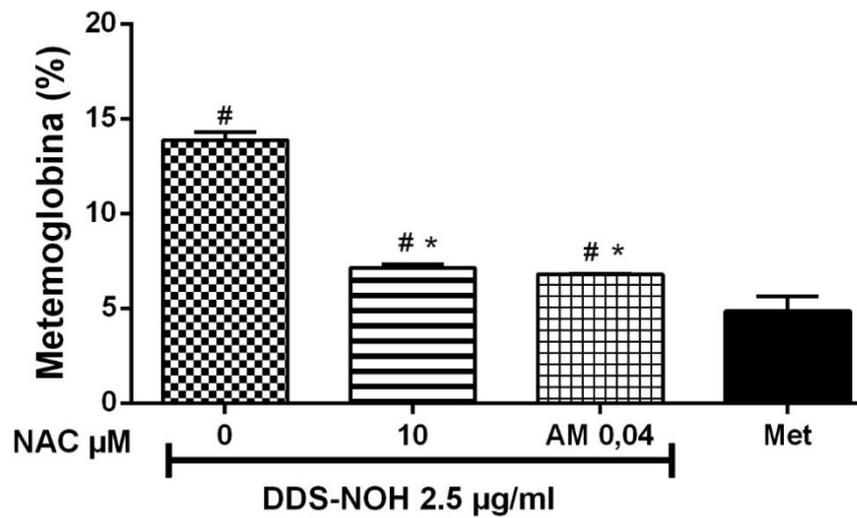


Figura 26 - Efeito da NAC na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicata. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. NAC, N-acetilcisteína; AM, azul de metileno; DDS-NOH, dapsona-hidroxiilamina; MetHb, Metemoglobina; Metemoglobina (%), percentual de formação de metemoglobina.

Todas as concentrações testadas do R-ALA preveniram a formação de MetHb comparado ao grupo DDS-NOH ($p \leq 0,05$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações de R-ALA e o controle positivo, o AM (Figura 27).

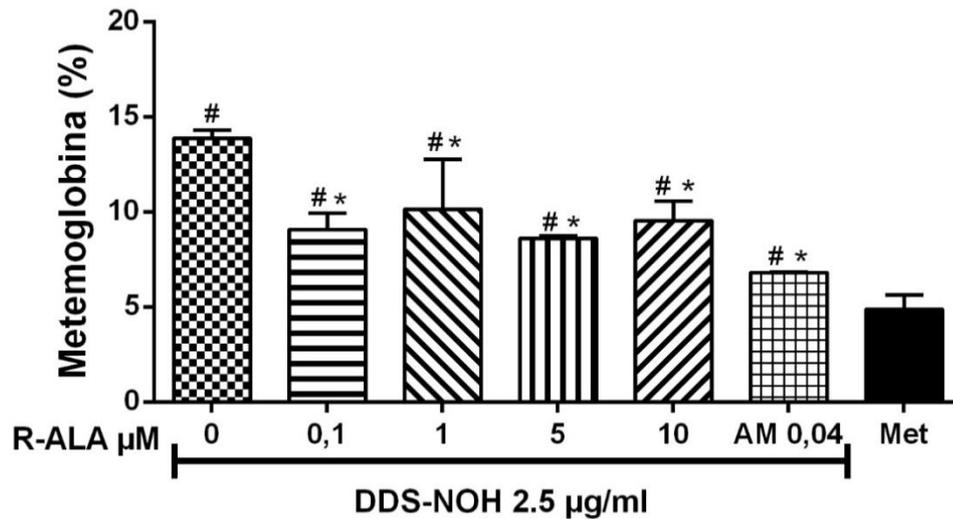


Figura 27 - Efeito do R-ALA na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicata. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. R-ALA, ácido R-lipóico; AM, azul de metileno; DDS-NOH, dapsona-hidroxilamina; MetHb, Metemoglobina; Metemoglobina (%), percentual de formação de metemoglobina.

Nos grupos pré-tratados com S-ALA, observou-se uma prevenção no aumento da concentração de MetHb em comparação ao grupo DDS-NOH ($p \leq 0,05$). Não houve diferenças estatísticas entre as concentrações de S-ALA (Figura 28).

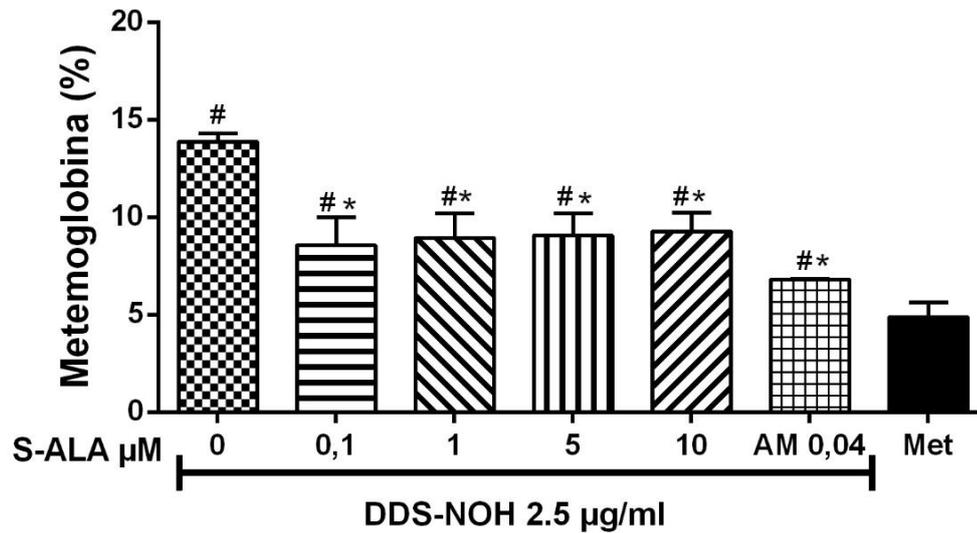


Figura 28 - Efeito do S-ALA na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicata. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. S-ALA, ácido S-lipóico; AM, azul de metileno; DDS-NOH, dapsona-hidroxilamina; MetHb, Metemoglobina; Metemoglobina (%), percentual de formação de metemoglobina.

5.2 Efeito do pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, Ácido R-lipóico ou Ácido S-lipóico sobre os níveis de glutatona em eritrócitos tratados com DDS-NOH

A DDS-NOH reduziu os níveis de GSH comparado ao metanol. O pré-tratamento em todas as concentrações de EbSe induziu aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos nível de GSH em relação ao DDS-NOH sem tratamento, metanol e AM. O pré-tratamento com AM reduziu os níveis de GSH comparado aos grupos DDS-NOH e metanol (Figura 29).

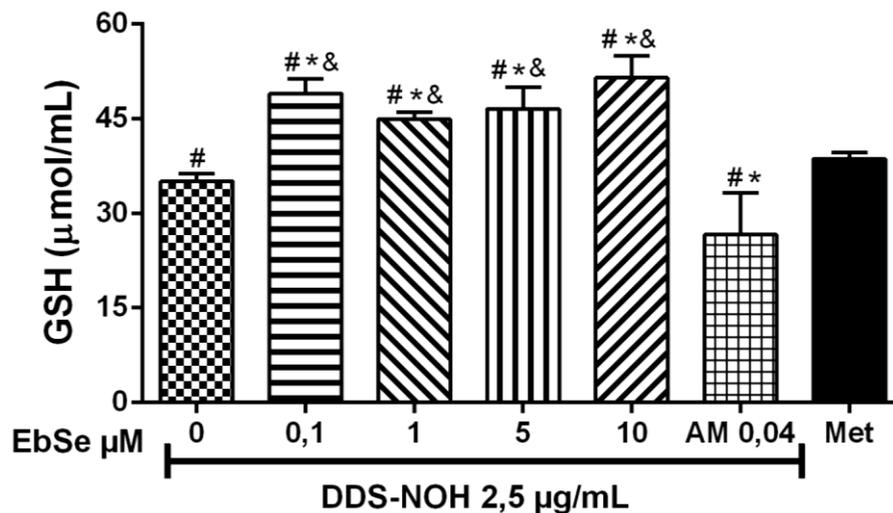


Figura 29 - Efeito do EbSe nos níveis de GSH em eritrócitos estimulados com DDS-NOH. Os eritrócitos foram pré-tratados com EbSe (0,1; 1; 5 e 10 µM) e estimulados com DDS-NOH (2,5 µg/mL), em seguida, a concentração de GSH foi avaliada. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento, & $p \leq 0,05$ comparado ao AM. EbSe, Ebselen; DDS-NOH, dapsona-hidroxilamina; GSH, glutatona; AM, Azul de Metileno; Met, Metanol.

Adicionalmente, a NAC induziu aumento na concentração de GSH quando comparado aos grupos DDS-NOH, metanol e AM ($p \leq 0,05$; Figura 30).

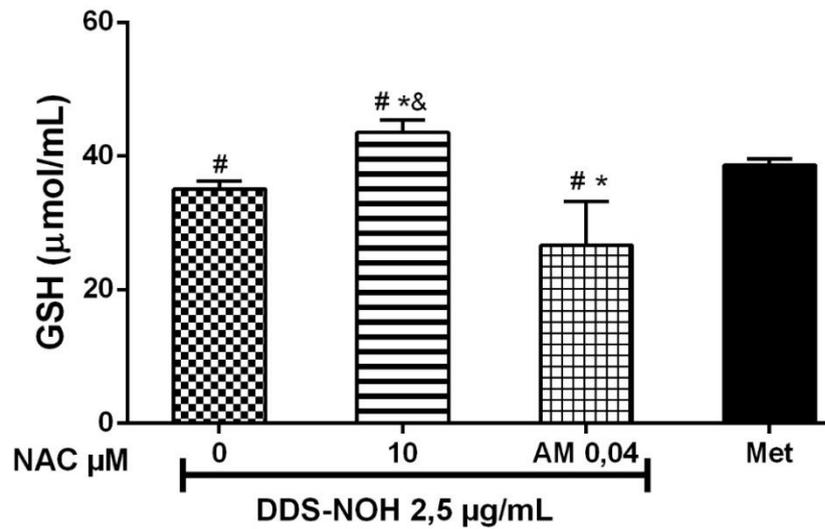


Figura 30 - Efeito da NAC nos níveis de GSH em eritrócitos estimulados com DDS-NOH. Os eritrócitos foram pré-tratados com NAC (10 µM) e estimulados com DDS-NOH (2,5 µg/mL), em seguida, a concentração de GSH foi avaliada. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento, & $p \leq 0,05$ comparado ao AM. * $p \leq 0,05$ comparado ao controle metanol. NAC, N-acetilcisteína; DDS-NOH, dapsona-hidroxilamina; GSH, glutatona; AM, Azul de Metileno; Met, Metanol.

Em relação ao pré-tratamento com R-ALA, somente a menor concentração (0,1 μM) levou a um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na concentração de GSH comparado ao grupo DDS-NOH e metanol. As concentrações de 1, 5 e 10 μM preveniram a redução da concentração de GSH em relação ao grupo DDS-NOH (Figura 31).

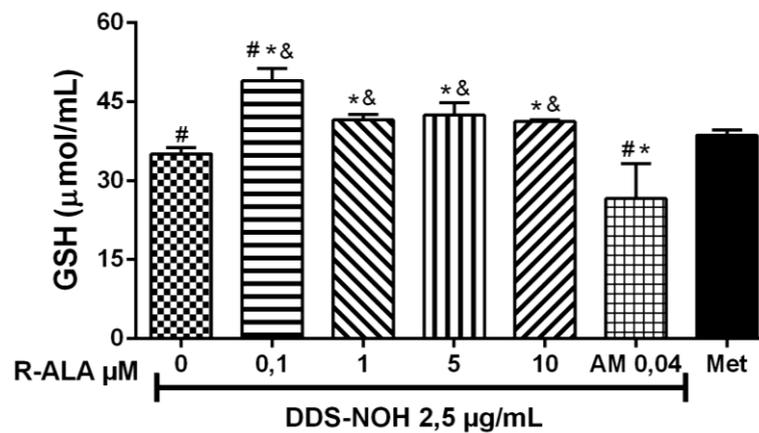


Figura 31 - Efeito do pré-tratamento com R-ALA nos níveis de GSH em eritrócitos estimulados com DDS-NOH. Os eritrócitos foram pré-tratados com R-ALA (0,1; 1; 5 e 10 μM) e estimulados com DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g/mL}$), em seguida, a concentração de GSH foi avaliada. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento, & $p \leq 0,05$ comparado ao AM. R-ALA, ácido R-lipóico; DDS-NOH, dapsona-hidroxilamina; GSH, glutathiona, AM, Azul de Metileno; Met, controle metanol.

Em relação ao S-ALA, somente o pré-tratamento com 5 e 10 μM induziram aumento significativo ($p \leq 0,05$) na concentração de GSH comparado ao grupo DDS-NOH, metanol e AM (Figura 32).

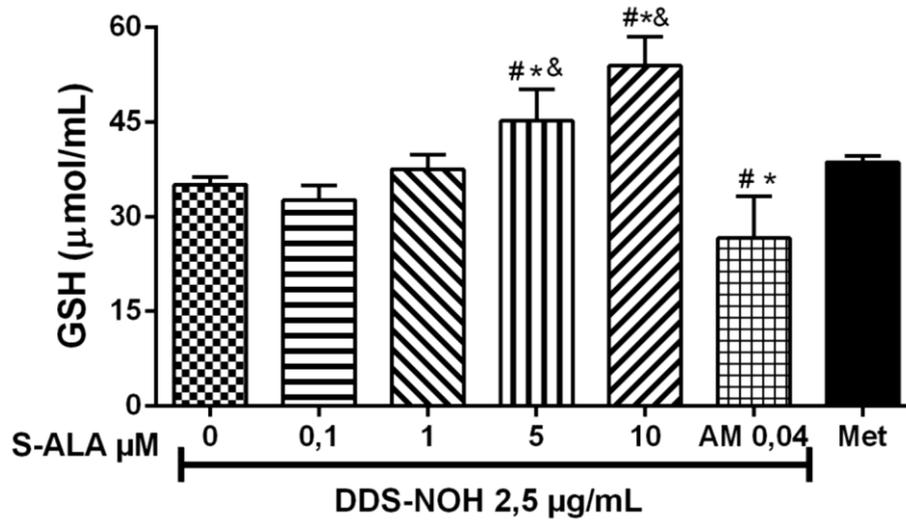


Figura 32 - Efeito do S-ALA nos níveis de GSH em eritrócitos estimulados com DDS-NOH. Os eritrócitos foram pré-tratados com S-ALA (0,1; 1; 5 e 10 μM) e estimulados com DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g/mL}$), em seguida, a concentração de GSH foi avaliada. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicatas. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento, & $p \leq 0,05$ comparado ao AM. S-ALA, ácido S-lipóico; DDS-NOH, dapsona-hidroxilamina; GSH, glutathiona; AM, Azul de metileno; Met, controle metanol.

5.3 Efeito do pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, Ácido R-lipóico ou Ácido S-lipóico sobre capacidade antioxidante total em eritrócitos tratados com DDS-NOH

A DDS-NOH diminuiu a capacidade antioxidante total dos eritrócitos de forma significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao controle metanol. Por outro lado, o pré-tratamento com as diferentes concentrações de EbSe preveniram a redução da capacidade antioxidante total induzida pelo DDS-NOH ($p \leq 0,05$). Adicionalmente, a concentração de 1 μM de EbSe induziu aumento significativo ($p \leq 0,05$) na capacidade antioxidante de eritrócito comparado ao metanol e AM. O pré-tratamento com AM também preveniu a redução dos níveis de TEAC induzido pelo DDS-NOH, obtendo valores similares ao grupo metanol (Figura 33).

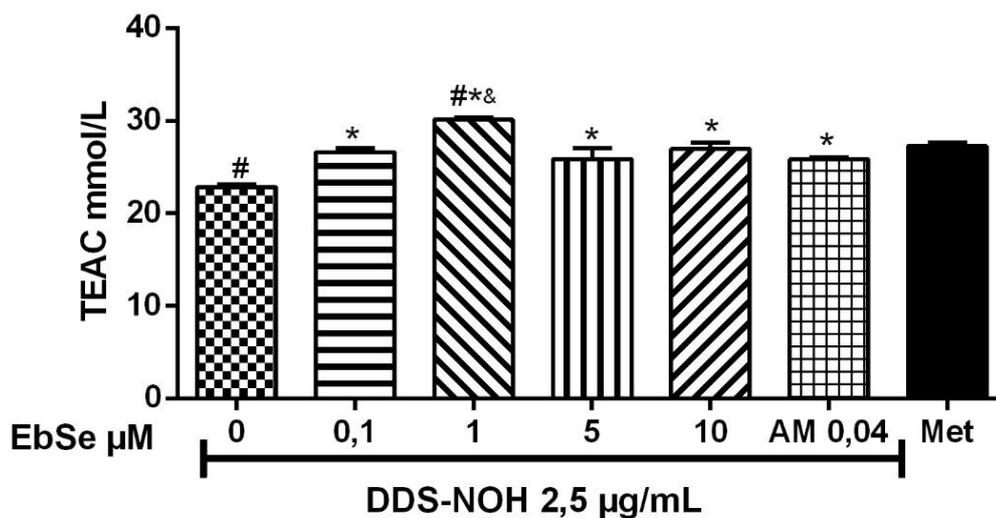


Figura 33 - Efeito do pré-tratamento com o EbSe sobre a capacidade antioxidante de eritrócitos tratado com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento, & $p \leq 0,05$ comparado ao AM. EbSe: Ebselen; TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao trolox; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

O pré-tratamento com a NAC preveniu a diminuição da capacidade antioxidante total induzida pelo DDS-NOH ($p \leq 0,05$), assim como o AM que apresentou efeito similar (Figura 34).

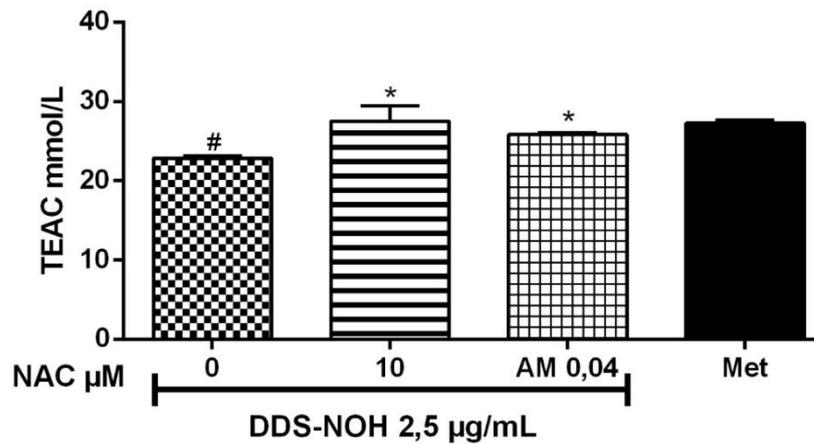


Figura 34 - Efeito do pré-tratamento com a NAC sobre a capacidade antioxidante de eritrócitos tratado com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. NAC: N-acetilcisteína; TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao trolox; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

Adicionalmente, o pré-tratamento com o R-ALA também preveniu a diminuição da capacidade antioxidante dos eritrócitos induzido pelo DDS-NOH ($p \leq 0,05$). Além disso, a concentração de 0,1 μM de R-ALA induziu um aumento significativo ($p \leq 0,05$) da capacidade antioxidante do eritrócito em comparação ao metanol e AM (Figura 35).

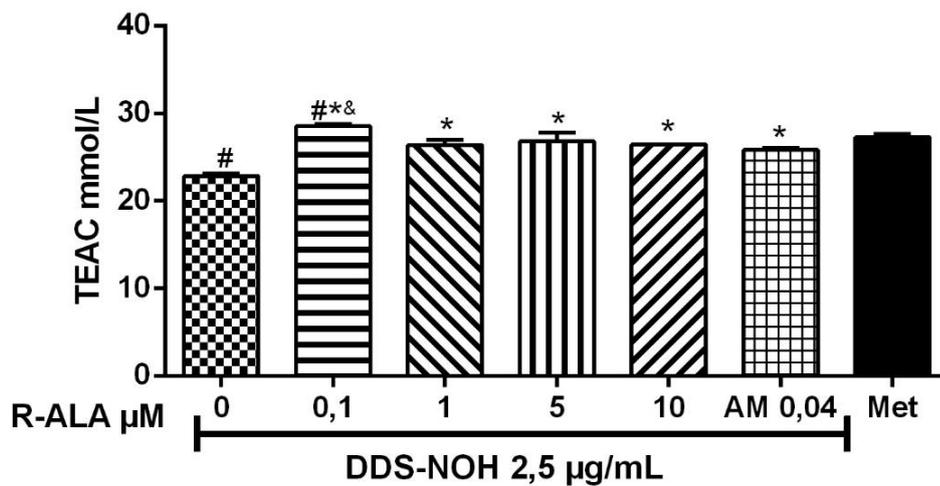


Figura 35 - Efeito do pré-tratamento com R-ALA sobre a capacidade antioxidante de eritrócitos tratado com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento, & $p \leq 0,05$ comparado ao AM. R-ALA: Ácido R-lipóico; TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao trolox; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

O pré-tratamento com o S-ALA, em todas as concentrações, preveniu a redução da capacidade antioxidante induzida pelo DDS-NOH ($p \leq 0,05$), mostrando efeito similar ao AM (Figura 36).

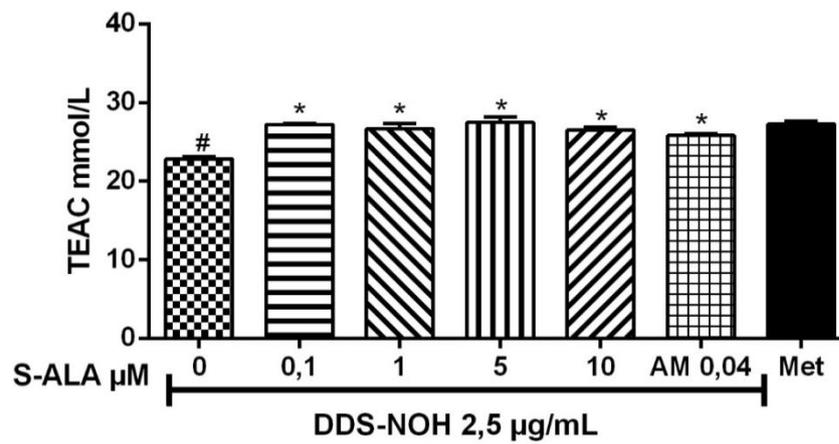


Figura 36 - Efeito do pré-tratamento com o S-ALA sobre a capacidade antioxidante de eritrócitos tratado com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. S-ALA: Ácido S-lipóico; TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao trolox; DDS-NOH: Dapsona-hidroxiilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

5.4 Efeito do pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, Ácido R-lipóico ou Ácido S-lipóico sobre os níveis de TBARS em eritrócitos tratados com DDS-NOH

A incubação com DDS-NOH aumentou os níveis de TBARS de forma significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao metanol. O pré-tratamento com o EbSe, em todas as concentrações, reduziu os nível de TBARS de forma significativa ($p \leq 0,05$) induzida pelo DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O pré-tratamento com AM diminuiu os níveis de TBARS induzido pelo DDS-NOH, mas obteve valores maiores que o metanol (Figura 37).

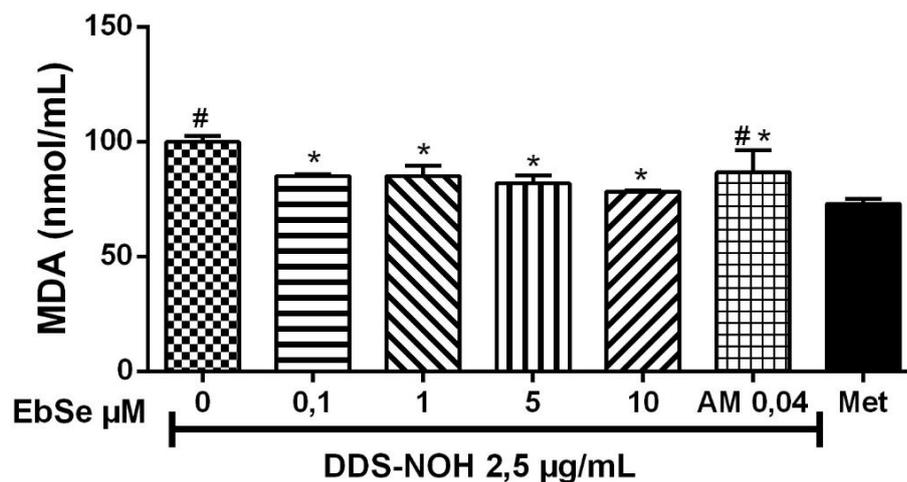


Figura 37 - Efeito do pré-tratamento com EbSe sobre os níveis de TBARS em eritrócitos tratado com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. EbSe: Ebselen; TBARS: substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA: malondialdeído; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

O pré-tratamento com o NAC reduziu os níveis de TBARS induzido pelo DDS-NOH, obtendo valores similares ao metanol (Figura 38).

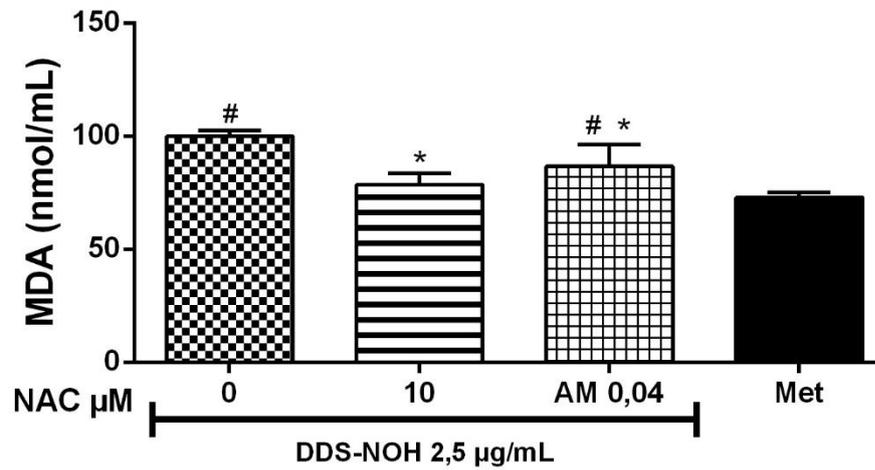


Figura 38 - Efeito do pré-tratamento com NAC sobre os níveis de TBARS em eritrócitos tratado com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. NAC: N-acetilcisteína; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA: malondialdeído; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

Em relação ao pré-tratamento com o R-ALA, somente as concentrações de 0,1 e 1 μM de R-ALA diminuíram os níveis de TBARS induzido pelo DDS-NOH (Figura 39).

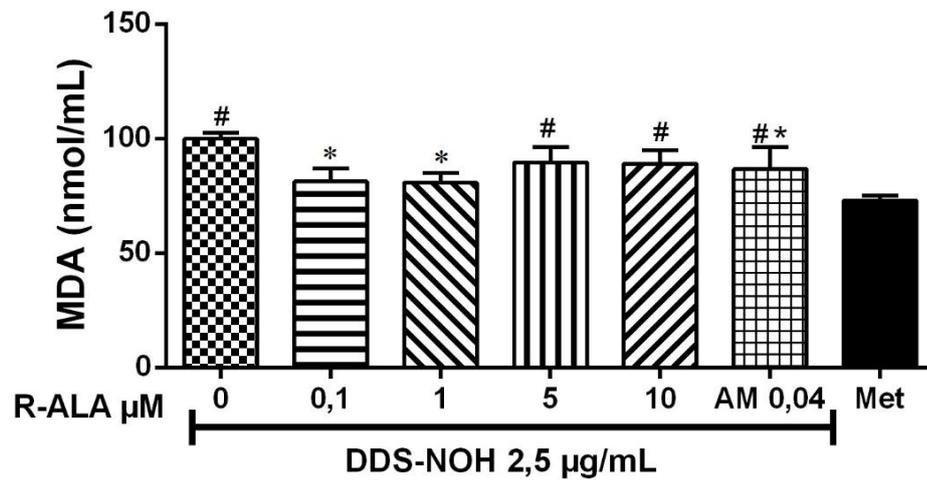


Figura 39 - Efeito do pré-tratamento com R-ALA sobre os níveis de TBARS em eritrócitos tratado com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. R-ALA: Ácido R-lipóico; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA: malondialdeído; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

Em relação ao pré-tratamento com S-ALA, todas as concentrações de S-ALA foram capazes de reduzir ($p \leq 0,05$) os níveis de TBARS induzido pelo DDS-NOH, obtendo valores similares ao metanol (Figura 40).

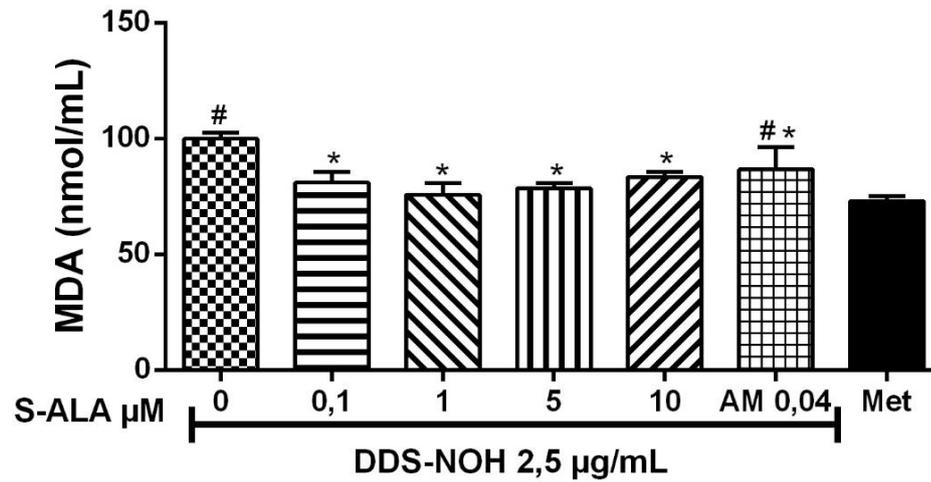


Figura 40 - Efeito do pré-tratamento com S-ALA sobre os níveis de TBARS em eritrócitos tratado com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. S-ALA: Ácido S-lipóico; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA: malondialdeído; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

5.5 Efeito do pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, Ácido R-lipóico ou Ácido S-lipóico sobre a atividade da enzima catalase em eritrócitos tratados com DDS-NOH

A atividade da catalase estava significativamente aumentada ($p \leq 0,05$) nos eritrócitos tratados com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de DDS-NOH em comparação ao metanol. No entanto, o pré-tratamento com EbSe, em todas as concentrações, e o AM preveniram este aumento induzido pelo DDS-NOH. Desta forma, o EbSe apresentou atividade semelhante ao grupo AM (Figura 41).

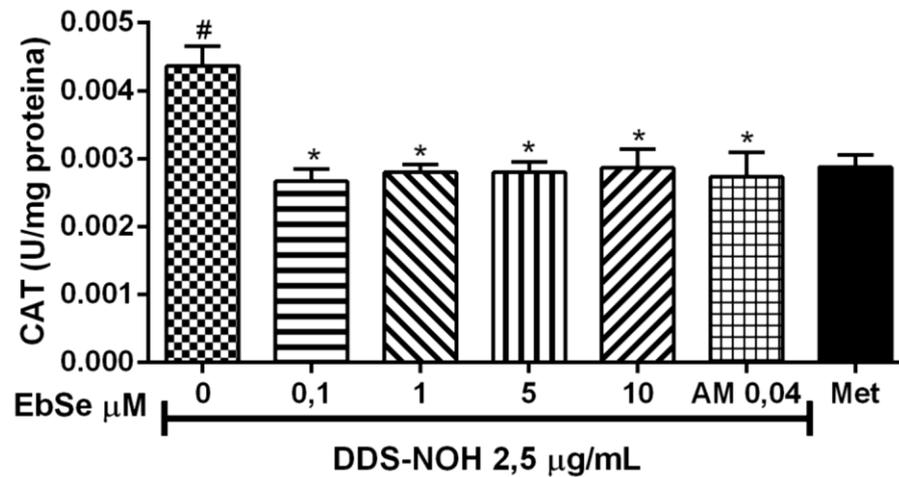


Figura 41 - Efeito do pré-tratamento com EbSe sobre a atividade de catalase de eritrócitos estimulados com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. EbSe: Ebselen; CAT: Catalase; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

O pré-tratamento com a NAC reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) a atividade de catalase induzida pelo DDS-NOH, obtendo valores menores que o AM e metanol (Figura 42).

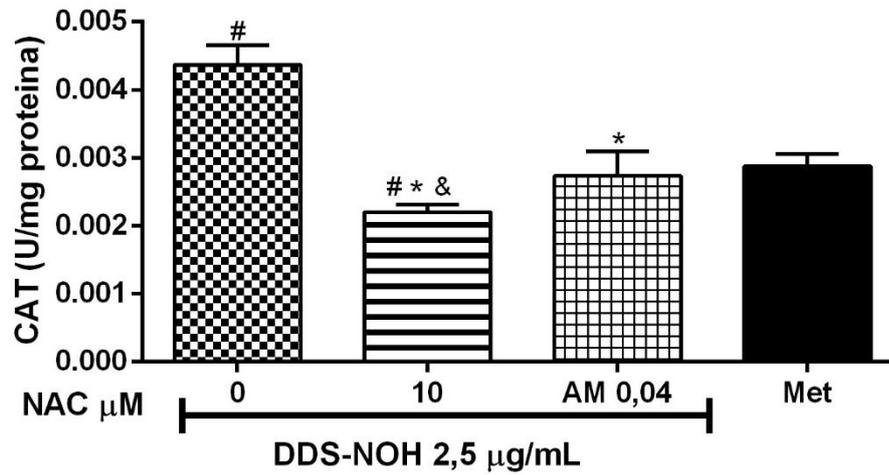


Figura 42 - Efeito do pré-tratamento com NAC sobre a atividade de catalase de eritrócitos estimulados com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento, & $p \leq 0,05$ comparado ao AM. NAC: N-acetilcisteína; CAT: Catalase; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

Da mesma forma, todas as concentrações de R-ALA (0,1; 1; 5 e 10 μM) preveniram o aumento da atividade da catalase de forma significativa ($p \leq 0,05$) induzida pelo DDS-NOH, obtendo valores similares da atividade de CAT do grupo metanol (Figura 43).

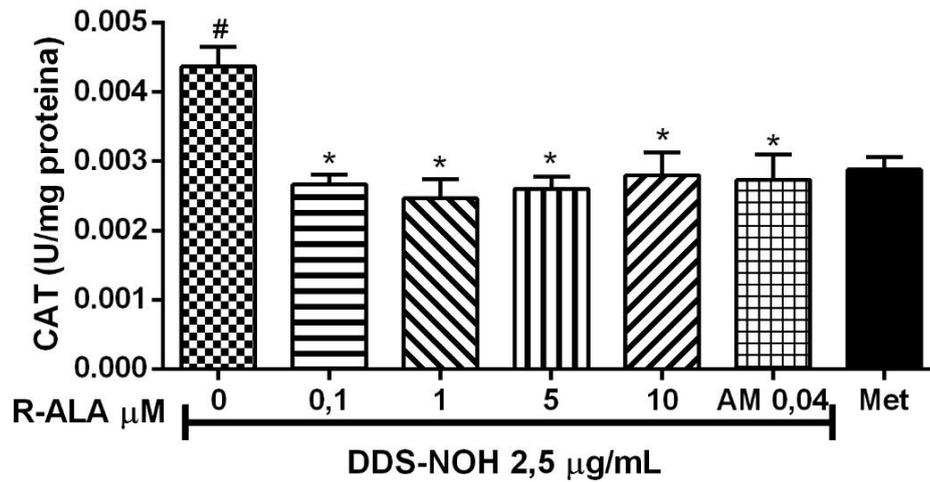


Figura 43 - Efeito do pré-tratamento com R-ALA sobre a atividade de catalase de eritrócitos estimulados com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. R-ALA: Ácido R-lipóico; CAT: Catalase; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

Além disso, as concentrações de 0,1, 1, e 5 μM de S-ALA também foram capazes de prevenir o aumento da atividade da catalase ($p \leq 0,05$) induzida pelo DDS-NOH, obtendo valores menores de atividade da CAT que os grupos metanol e AM (Figura 44).

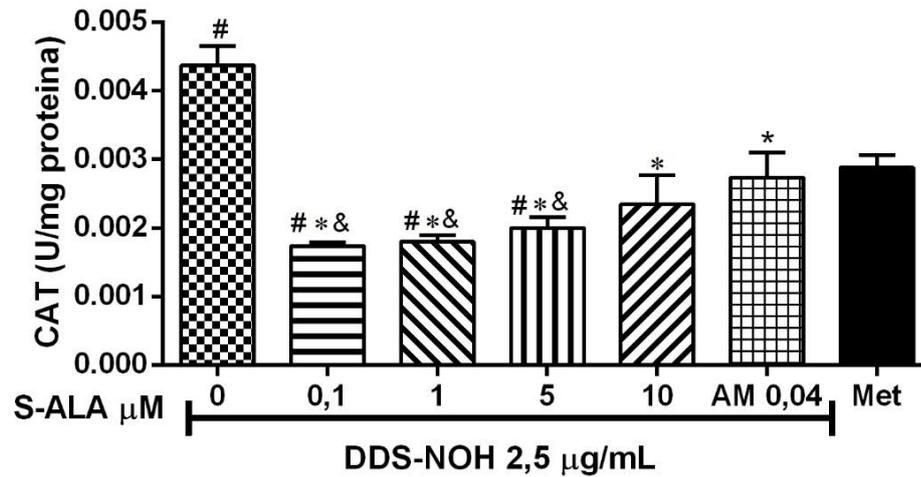


Figura 44 - Efeito do pré-tratamento com S-ALA sobre a atividade de catalase de eritrócitos estimulados com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento, & $p \leq 0,05$ comparado ao AM. S-ALA: Ácido S-lipóico; CAT: Catalase; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

5.6 Efeito do pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, Ácido R-lipóico ou Ácido S-lipóico sobre a atividade da enzima superóxido dismutase de eritrócitos tratados com DDS-NOH

O tratamento com DDS-NOH (2,5 µg/mL) levou um aumento da atividade da SOD de forma significativa ($p \leq 0,05$), em relação ao metanol. O pré-tratamento com EbSe, em todas as concentrações, preveniu o aumento da atividade da SOD de maneira significativa ($p \leq 0,05$) induzido pelo DDS-NOH, similar ao grupo AM e obteve valores similares ao metanol (Figura 45).

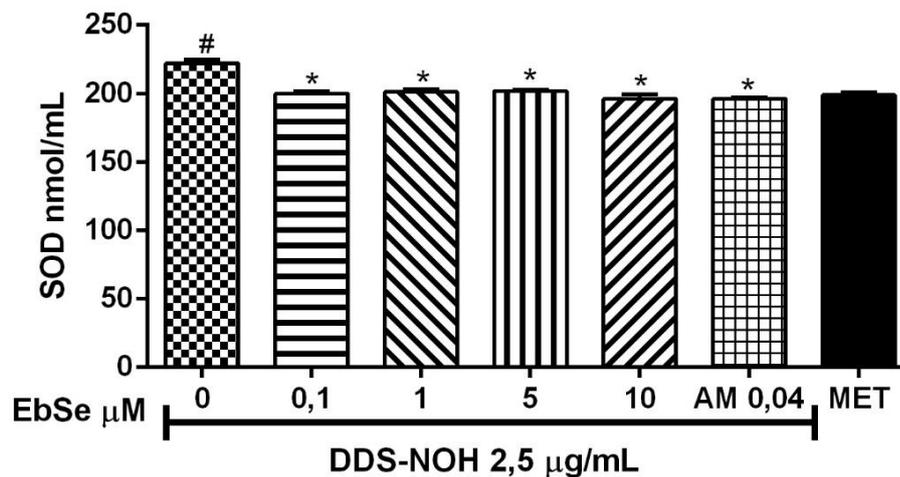


Figura 45 - Efeito do pré-tratamento com o EbSe na atividade da SOD de eritrócitos tratados com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. EbSe: Ebselen; SOD: enzima superóxido dismutase; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

Do mesmo modo, o pré-tratamento com NAC (10 μM) também preveniu o aumento da atividade da SOD induzida pelo DDS-NOH ($p \leq 0,05$), obtendo valores similares de atividade desta enzima aos grupos metanol e AM (Figura 46).

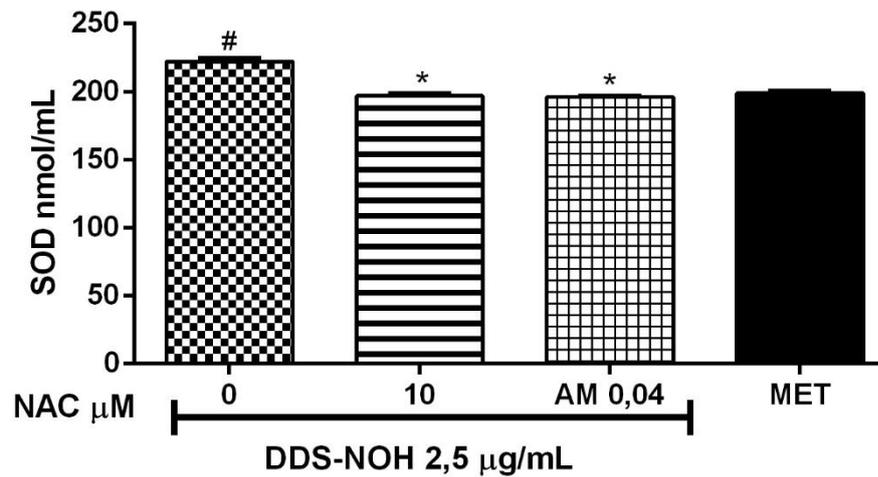


Figura 46 - Efeito do pré-tratamento com NAC na atividade da SOD de eritrócitos tratados com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. NAC: N-acetilcisteína; SOD: enzima superóxido dismutase; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

Adicionalmente, o pré-tratamento com R-ALA, em todas as concentrações, preveniu o aumento da atividade da SOD de forma significativa ($p \leq 0,05$) induzida pelo DDS-NOH, obtendo valores similares ao metanol e AM (Figura 47).

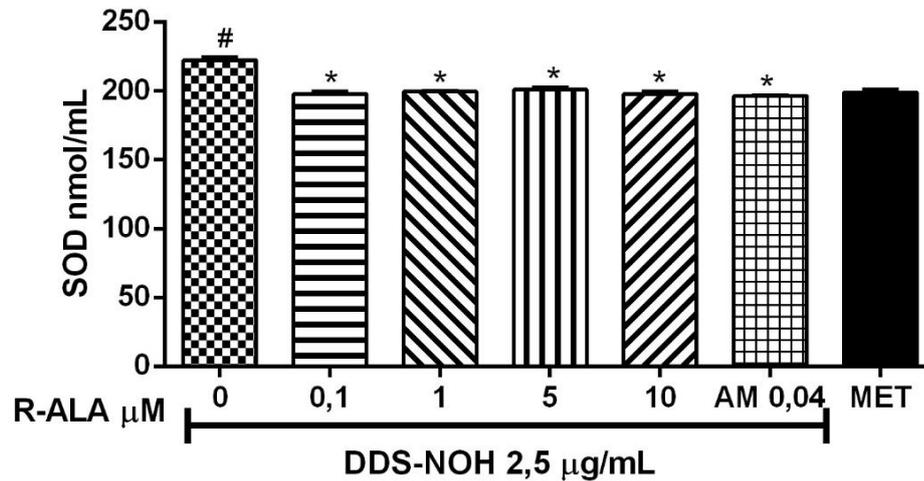


Figura 47 - Efeito do pré-tratamento com R-ALA na atividade da SOD de eritrócitos tratados com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. R-ALA: Acido R-lipóico; SOD: enzima superóxido dismutase; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

Além disso, todas as concentrações testadas de S-ALA também preveniram o aumento da atividade de SOD induzida pelo DDS-NOH ($p \leq 0,05$), obtendo valores similares aos grupos AM e metanol (Figura 48).

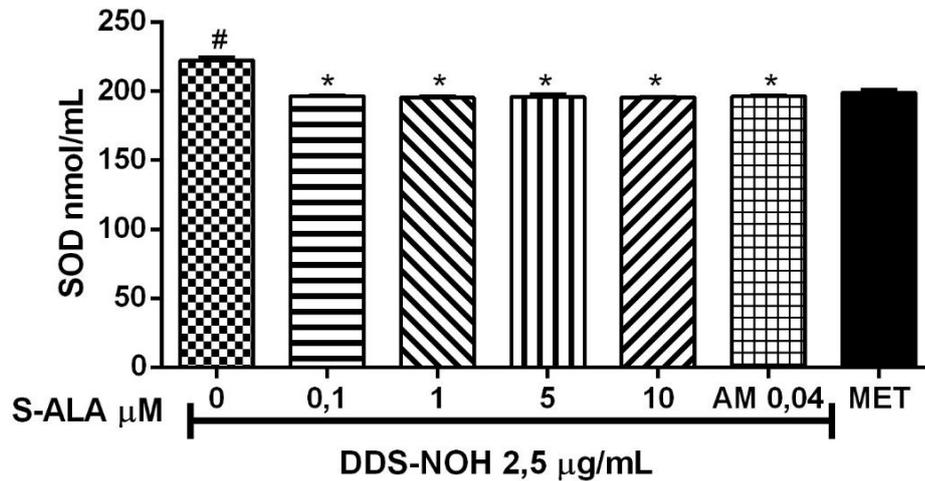


Figura 48 - Efeito do pré-tratamento com S-ALA na atividade da SOD de eritrócitos tratados com DDS-NOH. # $p \leq 0,05$ comparado ao metanol; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS-NOH sem tratamento. S-ALA: Ácido S-lipóico; SOD: enzima superóxido dismutase; DDS-NOH: Dapsona-hidroxilamina; Met: Metanol; AM: Azul de metileno.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo fornece evidências adicionais para implicar a DDS-NOH como a responsável em causar alterações do equilíbrio redox em eritrócitos de pacientes que usam a DDS, como é o caso de pacientes hansenianos. Nossos dados mostram que a administração de DDS-NOH (2,5 µg/mL) aumentou o dano oxidativo e diminuiu as defesas antioxidantes em eritrócitos humanos. Os eritrócitos expostos à DDS-NOH apresentaram aumento significativo nos percentuais de MetHb, nas atividades de SOD e CAT, assim como nos níveis de peroxidação lipídica. A DDS-NOH também causou diminuições significativas na concentração de GSH e na capacidade antioxidante total nos eritrócitos. Por outro lado, o pré-tratamento com Ebselen, N-acetilcisteína, ácido R-lipóico ou ácido S-lipóico reverteram os efeitos oxidativos da DDS-NOH no sangue.

Os eritrócitos são expostos a várias situações de estresse, principalmente durante a exposição às drogas, uma vez que várias drogas podem interferir com a hemoglobina (IBRAHIM et al. 2006). Devido à combinação de fatores, como os mecanismos de reparo limitados, exposição à alta concentração de O₂, presença da Hb que é um forte catalisador oxidativo, o sistema antioxidante do eritrócito pode não fornecer proteção apropriada quando estas células são expostas a agentes oxidantes, deixando-as altamente suscetíveis aos danos oxidativos, levando à MetHba e hemólise (IYER et al. 2013). Estas alterações hematológicas são encontradas, frequentemente em pacientes hansenianos que usam DDS (HALIM e OGBEIDE, 2002).

A DDS é administrada diariamente, em doses de 50-100 mg, levando a concentrações séricas de 0,5 a 5 µg/mL do seu principal metabólito, DDS-NOH, equivalentes a 2-20 µM (LEONARD e FRY, 1991). Como a DDS, quando incubada com eritrócitos não induz efeitos hematotóxicos, foi sugerido que o seu metabólito, a DDS-NOH seria o principal responsável pelas alterações hematológicas, como a formação de MetHb (GROSSMAN e JOLLOW, 1988; COLEMAN, 1993). Neste estudo, nós utilizamos a DDS-NOH na concentração de 2,5 µg/mL, equivalente a 9 µM comparáveis as concentrações séricas encontradas em pacientes que utilizam a

terapia com a DDS. Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa utilizaram modelo de eritrócitos e demonstraram que 2,5 µg/mL de DDS-NOH, correspondente a aproximadamente 9 µM foram capazes de induzir 19% de MetHb (ALBUQUERQUE et al. 2015). Adicionalmente, outros estudos também mostraram que a DDS-NOH na concentração de 10 µM induziu 15% de MetHb (VAGE et al. 1994; REILLY et al. 1999).

A MetHb, um marcador da oxidação da Hb, é formada quando o Fe^{2+} da Hb perde um elétron. Este elétron pode ser transferido a uma molécula de O_2 , resultando na formação do $O_2^{\bullet-}$ (WINTERBOURN, 1990). Os resultados deste estudo mostraram que a MetHb aumentou, em aproximadamente 14% após a exposição dos eritrócitos à DDS-NOH, evidenciando o dano oxidativo induzido pela DDS-NOH no eritrócito. Este mecanismo é devido a DDS-NOH se ligar ao complexo férrico/ânion superóxido ($Fe^{3+}/O_2^{\bullet-}$) da O_2Hb favorecendo a formação de MetHb, ERO e DDS-NO. Enquanto as ERO, principalmente o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , formadas durante o processo de oxidação podem oxidar outras moléculas de Hb a MetHb (HATHERILL et al. 1991), a DDS-NO pode reagir com a glutathiona para se converter a DDS-NOH, que oxida outras moléculas de Hb. Este ciclo redox só termina quando a GSH é totalmente consumida (COLEMAN e JACOBUS, 1993; COLEMAN et al. 1994; DONA et al. 2012).

Diante disso, investigou-se o efeito da DDS-NOH sobre um dos mais importantes antioxidantes do eritrócito, a GSH. Um estudo anterior demonstrou a capacidade da DDS-NOH em reduzir a concentração de GSH reduzida (BORDIN et al. 2010). Nossos resultados também demonstraram que após a exposição dos eritrócitos à DDS-NOH, a concentração de GSH reduzida diminuiu em aproximadamente 10% em relação às células sem tratamento. Os agentes oxidantes podem reagir e consumir substâncias antioxidantes, como a GSH ou inibir a síntese desta substância. Dessa forma, os agentes oxidantes podem induzir a oxidação da Hb, geração de ERO e peroxidação lipídica (MURAKAMI e MAWATARI, 2003; JADHAV et al. 2007). Além disso, devido a importância da GSH na indução da atividade da GPx e na reciclagem de ácido ascórbico e α -tocoferol no organismo, a diminuição da concentração de GSH pode reduzir fatores antioxidantes não-

enzimáticos e a capacidade dos eritrócitos em remover ERO do interior destas células (NUTTALL et al. 1999).

De maneira geral, a exposição do eritrócito à DDS-NOH pode levar a oxidação da Hb e diminuição da capacidade antioxidante endógena, incluindo GSH e indução da peroxidação lipídica, o que pode levar o dano eritrocitário. Nesse sentido, neste estudo a exposição dos eritrócitos à DDS-NOH induziu o aumento da concentração do MDA em relação ao controle. O MDA é um produto final estável, indicador indireto da peroxidação lipídica (RIFAIOGLU et al. 2014). Estudos anteriores demonstraram que os níveis de MDA no eritrócito aumentam após o dano oxidativo (ESTERBAUER et al. 1991; KROLOW et al. 2014). A partir do aumento da concentração de MDA e da atividade das enzimas SOD e CAT observadas no presente estudo, nós podemos sugerir que a exposição à DDS-NOH leve a níveis aumentados de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 nos eritrócitos, como resultado da oxidação da Hb. Estas ERO podem reagir com o Fe^{2+} da Hb, via reação de Fenton e Haber-Weiss, produzindo o $\bullet OH$. Este radical é o mais reativo e lesivo para o organismo humano, capaz de causar entre outros danos a peroxidação lipídica.

Além da peroxidação lipídica as ERO induzem danos as proteínas de membrana do eritrócito levando a alterações na morfologia celular, que estão associadas a desnaturação oxidativa na membrana dos eritrócitos induzida pelas ERO (COLEMAN, 1993; BRADSHAW et al. 1997; McMILLAN et al. 2005). Resultados de estudos anteriores relataram que a DDS-NOH pode induzir alterações progressivas na proteína de membrana, a banda 3, através da oxidação direta da cisteína localizada no domínio catalítico da proteína (BORDIN et al. 2010; BAGGIO et al. 1993; LOW et al. 1993). A oxidação desses grupos sulfidrilas leva a desnaturação das proteínas de membrana que formam massas insolúveis chamadas de corpos de Heinz. A oxidação das proteínas de membranas, além de impedir as trocas aniônicas, faz com que os eritrócitos se tornem rígidos e não deformáveis, sendo removidos da circulação por macrófagos no baço e no fígado (COLLEMAN, 1993; BORDIN et al. 1995; MUSCH et al. 1999; BORDIN et al. 2009). Estes processos são encontrados principalmente em eritrócitos de pacientes que usam a DDS (BORDIN et al. 2010).

Adicionalmente, a oxidação da Hb e diminuição da capacidade antioxidante provocadas pela exposição à DDS-NOH demonstram que este metabólito induz o dano oxidativo, afetando a homeostase celular e levando a MetHba (McMILLAN et al. 1995; 2005). O AM, utilizado no tratamento da MetHba, atua como cofator para NADPH-MR acelerando a atividade e aumento a taxa de conversão da MetHb a Hb. No entanto, apesar de prevenir o agravamento da MetHba nos doentes submetidos a terapêutica com dapsona, o seu modo lento de atuação torna o uso do AM ineficaz no contexto de MetHba adquirida (ASH-BERNAL et al. 2004). Nesse sentido, antioxidantes podem contribuir com a redução da MetHba, inibindo a ação oxidante da DDS-NOH, servindo com antídoto mais eficaz e seguro para tratamento da MetHba adquirida (BORAN et al. 2008; ELHUSSEINI e AZAROV, 2010).

Nesse sentido, o Ebselen é um antioxidante que possui efeitos particularmente benéficos devido às suas potenciais aplicações médicas (PAWLAS e MALECKI, 2007; SALUK et al. 2013). Ebselen é um composto orgânico selênio que foi originalmente descrito como um mimético da GPx, esta habilidade, o torna capaz de inibir a formação de ERO. Dessa forma, resultados anteriores demonstraram que o EbSe inibiu a conversão de O₂Hb a MetHb, devido supressão de ERO, como H₂O₂ e O₂^{•-} (WANG et al. 1992; TIANO et al. 2003). Nossos dados mostraram que o pré-tratamento com EbSe preveniu a formação de MetHb induzida por DDS-NOH. O EbSe apresentou este efeito, provavelmente devido a sua capacidade catalítica de inibição das ERO, principalmente o H₂O₂, O₂^{•-}, formados durante a oxidação induzida por DDS-NOH.

O EbSe realiza uma serie de reações químicas, utilizando como substrato a GSH ou outras moléculas tiólicas para reduzir as ERO (SCHEWE, 1995). Previamente, foi descrito que o EbSe protege contra a redução dos níveis de GSH, devido sua capacidade antioxidante, o que leva este composto a interagir com o sistema GSH (WENDEL et al. 1984; WILHELM et al. 2014). No presente estudo, o EbSe foi capaz de prevenir a diminuição dos níveis de GSH em eritrócitos humanos induzidas pela DDS-NOH. A partir desse resultado, nós sugerimos que o EbSe atua diretamente ou utiliza outros compostos tiólicos como cofator para a atuar frente as ERO. Dessa forma, o EbSe não consome a GSH, mantendo a concentração desta substância ou até mesmo aumentando os níveis da GSH.

Nesse sentido, ressalta-se que o principal mecanismo protetor e a ação antioxidante do EbSe, está associado à sua habilidade mimética de GPx e GPx-PH (MULLER et al. 1984; MAIORINO et al. 1988, KADE et al. 2013). Sendo assim, o EbSe, assim com a GPx pode usar a GSH como substrato para iniciar o sua ação. Por outro lado, o EbSe pode não alterar a concentração de GSH, sugerindo que o seu mecanismo também pode ser independente de GSH (GABRYEL et al. 2006). Adicionalmente, tem sido sugerida uma interação mais eficiente do EbSe com o sistema de Tiorredoxinas (Zhao et al. 2002).

LUGOKENSKI et al. (2010) mostraram que o EbSe foi capaz de reduzir a concentração de grupos tiol, provavelmente devido a sua atividade como tiol-oxidase. Outros estudos também sugeriram que, ao contrário da enzima GPx, o ciclo redox de EbSe não é estritamente dependente de GSH e, como tal, EbSe pode alternativamente utilizar outras moléculas estruturalmente diversas contendo tiol tais como, a TrxR, δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) e a Na⁺/K⁺-ATPase como geralmente é observado *in vitro* (AITKEN et al. 2012; KADE et al. 2013). Desta forma, a partir dos nossos dados, pode-se sugerir que a ação antioxidante do EbSe pode estar associado a utilização de tíois livres disponíveis em enzimas sulfidrilas presente nos eritrócitos.

Em condições normais, a ação das ERO pode ser prevenida por enzimas defensivas endógenas presente nos eritrócitos, como SOD e CAT. Quando estes mecanismos defensivos se tornam fracos, as ERO geradas por fontes endógenas e exógenas podem escapar e danificar proteínas, lipídios e DNA, o que resulta na alteração do comportamento e desenvolvimento do dano oxidativo nos eritrócitos (PANDEY e RIZVI, 2010). Neste estudo, o EbSe não alterou a atividade das enzimas SOD e CAT, no entanto impediu a peroxidação lipídica, resultando numa redução dos níveis de MDA. Estes dados reforçam a hipótese que o EbSe atua, principalmente pela sua atividade mimética sobre a atividade da GPx-PH. Nesse sentido, assim como a GPx-PH, o EbSe pode catalisar a redução de hidroperóxidos inorgânicos, incluindo fosfolipídios ligados à membrana e hidroperóxidos de colesterol reduzindo-os a ROH para impedir a peroxidação lipídica (SAKURAI et al. 2006).

O Ebselen também pode exercer a sua capacidade antioxidante por outros mecanismos, como catalisar a redução de peróxidos e inibir a formação de espécies oxidantes. Desta forma, pode-se inferir que a ação protetora do EbSe contra danos causados pela DDS-NOH possivelmente está associada a sua propriedade antioxidante, dependente do seu efeito mimético sobre a atividade da GPx e GPX-PH e através da utilização de outros grupos tióis como substrato. Nosso estudo experimental é o primeiro estudo que mostra o efeito protetor do EbSe contra estresse oxidativo eritrocitário provocado pela DDS-NOH. De acordo com os dados apresentados neste estudo, pode-se propor que a aplicação clínica de EbSe possa ser uma nova abordagem terapêutica para casos de MetHba, além do tratamento convencional com o azul de metileno.

Outro composto antioxidante avaliado foi a NAC, que é uma substância lipofílica, que não necessita de transporte ativo para atravessar a membrana, com capacidade de aumentar às concentrações de GSH intracelular, fornecendo um dos seus precursores biossintéticos, a cisteína (LAUTERBURG et al. 1983; SEHIRLI et al. 2003). Vários estudos demonstram que a NAC foi capaz de aumentar os níveis de GSH e com isso promover a redução do dano oxidativo celular (ARAKAWA et al. 2007; DOBIS et al. 2008; PAWLAS e MALECKI, 2009; HAMZEH et al. 2016; JIAO et al. 2016; TAKHTFOOLADI et al. 2016). Outros estudos relataram que, através do aumento da capacidade antioxidante, a NAC impediu a oxidação da Hb e a consequente formação de MetHb (ARUOMA et al. 1989; TAKHTFOOLADI et al. 2013; CUZZOCREA et al. 2000). No presente estudo, verificou-se que a NAC foi capaz de reduzir os níveis MetHb, aumentar a concentração de GSH e aumentar capacidade antioxidante total dos eritrócitos.

O aumento da concentração da GSH ocasionado pelo NAC, possivelmente, foi o responsável por reverter à ação oxidativa da DDS-NOH sobre a Hb. Isto foi possível, devido o nitrosoareno, que é formado durante a oxidação da hemoglobina reagir com a GSH, formando o derivado sulfenamida ou outros produtos de GSH que não participam do ciclo redox da DDS-NOH, levando a diminuição da toxicidade. Estes derivados são facilmente hidrolisados e liberam a DDS-NOH, que se difunde para fora do eritrócito (MORAES et al. 2008).

Além disso, nossos resultados demonstraram que a NAC restabeleceu os níveis de SOD e reduziu a atividade da CAT. A SOD é responsável pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e a CAT, encarregada pela conversão de H_2O_2 em água e O_2 . Dessa forma estas enzimas atuam prevenindo a ação das ERO (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000). Estudos anteriores indicaram que a oxidação da Hb pode promover alteração da atividade da SOD em eritrócitos de mamíferos em resposta ao dano oxidativo (OZTURK et al. 2004; SULIMAN, H. B. et al. 2004). Desta forma, nós sugerimos que a NAC pode atuar diretamente, impedindo a formação do H_2O_2 e $^{\bullet}OH$, com isso a NAC reestabeleceu a atividade da SOD e inibiu a atividade da CAT. Além disso, *in vivo*, a NAC pode induzir a biossíntese de GSH, dessa forma a NAC pode exercer ação indireta sobre numerosos componentes oxidantes, como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $^{\bullet}OH$. Estes processos favorecem a eliminação de ERO e protegem os eritrócitos do dano oxidativo induzido pela DDS-NOH.

Além da catalase, a GPx também está envolvida no processo de eliminação das ERO (CERESER et al. 2001, KOH et al. 2000), principalmente o $^{\bullet}OH$ implicado no processo de peroxidação lipídica (AFAQ et al. 2000; VENDEMIALE et al. 2001). De acordo com resultados anteriores, a administração da NAC induziu a síntese de GSH, promoveu a redução do MDA. Dessa forma, a NAC foi capaz de impedir o desenvolvimento da peroxidação lipídica (GIANNIKOURIS, 2015). Nossos dados mostraram que a NAC protegeu as macromoléculas do dano oxidativo, prevenindo o aumento dos níveis de MDA induzidos por DDS-NOH. Como a GPx utiliza a GSH como cofator durante a sua ação antioxidante, é possível que a partir do aumento da concentração da GSH induzida pela NAC, a atividade da enzima seja potencializada, aumentando a sua capacidade de eliminação de ERO. Dessa forma, é possível que a NAC possa ser capaz de prevenir a peroxidação lipídica, mediada pela ação da GPx e em conjunto com a GSH. Diante disso, sugere-se que a NAC é um medicamento que pode ser útil para proteger contra a formação da MetHb e a peroxidação lipídica em pacientes que utilizam a DDS.

Outro composto estudado por nosso grupo é o ALA, que sinteticamente existe como uma mistura 1:1 de dois diferentes isômeros: o isômero R de ocorrência natural e o isômero sintético S (MADDUX et al. 2001). Estudos farmacocinéticos demonstraram que após a administração oral de ALA, o pico de concentração

plasmática do R-ALA foi 40-50% maior que o S-ALA, sugerindo que o R-ALA é melhor absorvido (GLEITER et al. 1996; HERMANN et al. 1996; BREITHAUPT-GROGLER et al. 1999). O R-ALA pode ser reduzido a ácido dihidrolipoico, um potente redutor tiol com atividade antioxidante, capaz de aumentar esta atividade mitocondrial e celular, através redução da cistina a cisteína, e dessa forma, aumenta a biossíntese da GSH (PACKER et al. 2001; SUH et al. 2001). O S-ALA é reduzido mais lentamente e de uma maneira inespecífica por meio de um processo metabólico envolvendo o ciclo catalítico da GSH (HAGEN et al. 2000).

Estudos anteriores demonstraram que o pré-tratamento de células hepáticas, com os enantiômeros R e S protegeram contra a citotoxicidade (PACKER et al. 2001) e impediram a peroxidação lipídica induzida por cobre (OU et al. 1995), através do aumento da concentração de antioxidantes endógenos, como GSH e o ácido ascórbico. No presente estudo, nossos dados mostraram que o pré-tratamento com as formas R e S preveniram também a formação de MetHb, e aumentaram os níveis de GSH. Além disso, o R-ALA ou S-ALA reduziram a peroxidação lipídica e restauraram a atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT para parâmetros normais. Desta forma, a partir dos resultados nós sugerimos que estes efeitos podem estar relacionados à capacidade dos isômeros em preservar o equilíbrio redox intracelular, atuando diretamente, através da reação do grupo tiol com radicais oxidantes e/ou através do aumento da concentração do antioxidante endógeno, GSH, que pode atuar sinergicamente com a GPx, reduzindo peróxidos orgânicos potencializando a capacidade antioxidante do eritrócito (KHALID, 2007).

Nesse sentido, estudos relataram que o pré-tratamento, com R-ALA e S-ALA preveniram a depleção de GSH (HAGEM et al. 2000; SUH et al. 2001), assim como o R-ALA preveniu a disfunção mitocondrial (BHARAT et al. 2002), assim revertendo o estresse oxidativo (LIU et al. 2002). Estudos em células de adipócitos 3T3-L1 e musculares L6 mostraram redução na captação de glicose estimulada por insulina quando expostas ao estresse oxidativo, o que foi prevenido pelo pré-tratamento com os agentes antioxidantes R-ALA e S-ALA (RUDICH et al. 1999; MADDUX et al. 2001). Com isso, os autores sugeriram a manutenção dos níveis de GSH pelos isômeros do ALA, que pode ser o seu principal mecanismo antioxidante (HAN et al. 1997; RUDICH et al. 1999; MADDUX et al. 2001).

No estudo realizado por Estrada et al. (1996), os dois isômeros foram capazes de estimular o transporte da glicose *in vitro*, no entanto o R-ALA foi mais potente que o S-ALA (ESTRADA et al. 1996). Streeper et al. (1997) demonstraram que a suplementação com R-ALA e S-ALA melhoraram tanto o metabolismo oxidativo quanto o não-oxidativo da glicose em ratos obesos resistentes a insulina (STREEPER et al. 1997). Esses dados mostraram que tanto o R-ALA quanto o S-ALA fornecem proteção contra o estresse oxidativo (LYKKESFELDT et al. 1998; KHANNA et al. 1999; MADDUX et al. 2001).

Em resumo, como o fator limitante na síntese de GSH é a biodisponibilidade da cisteína intracelular, tanto o ALA quanto o NAC, podem gerar cisteína intracelular a partir de cistina extracelular e assim manter a concentração de GSH em níveis basais e até mesmo aumentar a concentração desse antioxidante (HAN et al. 1997; MADDUX et al. 2001). Estudos relataram que em eritrócitos humanos, células 3T3-L1 e outros, o pré-tratamento com ALA mantém a concentração celular de GSH em resposta ao estresse oxidativo (HAN et al. 1997; RUDICH et al. 1999). Neste estudo, a partir dos resultados nós sugerimos que os isômeros R e S podem atuar favorecendo a manutenção ou até mesmo aumentando a concentração da GSH, proporcionando maior proteção para o eritrócito contra o dano oxidativo provocado pela DDS-NOH.

7 CONCLUSÃO

Desta forma, conclui-se com este estudo que:

O metabólito dapsona-hidroxilamina induz a formação de metemoglocina e a peroxidação lipídica, assim como diminui os níveis de glutathione e estimula a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em eritrócitos humanos *in vitro*.

O pré-tratamento com os antioxidantes Ebselen, N-acetilcisteína, ácido R-lipóico e ácido S-lipóico preveniu a formação de metemoglobina, a redução da glutathione e a peroxidação lipídica induzida pelo metabólito dapsona-hidroxilamina em eritrócitos humanos *in vitro*. Além disso, o Ebselen e o ácido R-lipóico mantiveram em níveis basais as atividades das enzimas SOD e CAT de eritrócitos, enquanto a N-acetilcisteína e o ácido S-lipóico reduziram a atividade dessas enzimas neste modelo *in vitro*.

Estes dados mostram que os compostos antioxidantes avaliados apresentam potenciais terapêuticos na prevenção de MetHba observados em pacientes com hanseníase em uso da dapsona. Desta forma, este estudo contribui com possíveis alternativas de tratamento para prevenção dos efeitos hematotóxicos ocasionados por fármacos oxidativos, como a DDS.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.
- AFAQ, F. ABIDI, P. e RAHMAN, Q. N-acetyl L-cysteine attenuates oxidant-mediated toxicity induced by chrysotile fibers. **Toxicol Lett.**, v. 117, p. 53-60, 2000.
- AITKEN, J. B. et al. Synchrotron radiation induced X-ray emission studies of the antioxidant mechanism of the organoselenium drug ebselen. **J Biol Inorg Chem.**, v. 17, p. 589-598, 2012.
- ALBUQUERQUE, R. V. et al. In Vitro Protective Effect and Antioxidant Mechanism of Resveratrol Induced by Dapsone Hydroxylamine in Human Cells. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1-24, 2015.
- ALGREN, A. Review of n-acetylcysteine for the treatment of acetaminophen (paracetamol) toxicity in pediatrics. **Geneva**, 2008.
- AMAYA-FARFAN, J. et al. Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Rev. Nutr**, v. 14, n. 1, p. 71-78, 2001.
- AMUKOYE, E. et al. Chlorproguanil-Dapsone: Effective Treatment for Uncomplicated Falciparum Malaria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2261-2264, 1997.
- ARAKAWA, M. et al. N-Acetylcysteine and ebselen but not nifedipine protected cerebellar granule neurons against 4-hydroxynonenal-induced neuronal death. **Neuroscience Research**, v. 57, p. 220-229, 2007.
- ARUOMA, O. I. et al. The antioxidante action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 6, n. 6, p. 593-597, 1989.
- ASH-BERNAL, R. et al. Acquired methemoglobinemia: a retrospective series of 138 cases at 2 teaching hospitals. **Medicine**, v. 83, n. 5, p. 265-73, 2004.
- ASLAN, M. et al. Reactive species in sickle cell disease. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 899, p.375-391, 2000.
- ATKURI, K. R. et al. N-acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, p. 355-359, 2007.
- AUFFRAY, I. et al. Glycophorin A dimerization and band 3 interaction during erythroid membrane biogenesis: in vivo studies in human glycophorin A transgenic mice. **Blood**. v. 97, p. 2872-8, 2001.

- AZAD, G. e TOMAR, R. Ebselen, a promising antioxidant drug: Mechanisms of action and targets of biological pathways. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 8, p. 4865-4879, 2014.
- BAGGIO, B. et al. Evidence of a link between band 3 phosphorylation and anion transport in patients with 'idiopathic' calcium oxalate nephrolithiasis. **Miner. Electrolyte Metab**, v. 19, p.17-20, 1993.
- BAGGIO, B. et al. Functional correlation between the Ser/Thr-phosphorylation of band 3 and band 3-mediated transmembrane anion transport in human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1148, p.157–160, 1993.
- BARREIROS, A. L. B. S. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Quimica nova**, v. 29, n. 1, p. 113-126, 2006.
- BEUTLER, E. Red Metabolism: a Manual of Biochemical methods., 3^o edition. **Orlando: Grune & Stratton**, 1984.
- BHARAT, S. et al. Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. **Neurotoxicology**, v. 23, n. 4-5, p. 479-486, 2002.
- BJORNSTEDT, M. et al. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. **J Biol Chem**, v. 269, p. 29382-29384, 1994.
- BOLCHOZ, L. J. C. et al. Primaquine-Induced Hemolytic Anemia: Formation and Hemotoxicity of the Arylhydroxylamine Metabolite 6-Methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 297, p. 509-515, 2001.
- BOOTH, S. A. et al. Dapsone suppresses integrin-mediated neutrophil adherence function. **Journal of investigative dermatology**, v. 98, n. 2, p. 135-140, 1992.
- BORAN, P. et al. Methemoglobinemia due to application of prilocaine during circumcision and the effect of ascorbic acid. **J. Pediatr. Urol.**, v.4, p. 475-476, 2008.
- BORDIN, L et al. Dapsone hydroxylamine induces premature removal of human erythrocytes by membrane reorganization and antibody binding. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, p.1186–1199, 2010.
- BORDIN, L. et al. Functional link between phosphorylation state of membrane proteins and morphological changes of human erythrocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 213, p. 249-257, 1995.
- BORDIN, L. et al. Regulation of membrane band 3 Tyr-Pby proteolysis of p72syk and possible involvement in senescence process. **Acta. Biochim. Biophys.** v. 41, p. 846–851, 2009.

BRADSHAW, T. P. et al. Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsone hydroxylamine. **Free Radic Biol Med.**, v. 22, p.1183–1193, 1997.

BRAMANTI, V. et al. α -Lipoic acid modulates GFAP, vimentin, nestin, cyclin D1 and MAP-kinase expression in astroglial cell cultures. **Neurochem. Res.**, v. 35, p. 2070-2077, 2010.

BRASIL, **Portaria Nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância Atenção e Controle da hanseníase.** Brasília: Ministério da Saúde., 2010

BRATOSIN, D. et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. **A review. Biochimie**, v. 80, p. 173-195, 1998.

BREITHAUPT-GROGLER, K. et al. Dose-proportionality of oral thioctic acid-coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. **Eur J Pharm Sci.** v. 8, n. 1, p. 57-65, 1999.

BRIVIBA, K. et al. Attenuation of oxidation and nitration reactions of peroxynitrite by selenomethionine, selenocystine and ebselen. **Biochem. J.** v. 319, p. 13-15, 1996.

BURGER, M. et al. Ebselen attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 3, p. 608-615, 2005.

BUSTAMANTE, J. et al. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. **Free Radic Biol Med.** v. 24, n. 6, p. 1023-1039,1998.

BUTTLE, G. A. H., et al. The treatment of streptococcal infections in mice with 4,4' diaminodiphenylsulphone. **The Lancet**, v. 232, n. 5936, p. 1331-1334, 1937.

CAMBAU, E. et al. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. **Lancet**, v. 349, p.103-104, 1997.

CARLSON, D. A. et al. The Plasma Pharmacokinetics of R-(+)-Lipoic Acid Administered as Sodium R-(+)-Lipoate to Healthy Human Subjects. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 4, p. 343-351, 2007.

CARVALHO, C. et al. Methemoglobinemia: case report and review. **Arquivos de Medicina**, v. 25, n. 3, p. 100-106, 2011.

CERESER, C. et al. Thiraminduced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. **Toxicology**, v. 163, p. 153-162, 2001.

CHUI, J. S. W. et al. Nitrite-induced methaemoglobinaemia-aetiology, diagnosis and treatment. **Anaesthesia**, v. 60, p. 496-500, 2005.

CICCOLI, L. et al. Hemolytic drugs aniline and dapsone induce iron release in erythrocytes and increase the free iron pool in spleen and liver. **Toxicology Letters**, v. 29, p. 57-66, 1999.

CIESLA, B. Hematology in practice. **Davis Company**, 2007.

ÇIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, p. 1-11, 2008.

COLEMAN, M. D e WALKER, C. L. Effects of oxidized alipoic acid and α -tocopherol on xenobiotic-mediated methaemoglobin formation in diabetic and non-diabetic human erythrocytes in vitro. **Environ. Toxicol and Pharmaco.**, v. 8, p. 127-132, 2000.

COLEMAN, M. D. e JACOBUS, D. P. Reduction of dapsone hydroxylamine to dapsone during methaemoglobin formation in human erythrocytes in vitro. **Biochem. Pharmac.** v. 45, p. 1027-1033, 1993.

COLEMAN, M. D. Dapsone toxicity: some current perspectives. **Gen. Pharmacol.** v. 26, n. 7, p. 1461-7, 1995.

COLEMAN, M. D. Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. **Br. J. Dermatol.**, v. 129, p. 507-13, 1993.

COLEMAN, M. D. e TAYLOR, C. T. Effects of dihydrolipoic acid (DHLA), α -lipoic acid. N-acetyl cysteine and ascorbate on xenobiotic-mediated methaemoglobin formation in human erythrocytes in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 14, p. 121-127, 2003.

COLEMAN, M. D. e TINGLE, M. D. Use of a metabolic inhibitor to reduce dapsone dependent haematological toxicity. **Drug Dev. Res.**, v. 25, p.1-16, 1992.

COLEMAN, M. D. et al. Studies on the differential sensitivity between diabetic and non-diabetic human erythrocytes to monoacetyl dapsone hydroxylamine-mediated methaemoglobin formation in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 1 p. 97-102, 1996.

COLEMAN, M; SIMPSON, J. e JACOBUS, D. P. Reduction of dapsone hydroxylamine to dapsone during methaemoglobin formation in Human erythrocytes in vitro IV: implications for the development of agranulocytosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 45, n. 5, p. 1027-1033, 1994.

COOPER, G. M. The cell surface In: The cel: A molecular approach. **Washington: ASM Press**, p.467–517, 1997.

COTGREAVE, I. A. et al. Characterisation and quantitation of a selenol intermediate in the reaction of ebselen with thiols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 84, n. 1, p. 69-76, 1992.

COTGREAVE, I. A. et al. N-Acetylcysteine-and glutathione-dependent protective effect of PZ 51 (ebselen) against diquat-induced cytotoxicity in isolated hepatocytes. **Biochem. Pharmacol**, v. 36, p. 2899-2904, 1987.

COTGREAVE, I. A. et al. Studies on the anti-inflammatory activity of ebselen: Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C?. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 4, p. 649-656, 1989.

COTINGUIBA, G. G. et al. Methods of the Antioxidant Defense: A Literature Review. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-237, 2013.

CUZZOCREA, S. et al. Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. **Cardiovasc Res**. v. 47, n. 3, p. 537-48, 2000.

DACIE, J. e LEWIS, S. M. Practical haematology. 8. Ed. **Edinburgh: Churchill Livingstone**, p. 453, 1995.

DAIBER, A. et al. Ebselen as a Peroxynitrite Scavenger In Vitro and Ex Vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 153-160, 2000.

DAVIDSON, W. D. e TANAKA, K. R. Factors affecting pentose phosphate pathway activity in human red cells. **British Journal of Haematology**, v. 23, p. 371-380, 1972.

DAWSON, D. A. et al. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 85, n. 1, p. 65-69, 1995.

DE FLORA, S. et al. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 999-1013, 2001.

DEKHUIJZEN, P.N.R. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J.**, 23: 629–636, 2004.

DHOPLE, A. M. Antimicrobial activities of dihydrofolate reductase inhibitors, used singly or in combination with dapsone, against *Mycobacterium ulcerans*. **Journal of antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 93-96, 1999.

DHOPLE, A. M. *In vitro* activity of epiroprim, a dihydrofolate reductase inhibitor, singly and in combination with brodimoprim and dapsone, against *Mycobacterium leprae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 4, p. 319-323, 1999.

DIMARI, J. et al. N-acetyl cysteine ameliorates ischemic renal failure. **Am J Physiol**. v. 272, n. 3/2, p. 292-8, 1997.

DIÓRIO, S. M. et al. Resistance to dapsone and rifampin in *Mycobacterium leprae* isolated from leprosy patients of São Paulo State. **Hansenologia Internationalis**, v. 30, n. 1, p. 09-14, 2005.

DIZDAROGLU, M. et al. Damage to the DNA Bases in Mammalian Chromatin by Hydrogen Peroxide in the Presence of Ferric and Cupric Ions. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 285, n. 2, p. 317, 1991.

DOBIS, D. R. et al., Modulation of lymphocyte proliferation by antioxidants in chronic beryllium disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v. 177, p. 1002-1011, 2008.

DONÀ, G. et al. Hemolysis and Anemia Induced by Dapsone Hydroxylamine. **Anemia**, p. 425-440, 2012.

EL-HUSSEINI, A. e AZAROV, N. Is threshold for treatment of methemoglobinemia the same for all? A case report and literature review. **Am. J. Emerg. Med.**, v.28, p.748e5–748e10, 2010.

ELLARD, G. A. Absorption, metabolism and excretion of di(rhoaminophenyl) sulphone (dapsone) and di(rhoaminophenyl) sulphoxide in man. **British Journal of Pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 212-217, 1966.

ELLARD, G.; GAMMON, P. e REES, R. Dapsone acetylation and the treatment of leprosy. **Nature**, v. 239, p. 159–60, 1972.

ELLENHORN, M. J. DAPSONE. IN: ELLENHORN, M. J.; SCHONWALD, S.; ORDOG, G.; WASSERBERGER, J. eds. Ellenhorn's Medical Toxicology. **Diagnosis and treatment of human poisoning. 2^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.244-5, 1997.**

Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 82, p. 70-77, 1959.

ESTERBAUER, H. SCHAUR, R. J. e ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

ESTRADA, D. E. et al. Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme α -lipoic acid/thioctic acid: participation of elements of the insulin signaling pathway. **Diabetes**, v. 45, p. 1798-1804, 1996.

EVANS, J. L. e GOLDFINE, I. D. α -Lipoic acid: A multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Technol. Ther.** v. 2, p. 401-413, 2000.

EVELO, C. et al. Two Mechanisms for Toxic Effects of Hydroxylamines in Human Erythrocytes: Involvement of Free Radicals and Risk of Potentiation. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 24, n. 13, p. 280-295, 1998.

FANG, J. Ebselen: A thioredoxin reductase-dependent catalyst for a-tocopherol quinone reduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, n. 2 SUPPL, S103-S109, 2005.

FARINA, A. et al. Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. **Toxicology Letters**, v. 146, p. 227-235, 2004.

FARINA, M. et al. Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. **Toxicology Letters**, v. 144, n. 3, p. 351-357, 2003.

FERREIRA, A. L. A. e MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu**, Botucatu, SP. 1997

FOURNEAU, E. et al. Action anti-streptococcique des derives sulfures organiques. *CR Acad Sci*, v. 204, n. 7, p. 1763-1766, 1937.

FROMM, E. e WITTMANN, J. Derivate des p-Nitrothiophenols. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 41, n. 2, p. 2264-2273, 1908.

GABRYEL, B. e MALECKI, A. Ebselen attenuates oxidative stress in ischemic astrocytes depleted of glutathione. Comparison with glutathione precursors. **Pharmacological Reports**, v. 58, p. 381-392, 2006.

GALIZA NETO, G. C. e PITOMBEIRA, M. S. Aspectos Moleculares da Anemia Falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2002.

GALLAGER, P. G. et al. Disorders of Erythrocyte Membrane. In: Nathan DG, Oski FA, Orkin SH. **Hematology of Infancy and Childhood**. 5 ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 544-664, 1998.

GIANNIKOURIS, I. The effect of N-acetylcysteine on oxidative serum biomarkers of hemodialysis Patients. **Hippokratia**, v. 19, n. 2, p. 131-135, 2015.

GIBSON, Q. Introduction: congenital methemoglobinemia revisited. **Blood**, v. 100, n. 10, p. 3445-6, 2002.

GILL, H. J.; TINGLE, M. D. e PARK, B.K. N-Hydroxylation of dapsone by multiple enzymes of cytochrome P450: implications for inhibition of haemotoxicity. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.40, n.6, p.531-8, 1995.

GLADER, B. E. e CONRAD, M. E. Hemolysis by diphenylsulfones: Comparative effects of DDS and hydroxylamine-DDS. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 81, p. 267-272, 1973.

GLEITER, C. H. et al. Influence of food intake on the bioavailability of thioctic acid enantiomers. **Eur J Clin Pharmacol**. v. 50, n. 6, p. 513-514, 1996.

GONZALES, R. et al. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. **Cancer Res.**, v. 44, p. 4137-4139, 1984.

GOULART, I. M. et al. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 453-460, 2002.

GRASSO, S. et al. Effect of lipoic acid and α -glyceryl-phosphoryl-choline on astroglial cell proliferation and differentiation in primary culture. **J. Neurosci. Res.** v. 92, p. 86-94, 2014.

GREER, F. R. e SHANNON, M. Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water. **Pediatrics**, v. 116, p. 784-786, 2005.

GREER, J. P. et al. Wintrobe's Clinical Hematology., 11.ed. **Lippincott Williams & Wilkins Publishers**, 2003.

GREGG, X. T. e PRCHAL, J. T. Red blood Cell Enzymopathies. In: Hoffman R, benz E. Hematology: basic principles and practice, 4T ed. philadelphia. **Churchill livingstone**, p. 611-23, 2005.

GRUNWAL, M. H. e AMICHAJ, B. Dapsone - the treatment of infectious and inflammatory diseases in dermatology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 7, n. 3, p. 187- 192, 1996.

GUTTERIDGE, J e HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p. 136-147, 2000.

HAENEN, G. R. M. et al. Mechanism of the Reaction of Ebselen with Endogenous Thiols: Dihydrolipoate Is a Better Cofactor than Glutathione in the Peroxidase Activity of Ebselen. **Molecular Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 412-422, 1990.

HAGEN, T. M. et al. (R)- α -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. **FASEB J.** v. 13, p. 411-418, 1999.

HAGEN, T. M. et al. (R)- α -lipoic acid reverses the age-associated increase in susceptibility of hepatocytes to tert-butylhydroperoxide both in vitro and in vivo. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 2, n. 3, p. 473-483, 2000.

HAGER, K. et al. Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer type dementia. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 32, p. 275-282, 2001.

HALIM, N. K. e OGBEIDE, E. Haematological alterations in leprosy patients treated with dapsone. **East African Medical Journal**, v. 7, n. 2, p. 100-102, 2002.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. Free Radicals in Biology and Medicine. 3ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Oxford, UK, 3rd edition, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr Rev**, v. 70, p. 257-65, 2012.

HAMZEH, N. et al. The effect of an oral anti-oxidant, N-Acetyl-cysteine, on inflammatory and oxidative markers in pulmonary sarcoidosis. **Respiratory Medicine**, v. 112, p. 106-111, 2016.

HAN D. et al. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. **Biofactors**, v. 6, p. 321-338, 1997.

HARAMAKI, N. et al. Cytosolic and mitochondrial systems for NADH- and NADPH-dependent reduction of alpha-lipoic acid. **Free Radical Biol. Med.** v. 22, p. 535-542, 1997.

HARDEJ, D e TROMBETTA, L. D. The effects of ebselen on cisplatin and diethyldithiocarbamate (DDC) cytotoxicity in rat hippocampal astrocytes. **Toxicology Letters**, v. 131, n. 3, p. 215–226, 2002.

HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry**. London: Plenum Press, 1991.

HARRISON, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, n. 6, p. 774, 2002.

HARVEY, J. W. e KEITT, A. S. Studies of the efficacy and potential hazards of methylene blue therapy in aniline-induced methaemoglobinaemia. **Br J Haematol**, v. 54, p. 29-41, 1983.

HATHERILL, J. R. et al. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents Actions**, v. 32, p. 351-358, 1991.

HATTORI, R. et al. Effect of Ebselen on Bovine and Rat Nitric Oxide Synthase Activity Is Modified by Thiols. **Jpn. J. Pharmacol**, v. 72, p. 191-193, 1996.

HAYMOND, S. et al. Laboratory assessment of oxygenation in methemoglobinemia. **Clin Chem**, v. 51, p. 434-444, 2005.

HEBBEL, R. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, n. 5, p. 401-404, 1986.

HERBETTE, S. et al. Selenium-independent glutathione peroxidases More than simple antioxidant scavengers. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 2163-2180, 2007.

HERIN, G. A.; DU, S. e AIZENMAN, E. The neuroprotective agent ebselen modifes NMDA receptorfunction via the redox modulatory site. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, p. 1307-1314, 2001.

HERMANN, R. et al. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic α -lipoic acid formulations in healthy volunteers. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 4, p. 167-174, 1996.

HERMANN, R. et al. Enantiomer-selective pharmacokinetics, oral bioavailability, and sex effects of various α -lipoic acid dosage forms. **Clin. Pharmacol.**, v. 6, p. 195-204, 2014.

HILLMAN, R. S. F. **Manual da Série Vermelha**. São Paulo: Editora Santos, 2001.

HJELM, M. e DEVERDIER, C. H. Biological effects of aromatic amines. I. Methemoglobinemia, hemolysis and Heinz-body formation induced by 4,4'-diaminodiphenylsulfone. **Biochem. Pharmacol.**, v. 14, p. 1119-1128, 1965.

HOLDINESS, M. R. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. **Clin Pharmacokinet.** v. 20, n. 2, p. 123-134, 1991.

IBRAHIM, I. H. et al. Oxidative hemolysis of erythrocytes induced by various vitamins. **Int J Biomed Sci.**, v. 2, p. 295-298, 2006.

ICHIKAWA, S. et al. Inhibition of superoxide anion production in guinea pig polymorphonuclear leukocytes by a selenoorganic compound, ebselen. **J Pharmacobio-Dyn**, v. 10, p. 595-59, 1987.

IMAI, H. et al. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 1, p. 56-63, 2003.

IMAI, H. et al. Ebselen protects both gray model of focal and white matter in a rodent cerebral ischemia. **Stroke**, v. 32, n. 9, p. 2149-2156, 2001.

IRANI, K. et al. Mitogenic Signaling Mediated by Oxidants in Ras-Transformed Fibroblasts. **Science**, v. 275, p. 1649, 1997.

ISRAILI, Z. H. et al. Studies of the metabolism of DDS in man and experimental animals. Formation of N-hydroxy metabolites. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 187, p. 138-151, 1973.

IYER, M. K. et al. Attenuation of oxidative hemolysis of human red blood cells by the natural phenolic compound, allylpyrocatechol. **Free Radical Research**, v. 47, n. 9, p. 710-717, 2013.

JACKA, M. J. et al. Methemoglobinemia after transesophageal echocardiography: a life-threatening complication. **J Clin Anesth**, v. 18, p. 52-54, 2006.

JACOBS, J. M. et al. Utilizando plasma de sangue humano para a descoberta de biomarcadores de proteômica. **Jornal da pesquisa proteoma**, v. 4, n. 4, p. 1073-1085, 2005.

JADHAV, S. H. et al. Induction of oxidative stress in erythrocytes of male rats subchronically exposed to a mixture of eight metals found as groundwater contaminants in different parts of India. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 52, n. 1, p. 145-151, 2007.

JIAO, Y. et al. N-Acetyl Cysteine Depletes Reactive Oxygen Species and Prevents Dental Monomer-Induced Intrinsic Mitochondrial Apoptosis In Vitro in Human Dental Pulp Cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2016.

JOHNSON, R. M. et al. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 1407-1417, 2005.

KADE, I. J. et al. In vitro glutathione peroxidase mimicry of ebselen is linked to its oxidation of critical thiols on key cerebral suphydryl proteins – A novel component of its GPx-mimic antioxidant mechanism emerging from its thiol-modulated toxicology and pharmacology. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, p. 27-36, 2013.

KARACAY, B. e CHANG, L. S. Induction of erythrocyte protein 4.2 gene expression during differentiation of murine erythroleukemia cells. **Genomics**, v. 59, p. 6-17, 1999.

KERN, K. e LANGEVIN, P. B. Methemoglobinemia After Topical Anesthesia With Lidocaine and Benzocaine for a Difficult Intubation. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 12, p. 167-172, 2000.

KHALID, R. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

KHANNA, S. et al. Cytokine-induced glucose uptake in skeletal muscle: redox regulation and the role of alpha-lipoic acid. **Am J Physiol**. v. 276, n. 5, p. 1327-33, 1999.

KIM, Y-J et al. Difference of the clinical course and outcome between dapsone-induced methemoglobinemia and other toxic-agent-induced methemoglobinemia. **Clin. Toxicol**, v. 54, n. 7, p. 581-584, 2016.

KOH, Y. H. et al. Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE. **Free Radic Res.**, v. 33, p. 739-746, 2000.

KONO, H. et al. Ebselen prevents early alcohol-induced liver injury in rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 4, p. 403-411, 2001.

KONRAD, D. et al. The Antihyperglycemic Drug α -Lipoic Acid Stimulates Glucose Uptake via Both GLUT4 Translocation and GLUT4 Activation Potential Role of p38

Mitogen-Activated Protein Kinase in GLUT4 Activation. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1464-1471, 2001.

KROLOW, R. et al. Oxidative Imbalance and Anxiety Disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 12, p. 193-204, 2014.

KUHL, P. et al. Ebselen reduces the formation of ltb₄ in human and porcine Leukocytes by isomerisation to its 5S,12R-6-trans-isomer. **Prostaglandins**, v. 31, n. 6, p. 1029-1048, 1986.

LANDERS, D. et al. Dapsone induced methaemoglobinaemia. **Int. J. STD AIDS**, v. 7, n. 6, p. 445-447, 1996.

LANG, P. G. Sulfones and sulfonamides in dermatology today. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 1, n. 6, p. 479-492, 1979.

LAPCHAK, P. A. e ZIVIN, J. A. Ebselen, a Seleno-Organic Antioxidant, Is Neuroprotective After Embolic Strokes in Rabbits. **Stroke**, v. 34, n. 8, p. 2013-2018, 2003.

LAUTERBURG, B. H. et al. Mechanism of Action of N-Acetylcysteine in the Protection Against the Hepatotoxicity of Acetaminophen in Rats In Vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 71, n. 4, p. 980-991, 1983.

LESLIE, K. S. et al. A near fatal case of the dapsone hypersensitivity syndrome in a patient with urticarial vasculitis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 28, n. 5, p. 496, 2003.

LIMA, E. S. e ABDALLA, D. S. P. Lipid Peroxidation: Mechanisms and evaluation in biological samples. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LIU, J. et al. Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R-alpha-lipoic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, n. 4, p. 2356-61, 2002.

LODISH, H. Molecular Cell Biology., W.H. Freeman and Company. 5.ed. 2004.

LORENZI, T. F. Fisiologia das células do sangue e hemostasia. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**, 3ª Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p.45-192, 2003.

LOW, P. S. et al. Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein band 3. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p.14627-14631, 1993.

LUGOKENSKI, T. H. et al. Inhibitory effect of ebselen on lactate dehydrogenase activity from mammals: a comparative study with diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 66-76, 2010.

LYKKESFELDT, J. et al. Age-associated decline in ascorbic acid concentration, recycling, and biosynthesis in rat hepatocytes reversal with (R)-alpha-lipoic acid supplementation. **FASEB J**, v. 12, n. 12, p. 1183-9, 1998.

MADDUX, B. A. et al. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. **Diabetes**, v. 50, p. 404-410, 2001.

MAGALHÃES, A. S. M. **Estudo do efeito protetor da espécie *Cydonia oblonga* Miller, na danificação oxidativa em eritrócitos humanos**. Porto, 2009. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde-Universidade Fernando Pessoa.

MAIORINO, M. et al. Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51). **Biochemical Pharmacology**, v. 31, n. 11, p. 2267-2271, 1988.

MAITRA, I. et al. Alpha-lipoic acid prevents buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. **Free Radical Biol. Med.** v. 18, p. 823-829, 1995.

MANSOURI, A. e LURIE, A. Concise review: methemoglobinemia. **American Journal of Hematology**, v. 42, p. 7-12, 1993.

MARMOLINO, D. e MANTO, M. Past, present and future therapeutics for cerebellar ataxias. **Current neuropharmacology**, v. 8, n. 1, p. 41-61, 2010.

MASUMOTO, H. et al. Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxy nitrite. **FEBS letters**, v. 398, n. 2/3, p. 179-182, 1996.

MATSUGO, S. et al. Re-evaluation of superoxide scavenging activity of dihydrolipoic acid and its analogues by chemiluminescent method using 2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo-[1,2-a]pyrazine-3-one (MCLA) as a superoxide probe. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 227, p. 216-220, 1996.

MAULIK, N. et al. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 5, p. 869-875, 1998.

McMILLAN, D. C. et al. Dapsone-induced hemolytic anemia: effect of dapsone hydroxylamine on sulfhydryl status, membrane skeletal proteins and morphology of human and rat erythrocytes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 274, p. 540-547, 1995.

McMILLAN, D. C. et al. Lipid versus proteins as major targets of pro-oxidant, direct-acting hemolytic agents. **Toxicol Sci**, v. 88, p. 274-283, 2005.

MELLO, M. H. N-acetilcisteína e dapsona: avaliação da toxicidade hematológica e bioquímica em ratos Wistar. **Dissertação (Mestrado) - programa de Pós Graduação em Toxicologia**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005

MELLO-FILHO, A. C. e MENEHINI, R. In vivo formation of single-strand breaks in dna by hydrogen peroxide is mediated by the haber-weiss reaction. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 781, n. 1/2, p. 56, 1984.

MIORELLI, S. T. et al. Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. **Mutagenesis**, v. 23 n. 2 p. 93-99, 2008.

MISRA, H. P. e FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. **J Biol Chem**, v. 247, n. 21, p. 6960-2, 1972.

MISRA, S. et al. Redox-Active Selenium Compounds-From Toxicity and Cell Death to Cancer Treatment. **Nutrients**, v. 7, n. 5, p. 3536-3556, 2015.

MITRA, A. K. et al. Metabolism of dapsone to its hydroxylamine by CYP2E1 *in vitro* and *in vivo*. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 5, 1995.

MOHANTY, J. G. et al. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1-6, 2014.

MOINI, H. et al. Antioxidant and Prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, p. 84-90, 2002.

MOINI, H. et al. R-a-Lipoic Acid Action on Cell Redox Status, the Insulin Receptor, and Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 384-391, 2002

MORAES, N. V. et al. Potencialização do efeito metemoglobinizante da dapsona em ratos pela N-acetilcisteína. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 1, p. 97-104, 2008.

MORETTO, M. B. et al. Ebselen Protects Ca^{2+} Influx Blockage But Does Not Protect Glutamate Uptake Inhibition Caused By Hg^{2+} . **Neurochemical Research**, v. 29, n. 10, p. 1801-1806, 2004.

MORETTO, M. et al. Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg^{2+} . **Toxicology**, v. 214, n. 1/2. p. 57-66, 2005.

MORIKAWA, T. et al. Do mammalian cells synthesize lipoic acid?: Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria. **FEBS Lett**, v. 498, p. 16-21, 2001.

MORIN, D. et al. Dual effect of ebselen on mitochondrial permeability transition. **Biochem Pharmacol**, v. 65, n. 10, p. 1643-1651, 2003.

MOUSSAOUI, S. et al. The Antioxidant Ebselen Prevents Neurotoxicity and Clinical Symptoms in a Primate Model of Parkinson's Disease. **Experimental Neurology**, v. 166, n. 2, p. 235-245, 2000.

MULLER, A. et al. A novel biologically active seleno-organic compound-I: Glutathione peroxidase-like activity in vitro and Antioxidant capacity of pz 51 (ebselen). **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 20, pp. 3235-3239, 1984.

MULLER, A. et al. A novel biologically active selenoorganic compound-IV: Protective glutathione-dependent effect of pz 51 (ebselen) against ADP-Fe induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, n. 8, p. 1185-1189, 1985.

MURADOR, P. e DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hematologia**, v.29, n.2, p.168-178, 2007.

MURAKAMI, Kaori; MAWATARI, Shiro. Oxidation of hemoglobin to methemoglobin in intact erythrocyte by a hydroperoxide induces formation of glutathionyl hemoglobin and binding of α -hemoglobin to membrane. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 417, n. 2, p. 244-250, 2003.

MURRAY, R. K. et al. Bioquímica. 7.ed. **São Paulo: Atheneu**, 2006.

MUSCH, M. W. et al. Volume expansion stimulates p72syk and p56lyn in skate erythrocytes. **J. Biol. Chem.** v. 274, p.7923–7928, 1999.

NAGABABU, E. et al. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1620, p. 211-217, 2003.

NAKAMURA, Y. et al. Ebselen, a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant. Implication for inflammation-associated carcinogenesis. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 4, p. 2687-2694, 2002.

NAMURA, S. et al. Ebselen Reduces Cytochrome c Release From Mitochondria and Subsequent DNA Fragmentation After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. **Stroke**, v. 32, p. 1906-1911, 2001.

NASCIMENTO, T. S. et al. Methemoglobinemia: from Diagnosis to Treatment. **Rev. Bras. Anestesiol**, v. 58, n. 6, p. 651-664, 2008.

NOGUCHI, N. et al. Action of ebselen as an antioxidant against lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 3944, 1992.

NOHL, H. E STOLZE, K. The effects of xenobiotics on erythrocytes. **General Pharmacology**, v. 31, p. 343-347, 1998.

NUTTALL, S. L. et al. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease. **Quart. J. Med.** v. 92, p. 239-244, 1999.

OLIVEIRA, F. R. et al. Clinical Applications and Methemoglobinemia Induced by Dapsone. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, n. 10, p. 1770-1779, 2014.

OU, P. et al. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant?. **Biochem Pharmacol**, v. 50, p. 123-126, 1995.

ÖZTÜRK, O. et al. Age-related changes of antioxidant enzyme activities, glutathione status and lipid peroxidation in rat erythrocytes after heat stress. **Life sciences**, v. 75, n. 13, p. 1551-1565, 2004.

OZAKI, M. et al. Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. **Transplant International**, v. 10, n. 2, p. 96-102, 1997.

PACKER, L. et al. α -Lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biol. Med.** v. 19, p. 227-250, 1995.

PACKER, L. et al. Molecular Aspects of Lipoic Acid in the Prevention of Diabetes Complications. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 888-895, 2001.

PANDEY, K. B. e RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 1, p. 2-12, 2010.

PANTALEO, A. et al. Oxidized and poorly glycosylated band 3 is selectively phosphorylated by Syk kinase to form large membrane clusters in normal and G6PD deficient red blood cells. **Biochem. J**, v. 418, p. 359-367, 2009.

PARK, K. H. et al. Dapsone intoxication: clinical course and characteristics. **Journal Clinical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 516-521, 2010.

PARNHAM, M. e GRAF, E. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 19, p. 3095-3102, 1987.

PARNHAM, M. e SIES, H. Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 9, n. 3, p. 607-619, 2000.

PARNHAM, M. et al. The pharmacology of ebselen, **Agents and Actions**, v. 32, n. 1/2, p. 1-9, 1991.

PARNHAM, M. J. e KINDT, S. A novel biologically active seleno-organic compound III: Effects of pz 51 (ebselen) on glutathione peroxidase and secretory activities of mouse macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 20, p. 3247-3250, 1984.

PASSON, P. G. e HULTQUIST, D. E. Soluble cytochrome b 5 reductase from human erythrocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 275, n. 1, p. 62-73, 1972.

PAVITHRAN, K. e SATISH, T. C. Dapsone induced motor polyneuropathy in a patient with leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 65, n. 2, p. 262-263, 1997.

PAWLAS, N e MALECKI, A. Effects of ebselen on glutathione level in neurons exposed to arachidonic acid and 4-hydroxynonenal during simulated ischemia in vitro. **Pharmacological Reports**, v. 59, n. 6, p. 708-714, 2007.

PAWLAS, N. e MALECKI, A. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine in neurons exposed to arachidonic acid during simulated ischemia in vitro. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 743-750, 2009.

PERCY, M. J. et al. Disorders of oxidised haemoglobin. **Blood Rev**, v. 19, n. 2, p. 61-68, 2005.

PINTO, W. J. Topology of the main proteins of erythrocyte membrane and cytoskeletal. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, v.12, n.1, p.106-120, 2013.

POLI, G, et al. Oxidative Stress and Cell Signalling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1163-1182, 2004.

PORCIÚNCULA, L. O. et al. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. **Neuroscience Letters**, v. 299, n. 3, p. 217-220, 2001.

POSSER, T. et al. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. **European Journal of Pharmacology**, v. 602, p. 85-91, 2009.

PRASAD, R. et al. Dapsone Induced Methemoglobinemia: Intermittent vs Continuous Intravenous Methylene Blue Therapy. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 75, p. 245-247, 2006.

QUEIROZ, R. H. C. et al. Haematological and biochemical alterations in leprosy patients already treated with dapsone and MDT. **Pharm. Acta Helv.**, v. 72, p. 209-213, 1997.

RAHAL, A. et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, Article ID 761264, 19 pages, 2014.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The lancet**, v. 356, n. 9225, p. 233-241, 2000.

REED, L. J. A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. **J Biol Chem**. v. 276, n. 42, p. 38329-38336, 2001.

REED, L. J. From lipoic acid to multi-enzyme complexes. **Protein Sci.**, v. 7, p. 220-224, 1998.

REHMAN, H. U. Methemoglobinemia. **West J Med**, v. 175, p. 193-196, 2001.

REILLY, T. P. et al. A role for bioactivation and covalent binding within epidermal keratinocytes in sulfonamide induced cutaneous drug reactions. **J Invest Dermatol.**, v. 114, p. 1164–1173, 2000.

REILLY, T. P. et al. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology.**, v.55, n. 6, p. 803-10, 1998.

REILLY, T. P. et al. Methemoglobin formation by hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsona: Implications for differences in adverse drug reactions. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics.**, v. 288, p. 951–959, 1999.

RIFAIUGLU, M. M. et al. Protective effect of ebselen on experimental testicular torsion and detorsion injury. **Andrologia**, v. 46, p. 1134-1140, 2014.

ROSEN, P. J. et al. Failure of methylene blue treatment in toxic methemoglobinemia. Association with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Ann Intern med**, v. 75, n. 1, p. 83-6, 1971.

ROSSATO, J. I. et al. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 318, n. 3, p. 137–140, 2002.

ROVER JUNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

ROY, S. et al. Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by alpha-lipoic acid. Mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. **Biochem. Pharmacol.** v. 53, p. 393-399, 1997.

RUDICH, A. et al. Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. **Diabetologia**, v. 42, p. 949-957, 1999.

RUFFMANN, R. e WENDEL, A. GSH Rescue by N-Acetylcysteine. **Klinische Wochenschrift**, v. 69, n. 18, p. 857-862, 1991.

SAFAYHI, H. et al. A novel biologically active seleno-organic compound-V: Inhibition by ebselen (pz 51) of rat peritoneal neutrophil lipooxygenase. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, n. 15, p. 2691-2694, 1985.

SAITO, I. et al. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery**, v. 42, n. 2, p. 269-77, 1998.

SAKURAI, T. et al. Ebselen, a Seleno-organic Antioxidant, as an Electrophile. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 9, p. 1196-1204, 2006.

SALAMAT, A e WATSON, H. G. Drug-induced methaemoglobinaemia presenting with angina follow the use of dapsone. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 25, n. 5, p. 327-328, 2003.

SALUK, J. et al. Evaluating the antioxidative activity of diselenide containing compounds in human blood. **Bioorganic Chemistry**, v. 50, p. 26-33, 2013.

SCHALCHER, T. R. et al. Clinical Oxidative Stress during Leprosy Multidrug Therapy: Impact of Dapsone Oxidation. **PLOS ONE**, v. 9, n.1, p. 1-9, 2014.

SCHEWE, C. et al. Strong inhibition of mammalian lipoxygenases by the antiinflammatory seleno-organic compound ebselen in the absence of glutathione. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, n. 1, p. 65-74, 1994.

SCHEWE, T. Molecular actions of Ebselen - An antiinflammatory antioxidant. **General Pharmacology**, v. 26, n. 6, p. 1153-1169, 1995.

SCHIFF, D. E. et al. Methaemoglobinemia associated with dapsone therapy in a child with pneumonia and chronic immune thrombocytopenic purpura. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 28, p. 395-398, 2006.

SCOTT, G. e RASBRIDGE, M. The in vitro action of dapsone and its derivatives on normal and G6PD-deficient red cells. **Br. J. Haematol.**, v. 24, p. 307, 1973.

SEHIRLI, A. O. et al. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. **J Nephrol.** v. 16, n. 1, p. 75-80, 2003.

SHAHRIPOUR, R. B. et al. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. **Brain and Behavior**, v. 4, n. 2, p.108-122, 2014.

SHAIK, I. H. e MEHVAR, R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 1, p.105-13, 2006.

SHELLY, C. L. regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 42-49, 2009.

SHIHANA, F et al. A Simple Quantitative Bedside Test to Determine Methemoglobin. **Ann Emerg Med.**, v. 55, n. 2, p. 184-189, 2010.

SIES, H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, n. 3, p.313-323, 1993.

SIES, H. et al. Glutathione Peroxidase Protects against Peroxynitrite-mediated Oxidations. **The journal of biological chemistry**, v. 272, n. 44, p. 27812-27817, 1997.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SILLS, M. R. e ZINKHAM, W. H. Methylene blue-induced Heinz body hemolytic anemia. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v.148, p. 306-10, 1994.

SMITH, A. R. et al. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, n. 9, p. 1135-1146, 2004.

SOHAL, R. S. et al. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. **Mech Ageing Dev.** v. 74, p. 121-133, 1994.

SPALLHOLZ, J. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 1, p. 45-64.

STAMATOYANNOPOULUS, J. Future prospects for treatment of hemoglobinopathies. **West Journal of Medicine**, v. 157, p. 631-636, 1992.

STREEPER, R. S. et al. Differential effects of lipoic acid stereoisomers on glucose metabolism in insulin-resistant skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** v. 273, p. E185-E191, 1997.

SUH, J. H. et al. Oxidative stress in the aging rat heart is reversed by dietary supplementation with (R)- α -lipoic acid. **FASEB J.** v. 15, n. 3, p. 700-706, 2001.

SULIMAN, H. B. et al. Superoxide dismutase-3 promotes full expression of the EPO response to hypoxia. **Blood**, v. 104, n. 1, p. 43-50, 2004.

SUYAMA, H. et al. Methemoglobinemia induced by automobile exhaust fumes. **J. Anesth**, v. 19, p. 333-335, 2005.

TAKHTFOOLADI, H. A. et al. Effects of N-acetylcysteine and pentoxifylline on remote lung injury in a rat model of hindlimb ischemia/reperfusion injury. **J Bras Pneumol.**, v. 42, n. 1, p. 9-14, 2016.

TAKHTFOOLADI, M. A. et al. The antioxidant role of N-acetylcysteine on the testicular remote injury after skeletal muscle ischemia and reperfusion in rats. **Pol J Pathol.** v. 64, n. 3, p. 204-9, 2013.

TAN, S. M. et al. (2013) The Modified Selenenyl Amide, M-hydroxy Ebselen, Attenuates Diabetic Nephropathy and Diabetes-Associated Atherosclerosis in ApoE/GPx1 Double Knockout Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69193, 2013.

TAVAZZI, B. et al. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. **European Journal Biochemistry**, v. 267, p. 684-689, 2000.

TEDESCO, I. et al. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 114-119, 2000.

TELEN, M. J. e KAUFMAN, R. The Mature Erythrocyte. In. Wintrobe's Clinical Hematology. **Baltimore**, p.193-227, 1999.

THUONG-NGUYEN, V. et al. Inhibition of neutrophil adherence to antibody by dapsone: A possible therapeutic mechanism in the treatment of IgA dermatoses. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, n. 4, p. 349-355, 1993.

TIANO, L. et al. Ebselen prevents mitochondrial ageing due to oxidative stress: in vitro study of fish erythrocytes. **Mitochondrion**, v. 2, n. 6, p. 428-436, 2003.

TIEGS, G. et al. Ebselen Protects Mice Against T Cell-Dependent, TNF-Mediated Apoptotic Liver Injury. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 287, n. 3, p. 1098-1104, 1998.

TIMOTHY, P. B. et al. Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsone hydroxylamine. **Free Radic. Biol. Med**, v. 22, n. 7, p. 1183-93, 1997.

UCHIDA, R. et al. Enantioselective Pharmacokinetics of α -Lipoic Acid in Rats. **Int. J. Mol. Sci.** v. 16, p. 22781-22794, 2015.

UDEH, C. et al. Severe methemoglobinemia on reexposure to benzocaine. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 13, n. 2, p. 128-130, 2001.

UEDA, S. et al. Protection by Seleno-Organic Compound, Ebselen, Against Acute Gastric Mucosal Injury Induced by Ischemia-Reperfusion in Rats. **Antioxidants in therapy and Preventive Medicine**, v. 264, p. 187-191, 1990.

VAGE, C. et al. Dapsone-induced hematologic toxicity: comparison of the methemoglobin-forming ability of hydroxylamine metabolites of dapsone in rat and human blood. **Toxicology and Applied Pharmacology.**, v. 129, n. 2, p. 309-16, 1994.

VALKO, M, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemistry Biological Interaction**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VENDEMIALE, G. et al. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon alpha. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 175, p. 130-139, 2001.

VYAS, P. et al. Reactive oxygen species generation and its role in the differential cytotoxicity of the arylhydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone in normal human epidermal keratinocytes. **Bio. Pharmacol.**, v. 70, p. 275-286, 2005.

WALTHER, M. et al. The Inhibition of Mammalian 15-Lipoxygenases by the Anti Inflammatory Drug Ebselen: Dual-Type Mechanism Involving Covalent Linkage and Alteration of the Iron Ligand Sphere. **Molecular pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 196-203, 1999.

WANG, D. N. Band 3 protein: structure, flexibility and function. **FEBS Lett**, v. 346, p. 26-31, 1994.

WANG, J-F. et al. Inhibition of Superoxide and Nitric Oxide Release and Protection from Reoxygenation Injury by Ebselen in Rat Kupffer Cells. **Hepatology**, v. 15, n. 6, p. 1112-1116, 1992.

WARD, K. E. e MCCARTHY, M. W. Dapsone-induced methemoglobinemia. **Ann. Pharmacother.**, v. 32, p. 549-553, 1998.

WENDEL, A. et al. A novel biologically active seleno-organic compound-II: activity of pz 51 in relation to glutathione peroxidase. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 20, p. 3241-3245, 1984.

WILHELM, E. A. et al. Ebselen protects against behavioral and biochemical toxicities induced by 3-nitropropionic acid in rats: Correlations between motor coordination, reactive species levels, and succinate dehydrogenase activity. **Biol. Trace. Elem. Res.**, v. 162, p. 200-210, 2014.

WINTER, H. R. et al. CYP2C8/9 mediate dapsone Nhydroxylation at clinical concentrations of dapsone. **Drug Metab. Dispos.**, v. 28, p. 865-868, 2000.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Meth. Enzymol.**, v. 186, p. 265-272, 1990.

WOLF, R. et al. Dapsone: Unapproved Uses or Indications. **Clinics in Dermatology**, v. 18, n. 1, p. 37-53, 2000.

WOLVERTON, S. E. Monitoring for adverse effects from systemic drugs used in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 26, n. 5, p. 661-679, 1992.

WRIGHT, R. O. et al. Methemoglobinemia: Etiology, Pharmacology, and Clinical Management. **Annals Of Emergency Medicine**, v. 34, n. 5, p. 646-656, 1999.

WRIGHT, R. O. et al: N-acetylcysteine reduces methemoglobin in an in vitro model of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Acad Emerg Med.**, v. 5, p. 225-229, 1998.

WRIGHT, R. O. et al. N-Acetylcysteine reduces methemoglobin in vitro. **Ann Emerg Med.**, v. 28, p. 499-503, 1996.

XU, J. et al. Neuroprotective effects of ebselen are associated with the regulation of Bcl-2 and Bax proteins in cultured mouse cortical neurons. **Neuroscience letters**. v. 399, n. 3, p. 210-214, 2006.

YAMAGUCHI, T. et al. Ebselen in acute ischemic stroke: A placebo-controlled, double-blind clinical trial. **Stroke**, v. 29, n. 1, p. 12-17, 1998.

YANG, C-F. et al. Protective Effect of Ebselen against Hydrogen Peroxide-induced Cytotoxicity and DNA Damage in HepG₂ Cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 3. p. 273-279, 1999.

YANG, J. J. et al. Methemoglobinemia misdiagnosed as ruptured ectopic pregnancy. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 49, p. 586-588, 2005.

YAWATA, Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.

YAWATA, Y. et al. New variant of cytochrome b5 reductase deficiency (b5Rkurashiki) in red cells, platelets, lymphocytes, and cultured fibroblasts with congenital methemoglobinemia, mental and neurological retardation, and skeletal anomalies. **Am J Hematol**, v. 40, p. 299-305, 1992.

YAWORSKY, K. et al. Engagement of the insulin-sensitive pathway in the stimulation of glucose transport by α -lipoic acid in 3T3-L1 adipocytes. **Diabetologia**, v. 43, n. 3, p. 294-303, 2000.

YOSHIZUMI, M. et al. Ebselen attenuates oxidative stress-induced apoptosis via the inhibition of the c-Jun N-terminal kinase and activator protein-1 signalling pathway in PC12 cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n.7, p. 1023-1032, 2002.

ZHANG, D. et al. Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. **Blood**. v. 96, p. 2925-33, 2000.

ZHANG, M. et al. Ebselen suppresses late airway responses and airway inflammation in guinea pigs. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 5, p. 454-464, 2002.

ZHAO, R. e HOLMGREN, A. A Novel Antioxidant Mechanism of Ebselen Involving Ebselen Diselenide, a Substrate of Mammalian Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. **The journal of biological chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39456-39462, 2002.

ZHAO, R.; MASAYASU, H. e HOLMGREN, A. Ebselen: A substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 13, p. 8579-8584, 2002.

ZIMENT, I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. **Biomed. Pharmacother**, v. 42, n. 8, p. 513-519, 1988.

ZUIDEMA, J.; HILBERS-MODDERMAN, E. S. M. e MERKUS, F. W. H. M. Clinical pharmacokinetics of dapsone. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 11, n. 4, p. 299-315, 1986.

ANEXOS

A - TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Baseado na resolução nº 466 de 12/12/2012)

Você está sendo convidado (a) para participar como voluntário em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Sendo uma delas sua, e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/ICS-Sala13-Campus Universitário, nº01, Guamá; CEP: 66075-110-Belém-Pará. Tel/Fax. 3201-7735 E-mail: cepccs@ufpa.br

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa será realizada pelo aluno de Mestrado em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFPA) Everton Luiz Pompeu Varela, sob orientação da Professora Doutora Marta Chagas Monteiro, (Fone: (91) 981917135) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UFPA. Tem como objetivo avaliar o efeito protetor de antioxidantes, como ALA, NAC e Ebselen na formação de metemoglobina induzida pelo metabólito dapsona-hidroxicilamina *in vitro*, correlacionando à ocorrência (ou reversão) do estresse oxidativo. Os voluntários serão alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UFPA, sendo que a obtenção do sangue venoso para a preparação será em local apropriado e por um profissional habilitado. Os critérios de exclusão serão o uso recente de algum medicamento, doenças crônicas, menor de 20 anos e maiores de 25 anos e uso de tabaco. Todo material coletado nesta pesquisa ficará sob a guarda da pesquisadora responsável durante o período de utilização e logo depois será destruído.

Em nenhuma hipótese serão divulgados dados que permitam a sua identificação, guardando assim o absoluto sigilo das informações cedidas à pesquisadora. A sua participação é de livre arbítrio, não havendo pagamento pela mesma, podendo se recusar a responder quaisquer perguntas das entrevistas. Após conclusão da coleta do material biológico, os eritrócitos serão isolados e posteriormente serão incubados com a substância a ser testada na experimentação.

Marta Chagas Monteiro (Orientadora)

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa e que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com as informações necessárias.

NOME: _____ Belém ____ / ____ / ____
Assinatura do voluntário _____ RG: _____

B: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE ANTIOXIDANTES NA FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA INDUZIDA PELO METABÓLITO DAPSONA-HIDROXILAMINA IN VITRO

Pesquisador: Marta Chagas Monteiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60044516.9.0000.0018

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - ICS/ UFPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.898.698

Apresentação do Projeto:

O presente estudo será realizado para avaliar propriedades antioxidantes in vitro e o efeito protetor do Ebselen em eritrócitos humanos expostos a dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH). O metabolito DDS-NOH, é um potente oxidante, causador de alterações estruturais em eritrócitos e desenvolvimento de metemoglobinemia e anemia hemolítica. Ebselen, composto orgânico de selênio, lipofílico, é um potente antioxidante, também

exibe propriedades anti-inflamatória e citoprotetora. Será avaliado o efeito protetor do Ebselen na metemoglobina (MetHb) induzida pelo DDS-NOH em eritrócitos in vitro, correlacionando com alterações do equilíbrio redox. Os eritrócitos serão pré-encubados com o Ebselen ou Acido alfa lipóico ou N-Acetilcisteína (em diferentes concentrações) por 1 h a 37°C, seguido por DDS-NOH (2.5 e 7.5 g/mL) incubados por 1 h a 37°.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo do estudo será avaliar o efeito protetor de antioxidantes, como Ácido alfa lipóico, N-Acetilcisteína e Ebselen na formação de metemoglobina induzida pelo metabolito dapsona-hidroxilamina in vitro, correlacionando à ocorrência (ou reversão) do estresse oxidativo.

Objetivo Secundário:

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

Bairro: Campus Universitário do Guamá **CEP:** 66.075-110

UF: PA **Município:** BELEM

Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br