



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

**EFEITO DA DAPSONA NA GERAÇÃO DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM PACIENTES COM HANSENÍASE EM USO  
DE POLIQUIMIOTERAPIA**

**Taysa Ribeiro Schalcher**

BELÉM-PA  
2011



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

**EFEITO DA DAPSONA NA GERAÇÃO DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM PACIENTES COM HANSENÍASE EM USO  
DE POLIQUIMIOTERAPIA**

Autor: Taysa Ribeiro Schalcher

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Marta Chagas Monteiro

Co-orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

BELÉM-PA

2011

---

Schalcher, Taysa Ribeiro.

Efeito da dapsona na geração de estresse oxidativo em pacientes com hanseníase em uso de poliquimioterapia / Taysa Ribeiro Schalcher ; orientador, Marta Chagas Monteiro, co-orientador, José Luiz Fernandes Vieira. – 2011

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), 2011.

1. Dapsona. 2. Estresse oxidativo. 3. ERO. 4. Hanseníase.5.Poliquimioterapia I. Título.

---

CDD: 22. ed.: 615.7042

TAYSA RIBEIRO SCHALCHER

**EFEITO DA DAPSONA NA GERAÇÃO DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM PACIENTES COM HANSENÍASE EM USO  
DE POLIQUIMIOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca examinadora**

---

Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro PPGCG/UFPA

---

Prof. Dra. Lilian Lund Amado PPGEAP/UFPA

---

Prof. Dr. Claudio Guedes salgado BAIP/UFPA

Dedico este trabalho aos meus pais e amigos que sempre foram grandes colaboradores e incentivadores, assim como, a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização do mesmo.

Taysa Ribeiro Schalcher

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que sempre esteve presente na minha vida e que nestes dois anos de mestrado me ajudou a superar todas as adversidades e concluir este trabalho.

Aos meus familiares, a quem considero como meus eternos colaboradores e incentivadores.

A professora Dra. Marta Chagas Monteiro, que sempre acreditou no meu potencial e foi de fundamental importância para concretização e realização dessa pesquisa. Além de uma excelente orientadora, foi uma grande amiga, durante este período.

Ao Professor Dr. José Luiz Fernandes Vieira, o idealizador deste projeto e que no decorrer do mesmo sempre foi um bom colaborador.

A Unidade de Referência Especializada Marcelo Cândia, local onde foi realizada parte da pesquisa.

À toda equipe de profissionais da Unidade de Referência Especializada Marcelo Cândia, em especial aos que trabalhavam no laboratório de análises clínicas, as técnicas de enfermagem da sala de poliquimioterapia por todo o apoio prestado durante o período em que a pesquisa foi realizada.

A secretaria de saúde de Belém por permitir que uma parte deste trabalho fosse realizada na Unidade de saúde do Guamá.

A equipe de profissionais que trabalharam no Laboratório de Análises Clínicas da Unidade de saúde do Guamá por todo o apoio logístico que me deram durante os dias de coleta.

A Enfermeira Tatiana Monteiro e a técnica de enfermagem Deusoneide da Silva da sala de doenças transmissíveis da Unidade de Saúde do Guamá que foram sempre muito prestativas durante a realização do trabalho.

Aos pacientes da Unidade Marcelo Cândia e da Unidade de Saúde do Guamá por participarem deste trabalho.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário do Pará, pelo espaço físico e equipamentos cedidos para a análise da enzima catalase.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, instituição na qual realizei o curso de mestrado e que contribuiu para meu aperfeiçoamento profissional.

A Universidade Federal do Pará, pelo espaço físico, equipamentos utilizados, bem com, pelo apoio financeiro oferecido.

A fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará pelo suporte financeiro concedido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo suporte financeiro prestado, através da concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus amigos da Pós- Graduação de Ciências Farmacêuticas, em especial Andressa, Bruno, Cléa Tereza, Jeane, Joseane, Luis Fábio, Fabricio, Lúcia Carla, Taís Gabbay, Thais Montenegro, Michel, Luiz Mário, Patrick, Tiago Leite, Tiago Vilhena que durante estes anos de mestrado foram minha segunda família.

As amigas do Laboratório de Toxicologia, Amanda, Michelli, Marielli e Priscila, que nestes anos de trabalho sempre me apoiaram e me ajudaram no que fosse necessário.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia, em especial as bolsistas de iniciação, Amanda, angélica, Juliana, Kelly.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Haja, pois o que houver, ampliem-se os obstáculos  
Agigantem-se problemas, intensifiquem-se lutas  
Ou se agravem provações, trabalha sempre no bem de todos,  
Porque, trabalhando na seara do bem, podes conservar a  
certeza de que Deus te sustentará”.

Emmanuel,  
do livro coragem de Chico Xavier

## RESUMO

### EFEITO DA DAPSONA NA GERAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM HANSENÍASE EM USO DE POLIQUIMIOTERAPIA

O processo inflamatório decorrente da infecção por *Mycobacterium leprae* e a administração de fármacos com propriedades oxidativas, como a dapsona, são fatores de riscos ao estresse oxidativo ocasionado em pacientes com hanseníase. Este trabalho visa determinar as concentrações plasmáticas de dapsona em pacientes com hanseníase em uso de poliquimioterapia (PQT), correlacionando ao desenvolvimento do estresse oxidativo. Para o estudo, foram selecionados indivíduos saudáveis e pacientes com hanseníase, acompanhados antes (D0) e após a terceira dose supervisionada de PQT (D3). As concentrações plasmáticas de dapsona dos pacientes sob tratamento foram mesuradas por cromatografia líquida de alta eficiência. A avaliação do estresse oxidativo foi realizada através da determinação de metemoglobina (MetHb) e das concentrações de glutathiona reduzida (GSH), óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA), capacidade antioxidante total (TEAC) e avaliação das atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e da presença de corpúsculo de Heinz em esfregaços sanguíneos. No período de estudo foram obtidas 23 amostras de pacientes com hanseníase D0, 13 pacientes em D3 e 20 de indivíduos saudáveis e sem a doença. As alterações no pacientes antes do tratamento estavam associadas ao aumento de NO (D0=18.91±2.39; controle= 6.86±1.79mM) e a redução significativa na enzima SOD (D0=69.88±12.26;controle= 138.42±14.99nmol/mL). Com relação aos pacientes sob tratamento, a concentração de dapsona no plasma foi 0.552± 0.037 µg/mL e as principais alterações observadas foram o aumento significativo no percentual de MetHb (D3= 3.29±0.74;controle=0.66±0.051%) e presença de corpúsculo de Heinz. Nos pacientes em tratamento também se observou aumento nos níveis de GSH (7.01±1.09µg/mL) quando comparados ao controle (3.33±1.09µg/mL) e diminuição da atividade de CAT (D3= 10.29± 2.02; controle= 19.52±2.48 U/g de proteínas). Os níveis de MDA antes e durante o PQT não mostraram alteração, enquanto os níveis de TEAC aumentaram significativamente neste pacientes (D0=2.90 ± 0.42; D3=3.04±0.52; controle= 1.42±0.18µmol/mL). Estes dados sugerem que a PQT é a principal responsável pelo desenvolvimento de estresse oxidativo, através da geração de danos oxidativos identificados pela presença de corpúsculo de Heinz e aumento no percentual de MetHb.

**Palavras chave:** Dapsona; Estresse Oxidativo; ERO; Hanseníase; Poliquimioterapia

## ABSTRACT

### DAPSONE EFFECT IN GENERATION OF OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH LEPROSY IN USE OF MULTIDRUG THERAPY

Inflammation caused by *Mycobacterium leprae* infection and drugs with oxidative properties such as dapsone, are risk factors to induce the oxidative stress in leprosy patients. This study aims to determine plasma concentrations of dapsone in leprosy patients in use of multidrug therapy (MDT), correlating the development of oxidative stress. For the study, healthy individuals and leprosy patients were selected, followed before (D0) and after the third MDT-supervised dose (D3). The plasma concentrations of dapsone in patients under treatment (D3) were evaluated by high performance liquid chromatography. The oxidative stress was performed by methemoglobin (MetHb) and Heinz bodies determination, concentrations of reduced glutathione (GSH), nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (TEAC) and enzymatic activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) in blood. In the study were obtained 23 samples from leprosy patients in D0 and 13 in D3; and 20 healthy and without leprosy subjects. In patients before treatment (D0) were observed increase of NO (D0 =  $18.91 \pm 2.39$ , control =  $6.86 \pm 1.79$  mM) and significant reduction of the activity of SOD enzyme (D0 =  $69.88 \pm 12.26$ , control =  $138.42 \pm 14.99$  nmol/mL). In MDT-treated patients (D3), the dapsone concentration in plasma was of  $0,552 \pm 0,037$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ , and they showed Heinz bodies presence and significant increase in the MetHb percentage (D3 =  $3.29 \pm 0.74$ , control =  $0.051 \pm 0.66\%$ ). In this patients also were observed increase of the GSH levels (D3 =  $7.01 \pm 1.9$ ; control =  $3.33 \pm 1.9$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and decrease of the CAT activity (D3 =  $10.29 \pm 02.02$ , control =  $19:52 \text{ } 2:48 \pm \text{U} / \text{g protein}$ ). However, MDA levels in D0 and D3 patients didn't show changed, while TEAC levels, in this patients, significantly increased (D0 =  $2.90 \pm 0.42$ ; D3 =  $3.04 \pm 0:52$ , control =  $1.42 \pm 0.18$   $\mu\text{mol} / \text{mL}$ ). These data suggest that the MDT is mainly cause for oxidative stress, because it induced the generation of oxidative damage identified by Heinz bodies' presence and increase in the MetHb percent.

**Keywords:** Dapsone, oxidative stress, ROS; Leprosy; Multidrug therapy

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Coeficiente de detecção geral de casos novos de Hanseníase no Brasil e regiões. 1990-2009.....	27
<b>Figura 2</b>	Fórmula estrutural da dapsona.....	30
<b>Figura 3</b>	Mecanismo de ação da dapsona no interior de microrganismos.....	31
<b>Figura 4</b>	Proposta de mecanismos de bioativação e detoxificação de dapsona.....	33
<b>Figura 5</b>	Reação de Haber-Weiss.....	37
<b>Figura 6</b>	Reação de Fenton.....	38
<b>Figura 7</b>	Reação catalisada pela óxido nítrico sintetase.....	39
<b>Figura 8</b>	Representação esquemática dos principais mecanismos de defesa contra ERO.....	42
<b>Figura 9</b>	Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR).....	43
<b>Figura 10</b>	Ilustração esquemática da localização das três isoformas de superóxido dismutase.....	44
<b>Figura 11</b>	Eliminação do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase.....	45
<b>Figura 12</b>	Fontes de ERO e mecanismo geral pelo qual o estresse oxidativo pode alterar a função celular.....	46
<b>Figura 13</b>	Etapas de evolução do estresse oxidativo.....	47
<b>Figura 14</b>	Representação dos grupos de voluntários participantes da pesquisa.....	55
<b>Figura 15</b>	Delineamento da pesquisa.....	56
<b>Figura 16</b>	Procedimentos para determinação de daspona em plasma de pacientes com hanseníase após D3.....	57
<b>Figura 17</b>	Modelo ProStart Varian, com coluna ODS RP 18, 25 cm x 4mm.....	58

<b>Figura 18</b>	Procedimento para determinação de glutatona reduzida.....	59
<b>Figura 19</b>	Procedimento para determinação de superóxido dismutase.....	60
<b>Figura 20</b>	Procedimento para determinação da enzima catalase.....	61
<b>Figura 21</b>	Procedimento para determinação da capacidade antioxidante total.....	62
<b>Figura 22</b>	Procedimento para detecção de óxido nítrico.....	63
<b>Figura 23</b>	Procedimento para determinação das concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	64
<b>Figura 24</b>	Procedimento para determinação do percentual de metemoglobina...	65
<b>Figura 25</b>	Procedimento para verificação da presença de corpúsculo de Heinz...	66
<b>Figura 26</b>	Distribuição dos pacientes participantes do estudo, segundo a classificação operacional da Organização Mundial da Saúde.....	68
<b>Figura 27</b>	Concentração sanguínea de GSH em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).....	72
<b>Figura 28</b>	Atividade da superóxido dismutase em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).....	73
<b>Figura 29</b>	Atividade da catalase em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).....	74
<b>Figura 30</b>	Capacidade antioxidante total, avaliado pelo método da atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).....	75
<b>Figura 31</b>	Concentração de NO no soro de indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).....	76
<b>Figura 32</b>	Níveis de Malondialdeído em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).....	77

<b>Figura 33</b>	Percentual de metemoglobina em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).....	78
<b>Figura 34</b>	Hipótese sobre a geração de estresse oxidativo provocado pelo uso de dapsona.....	91
<b>Quadro 1</b>	Correlação entre as classificações de Madri (1953), Ridley & Jopling (1966) e OMS (1982) .....	25
<b>Quadro 2</b>	Poliquimioterapia da hanseníase preconizada pela OMS para adultos.....	29
<b>Quadro 3</b>	Principais espécies reativas do oxigênio.....	36
<b>Quadro 4</b>	Crítérios para avaliação da presença de corpos de Heinz em esfregaços sanguíneos.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Perfil dos pacientes de hanseníase participantes da pesquisa, segundo a classificação operacional em multi e paucibacilar.....	70
<b>Tabela 2</b>	Concentrações plasmáticas de dapsona em amostras de pacientes com hanseníase nas formas multi e paucibacilar de acordo com o tempo de tratamento em meses.....	71
<b>Tabela 3</b>	Presença de corpos de Heinz em esfregaços sanguíneos dos indivíduos participantes do estudo.....	79
<b>Tabela 4</b>	Correlação entre as concentrações de dapsona e parâmetros indicativos de estresse oxidativo em amostras biológicas de pacientes com hanseníase após a terceira dose supervisionada de PQT.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Capacidade antioxidante total
ABTS <sup>+</sup>	Radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio)
B	Boderline
BB	Boderline-Boderline
BL	Boderline-lepromatoso
BT	Boderline-tuberculose
Ca <sup>++</sup>	Íon cálcio
CAT	Catalase
CFZ	Clofazimina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
CYP	Cytocromo P-450
Cu	Cobre
Cu <sup>+2</sup>	Íon cúprico
Cu/ZnSOD	Superóxido dismutase dependente de cobre/zinco
D	Dimorfa
DDS	Dapsona
DDS-NOH	Dapsona hidroxilamina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTNB	5, 5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
EC-SOD	Superóxido dismutase extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas do oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ESR	resonância eletrônica spin
FDH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleotídeo reduzido
Fe <sup>+2</sup>	Íon Ferroso
Fe <sup>+3</sup>	Íon Ferríco

FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto
FRAP	Habilidade do plasma reduzir o ferro
GO	Glutaciona oxidase
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S- transferase
GT	glucuronil-transferase
H <sup>+</sup>	Íon hidrogênio
HOBr	Ácido hipoboroso
HCIO	Ácido hipocloroso
H <sub>2</sub> O	Água
Hb	hemoglobina
HO <sub>2</sub> ·	hidroperoxila
HO·	Radical hidroxil
HO <sup>-</sup>	Ânion hidroxila
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HNO <sub>2</sub>	Ácido nitroso
I	Indeterminada
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina -1
IL-1β	Interleucina -1β
IL-2	Interleucina- 2
IL-3	Interleucina -3
IL-4	Interleucina -4
IL-5	Interleucina -5
IL-6	Interleucina- 6
IL-10	Intereucina -10
IL-2R	Receptor de interleucina-2
L	Lepromatoso
LL	Lepromatoso-lepromatoso

LAM	lipoarabinomanana
Mn	Manganês
MB	Multibacilar
MDA	Malondialdeído
MADDS-NOH	Monoacetildapsona hidroxilamina
MH	Mal de hansen
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
MS	Ministério da Saúde
MetHba	Metemoglobinemia
MetHb	Metemoglobina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAT	N-acetil-transferase
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	óxido nitroso
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
cNOS	Óxido nítrico sintetase constitutiva
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	nitrito
NO <sub>3</sub>	nitrato
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
O <sub>2</sub>	Oxigênio
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	oxigênio singlete
O <sub>3</sub>	Ozônio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical ânion superóxido
ORAC	Capacidade de absorvância de radicais de oxigênio
PABA	Ácido paraminobenzóico
PB	Paucibacilar
PGL-1	glicolípido-fenólico-1
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas

PQT	Poliqumioterapia
RFM	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucleico
RO·	Alcoxila
ROO·	Peroxila
ROOH	Peróxidos orgânicos
Se	Selênio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
SOD	Superóxido dismutase
T	Tuberculóide
T CD4+	Linfócito T auxiliar
T CD8+	Linfócito T citotóxico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade antioxidante trolox equivalente
Th1	T heper 1
Th2	T helper 2
TNB	Ácido nitrobenzóico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral - $\alpha$
TT	Tuberculóide-Tuberculóide
UDPGA	ácido uridina difosfato glucurônico
V	Virchoviano
VIT A	Vitamina A
VIT C	Vitamina C
VIT E	Vitamina E
Zn	Zinco

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

A1	Absorbância 1
A2	Absorbância 2
A3	Absorbância 3
A4	Absorbância 4
°C	Graus Celsius
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
g	Gramma
$\mu\text{g}$	Micrograma
L	Litro
$\mu\text{L}$	Microlitro
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimol
M	Molar
N	Normal
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
T0	Tempo zero
T1	1 minuto
T'1	1 segundo
T3	3 minutos
T5	5 minutos
T15	15 minutos
T'15	15 segundos
T30	30 minutos
T'30	30 segundos
T'45	45 segundos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
2.1.	HANSENÍASE E POLIQUIMIOTERAPIA.....	24
2.2.	DAPSONA.....	30
2.3.	ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO.....	35
2.3.1.	RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO .....	36
2.3.2.	PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	37
2.3.3.	RADICAL HIDROXIL.....	38
2.4	ESPÉCIES REATIVAS DO NITROGÊNIO.....	39
2.5.	SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	41
2.6.	ESTRESSE OXIDATIVO.....	45
2.7.	ESTRESSE OXIDATIVO E HANSENÍASE.....	48
2.8.	ESTRESSE OXIDATIVO E DAPSONA.....	49
2.9.	MONITORAMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	51
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	53
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	53
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	54
4.1.	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	54
4.2	ANÁLISE LABORATORIAL DAS AMOSTRAS.....	56
4.2.1.	DETERMINAÇÃO DOS TEORES PLASMÁTICOS DE DAPSONA....	56
4.2.2.	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	58
4.2.2.1.	DETERMINAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA.....	58
4.2.2.2.	DETERMINAÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	59
4.2.2.3.	DETERMINAÇÃO DA CATALASE.....	60
4.2.2.4.	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	61
4.2.2.5.	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO.....	62
4.2.2.6.	MEDIDA DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	63
4.2.2.7.	DETERMINAÇÃO DE METEMOGLOBINA.....	64

4.2.2.8.	ANÁLISE DA PRESENÇA DE CORPOS DE HEINZ.....	66
4.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
4.4.	ASPECTOS ÉTICOS.....	67
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	68
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	80
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	92
8.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	94
9.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
	<b>APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	115
	<b>ANEXO A- Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará</b> .....	117
	<b>ANEXO B- Autorização da Unidade de Referência especializada Dr. Marcello Cândia</b> .....	118
	<b>ANEXO C-Autorização da Secretária de Saúde do Município de Belém</b> .....	119

## 1. INTRODUÇÃO

A Hanseníase ou Mal de Hansen (MH) foi descoberta em 1874 pelo médico e botânico norueguês Gerhard Armauer Hansen. Atualmente, sabe-se que é uma doença infecto-contagiosa, crônica, curável, causada pelo bacilo álcool-ácido resistente, intracelular obrigatório, denominado *Mycobacterium leprae* (BRASIL/MS, 2002). O homem é conhecido como única fonte de infecção e a forma de contágio ocorre através do contato prolongado de indivíduos suscetíveis com pacientes bacilíferos não tratados, especialmente no ambiente intra-domiciliar. (BRASIL/MS, 2005).

Até o momento, o acesso a informação, diagnóstico e o tratamento com poliquimioterapia (PQT) continuam sendo os elementos principais na estratégia de eliminação da doença como problema de saúde pública (OMS, 2009). A PQT padronizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), constituída pelos medicamentos, rifampicina, dapsona e clofazimina, constitui-se hoje a principal estratégia para interromper a cadeia de transmissão do *M. leprae*. A utilização deste esquema terapêutico evita a evolução da doença, previne o surgimento de resistência e o aparecimento das incapacidades e deformidades (BRASIL/MS, 2002).

Todos os fármacos empregados na terapia são capazes de provocar reações adversas, contudo, a dapsona é responsável por grande número de intoxicações por seu uso em esquemas monoterápicos ou poliquimioterápicos. As reações adversas mais frequentes causadas pela utilização deste fármaco consistem na formação de metemoglobinemia e hemólise com presença de corpúsculo de Heinz. Estes são os efeitos tóxicos mais importantes detectados na intoxicação aguda por esta sulfona, bem como são indicativos de aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONALD, 1985; CARRAZA, 1999; RIMIOLLI, 2006).

As espécies reativas são produtos do metabolismo do oxigênio ou nitrogênio, sendo conhecidas como espécies reativas do oxigênio e espécies reativas do nitrogênio, respectivamente. Essas espécies são produzidas normalmente no organismo e desempenham funções de segundo mensageiros, sinalizadores intracelulares. Além disso, participam da produção de espécies bactericidas, como o

peroxinitrito, no interior dos fagócitos (DRÖGE, 2002). Entretanto, o excesso dessas moléculas no organismo acarreta efeitos tóxicos para o mesmo, visto que a instabilidade destes agentes é responsável pela sua grande reatividade às biomoléculas acarretando a alteração na estrutura e/ou funções de proteínas, lipídios de membrana e ácidos nucleicos (SIES, 1991; YOUNGSON, 1995; ROVER JÚNIOR et al. 2001; HALLIWELL e WHITEMAN, 2004; HICKS et al. 2006) .

As espécies reativas do oxigênio mais conhecidas são o radical hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ), radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\cdot$ ), alcoxila ( $\text{RO}^\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ).Dentre as ERN mais importantes, destacam-se o óxido nítrico, óxido nitroso, ácido nitroso, nitritos, nitratos e peroxinitritos (BARREIROS et al. 2006; BARBOSA et al. 2008).

Para controlar os níveis das espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, protegendo as células das condições de estresse e mantendo o equilíbrio dos processos de oxi-redução, existem os agentes antioxidantes em nosso organismo. Esses agentes são definidos como qualquer substância que, presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Podem ser classificados em enzimáticos como a glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase, bem como, não enzimáticos como  $\alpha$ -tocoferol, glutatona reduzida entre outros (HALLIWELL, 2000).

O desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e as defesa antioxidantes do organismo, levando a dano de macromoléculas e desorganização da sinalização molecular denomina-se estresse oxidativo. Os métodos mais utilizados para avaliação deste evento consistem em detectar a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e redutase) e na detecção da presença de danos em macromoléculas (determinação de proteína carbonilada, malondialdeído) em tecidos sangue e outros fluidos biológicos, utilizando métodos espectrofotométricos e cromatométricos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O estresse oxidativo está associado a algumas condições patológicas como o câncer, processos neurodegenerativos, doenças metabólicas, lesões inflamatórias crônicas, toxicidade química (MA, 2010) e em doenças infectocontagiosas como, hanseníase (PRASAD et al. 2007; PRASAD et al. 2008; ABDEL-HAFEZ et al. 2010) e síndrome da imunodeficiência-adquirida (REPETTO et al. 1996).

Levando em consideração que o processo inflamatório decorrente da infecção por *M. leprae* e a administração de fármacos oxidativos como a dapsona, são fatores de riscos ao desenvolvimento de estresse oxidativo aos quais os pacientes com hanseníase estão expostos, é de fundamental importância verificar a presença e intensidade deste evento nesta população. Estes dados poderão auxiliar no surgimento de novos métodos diagnósticos e prognósticos da doença, assim como medidas que possam minimizar o impacto da doença nos aspectos sociais, econômicos e psicológicos deste paciente com hanseníase.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Hanseníase e Poliquimioterapia

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica, de notificação compulsória e de investigação obrigatória em todo território nacional, que se manifesta, principalmente, por lesões cutâneas com diminuição de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil. O agente etiológico responsável por esta patologia é o bacilo álcool ácido resistente denominado *Mycobacterium Leprae*, uma bactéria que apresenta alta infectividade e baixa patogenicidade. (BRASIL/MS, 2005; BRASIL/MS, 2009). As manifestações clínicas, imunológicas e evolutivas, observadas neste processo infeccioso, refletem a relação entre o hospedeiro e o parasito (FOSS et al.1995).

As classificações mais utilizadas na hanseníase são a de Madri (1953), a de Ridley & Jopling (1966), sendo que em 1982, um Comitê da OMS propôs uma classificação da forma clínica simplificada e operacional: a forma multibacilar e paucibacilar (BERNADI et al.1981; PARDILLO et al. 2007). A correlação entre estas três formas de classificação está representada no quadro abaixo:

<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA</b>			
Madri	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	Borderline (B) ou Dimorfa (D)	Virchoviana (V) ou Lepromatoso (L)
Ridley & Jopling		Tubercuóide- Tuberculóide (TT)	Borderline- Tuberculóide (BT)  Borderline- Borderline (BB)  Borderline- Lepromatoso (BL)	Lepromatoso- lepromatoso  (LL)
OMS	Paucibacilar (PB)		Multibacilar (MB)	

Quadro1- Correlação entre as classificações de Madri (1953), Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982).

Fonte: SOUZA, 1997

A classificação de Madri (1953) considera critérios de polaridade baseados nas características clínicas da doença, que foram acrescidos pelos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, definindo os grupos polares, tuberculóide (T) e virchoviano (V) ou lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma indeterminada (I); e o instável e intermediário, a forma borderline (B) ou dimorfa (D).

A classificação de Ridley & Jopling (1966), adota subgrupos dentro do espectro de critérios clínicos e bacteriológicos, enfatizando os aspectos imunológicos e histopatológicos. As siglas utilizadas para indicar as duas formas polares são: tuberculóide-tuberculóide (TT) e lepromatoso-lepromatoso (LL) e os três subgrupos: borderline-tuberculóide (BT), borderline- borderline (BB), borderline-lepromatoso (BL).

O espectro clínico da hanseníase está intimamente ligado à resposta imune dos pacientes, visto que foi demonstrado que o *M. leprae* é um bacilo com alto poder infectante e baixo poder patogênico (ARAÚJO, 2003). Alguns pacientes podem apresentar a forma tuberculóide ou tuberculóide-tuberculóide, na qual há predomínio de células T CD4+ e citocinas Th1, como IL-2 e IFN- $\gamma$ . Esta forma da doença se caracteriza por exacerbação da imunidade celular e a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- $\alpha$ ), que impedem a proliferação bacilar, mas pode se tornar lesiva ao organismo, causando destruição das fibras nervosas em áreas específicas e o aparecimento de lesões localizadas e bem demarcadas na pele, com perda de sensibilidade térmica e dolorosa, devido à ausência de fatores reguladores (FOSS, 1999; BRITTON e LOCKWOOD, 2004). Na ausência de uma resposta Th1, ocorre a disseminação do bacilo, levando ao quadro de hanseníase Virchoviana ou lepromatoso-lepromatoso. Nesse caso, os macrófagos estão repletos de parasita, devido a expressão dos antígenos glicolípido-fenólico 1 (PGL-1) e lipoarabinomanana (LAM) pelo bacilo, favorecendo o escape dos mecanismos oxidativos e há predomínio de células T CD8+ e citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10). As formas boderlines (BT, BB, BL) também conhecidas como dimorfias, representam um padrão clínico e imunológico de resposta intermediária (BRITTON e LOCKWOOD, 2004).

A classificação da OMS (1982) divide os pacientes em paucibacilares (PB) casos com até cinco lesões de pele, que podem estar distribuídas assimetricamente pelo corpo, apenas um tronco nervoso comprometido e baixa carga de bacilos, que explica o exame baciloscópico negativo. Nos casos multibacilares (MB), os indivíduos apresentam mais de cinco lesões de pele distribuídas de forma simétrica pelo corpo, mais de um tronco nervoso acometido e a alta carga de bacilos, o que justifica a baciloscopia positiva (SOUZA, 1997).

A hanseníase ainda é um problema de saúde pública no mundo. No ano de 2008 foram notificados 249.007 casos novos, em 121 países, dos quais 134.184 foram detectados na Índia, o país com maior número de casos novos, seguida do Brasil com 38.914 e da Indonésia com 17.441 (OMS, 2009). No ano seguinte, observou-se uma queda no número de casos novos notificados no Brasil para 37.610, contudo mantém o segundo lugar como país que apresenta mais de 1000 casos novos durante o ano de 2009, bem como, o país da América com o maior número de casos novos detectados neste período (OMS, 2010).

No Brasil, observou-se um aumento da prevalência desta doença até o ano de 1990, passando a declinar a partir de 1991, quando a poliquimioterapia foi implantada em massa em todo o país (figura 1). Entretanto, apesar do desenvolvimento econômico, a expansão da saúde pública e os esforços do programa de controle da hanseníase nos últimos 30 anos, esta doença não foi eliminada e novos casos ainda estão sendo detectados (PENNA et al. 2009). Quando se analisa o coeficiente detecção de casos novos por 100 mil habitantes, no Brasil no ano de 2008 (20,56/ 100 mil habitantes), observou-se uma pequena redução quando comparado ao ano anterior, no qual foi obtido um coeficiente de 21,19/100mil habitantes. Apesar, deste indicador apresentar uma redução no ano de 2009 (16,72/ 100mil habitantes), as taxas de detecção destes eventos continuam se mantendo elevadas no país (Sinan/SVS/MS, 2010).

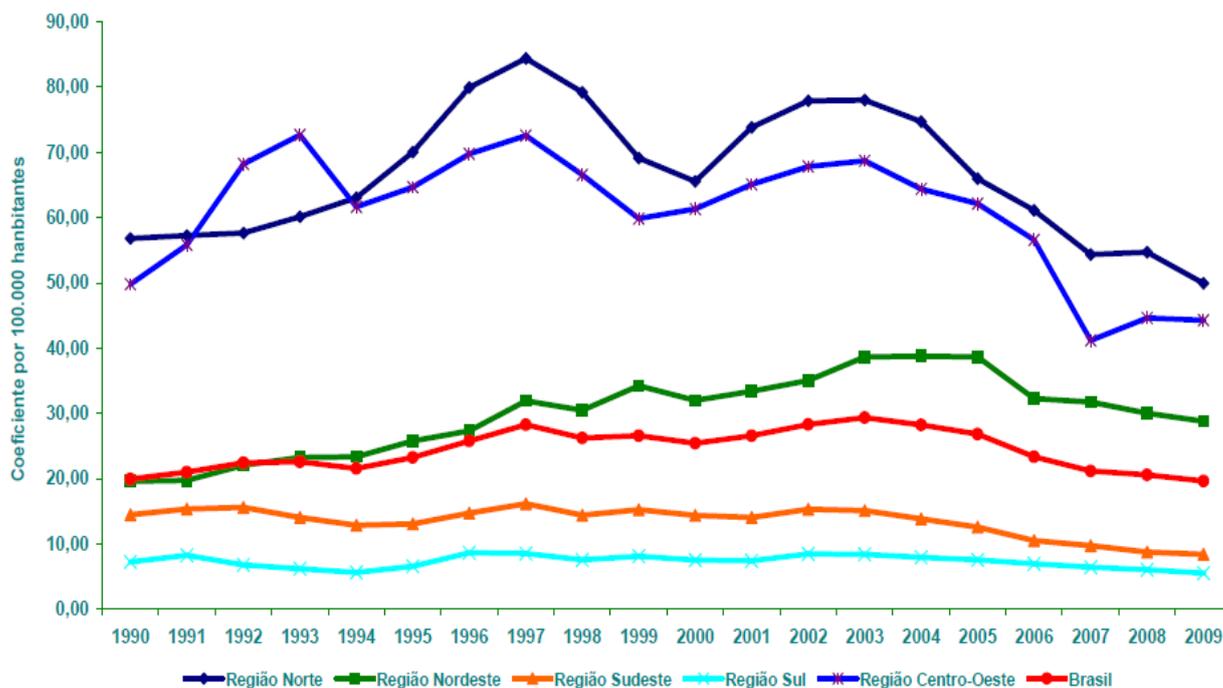


Figura 1- coeficiente de detecção geral de casos novos de Hanseníase no Brasil e regiões. 1990-2009.

Fonte: Sinan/SVS-MS, 2010a.

De modo geral, os coeficientes de detecção de casos novos registrados nos Estados brasileiros evidenciaram o comprometimento da Amazônia Legal em relação à hanseníase, sendo que os maiores coeficientes pertencem aos Estados de

Mato Grosso, Tocantins, Rondônia, Maranhão, Pará, e Roraima (BRASIL/MS, 2008). Dados do Sistema de Informação de Agravos de notificação do Ministério da saúde mostram que o Pará é líder de notificações de hanseníase no país, visto que no ano de 2008 foram registrados 4.595 casos da doença e em 2009, registrou-se 4.057 notificações (Sinan/SVS/MS, 2010b). Em 2010, o Estado do Pará ocupou o segundo lugar com 3.138 casos novos, perdendo apenas para o Estado do Maranhão (Sinan/SVS/MS, 2010c).

Um dos fatores essenciais na eliminação e no controle desta doença como problema de saúde pública é o tratamento poliquimioterápico (BRASIL/MS, 2005). Até o início da década de 80, a dapsona (4,4'-diaminodifenilsulfona) era o fármaco de escolha para o tratamento da hanseníase, porém, o emprego da monoterapia foi a principal causa de desenvolvimento de resistência ao medicamento. Em virtude deste fato, a OMS preconizou o uso da PQT, como esquema terapêutico apropriado para o controle e cura desta moléstia (CAMBAU et al. 1997).

Na Hanseníase, a PQT é administrada de acordo com a classificação operacional do doente em PB ou MB. O esquema-padrão consiste na combinação de três princípios ativos: a rifampicina (único bactericida do esquema padrão), dapsona (quimioterápico bacteriostático) e clofazimina (corante fenazínico, bacteriostático contra o bacilo de hansen) (BRASIL/MS, 2002).

O esquema terapêutico da hanseníase preconizado para adultos pela Organização Mundial da saúde está representado no quadro abaixo:

Formas Clínicas	Medicamento			Duração do tratamento
	Dapsona (DDS)	Rifampicina (RFM)	Clofazimina (CFZ)	
<b>PB</b>	100mg dose supervisionada + 100mg/dia auto-administrada	600mg, uma vez por mês, supervisionada	-	6 doses mensais supervisionadas de Rifampicina
<b>MB</b>	100mg dose supervisionada + 100mg/dia auto-administrada	600mg, uma vez por mês, Supervisionada	300 mg, uma vez por mês, supervisionada + 50mg/dia, auto-administrada	12 doses mensais supervisionadas de Rifampicina

Quadro 2- Poliquimioterapia da hanseníase preconizada pela OMS para adultos  
Fonte: Adaptado de BRASIL/MS,2009.

Apesar dos benefícios deste esquema, durante sua utilização os pacientes podem apresentar reações adversas, tais como, Síndrome da dapsona, Síndrome da rifampicina, metemoglobinemia, hemólise, farmacodermia, insuficiência renal e hepatite. Estas intercorrências geralmente são identificadas entre a 1ª a 5ª doses supervisadas (GALLO et al. 1995).

Dentre os fármacos empregados na PQT da hanseníase, a dapsona é responsável por grande número de intoxicações. Estudo publicado por Goulart et al. (2002), foi constatado que a causa da maioria das reações adversas que mais acometiam pacientes com hanseníase em tratamento com poliquimioterápico no Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia no período de 1995 à 2000, relacionava-se ao uso da Dapsona (80% dos casos), onde as maiores intercorrências atribuídas a este fármaco consistiam principalmente de casos de anemia hemolítica, gastrite e metemoglobinemia.

## 2.2. Dapsona

A 4,4'-diaminodifenil-sulfona ou dapsona também é conhecida com outras sinonímias, tais como, diadifenilsulfona, sulfonildianilina, disulfona e sulfona (CARRAZZA, 1998). Este fármaco é um pó cristalino inodoro branco, cuja fórmula molecular é  $C_{12}H_{12}N_2O_2S$  (GRUNWALD e AMICHAÏ, 1996). Sua fórmula estrutural está apresentada abaixo:

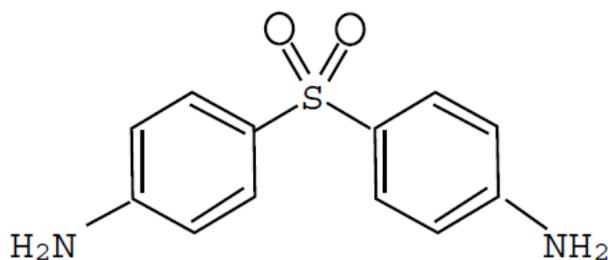


Figura 2- Fórmula estrutural da dapsona.  
Fonte: SÁNCHEZ- SALDAÑA, 2008

A dapsona apresenta similaridade química com as sulfonamidas, onde a presença do grupo sulfonil é essencial para sua atividade farmacológica e parece ser o responsável pela hematotoxicidade desenvolvida durante seu uso (MAHMUD et al. 1997). Esta droga é utilizada como antiinflamatório e antibacteriano/antiprotozoário (FORD, 2000; PANIKER e LEVINE, 2001).

Suas propriedades antiinflamatórias ainda não são completamente compreendidas, contudo, sabe-se que esta atividade provavelmente não está relacionada com sua ação antibacteriana, sendo preconizado seu uso em doenças inflamatórias não-infecciosas, tais como: dermatite herpetiforme, dermatite linear IgA, artrite reumatóide, vasculite leucocitária e lúpus eritematoso sistêmico Bolhoso (COLEMAN, 1993; ZHU e STILLER, 2001) e como adjuvante sistêmico combinado com corticóide no tratamento do pênfigo vulgar oral (BERNABÉ et al. 2005).

Além destas indicações farmacológicas, a dapsona é utilizada como quimioterápico bacteriostático. Seu mecanismo de ação contra bactérias e protozoários ocorre em virtude de sua interação com o sítio ativo da enzima

dihidropteroato sintetase (figura 3), que acarreta na inibição da síntese de ácido fólico, um evento essencial para síntese de purinas e consequente formação de RNA e DNA por parte destes microrganismos (WOLVERTON, 1992; COLEMAN e JACOBUS,1993; FARHI et al. 2005).

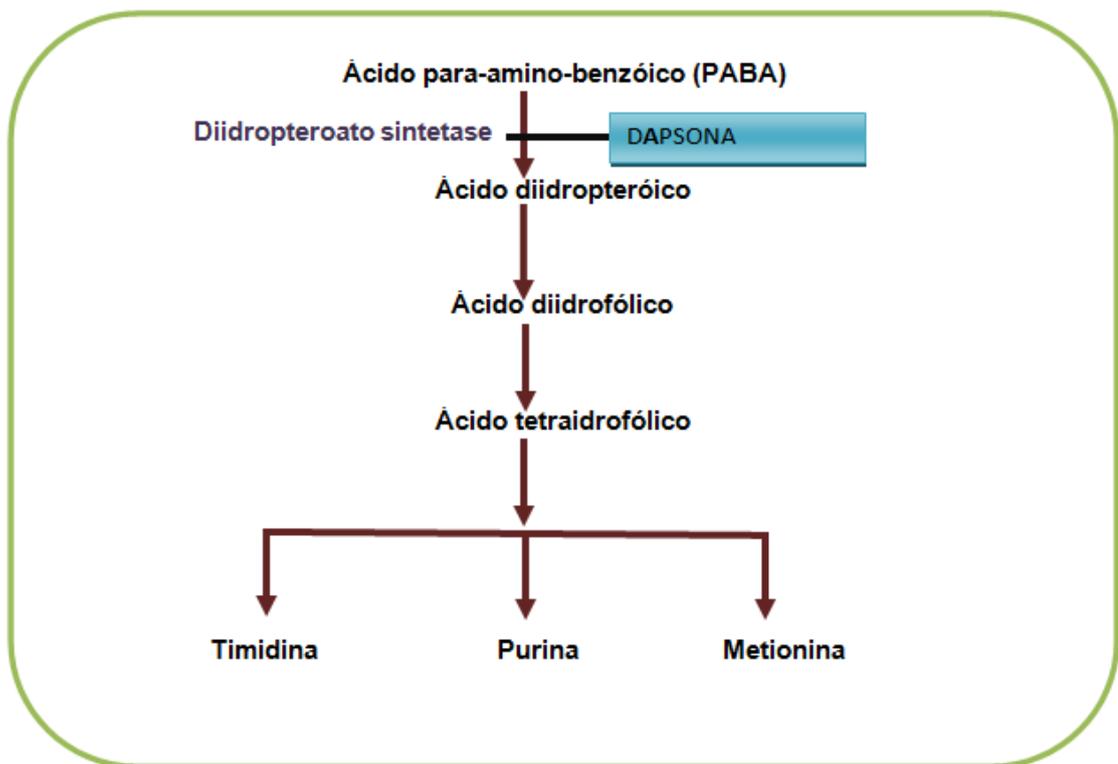


Figura 3 - Mecanismo de ação da Dapsona no interior de microrganismos  
Fonte: Adaptado de FARHI et al. 2005

A Dapsona é utilizada em conjunto com a pirimetamina na profilaxia e no esquema alternativo no tratamento da toxoplasmose e da pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (PODZAMCZER et al. 1995; EL -SADR et al. 1998). Na malária causada por *Plasmodium falciparum* é preconizado em associação com o clorproguanil (clorproguanil-dapsona) como antimalárico de ação esquizonticida, no tratamento e em esquemas profiláticos contra infecções não complicadas por este protozoário. Também é preconizado pela OMS, seu uso nos esquemas poliquimioterápicos utilizados no combate à hanseníase (BRASIL/MS, 2009).

Este fármaco está disponível para administração por via oral, sendo que cerca de 80 a 85% é absorvido lentamente no trato gastrointestinal, apresentando

distribuição uniforme em todos os tecidos do organismo, contudo, tende a se depositar na pele, músculos e especialmente no fígado e rins. Podem-se encontrar resquícios de disulfona nestes órgãos até três semanas após o término da terapia com esta sulfona. A dapsona atravessa tanto a barreira hematoencefálica quanto a placenta e é excretado no leite materno. (PETERS et al. 1975; EDSTEIN et al. 1986; GATTI et al. 1997; WOLF et al. 2000; PANIKER e LEVINE, 2001). Aproximadamente, 70% do princípio deste fármaco encontra-se ligado a proteínas plasmáticas, com concentração plasmática variando entre 0,4 a 1,2 mg/L, após 24 h da ingestão de 100 mg da droga (ELLARD, 1966; SHEPARD, 1976; ZUIDEMA et al. 1986). A concentração plasmática máxima é alcançada dentro de 0,5 a 4 ou 8h (AHMAD et al.1981; PIETERS e ZUIDEMA,1986), sendo que são necessários em torno de 7 a 10 dias após o início da terapia com a dapsona para que seus níveis se estabilizem no sangue (LAMMKTAUSTA et al. 1979). Além disso, a Dapsona apresenta um longo tempo de meia vida, podendo ser encontrado no organismo até 35 dias após o término da terapia (FORD, 2000).

Seu processo de biotransformação ocorre no fígado por N-acetilação realizada pela enzima N-acetil-transferase e N-hidroxilação através da via citocromo P450 (figura 4) (GILL et al. 1995). Este segundo processo é o responsável pela produção de metabólitos hidroxilados, como a Dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH) e monoacetil dapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH), considerados responsáveis pelos distúrbios hematológicos, como hemólise e metemoglobina (MetHb), causados pelo uso deste fármaco (VAGE et al. 1994).



“Síndrome da Sulfona” (“rash” cutâneo, aumento de linfonodos, icterícia, hepatoesplenomegalia e linfocitose com linfócitos atípicos) (SÁNCHEZ- SALDAÑA, 2008).

Os distúrbios hematológicos, como a metemoglobinemia (MetHba) e hemólise são os achados tóxicos mais freqüentes durante o tratamento com este fármaco (GOULART et al. 2002) e se mostram significativos, mesmo em doses usadas normalmente para tratar a hanseníase (100 mg dapsona / dia) (HALIM e OGBEIDE, 2002). A presença destes está associada ao aumento na geração de ERO no interior dos glóbulos vermelhos (RONALD, 1985; CARRAZA, 1998; RIMIOLLI, 2006).

A MetHba é uma síndrome clínica causada pelo aumento da concentração de MetHb no sangue (UDEH et al. 2001), que pode ocorrer devido alterações congênitas (crônicas) na síntese ou no metabolismo da hemoglobina (Hb), ou em situações agudas de desequilíbrio nas reações de redução e oxidação (desequilíbrio redox) induzidas pela exposição a agentes químicos diversos, tais como: dapsona, Primaquina, cloroquina, bupivacaína, azul de metileno, nitroglicerina, lidocaína, nitroprussiato, sulfonamidas entre outros (GREER e SHANNON, 2005). A MetHba descreve o estado clínico em que mais de 1% da hemoglobina do sangue é oxidada à forma férrica, diminuindo a capacidade de transporte de oxigênio. Manifestações clínicas, como a dispnéia, náuseas e taquicardia ocorrem quando há níveis de até 30% de hemoglobina oxidada; letargia, estupor e perda de consciência resultam de níveis de aproximadamente 50%; níveis de 50 a 70% levam a arritmias cardíacas, falência circulatória e depressão neurológica, e níveis acima de 70% geralmente levam à morte (COLEMAN e COLEMAN, 1996).

Nos portadores de MetHb é possível observar os produtos da agressão oxidativa no interior dos eritrócitos, que podem levar a desnaturação da hemoglobina que se precipita sob forma de agregados polipeptídios insolúveis, denominados corpúsculos de Heinz (WINTERBOURN, 1990). Estes acontecimentos são consequência de processos oxidativos no interior dos eritrócitos, que ocorrem devido à geração de ERO, como  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  (KANIAS e ACKER, 2010).

### 2.3. Espécies reativas do oxigênio

Nos organismos aeróbios, o oxigênio é utilizado como meio de obtenção de energia. Contudo, apesar desta molécula desempenhar um papel fundamental no processo de fosforilação oxidativa permitindo ao nosso organismo utilizar a energia proveniente da dieta com maior eficiência, uma pequena fração do seu consumo mitocondrial é transformada em espécies reativas do oxigênio (ERO) (CHANCE, 1979; JI, 1999).

As ERO, oxi-radical ou intermediários da redução do oxigênio são moléculas que se originam normalmente em consequência da redução parcial do oxigênio, através de uma série de transferências monoelétrônicas (SIES, 1993; MONTERO, 1996). As ERO apresentam uma grande instabilidade e reatividade, sendo capazes de afetar a homeostase redox das células por apresentar propriedades oxidantes como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou redutoras tal qual o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (THORPE et al. 2004; TEMPLE et al. 2005).

A origem das ERO pode ser endógena e exógena. As fontes endógenas são representadas pela cadeia de transporte eletrônico mitocondrial, peroxissomal e microsomal (citocromo P-450 e citocromo b5), enzimas citoplasmáticas como a xantina oxidase, catecolaminas, riboflavina e enzimas fagocíticas como a mieloperoxidase e NADPH-oxidase. Como fontes exógenas de oxi-radicais podem-se citar, xenobióticos (incluindo fármacos e químicos ambientais), uso do cigarro, componentes da dieta como os sais de ferro, cobre, compostos fenólicos e as radiações ionizantes (MONTEIRO, 1996).

Em baixas concentrações estão envolvidas normalmente em processos fisiológicos de nosso organismo, podendo atuar como segundo mensageiro, ativando proteínas alvo ou modificando o estado redox intracelular. Além disso, podem atuar como sinalizadores intracelulares e em processos de produção de energia (HALLIWELL et al. 2000). Desempenham papel importante na função reprodutiva normal, pois são essências para que o espermatozóide adquira capacidade de fertilização, podendo funcionar como moléculas sinalizadoras no processo de formação do embrião (TAYLOR, 2001; AGARWAL et al. 2003). Nos mecanismos de defesa do organismo participam da produção de espécies bactericidas no interior dos fagócitos via NADPH oxidase, funcionando como um

fator de estimulação de crescimento celular ou na ativação de receptores de citocinas, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), (TNF-  $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-3, fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) e na expressão gênica do receptor de IL-2 (IL-2R) ( DROGE, 2002).

Entretanto, o excesso destas espécies no organismo pode ocasionar efeitos prejudiciais, pois nestas condições, reagem com biomoléculas celulares, como carboidratos, proteínas, lipídios de membrana, enzimas e ácidos nucléicos, provocando mudanças estruturais e conseqüente alteração da função biológica destes constituintes celulares acarretando efeitos deletérios no organismo (SIES, 1991; YOUNGSON,1995; ROVER JÚNIOR et al. 2001; HALLIWELL e WHITEMAN, 2004; HICKS et al. 2006).

Estas espécies são classificadas em radiculares (quadro 3), átomos ou moléculas que e têm elétrons desemparelhados na sua última camada ou não radiculares(quadro 3) que não apresentam esta característica, mas que são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (Barbosa et al. 2008).

<b>ERO</b>	<b>Radicalares:</b> hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ), alcoxila ( $\text{RO}\cdot$ ), hidroperoxila ( $\text{HO}_2\cdot$ )
	<b>Não-Radicalares:</b> peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), ácido hipoboroso ( $\text{HOBr}$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), peróxidos orgânicos ( $\text{ROOH}$ )

Quadro 3: Principais espécies reativas de oxigênio  
Fonte: Adaptado de BARREIROS et al. 2006

As três espécies reativas de oxigênio mais importantes são:  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o  $\text{HO}\cdot$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

### 2.3.1. RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO

É formado após a primeira redução do oxigênio e ocorre em quase todas as células aeróbicas, sendo gerado por uma série de processos fisiológicos, como: na cadeia respiratória da mitocôndria, via xantina oxidase, via NADPH oxidase em

células fagocíticas, via síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e no sistema NADPH citocromo P-450 redutase microssomal (RIBEIRO et al. 2005)

É um oxidante fraco e atua na maioria das reações como agente redutor e sua citotoxicidade está relacionada à sua capacidade de gerar outras espécies reativas tais como, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), e o radical hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ) (REPETTO e LLESUY, 2002)

Seu efeito tóxico está relacionado à sua capacidade de se difundir através de membranas celulares e de reagir com metais de transição, principalmente o Ferro (reação de Haber-Weiss), dando origem ao radical  $\text{HO}^\cdot$  ( FERREIRA e MATSUBARA, 1997) , como mostra a equação 1, 2 e 3.

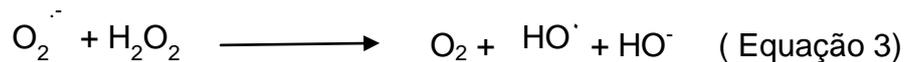


Figura 5- Reação de Haber-Weiss  
Fonte: Ferreira e Matsubara, 1997

### 2.3.2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O peróxido de hidrogênio não é propriamente um radical livre, já que não apresenta nenhum elétron desemparelhado na sua camada de valência (MONTERO, 1996) sua formação acontece em virtude da dismutação e redução do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , assim como pela ação de peroxidases e oxidases peroxissomais. Apresenta baixa reativa e difundiu-se facilmente através de membranas celulares (BARTOSZ, 2009).

Estudos mostram que o peróxido de hidrogênio é produzido endogenamente em certos tipos celulares, em resposta a ativação por citocinas e fatores de crescimento. No meio intracelular, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  desempenha o papel de segundo mensageiro, estimulando ativação de proteínas quinases envolvidas na expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e no controle do ciclo celular (HENSLEY et al. 2000). Células expostas ao peróxido mostram o acúmulo nuclear de um fator de

transcrição (Yap1p) responsável pela regulação da expressão de genes envolvidos na tradução de antioxidantes chaves, como a catalase, a superóxido dismutase citosólica, citocromo c peroxidase e todas as enzimas participantes da síntese e metabolismo da glutathione (TEMPLE et al. 2005).

O seu efeito tóxico está relacionado ao fato de reagir com metais de transição, principalmente o Ferro (Reação de Fenton), dando origem ao radical HO· (BARREIROS et al. 2006), como mostra a equação 4, 5 e 6.



Figura 6- Reação de Fenton  
Fonte: Barreiros et al 2006

### 2.3.3. RADICAL HIDROXIL

O radical HO· é gerado no organismo pela reação de Fenton, reação de Haber-Weiss, sendo considerada a espécie mais reativa e mais lesiva conhecida em sistemas biológicos, pois apresenta combinação extremamente rápida com metais e outros radicais no próprio sitio onde foi produzida (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Além disso, apresenta reatividade com todas as macromoléculas do organismo, podendo causar danos aos ácidos nucléicos, proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial.

Com relação ao DNA, ele reage tanto com bases nitrogenadas como a desoxirribose. Nas proteínas, HO· reage com aminoácidos, preferencialmente a cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina, podendo gerar alterações na conformação protéica que podem levar ou não a perda de atividade enzimática, assim como dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular (BARREIROS et al. 2006).

## 2.4. Espécies reativas de nitrogênio

As espécies reativas de nitrogênio (ERN) incluem o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), o óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (RÓDENAS et al. 1998). Dentre estas espécies, o óxido nítrico é o mais importante podendo atuar como molécula sinalizadora em vários processos fisiológicos, tais como, neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, relaxamento de células musculares lisas, bem como, regulação da resposta imune e mecanismos de defesa (BERGENDI et al. 1999).

O  $\text{NO}$  é uma pequena molécula gasosa, que apresenta rápida meia vida e se difunde diretamente pela membrana plasmática (SCHIMIDT e WALTER, 1994). É produzido normalmente nos tecidos a partir do aminoácido L- arginina, por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintetase (NOS) (figura 7) (GHAFOURIFAR e CADENAS, 2005).

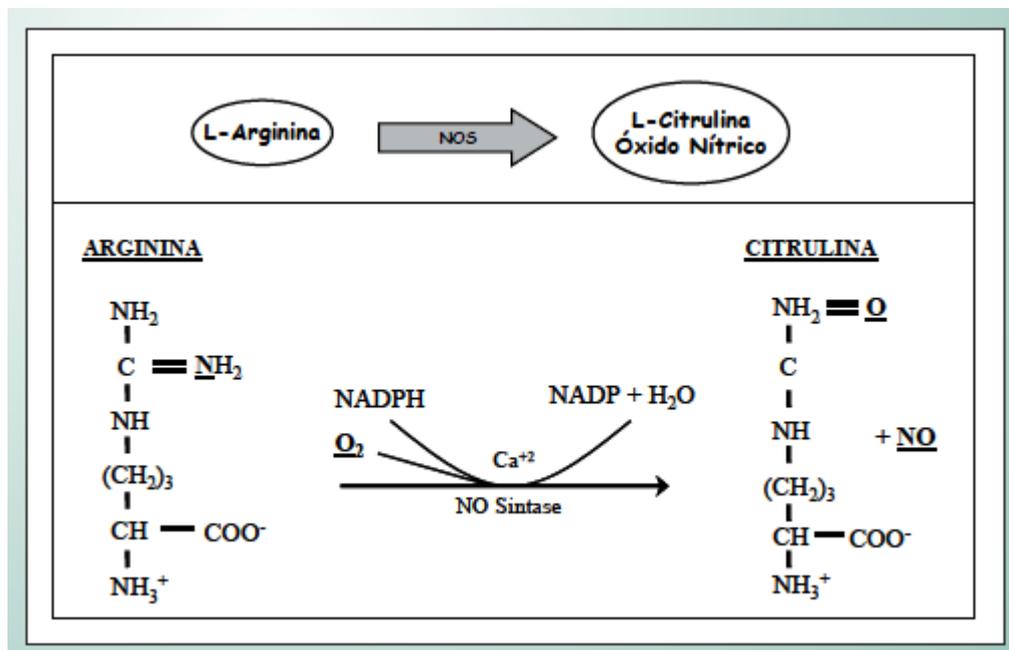


Figura 7- Reação catalisada pela óxido nítrico sintetase  
 Fonte: ZAGO e ZANESCO, 2006

A via de produção do  $\text{NO}$  depende da isoforma de óxido nítrico sintetase (NOS) estimulada. A NOS constitutiva (cNOS) é dependente de íons cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) e

calmodulina, e a NOS induzida (iNOS) é produzida durante processos inflamatórios (MONCADA e HIGGS, 1991; MARLETTA, 1994). A isosforma constitutiva compreende a NOS neuronal (nNOS, tipo I) presente normalmente nos neurônios (KNOWLES et al. 1989), e a NOS endotelial (eNOS, tipo III) presente normalmente em células endoteliais vasculares (MONCADA e HIGGS, 1991) e plaquetas (RADOMSKI et al. 1991). Durante a produção constitutiva deste radical são geradas concentrações nanomolares por períodos curtos de tempo. Nesta situação, o radical sintetizado reage diretamente com certas moléculas, principalmente com o grupo heme de certas proteínas (nitrosilação) formando adutos nitrosil-ferro (Fe-NO) responsáveis por seus efeitos fisiológicos no organismo (GRENFELL et al. 2006).

A iNOS (tipo II) tem sua expressão induzida por citocinas, polissacarídeos e/ou antígenos, como a endotoxina que pode ativar macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas (MONCADA e HIGGS 1991). Esta isoforma requer algumas horas para ser expressa, porém após sua síntese ocorre a produção de grandes quantidades de NO, que permanece constante até que as concentrações de L-arginina ou dos co-fatores necessários para sua síntese estejam diminuídas ou em caso de morte celular (DUSTING e MACDONALD, 1995). O NO produzida via iNOS está relacionada ao desencadeamento de processos, como a asma (HAMID et al. 1993), artrite reumatóide (SAKURAI et al. 1995), lesões ateroscleróticas ( BUTTERY et al. 1996), tuberculose (NICHOLSON et al. 1996), esclerose múltipla (BAGASRA et al. 1995), Alzheimer (VODOVOTZ et al. 1996) e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (MANNICK et al. 1996).

Em processos infecciosos, células como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais ativadas secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio no local da infecção. A ação citotóxica indireta do NO consiste principalmente na sua reação com os intermediários do oxigênio acarretando em uma ação tóxica cooperativa, na qual são produzidos potentes oxidantes, mais reativos e tóxicos, como o radical ONOO<sup>-</sup>. Esses radicais uma vez sintetizados podem sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos, como a tirosina gerando nitrotirosina e as bases do DNA, em particular a guanina, na qual o produto principal é a 8-nitroguanina (DARLEY-USMAR et al. 1995; EISERICH et al. 1996; HALLIWELL 2000).

## 2.5. Sistema Antioxidante

Geralmente existem um ou mais mecanismos reguladores redox que são ativados em resposta ao aumento intracelular de ERO, com o objetivo de prevenir danos oxidativos ( PERVAIZ e CLEMENT, 2007). Os mecanismos de defesa contra as ERO envolvem processos de prevenção, mecanismos de reparo, defesas físicas e antioxidantes (SIES, 1997; VALKO et al. 2007 ).

Considera-se um agente antioxidante todo aquele que regenera um substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo, mantendo desta forma o equilíbrio dos processos de oxi-redução (HALLIWELL, 2000). A forma de classificação mais utilizada dos antioxidantes consiste em dividi-los em enzimático e não enzimáticos (HICKS et al. 2006).

Os antioxidantes enzimáticos (figura 8) são um grupo de enzimas especializadas, cuja finalidade é reagir com compostos que causam danos oxidantes e detoxificá-los do organismo. Todas as células eucarióticas contam com numerosas enzimas que desempenham esta tarefa, todavia, a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peróxidase (GSH-Px), catalase (CAT) são as três principais classes deste tipo de defesa. Os compostos não enzimáticos agem no processo de defesa contra o dano oxidante, como co-fatores das enzimas antioxidantes ou neutralizando diretamente as ERO produzidas (KRINSKI, 1992; SIES, 1997). Dentre estas substâncias destacam-se: o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), glutathiona reduzida (GSH), carotenóides, flavonóides, ácido úrico,  $\beta$ -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

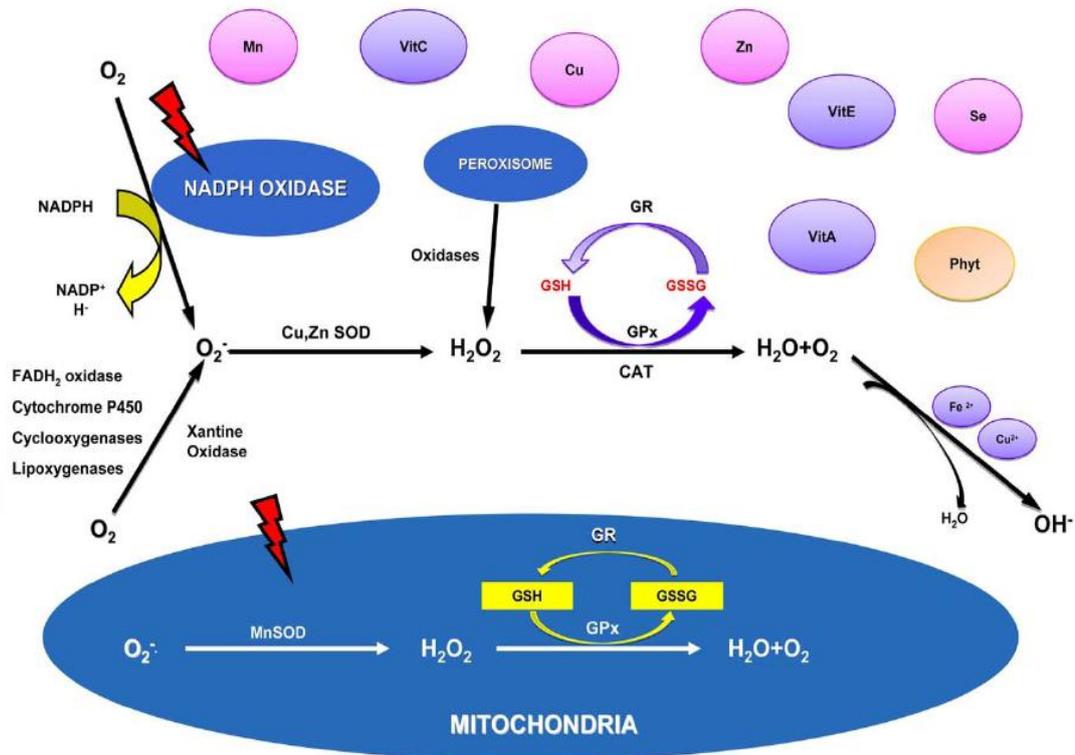


Figura 8-Representação esquemática dos principais mecanismos de defesa contra ERO. Cu= cobre;  $Fe^{+2}$  = íon ferroso ;  $Cu^{+2}$  = íon cúprico; Mn= manganês; Se= selênio; Zn= zinco;  $H_2O_2$ =peróxido de hidrogênio;  $H_2O$ =água;  $O_2$ = oxigênio;  $O_2^{\cdot-}$  =radical ânion superóxido;  $FDH_2$ =flavina adenina dinucleotídeo reduzida; GPx= glutatona peroxidase; GR= glutatona redutase; GSH= glutatona reduzida; GSSG= glutatona oxidada; CAT= catalase; CuZnSOD= superóxido dismutase dependente de cobre e zinco; MnSOD= superóxido dismutase dependente de manganês; Vit A= vitamina A; Vit C= vitamina C; Vit E= vitamina E  
 Fonte: PÉREZ-MATUTE et al. 2009

Dentre o sistema antioxidante existente nos organismos, a glutatona desempenha papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos, assim como na defesa das células contra o estresse oxidativo (JOSEPH et al. 1997).

A GSH é um tripeptídeo solúvel em água, composto de ácido glutâmico, cisteína e glicina. Como um importante antioxidante, a GSH atua na detoxificação de uma variedade de compostos eletrofílicos e peróxidos via catalisação por glutatona S-transferase (GST) e glutatona peroxidase (GSH-Px) (figura 9) (ANDERSON, 1998).

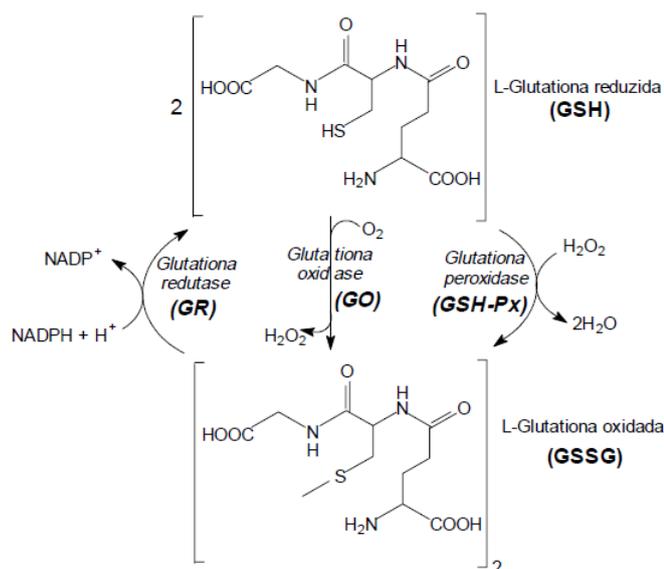


Figura 9- Interconversão de glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR).  
Fonte: Rover Júnior et al. 2001

As glutatonas oxidases pertencem à classe de sulfidrilas oxidases dependentes de flavina que catalisam a oxidação de proteínas e peptídeos com a formação de dissulfetos e peróxido de hidrogênio (HUBER et al. 2008)

A GSH-Px converte peróxido de hidrogênio a água, oxidando a GSH ao seu correspondente dissulfeto (GSSG). GSH é regenerada pela GR por intermédio da oxidação de NADPH (IMAI e NAKAGAWA, 2003).

Este sistema antioxidante desempenha várias funções nos mamíferos, como, na remoção de espécies reativas, como peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídios prevenindo desta forma a oxidação de biomoléculas. É essencial na regulação do estado redox intracelular, na proliferação celular do processo de apoptose, na produção de citocinas e resposta imune, na transdução de sinais e na expressão gênica, na síntese de proteínas e DNA, assim como, na manutenção e integridade mitocondrial. Participa de processos metabólicos, como na síntese de leucotrienos e prostaglandinas, armazenamento e transporte de cisteína (WU et al. 2004).

A principal função deste sistema é proteger os constituintes celulares dos efeitos danosos do hidroperóxido formado durante o metabolismo celular normal (DRÖGE, 2002).

Outro componente importante na defesa antioxidante é a SOD. Esta enzima é uma metaloproteína, que está presente no organismo dos mamíferos em três

isoformas: superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (CuZnSOD), superóxido dismutase extracelular (EcSOD) e superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) (figura 10). As isoformas da SOD são expressas em locais distintos na célula. A CuZnSOD ou SOD1 é encontrada no citosol, lisossomos, núcleo e espaço entre as membranas internas e externas da mitocôndria. A MnSOD ou SOD 2 presente no interior da mitocôndria. A terceira forma, CuZnSOD ou SOD 3 é expressa no meio extra-celular (principalmente secretada pelas células musculares lisas vasculares, funcionando como importante modulador do tônus muscular e inibidor da aterogênese (STRALIN et al. 1995; OURY et al. 1996; NONAKA et al. 2001)

Estas isoformas apresentam conformações diferentes, porém exercem a mesma função: são responsáveis pela dismutação do  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  e  $H_2O$  (MCCORD e FRIDOVICH, 1969; FARACI e DIDION, 2004).

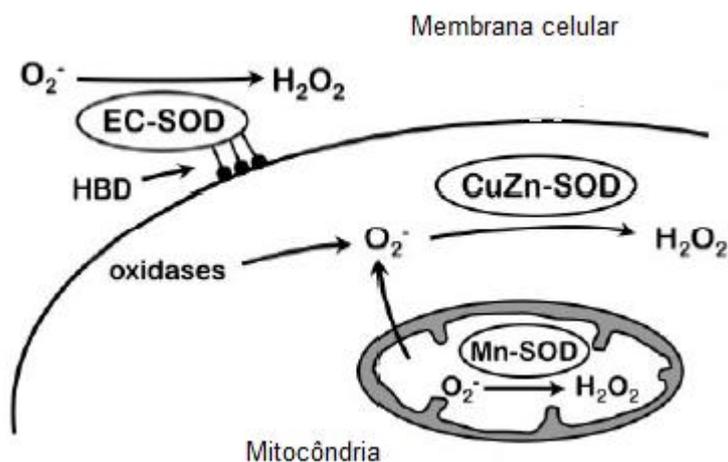


Figura 10- Ilustração esquemática da localização das três isoformas de superóxido dismutase. SOD: superóxido dismutase; CuZn-SOD= superóxido dismutase dependente de cobre-zinco; EC-SOD: superóxido dismutase extracelular; Mn-SOD: superóxido dismutase dependente de Manganês. Fonte: FARACI e DIDION, 2004

Além da SOD, outro agente antioxidante importante no processo de eliminação de ERO do organismo é CAT. Esta enzima é uma heme-proteína tetramérica, considerada a principal responsável pela degradação do  $H_2O_2$  de organismos aeróbicos e anaeróbicos (figura 11) (SWITALA e LOEWEN, 2002). Em mamíferos, incluindo o homem, é expressa em todos os tecidos, sendo encontrada

em elevadas quantidades, no fígado, eritrócitos e rins (SCHISLER e SINGH, 1987; DEISSEROTH e DOUNCE, 1970).

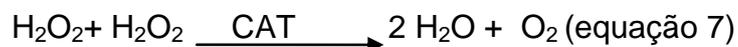


Figura 11- Eliminação do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase.

Fonte: SWITALA e LOEWEN, 2002

## 2.6. Estresse oxidativo

Normalmente, nos organismos aeróbicos e saudáveis existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. Nesse contexto, as defesas antioxidantes conseguem controlar os níveis de ERO produzidos naturalmente pelo processo de obtenção de energia (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007). Contudo, existem condições em que há o rompimento deste desequilíbrio, e o excesso destas moléculas provocam danos a macromoléculas levando a alterações de processos celulares fundamentais (ROCHE e ROMERO-ALVIRA, 1996).

O estresse oxidativo (figura 12) é definido como o evento que ocorre em organismos aeróbicos, caracterizado pelo desequilíbrio entre a proporção de espécies reativas geradas e sua degradação, de modo que estas moléculas não são eficientemente neutralizadas, levando ao acúmulo de danos oxidativos em uma grande variedade de macromoléculas e a desorganização dos processos de sinalização celular resultando em alteração de processos metabólicos normais e perda de função fisiológica (SIES, 1991; SOHAL e WEINDRUCH, 1996; JONES, 2006).

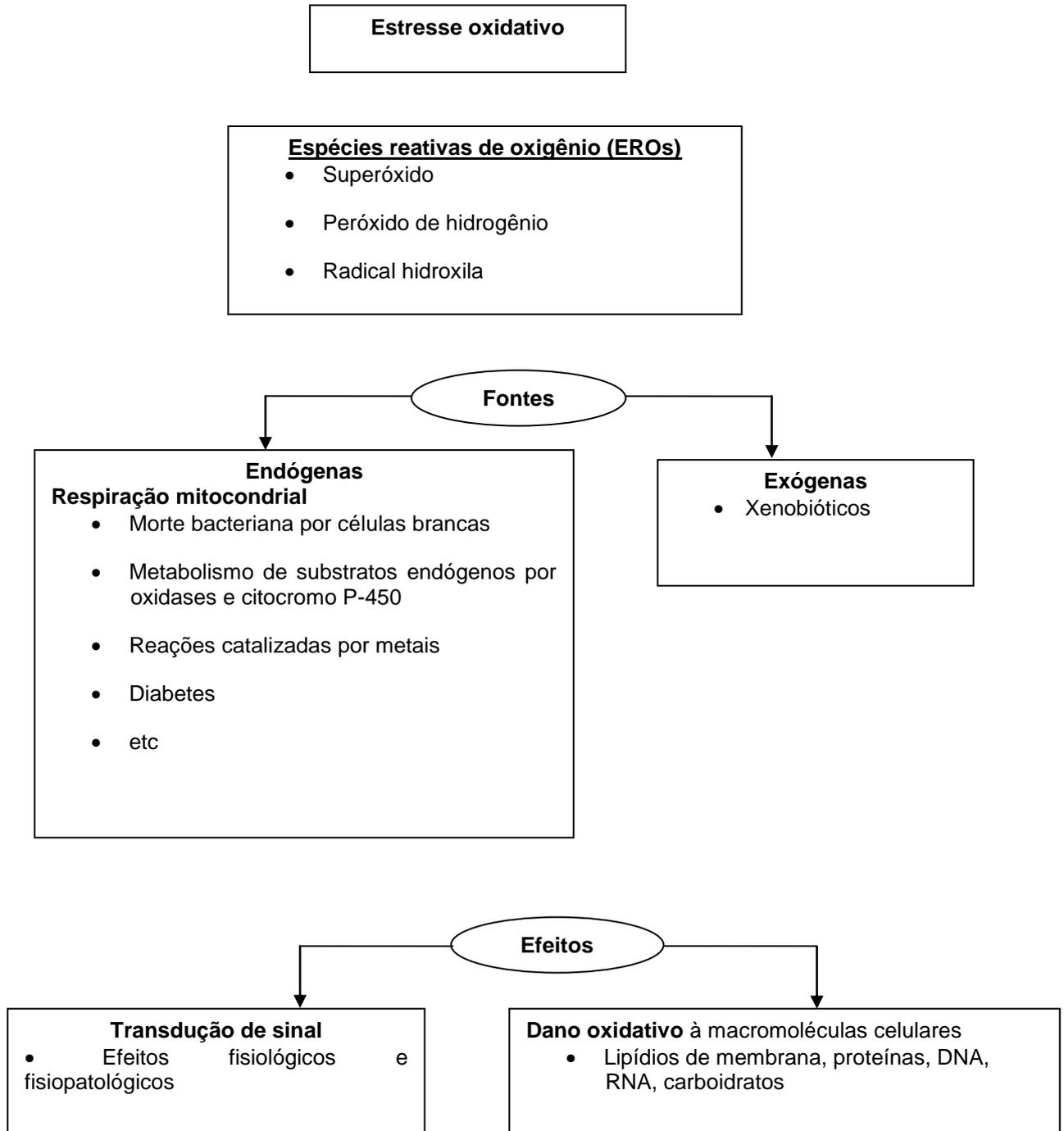


Figura 12- Fonte de EROs e mecanismo geral pelo qual o estresse oxidativo pode alterar a função celular

Fonte: WELLS et al. 2009

O estresse oxidativo é resultado de um distúrbio entre a produção e eliminação de espécies reativas, em consequência do aumento da produção destas espécies ou por uma deficiência nas defesas antioxidantes que resulta no acúmulo intracelular de ERO e ERN. O excesso destas espécies pode levar a mudanças persistentes nos mecanismos de transdução de sinais e expressão gênica,

acarretando nos quadros de estresse relatados em diversas patologias (PERVAIZ e CLEMENT, 2007).

A intensidade e patogenicidade do estresse oxidativo vão depender das concentrações locais de espécies reativas e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo, compartimentalização celular destes processos e fatores de solubilidade e difusibilidade destes agentes (GOW e ISCHIROPOULOS, 2001). Com isso, pode-se dividir o processo de desenvolvimento do estresse oxidativo em três níveis de progressão ou intensidade: adaptação, estresse agudo e estresse crônico (figura 13). Na etapa de adaptação, o estresse oxidativo já está instalado e a célula procura neutralizar o excesso de espécies reativas presentes no meio, através de mecanismos que levam a super expressão gênica e ativação enzimática dos sistemas antioxidantes. Na fase aguda, estão envolvidas espécies menos reativas como o  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$ , que ao serem geradas em uma proporção maior afetam as características de processos celulares vitais de regulação. A fase crônica é uma etapa mediada principalmente pelo radical  $HO^{\cdot}$  e se caracteriza pelo rompimento e modificação de biomoléculas com consequente liberação de produtos de oxidação que por sua vez são mais reativos, amplificando assim, o dano celular e tissular (HICKS et al. 2006).

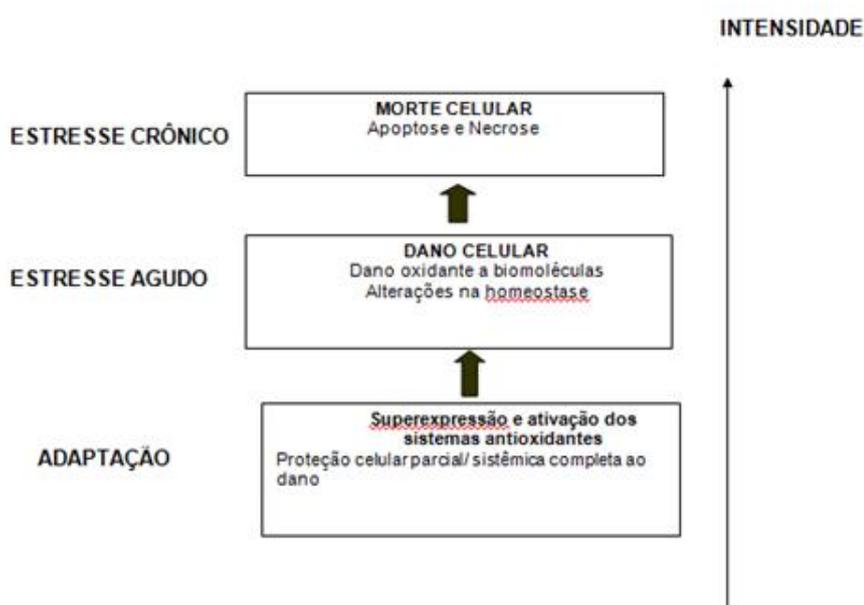


Figura 13- Etapas de evolução do estresse oxidativo  
Fonte: Adaptado de HICKS et al. 2006

O estresse oxidativo está relacionado a uma série de patologias, tais como, doenças degenerativas, como a Alzheimer, mal de Parkinson, doença de Huntington, esclerose amiotrófica lateral (SORG, 2004; MIGLIORE e COPPEDÈ, 2009), insuficiência renal aguda, crônica e em diálise, hipertensão arterial, diabetes mellitus, aterosclerose, câncer e síndrome de Down (GUERRA, 2001).

Além disso, alguns estudos têm associado estresse oxidativo a doenças infecciosas, tal como, a hanseníase. O que se tem observado nesta patologia é que alterações imunológicas observadas no decurso da doença, como, ativação de macrófagos por citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , estimulam a produção de ERO e ERN, que atuam nestas condições como agentes bactericidas, para destruição do bacilo de hansen através de um processo de oxidação (FOSS, 1995).

## 2.7. Estresse oxidativo e hanseníase

A efetiva resposta imunológica do organismo hospedeiro contra o *M. leprae* é mediada principalmente pelos macrófagos ativados. Estes produzem ERO e ERN que facilitam a eliminação dos bacilos intracelulares através de um processo de oxidação dos parasitos (Foss et al. 1995).

Estudo de Schon et al. (2004) mostrou a presença de espécies reativas como o óxido nítrico NO e ONOO<sup>-</sup> produzidos por macrófagos nas lesões de pele de pacientes com hanseníase com a forma do tipo borderline, sugerindo que estas espécies poderiam estar relacionadas com o dano nervoso observado nesses pacientes.

O estresse oxidativo nestes pacientes também pode estar associado à defesa antioxidante reduzida. Nesse sentido, Reddy et al. (2003) avaliaram o estado antioxidante de pacientes com hanseníase antes, durante e após o tratamento com o PQT, revelando que a capacidade antioxidante total e os níveis de SOD, CAT encontravam-se reduzidos em pacientes multibacilar. Além de também haver redução no sistema da glutatona (glutatona redutase e glutatona peroxidase) nos indivíduos hansenícos sem tratamento, sugerindo que a redução do potencial antioxidante seja dependente do tipo de hanseníase e da carga bacilar no paciente (PRASAD et al. 2007; PRASAD et al. 2008; ABDEI-HAFEZ et al. 2010).

Estudo realizados por Foster et al. (1991) relatou que pacientes hansênicos apresentavam níveis reduzidos de selênio, metal de fundamental importância para a atividade da selenoproteína GSH-Px. Outro trabalho nesta área mostrou que a redução das concentrações de metais como o selênio, na hanseníase, pode estar associada ao fato de que o *M. leprae* possa remover do tecido do hospedeiro este metal, durante sua multiplicação e crescimento (JAIN et al. 1995).

A progressiva diminuição de enzimas antioxidantes, bem como de antioxidantes não enzimáticos como a GSH no sangue de pacientes com hanseníase sem tratamento, pode estar relacionada com o aumento da peroxidação lipídica nesses pacientes. Além da avaliação da peroxidação lipídica em amostras biológicas de pacientes com hanseníase (soro, plasma e tecidos) encontrar-se aumentada nesses indivíduos, sugerindo que a elevação de malondialdeído está relacionada com o espectro da hanseníase, aumentando significativamente nas formas BB, BL e LL e de acordo com o índice bacilar destes pacientes (LIMA et al. 2007; PRASAD et al. 2007, ABDEL-HAFEZ et al. 2010)

Nesse sentido, a avaliação de estresse oxidativo através da análise do perfil oxidante/antioxidante nesta população pode ser um fator importante que auxilie o tratamento, controle e prognóstico desta doença.

## **2.8. Estresse oxidativo e dapsona**

O quadro oxidativo provocado pelo uso da dapsona tem sido atribuído, principalmente ao seu metabólito N-hidroxilado denominado DDS-NOH. A presença de eventos hematotóxicos como MetHb e hemólise está sendo associada a formação deste composto (COLEMAN e JACOBUS, 1993).

Estudos sugerem que o mecanismo de toxicidade do DDS-NOH nos eritrócitos, ocorreria em virtude da auto-oxidação deste metabólito. Como resultado deste processo oxidativo, haveria a formação de MetHb e de ERO como o  $O_2^-$  (CRIBB et al. 1991).

Acredita-se que o aumento na produção de ERO em virtude da formação da DDS-NOH possa estar envolvido em processos que levam a anemia hemolítica induzida por dapsona (BRADSHAW et al. 1997).

A literatura tem demonstrado que a DDS-NOH além de contribuir para formação de ERO, tem sido relacionada à depleção das defesas antioxidantes do organismo.

Estudo realizado por Ciccoli et al. (1999) mostrou a presença de eventos tóxicos mediados pela Dapsona em eritrócitos de camundongos, nos quais as células tratadas com DDS-NOH apresentaram aumento significativo na formação de metemoglobina, bem como depleção dos níveis de GSH se comparado ao controle. Tal fato sugere que a presença deste metabólito hidroxilado foi essencial para desenvolvimento de efeitos hematotóxicos.

Posteriormente, Veggi et al. (2008) avaliaram a atividade de enzimas hepáticas antioxidantes como, GSH-Px, CAT e SOD, bem como a viabilidade celular de hepatócitos de camundongos após tratamento com dapsona ou seu metabólito hidroxilado, com isso sugeriu a hipótese de que o fármaco induziu estresse oxidativo hepático, sendo seu composto N-hidroxilado, o principal mediador deste evento tóxico. Além disso, estes autores relataram que o desequilíbrio oxidante induzido pela Dapsona parece envolver tanto a produção aumentada de ERO por um ciclo redox da DDS-NHOH, quanto por uma redução na atividade das enzimas envolvidas na defesa antioxidante.

Contudo, trabalho mais recente está demonstrando que a dapsona apresenta propriedade antioxidante. Trabalho publicado por Cho et al. (2010a), demonstrou que o uso da dapsona em fibroblastos diplóides humanos provoca aumento da atividade de enzimas como, CAT, GSH-Px, GR, bem como a razão GSH / GSSG neste tipo de células. Além disso, tem se proposto que a dapsona poderia ser utilizada como novo agente antioxidante em casos de intoxicação por paraquat, por inibir a geração da citosólica e mitocondrial de  $O_2^-$  (CHO et al. 2010b).

Logo, quando trata-se de estresse oxidativo e uso de dapsona, observa-se que este fármaco apresenta uma dualidade (oxidante/antioxidante) que precisa ser melhor estudada .

## 2.9. Monitoramento do estresse oxidativo

Existem diferentes estratégias para avaliar alterações no estado oxidante/antioxidante de um organismo, tais como, avaliação da capacidade antioxidante total, detecção de componentes do sistema antioxidante e aferição de produtos gerados a partir da oxidação de biomoléculas. A avaliação da capacidade antioxidante total pode ser determinada através da capacidade antioxidante trolox equivalente (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity- TEAC*), capacidade de absorvância de radicais-oxigênio (*Oxygen-Radical Absorbancy Capacity- ORAC*), habilidade do plasma em reduzir o ferro (*Ferric-Reducing Ability of Plasma- FRAP*). Entre outros métodos, pode-se detectar a produção direta das espécies reativas por fluorescência, quimiofluorescência, ressonância eletrônica spin (*electron spin resonanc- ESR*) ou mensurando a atividade oxidase. Outras formas utilizadas para aferição do estresse consistem em detectar indiretamente por métodos espectrofotométricos e cromatométricos a atividade das enzimas antioxidantes, como, a SOD, CAT, GSH-Px, GR, ou pela detecção de antioxidantes não enzimáticos, como, GSH, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, tocoferol, ácido úrico, ceruplamina, transferrina em tecidos, sangue e outros fluidos biológicos (PÉREZ-MATUTE et al. 2009).

A avaliação de danos oxidativos em macromoléculas, pode ser mesurada por aferição de produtos gerados a partir da oxidação de moléculas como proteínas, açúcares, ácidos nucleicos e lipídios. Por exemplo, quando há oxidação de lipídios, são gerados vários compostos como, malondialdeido (MDA), que pode ser quantificado e utilizado para avaliar dano oxidativo em lipídios. Para a detecção de danos em proteínas, utilizam-se métodos de detecção de grupos carbonilas. Pode-se também verificar os danos diretos provocados por estresse oxidativo à moléculas de DNA utilizando a técnica de ensaio cometa (VASCONCELOS et al. 2007).

Nesse sentido, estudos a cerca da avaliação do estresse oxidativo vêm adquirindo relevância significativa, haja vista, que os marcadores oxidativos desempenham importante papel na gênese de processos metabólicos que culminam na ocorrência de enfermidades crônicas degenerativas. Desta forma, esforços têm sido realizados no sentido de identificar marcadores para avaliação do estresse oxidativo, com o objetivo de sistematizar sua utilização no diagnóstico, bem como,

na elucidação de mecanismos e implicações biológicas do dano oxidativo, possibilitando o planejamento de ações eficazes no controle e prevenção de tais processos (MAYNE, 2003; REYES et al. 2006; VINCENT et al. 2007; BARBOSA et al., 2008).

Desta forma, acredita-se que, através da determinação da atividade de enzimas antioxidantes e danos oxidativo em pacientes que estejam submetidos ao tratamento com o PQT, possa-se estabelecer a relação entre a administração da dapsona e a ocorrência de estresse oxidativo, contribuindo desta forma com o desenvolvimento de linhas de pesquisas que visem esclarecer a participação de fármacos como fatores etiológicos no desenvolvimento de eventos adversos a longo e médio prazo. Assim como, estes estudos podem favorecer o desenvolvimento de novas terapêuticas baseadas em substâncias antioxidantes que previnam o estresse oxidativo presente em pacientes com doenças infecciosas e uso de terapêuticas bastantes tóxicas. Além disso, a identificação de futuros marcadores de estresse oxidativo e/ou terapêuticos na prática clínica, e a investigação de reações adversas provocados pelos medicamentos é de grande contribuição a área da saúde. Visto que, uma das maiores necessidades terapêuticas atuais é avaliação prognóstica precoce de quadros de injúrias teciduais ou melhorias terapêuticas provocadas pelo medicamento e/ou processos infecciosos, tal fato pode auxiliar profissionais da saúde a detectarem e intervirem precocemente nos danos ocasionados em pacientes com diferentes patologias, como a hanseníase.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Determinar as concentrações séricas de Dapsona em pacientes com Hanseníase antes e durante o tratamento com a forma multibacilar e paucibacilar, correlacionando-as com o desenvolvimento do estresse oxidativo.

#### 3.2. Objetivos específicos

- ❖ Dosar as concentrações plasmáticas de Dapsona nos pacientes com hanseníase na terceira dose supervisionada de poliquimioterapia;
- ❖ Determinar a concentração sanguínea de GSH em indivíduos sem a doença e nos pacientes com hanseníase antes e na terceira dose supervisionada de poliquimioterapia;
- ❖ Determinar as atividades das enzimas SOD e CAT em indivíduos sem a doença e nos pacientes com hanseníase antes e na terceira dose supervisionada de poliquimioterapia;
- ❖ Determinar a capacidade antioxidante total em indivíduos sem a doença e nos pacientes com hanseníase antes e na terceira dose supervisionada de poliquimioterapia;
- ❖ Determinar a concentração de óxido nítrico em indivíduos sem a doença e nos pacientes com hanseníase antes e na terceira dose supervisionada de poliquimioterapia;
- ❖ Avaliar a peroxidação lipídica em indivíduos sem a doença e nos pacientes com hanseníase antes e na terceira dose supervisionada de poliquimioterapia;
- ❖ Determinar do percentual de metemoglobina e presença de corpos de Heinz em indivíduos sem a doença e nos pacientes com hanseníase antes e na terceira dose supervisionada de poliquimioterapia;
- ❖ Fazer a correlação entre cada um dos parâmetros indicativos de estresse oxidativo avaliados no trabalho e as concentrações de dapsona, nos pacientes na terceira dose supervisionada de poliquimioterapia.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção das amostras de sangue**

Para a realização deste estudo, foram incluídos pacientes que deram entrada como casos novos de hanseníase, na Unidade de Referência Especializada Dr. Marcello Candia em Marituba, Pará (ANEXO B) e na Unidade Básica de Saúde do Guamá em Belém, Pará (ANEXO C).

Os voluntários foram esclarecidos quanto o objetivo do estudo e finalidade dos resultados, obedecendo aos Aspectos Éticos e Legais da Resolução 196/96. Os mesmos foram divididos em dois grupos: pacientes com a forma multibacilar (MB), e paucibacilar (PB). Para a alocação em um destes grupos levou-se em consideração o exame clínico e baciloscópico e eventualmente, biópsia de pele. As amostras foram coletadas antes de ser administrada a primeira dose supervisionada de PQT (D0) e logo após o paciente ter ingerido a terceira dose supervisionada (D3) de tratamento (dois meses após a primeira coleta). Em ambos os grupos foram coletados 10 mL de sangue venoso.

O grupo controle foi constituído de voluntários saudáveis, sem a doença que trabalhavam nas duas instituições e que se enquadravam nos critérios de exclusão, também estabelecidos aos pacientes com hanseníase. Foram excluídos do estudo, indivíduos que apresentaram histórico de etilismo, fumo, reação hansênica, diabetes de mellitus, problemas cardíacos e outras doenças sistêmicas ou co-infecções (a fim de evitar que esses fatores possam interferir nos parâmetros estudados). Como critério de inclusão na pesquisa tanto os indivíduos do grupo controle quanto os pacientes portadores de hanseníase deveriam apresentar as seguintes características: indivíduos de ambos os sexos e idade entre 20 a 45 anos (figura 14).

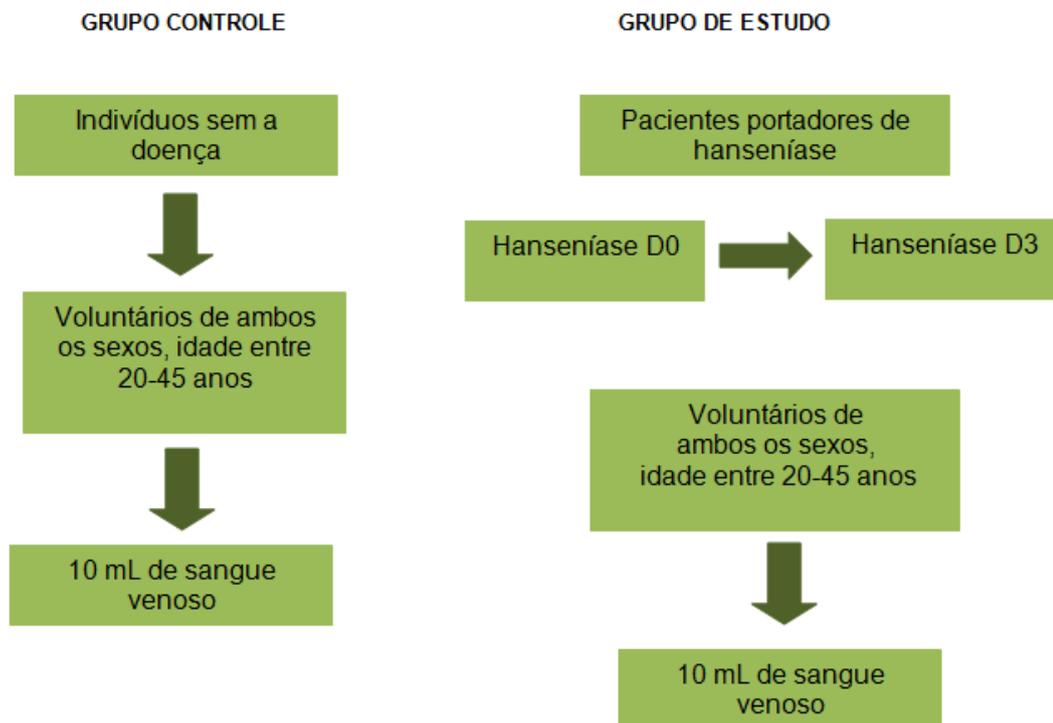


Figura 14- Representação dos grupos de voluntários participantes da pesquisa. Hanseníase D0= Grupo de pacientes com hanseníase antes do tratamento; Hanseníase D3= grupo de pacientes com hanseníase na terceira dose supervisionada.

A amostra de sangue coletada foi transferida para três vacuntaineres: um com EDTA para obtenção de sangue total, outro foi centrifugado para obtenção de plasma e o último sem EDTA para o soro (figura 15).

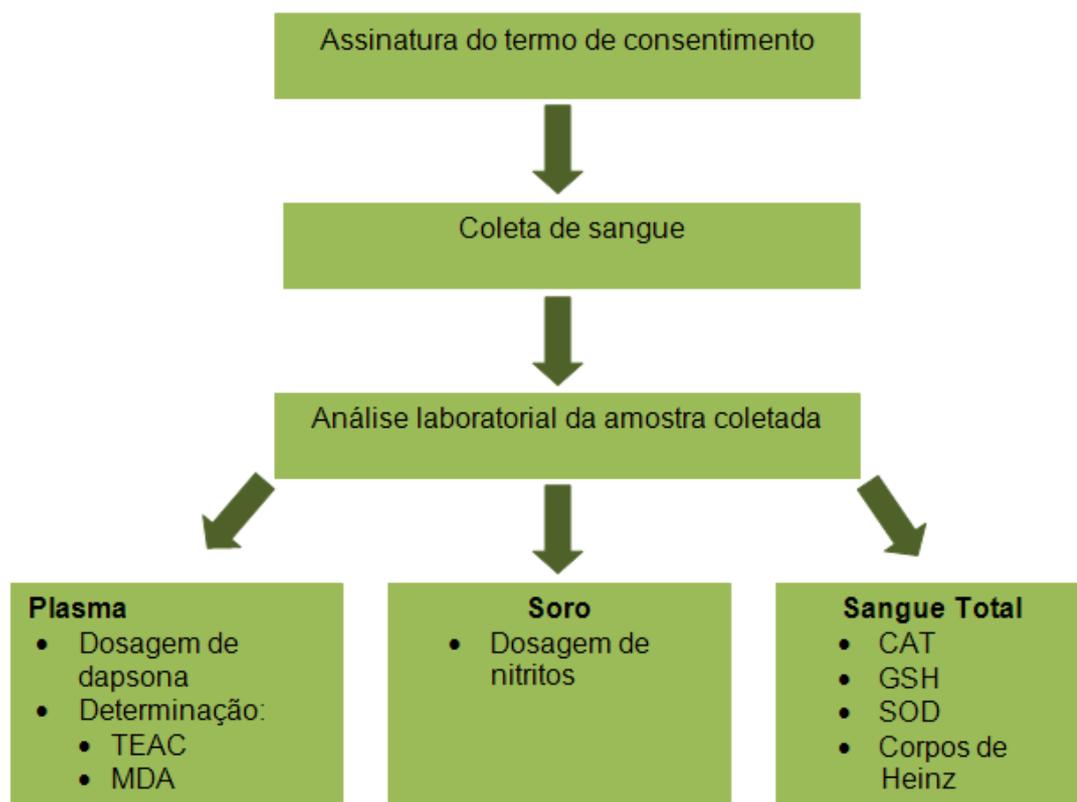


Figura 15- Delineamento da pesquisa

## 4.2. Análise laboratorial das amostras

### 4.2.1. DETERMINAÇÃO DOS TEORES PLASMÁTICOS DE DAPSONA:

As concentrações plasmáticas de dapsona foram determinadas de acordo com os procedimentos de extração e quantificação padronizados por Kwadir e Torano (2002), empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência (figura 16). O modelo do cromatografo utilizado no trabalho foi ProStarVARIAN, com coluna ODS RP18, 25cm X 4mm (figura 17), detecção no ultravioleta em comprimento de onda de 295 nm e fluxo de 1mL/min. Como fase móvel utilizou-se solução aquosa de

acetonitrila 30% e como padrão interno, solução de fenacetina de 100 µg/mL. As concentrações de dapsona das amostras foram expressas em µg/mL.

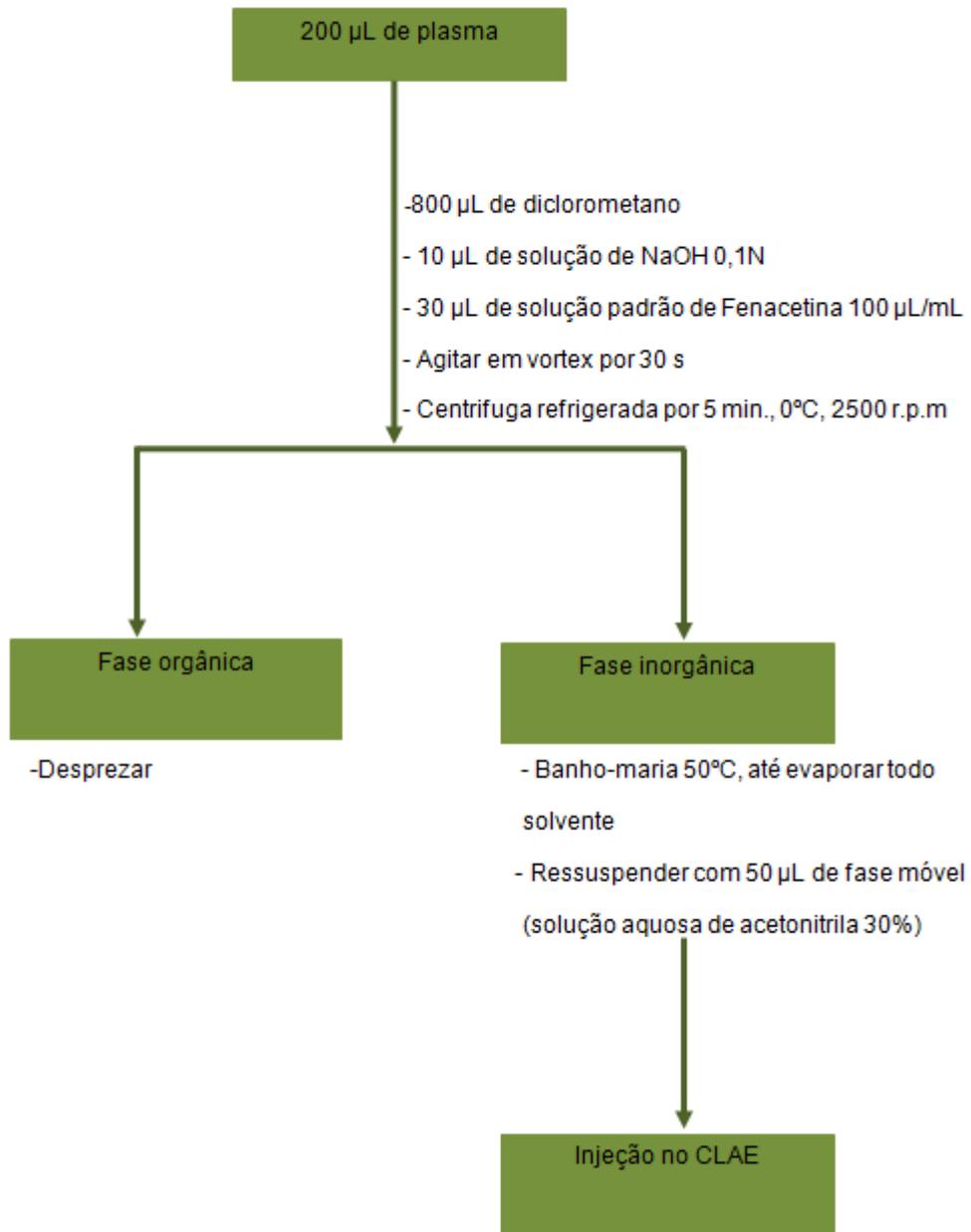


Figura 16- Procedimentos para determinação de dapsona em plasma de pacientes com hanseníase em D3.



Figura 17- Modelo ProStarVARIAN, com coluna ODS RP18, 25cm X 4mm  
Fonte: Acervo pessoal

## 4.2.2. AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

### 4.2.2.1. Determinação de glutatona reduzida

A determinação dos níveis intracelulares da forma reduzida da GSH baseia-se na capacidade da GSH em reduzir o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para ácido nitrobenzóico (TNB), o qual será quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm (VASCONCELOS et al. 2007).

Para as determinações das concentrações de GSH foi utilizada a metodologia adaptada de Ellman, 1959, Inicialmente é realizada lavagem de hemácias na amostra de sangue coletada. Em seguida, é retirada da papa de hemácias resultante uma alíquota de 200  $\mu$ L é adicionada a 1800  $\mu$ L de água destilada, para que seja realizada a determinação da concentração de GSH conforme mostra a ilustração abaixo (figura 18):

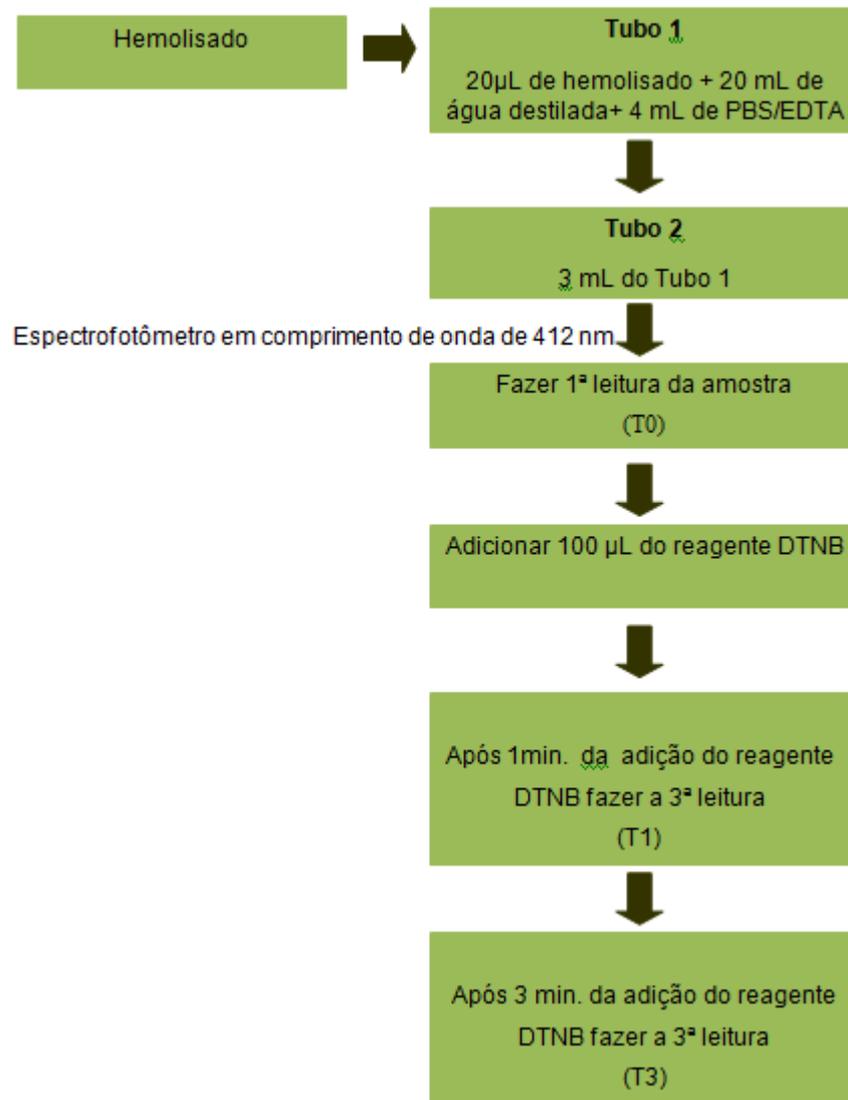


Figura18- Procedimento para determinação de glutathiona reduzida

A concentração de GSH das amostras foi expressas em µg/mL

#### 4.2.2.2. Determinação da superóxido dismutase

A determinação da atividade da SOD foi realizada segundo a técnica preconizada por McCord e Fridowich, 1969, adaptada. Esta metodologia detecção indireta da atividade da SOD, pois, a presença desta enzima na amostra, promove a conversão do  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , impedindo consequentemente a redução do citocromo C, que é detectada por espectrofotometria em comprimento de onda

de 550nm. A atividade da enzima SOD foi expressa em nmol/ mL de sangue. Abaixo (figura 19) está descrito o esquema para determinação da atividade enzimática.

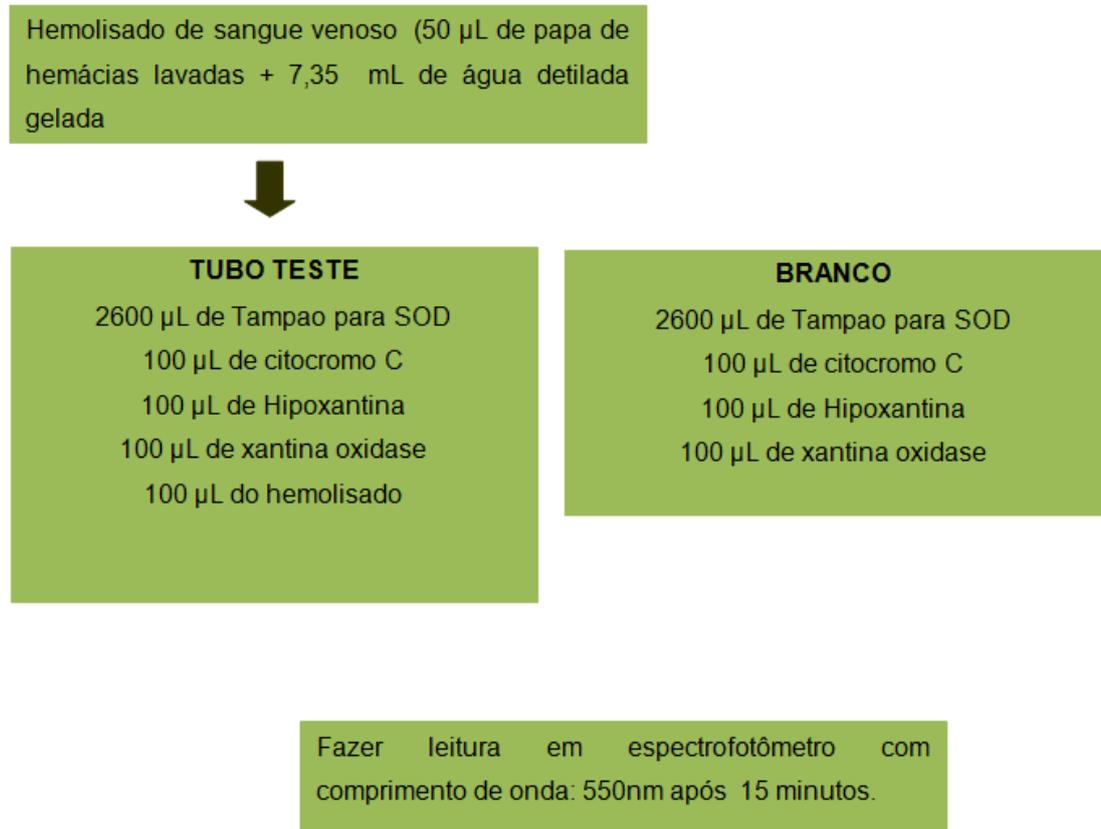


Figura 19- Procedimento para determinação de SOD

#### 4.2.2.3. Determinação da catalase

A determinação da atividade da enzima CAT foi realizada segundo a técnica adaptada de Beutler, 1975 (figura 20). Através desta metodologia, avalia-se a capacidade da enzima presente na amostra converter o  $H_2O_2$  em água e oxigênio. A leitura do decaimento do  $H_2O_2$  foi realizada por espectrofotometria no ultravioleta a 240nm e os valores de CAT foram expressos em unidade de catalase por g de proteínas (quantidade de catalase necessária para hidrolisar  $1\mu\text{mol}$  de  $H_2O_2/\text{min.}/\text{g}$  de proteína, à  $37^\circ\text{C}$ , pH 8).

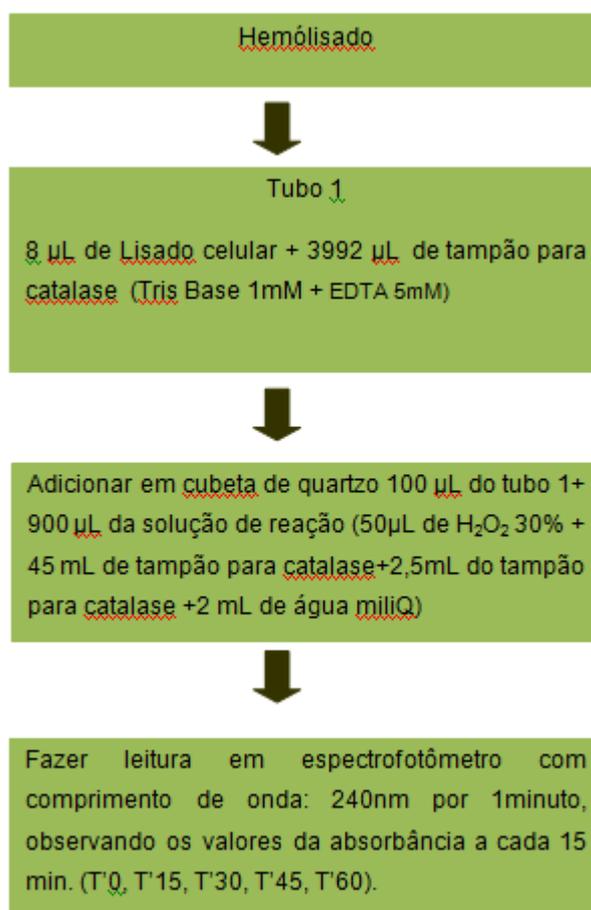


Figura 20- Procedimento para determinação da atividade da enzima catalase

#### 4.2.2.4. Avaliação da capacidade antioxidante total

Para determinação deste parâmetro foi realizado o teste TEAC (capacidade antioxidante Trolox equivalente), que consiste na inibição do cátion ABTS+• (radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio), por antioxidantes presentes na amostra (VASCONCELOS et al. 2007).

A metodologia empregada neste trabalho foi adaptada de Rufino et al. (2007), onde, inicialmente, são preparadas as seguintes soluções estoques: 7 mmol de ABTS e 2,45 mmol de persulfato de potássio. A partir da mistura destas duas soluções (88 µL de solução ABTS e 5 µL de persulfato) foi originada uma solução

de radical ABTS<sup>•+</sup>, que ficou em repouso em ausência de luz por 12 horas, originando uma solução azul marinho.

Após este período, foi preparada uma solução trabalho, onde, 1 mL de solução de radical ABTS<sup>•+</sup> foi misturado com etanol (P.A.) até a absorbância chegar próximo aos 0,7 em 734 nm. O percentual de inibição de ABTS<sup>•+</sup> é determinado em função do tempo e encontra-se esquematizada na ilustração abaixo (figura 21).

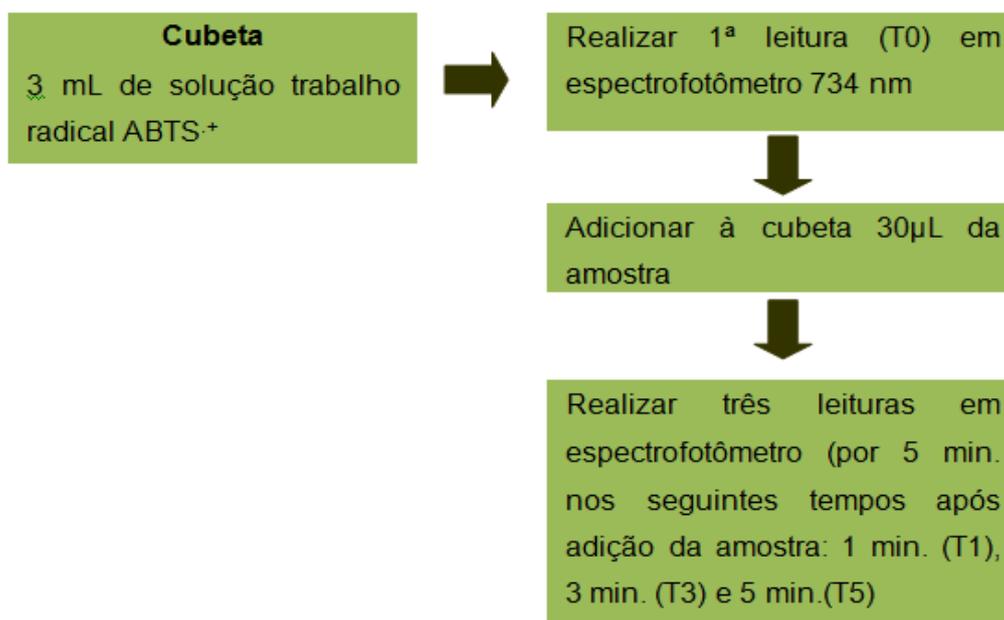


Figura 21: Procedimento para determinação da capacidade antioxidante total.

A capacidade antioxidante total das amostras foi expressa em  $\mu\text{mol/mL}$  de plasma.

#### 4.2.2.5. Dosagem de óxido nítrico

A determinação de NO envolve, geralmente, procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Griess. A reação de nitrito presente no soro e o reagente de Griess (sulfanilamida e N-1-naftiletilenodiamina) origina um cromógeno de cor rosa, que é detectado por leitor de ELISA em comprimento de

onda de 540 nm. As concentrações de NO na amostra foram determinadas como descrito por Granger et al. 1999 (figura 22). A absorbância das diferentes amostras foi comparada aos valores obtidos da curva padrão realizada com nitrito de sódio (Vetec) e os resultados encontrados foram expressos em Mm.



Figura 22- Procedimento para detecção de óxido nítrico.

#### 4.2.2.6. Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A análise do dano oxidativo por peroxidação lipídica se foi realizada através da determinação de malondialdeído (MDA). Aldeídos sempre são produzidos em processos de peroxidação lipídica, sendo o MDA o mais abundante. Cada molécula de MDA reage com 2 moléculas do ácido tiobarbitúrico. O Resultado desta reação é um composto de cor rosa que pode ser detectado espectrofotometricamente medindo sua absorção a 535nm ( HAGE, 2008). Para determinar as concentrações de MDA nas amostras utilizou-se a metodologia adaptada de Ohkawa et al.(1979), esquematizada na ilustração abaixo (figura 23):

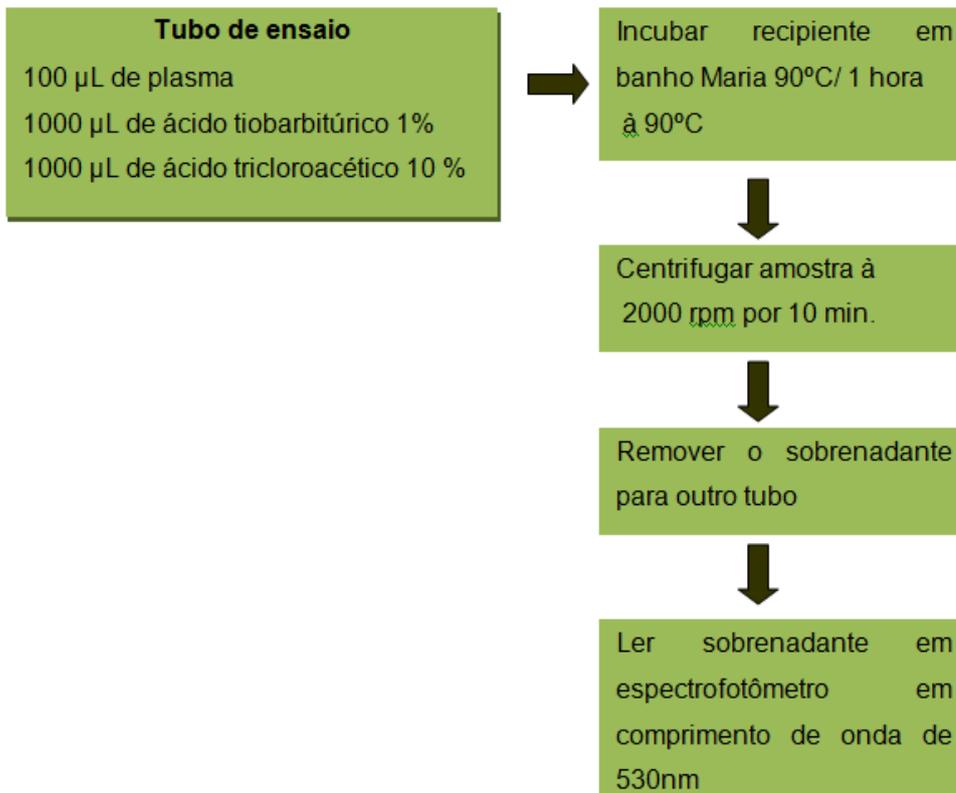


Figura 23- Procedimento para determinação das concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Os resultados de MDA foram expressos em nmol/mL de plasma.

#### 4.2.2.7. Determinação do percentual de metemoglobina

A técnica realizada neste estudo baseou-se na metodologia proposta por Hegesh (1970), onde o percentual de MetHb é avaliado, observando-se a variação de absorvância causada pela adição de cianeto de potássio (KCN) num hemolisado tamponado com ferricianeto de potássio (K<sub>3</sub>Fe (CN) 6) e outro tubo sem este reagente. O tubo contendo hemolisado e (K<sub>3</sub>Fe (CN) 6) foi utilizado como padrão, haja visto que, este composto químico, foi empregado para converter todas as formas possíveis de hemoglobina (Hb) para MetHb. As dosagens para determinação do percentual de MetHb foram realizadas em duplicata e valores inferiores a 2%

foram considerados normais. Abaixo (figura 24), está esquematizado o procedimento realizado para determinação de MetHb nas amostra coletas.

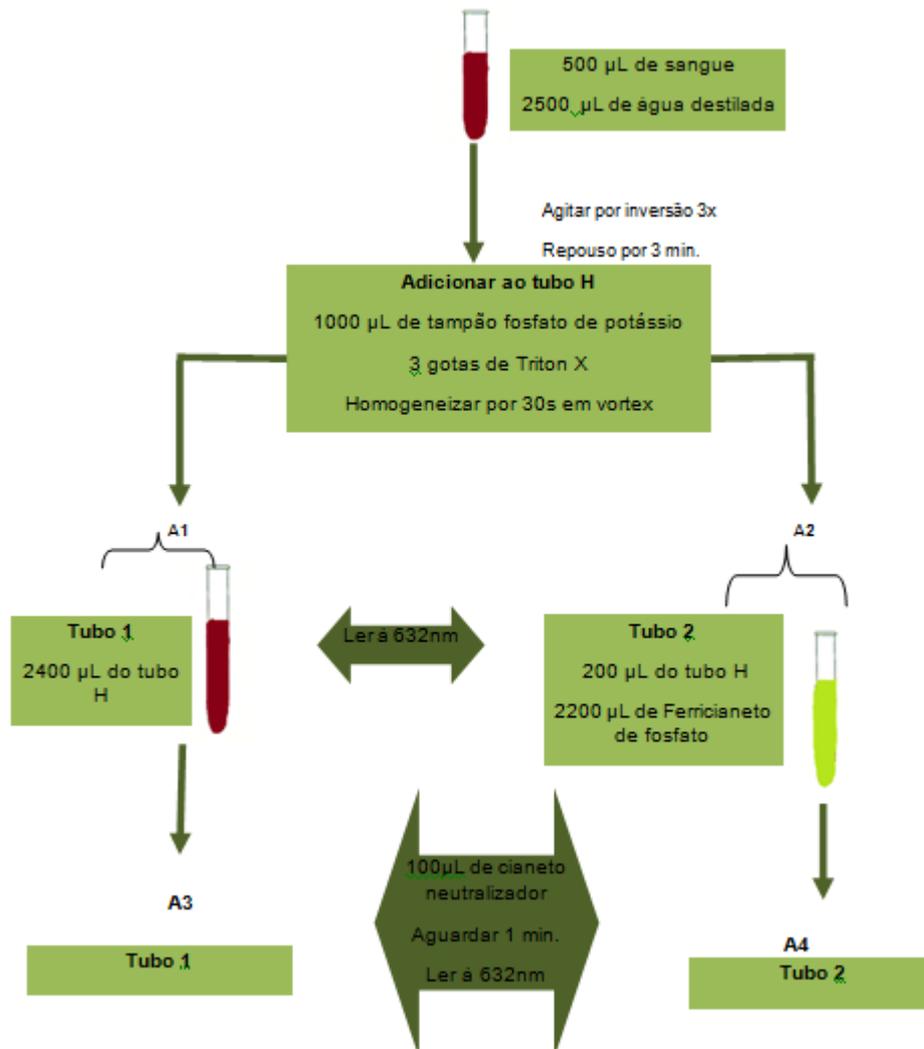


Figura 24 : Procedimento para determinação de metemoglobina.

Para o cálculo do percentual de metemoglobina na amostras deve-se utilizar a seguinte fórmula:

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

#### 4.2.2.8. Análise da presença de corpos de Heinz

A precipitação de agregados protéicos junto da membrana citoplasmática forma os chamados corpos de Heinz. Tais inclusões podem ser observadas ao microscópio óptico mediante coloração com cristal violeta ou azul de cresil brilhante, sendo visualizados como inclusões globulares de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  (BEUTLER et al. 1994).

A análise laboratorial para a quantificação dos corpos de Heinz foi baseada na metodologia empregada por Rimiolli e Godoy (2001) e está descrita na ilustração abaixo (figura 25).

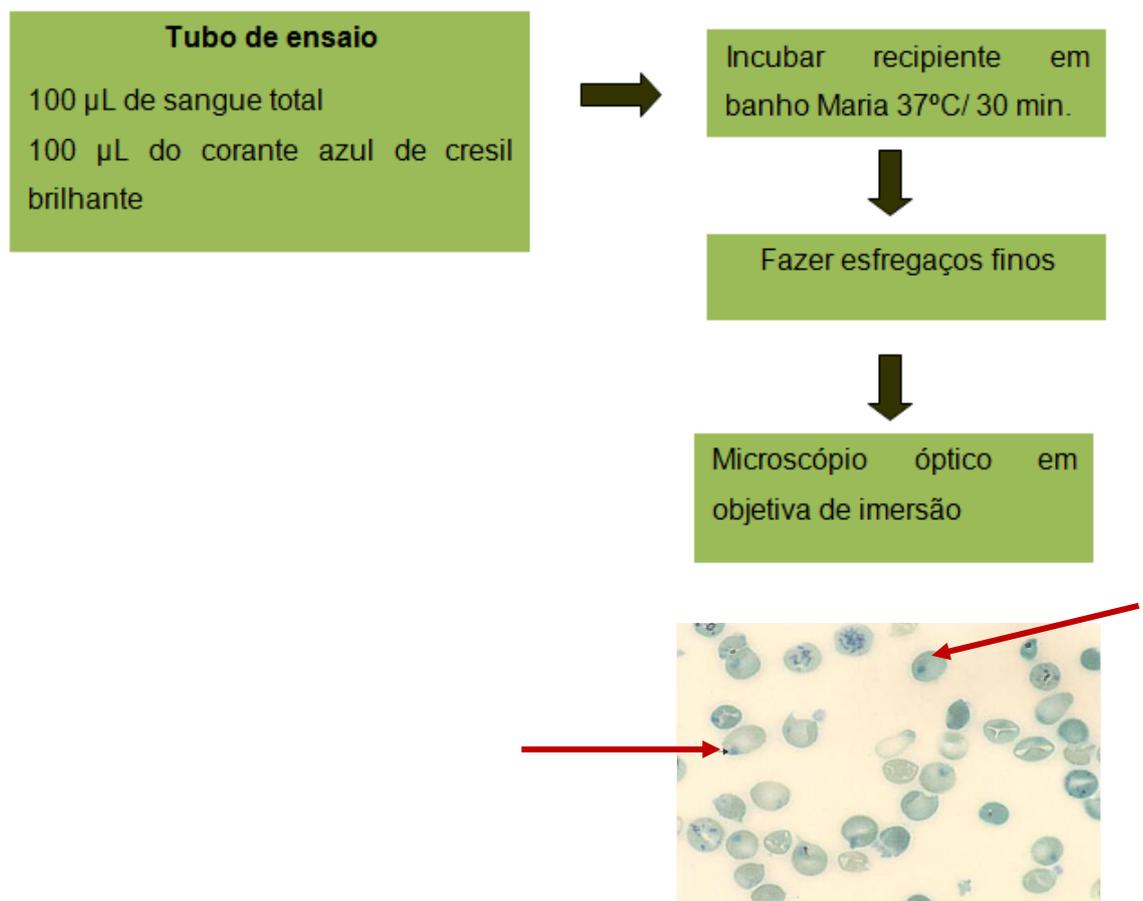


Figura 25- Representação dos procedimentos para verificação da presença de corpos de Heinz.

Para quantificação dos corpos de Heinz foram considerados como critérios de avaliação os seguintes resultados (quadro 4):

<b>Resultado</b>	<b>Interpretação</b>
Nenhum corpúsculo encontrado	Ausente
Maior ou igual a 1:500 células	Doente

Quadro 4. Critérios para avaliação da presença de corpos de Heinz em esfregaços sanguíneos

### **4.3. Análise estatística**

As informações coletadas durante a realização do trabalho foram armazenadas em banco de dados Microsoft Access 2007. Foram utilizados dois programas estatísticos neste trabalho: o Graphpad Prism e BIOESTAT 5.0. O teste ANOVA One -Way do programa Graphpad Prism foi utilizado para a análise estatística e confecção dos gráficos, relativos a comparação entre os grupos controle e pacientes com hanseníase. No programa BIOESTAT 5.0 realizou-se a correlação de Spearman, teste de Kolmogorov-smirnov e Qui-quadrado O nível de significância aceito foi de 5%.

### **4.4. Aspectos éticos**

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Pará, sob protocolo de aprovação 079/09 ( ANEXO A).

## 5. RESULTADOS

O período de coleta das amostras de pacientes com hanseníase e dos indivíduos do grupo controle ocorreu do mês de maio de 2010 a maio de 2011. Neste período foram obtidas vinte e três amostras de pacientes com hanseníase sem tratamento (denominado grupo D0) e vinte amostras de pacientes do grupo controle, sem a doença. Dos vinte e três pacientes que iniciaram esta pesquisa somente treze foram acompanhados na terceira dose supervisionada de PQT (denominado grupo D3) e permanecendo até o final da pesquisa. Os outros dez pacientes que iniciaram no estudo não puderam continuar sendo monitorados, pois três deles apresentaram intolerância à dapsona e na terceira dose supervisionada estavam fazendo esquema alternativo. Um paciente abandonou o tratamento e os outros seis apesar de inicialmente receberem a medicação na unidade de referência Marcelo Cândia, a partir da segunda dose optaram por serem contra referenciados para unidade de saúde que se localizava próxima as suas residências.

Quanto a forma clínica, de acordo com a classificação operacional da Organização Mundial da Saúde, observou-se que a maioria dos pacientes apresentou a forma multibacilar (18/72,26%) e somente 21,74% (n=5) pertencia ao grupo paucibacilar (figura 26).

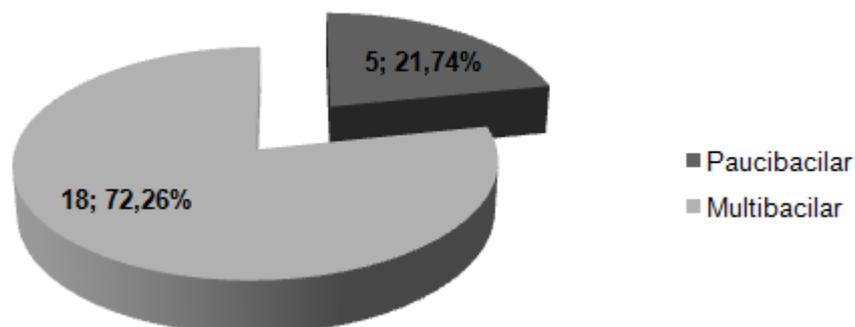


Figura 26- Distribuição dos pacientes participantes do estudo, segundo a classificação operacional da Organização Mundial da Saúde.

A forma clínica paucibacilar mostrou predominância do gênero feminino (04/80%), sendo apenas um paciente pertencente ao gênero masculino diagnosticado com este tipo de hanseníase (01/20%). Nos pacientes multibacilares, o gênero masculino apresentou maior prevalência (13/72,2%) quando comparado ao feminino (05/27,8%) (tabela 1).

A distribuição dos casos por faixa etária mostrou que nos pacientes paucibacilares a faixa etária predominante foi de 40 a 45 anos (03/60%), seguida da faixa etária de 20 a 24 anos e 25 a 29 anos, na qual se obteve um paciente por grupo (1/20%). Nos indivíduos multibacilares, a maioria dos pacientes se encontrava na faixa de 20 a 24 anos (06/33%), seguida de 35 a 39 anos (05/28% - Tabela 1).

Em relação ao índice baciloscópico (IB), observou-se que todos os pacientes paucibacilares (05/100%) não apresentaram este dado descrito nos prontuários, sendo estes casos considerados como “ignorado”. Entretanto, os pacientes multibacilares apresentaram em sua maioria IB igual a zero (8/44% dos casos), seguido de IB de 3,1-4,0 (02/11%). Em contrapartida, foram observados poucos casos de pacientes MB com IB igual a 1,1-2,0 (n=1) e 2,1-3,0 (n=1).

Com relação ao grau de incapacidade, a maioria dos pacientes paucibacilares foi classificada como apresentando grau zero de incapacidade (4/80%), ou seja, não apresentavam incapacidades. Nos pacientes multibacilares, o grau de incapacidade mais freqüente também foi o grau zero (8/44%), seguido dos pacientes apresentavam grau de incapacidade igual a dois (n=4/22%). Apenas 17% dos pacientes multibacilares apresentavam grau um de incapacidade (n=3). Em ambos os grupos, os pacientes que não apresentavam este dado descrito no prontuário foram classificados como “ignorado” (Tabela 1).

A avaliação do comprometimento nervoso dos indivíduos hanseníacos que participaram do estudo revelou que na forma paucibacilar 30% dos casos (n=3) não foi observado o comprometimento de nenhum nervo periférico. Os indivíduos classificados como multibacilares na sua maioria (6/33%) não apresentaram nervos afetados, seguidos de pacientes que apresentavam dois nervos (n=2) a três nervos afetados (n=2). Uma percentagem bem pequena dos pacientes multibacilares (1/6%) apresentava somente um nervo afetado. Em ambos os grupos, os pacientes que não apresentavam este dado descrito no prontuário foram classificados como “ignorado” (Tabela1).

Tabela 1: Perfil dos pacientes de hanseníase participantes da pesquisa, segundo a classificação operacional em pauci e multibacilar.

Variáveis	Classificação operacional OMS				
	Paucibacilar		Multibacilar		
<b>Gênero</b>	<b>n (%)</b>	<b>Estatística</b>	<b>n (%)</b>	<b>Estatística</b>	<b>Estatística</b>
Feminino	04(80)	$\chi^2 = 36.0$ $p < 0.0001$	05(27.8)	$\chi^2 = 19.4$ $p < 0.0001$	$p < 0.0001$
Masculino	01(20)		13(72.2)		
<b>Total</b>	<b>5(100)</b>		<b>18(100)</b>		
<b>Intervalo de idade</b>					
<b>(anos)</b>					
20 – 24	01(20)		06(33)		
25 – 29	01(20)	$\chi^2 = 32.0$ $p < 0.0001$	04(22)	$\chi^2 = 13.98$ $p = 0.0029$	$p < 0.01$
30- 34	00(00)		00(00)		
35 - 39	00(00)		05(28)		
40-45	03(60)		03(17)		
<b>Total</b>	<b>5(100)</b>		<b>18(100)</b>		
<b>IB</b>					
0	00(00)		08(44.5)		
0,1-1	00(00)		00(00)		
1,1-2,0	00(00)		01(5.5)	$\chi^2 = 66.44$ $p < 0.0001$	$p < 0.0001$
2,1-3,0	00(00)		01(5.50)		
3,1-4,0	00(00)		02(11)		
4,1-6,0	00(00)		01(5.5)		
Ignorado	05(100)		05(28)		
<b>Total</b>	<b>05(100)</b>		<b>18(100)</b>		
<b>Grau de incapacidade</b>					
0	04(80)		08(44)		
1	00(00)	$\chi^2 = 36.0$ $p < 0.0001$	03(17)	$\chi^2 = 16.40$ $p = 0.0009$	$p < 0.0001$
2	00(00)		04(22)		
Ignorado	01(20)		03(17)		
<b>Total</b>	<b>05(100)</b>		<b>18(100)</b>		

Nervos afetados					
0	03(60)		06(33)		
1	00(00)	$x^2 = 4.0$	01(6)	$x^2 = 49.9$	
2	00(00)	$p > 0.05$	02(11)	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$
3	00(00)		02(11)		
Ignorado	02(40)		07(39)		
<b>Total</b>	<b>05(100)</b>		<b>18 (100)</b>		

\* IB:Índice Baciloscópico

Neste trabalho, as concentrações plasmáticas de dapsona foram mensuradas por CLAE. Os resultados obtidos desta aferição mostram que os pacientes com hanseníase após a terceira dose supervisionada de PQT (D3) apresentaram concentrações plasmáticas de dapsona de  $0.552 \pm 0.037 \mu\text{g/mL}$ .

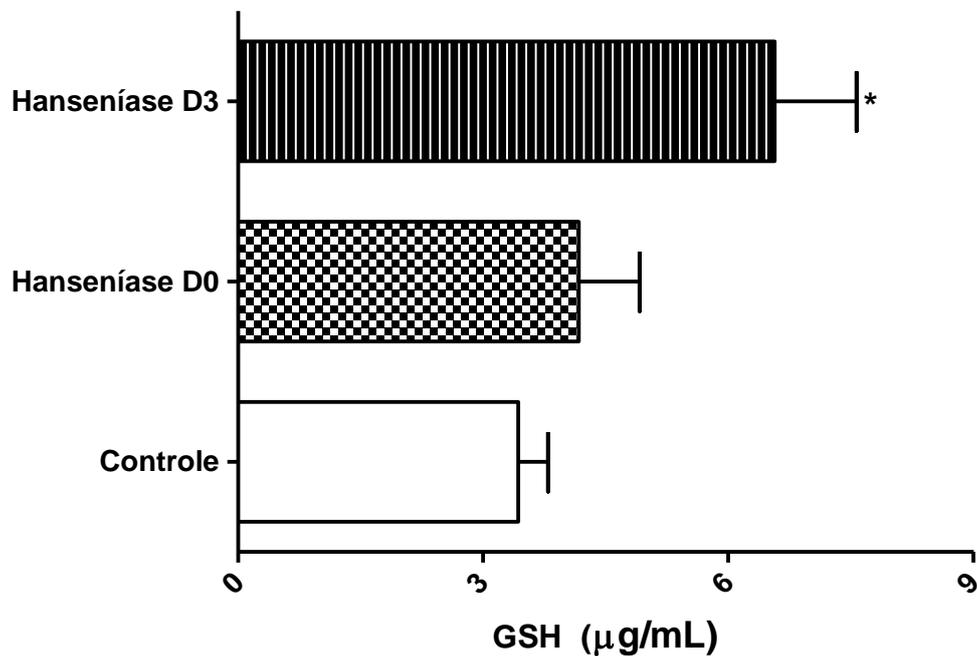
A análise do fármaco no plasma por forma clínica da doença mostrou que pacientes multibacilares apresentaram concentração de dapsona de  $0.518 \pm 0.029 \mu\text{g/mL}$  e pacientes paucibacilares de  $0.662 \pm 0.123 \mu\text{g/mL}$ . Não foi observada diferença significativa entre as concentrações de dapsona nos pacientes com as diferentes formas clínicas ( $p > 0,05$ , Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de dapsona determinadas em amostras de pacientes com hanseníase nas formas clínicas multi e Paucibacilar de acordo com o tempo de tratamento em meses.

Período de Tratamento (meses)	Concentrações de Dapsona ( $\mu\text{g/mL}$ ) por forma clínica	
	Multibacilar	Paucibacilar
D0	ND	ND
D3	$0,518 \pm 0.029$	$0,662 \pm 0.123$

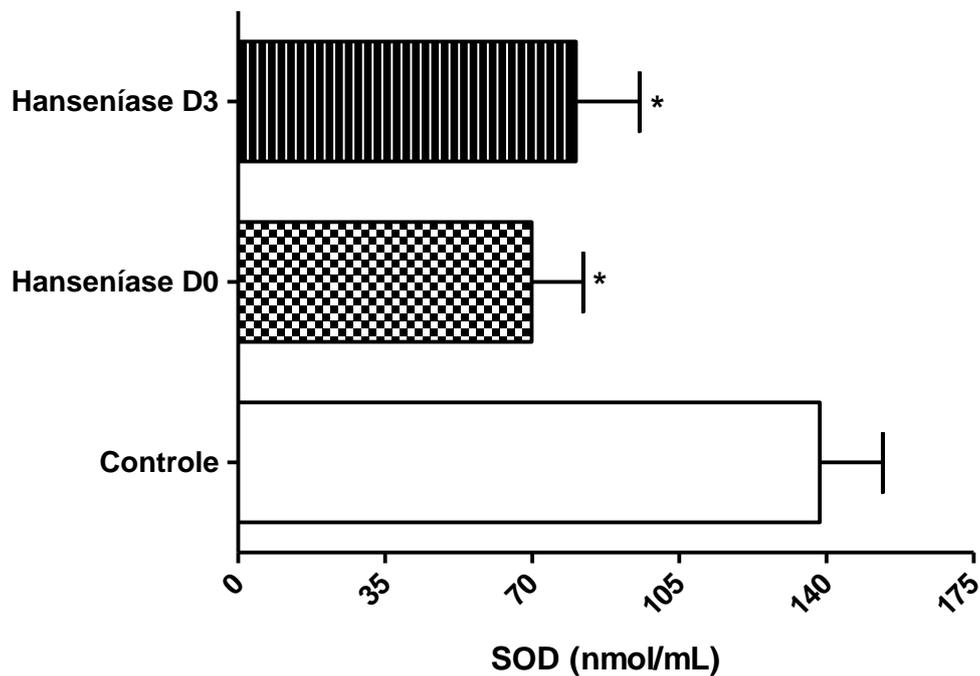
ND - Não Detectado; os valores foram expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão; D0= Grupo de pacientes com hanseníase antes do tratamento; D3= grupo de pacientes com hanseníase na terceira dose supervisionada.

Os níveis GSH nos pacientes com hanseníase D0 encontravam-se com valores similares ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). O nível médio de GSH encontrado no sangue dos pacientes D0 foi de  $4.16 \pm 0.74 \mu\text{g/mL}$ , e no controle foi  $3.33 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$ . No entanto, nos sangue de pacientes hanseníase (grupo D3) foi observado aumento significativo de GSH ( $7.00 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$ ) quando comparado comparados aos pacientes D0 e do grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 27).



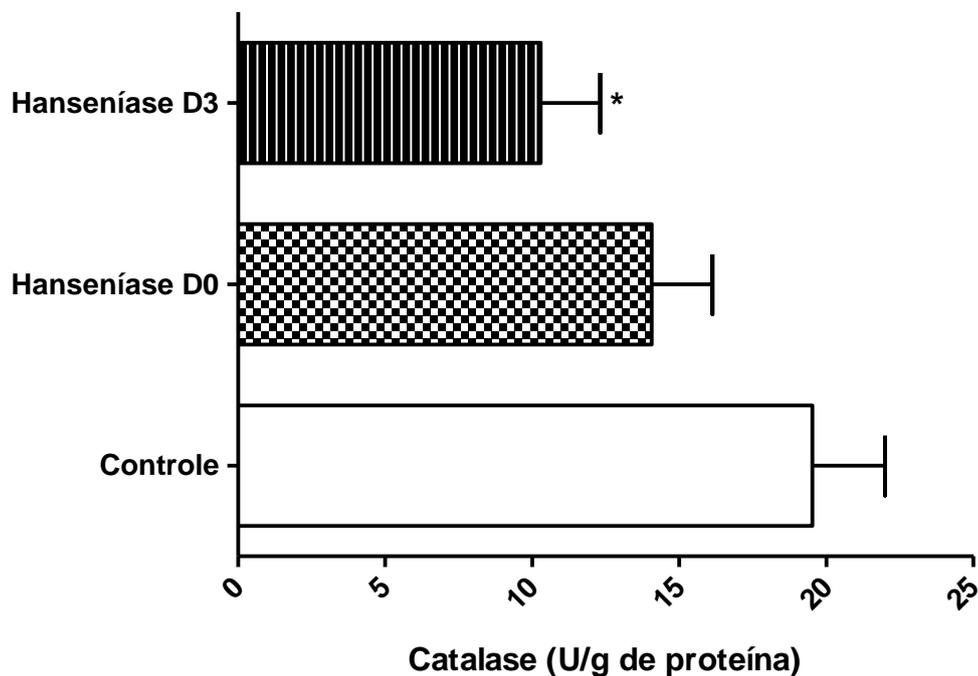
**Figura 27-Concentração sanguínea de GSH em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).** A determinação dos níveis intracelulares da forma reduzida da GSH baseia-se na capacidade da GSH em reduzir o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para ácido nitrobenzóico (TNB), o qual foi quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm. Os valores apresentados no gráfico estão expressos como média  $\pm$  D.P. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA).

A atividade da SOD eritrocitária se apresentava significativamente reduzida nos pacientes com hanseníase D0 comparada ao controle ( $p < 0,05$ ). Os níveis de SOD encontrados nos pacientes D0 foi de  $69.88 \pm 12.26$  nmol/mL, e no controle foi de  $138.42 \pm 14.99$  nmol/mL. No grupo hanseníase D3, os valores de SOD também se apresentaram diminuídos significativamente quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), com valores médios de  $80.40 \pm 15.10$  nmol/mL (Figura 28).



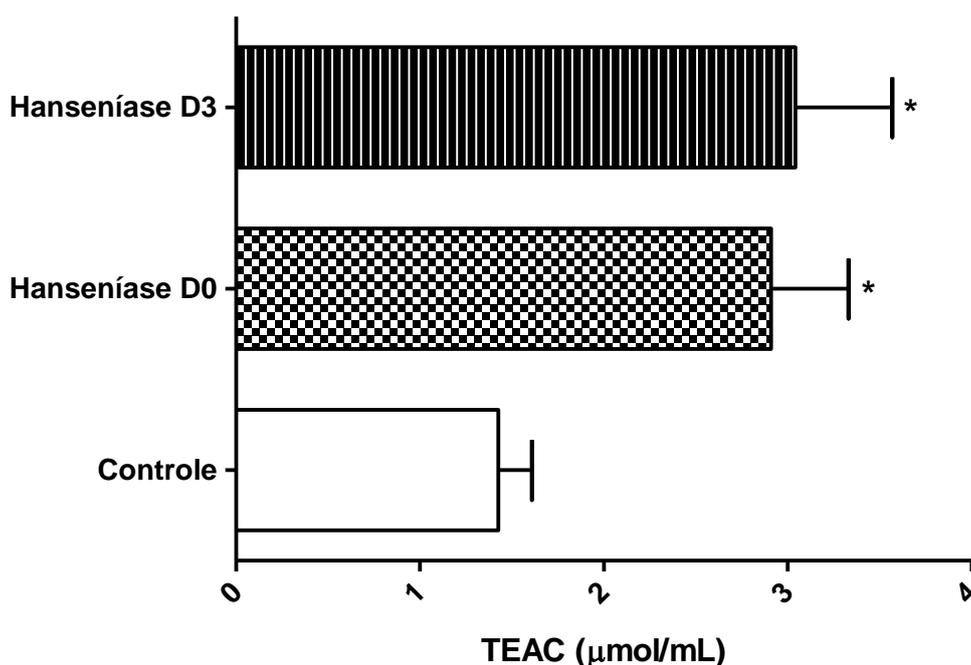
**Figura 28- Atividade da SOD em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).** Atividade enzimática foi avaliada pela da SOD catalisar a conversão de  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , que foi detectada por espectrofotometria em comprimento de onda de 550nm. Os valores apresentados no gráfico estão expressos como média  $\pm$  D.P. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA).

A atividade da enzima CAT eritrocitária nos pacientes com hanseníase D0 apresentou uma redução, mas não significativa quando comparado ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). Os valores médios de CAT nos pacintes D0 foi  $14.06 \pm 2.06$  U/g de proteína), e no grupo controle foi  $19.52 \pm 2.48$  U/g de proteína. No entanto, nos pacientes em tratamento com PQT (D3), os níveis médios de catalase encontravam-se reduzidos de forma significativa ( $10.29 \pm 2.02$  U/g de proteína) quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 29).



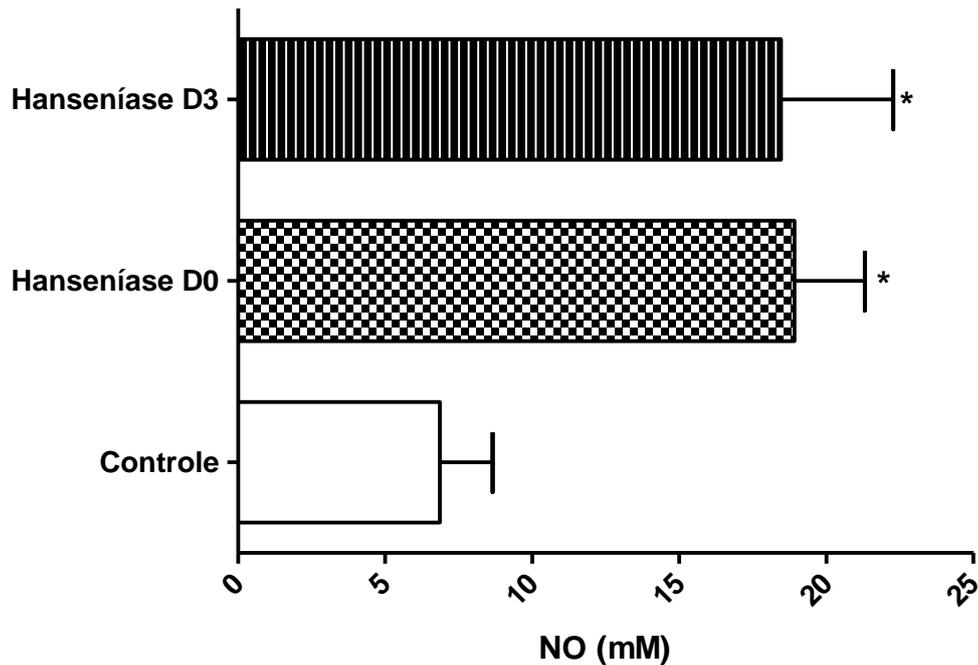
**Figura 29-Atividade da enzima Catalase em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).** A atividade da CAT foi avaliada pela capacidade da enzima presente na amostra em converter o  $H_2O_2$  em água e oxigênio. A leitura do decaimento do  $H_2O_2$  foi realizada por espectrofotometria em comprimento de onda de 240nm. Os valores apresentados no gráfico estão expressos como média  $\pm$  D.P. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA).

Com relação à avaliação da capacidade antioxidante total, avaliada através da atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), observou-se aumento significativo de TEAC tanto no grupo hanseníase D0 ( $p < 0,0001$ ) quanto no grupo D3 ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle ( $1.42 \pm 0.18 \mu\text{mol/mL}$ ). Os níveis médios de TEAC mensurados nos de pacientes antes do tratamento (D0) foi de  $2.91 \pm 0.42 \mu\text{mol/mL}$ , enquanto nos pacientes após a terceira dose supervisionada (D3) foi de  $3.04 \pm 0.53 \mu\text{mol/mL}$  (Figura 30).



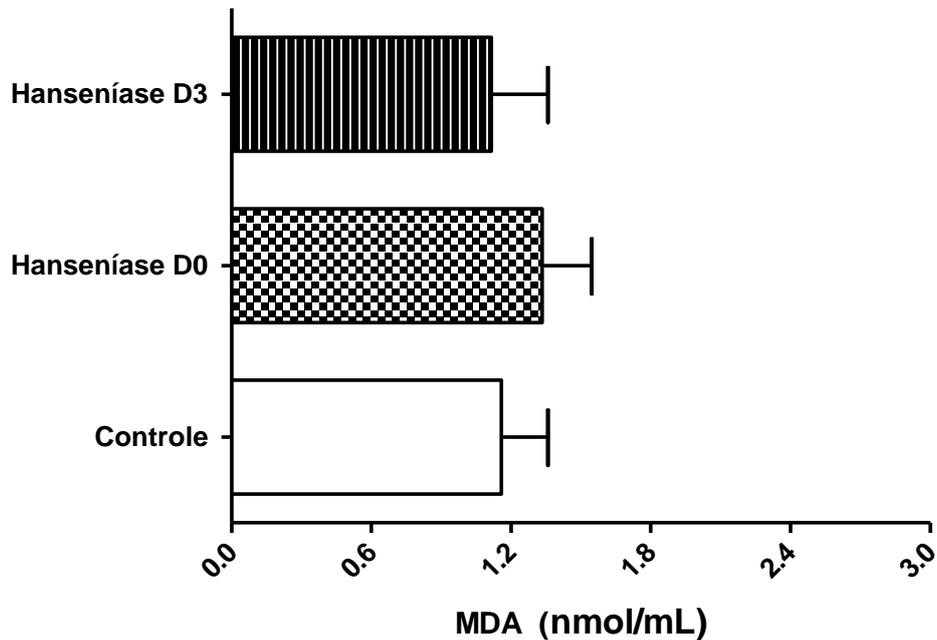
**Figura 30- Capacidade antioxidante total, avaliada pelo método da atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).** O TEAC baseou-se na inibição do cátion  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  (radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio) pelos antioxidantes presentes na amostra. A reação foi lida em comprimento de onda de 734 nm. Os valores apresentados no gráfico estão expressos como média  $\pm$  D.P. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA).

Os níveis de óxido nítrico no soro dos pacientes com Hanseníase D0 e D3, mostraram-se aumentados significativamente quando comparados aos indivíduos saudáveis ( $p < 0,01$ ). As concentrações de NO encontrados nos indivíduos do grupo controle foi de  $6.89 \pm 1.80$  mM, e em pacientes D0 foi  $18.9 \pm 2.39$  mM, valores similares aos obtidos no grupo D3 ( $18.45 \pm 3.82$  mM). (Figura 31).



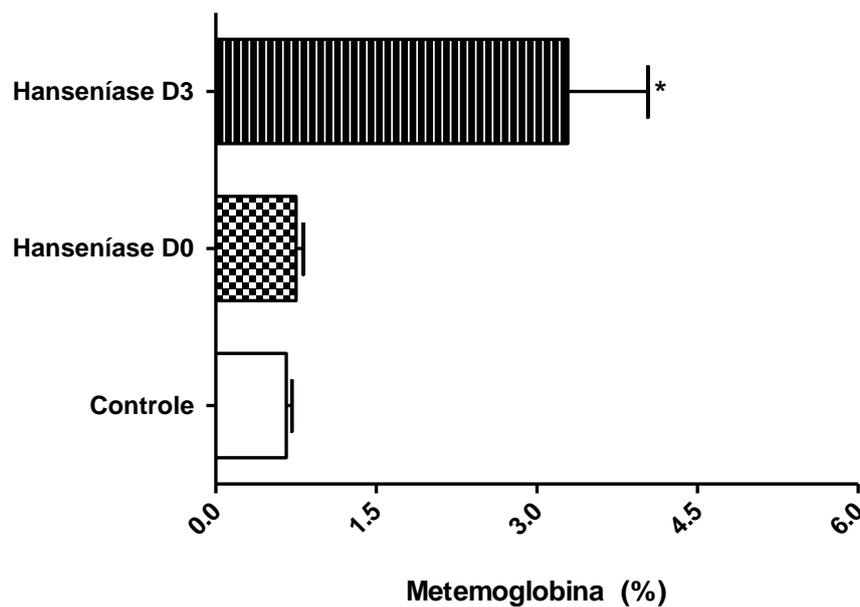
**Figura 31-Concentração de NO no soro de indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).** A determinação de NO foi realizada pela reação deste composto com o reagente de Griess lida em comprimento de onda de 540 nm. Os valores apresentados no gráfico estão expressos como média  $\pm$  D.P. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA).

O Malondialdeído (MDA) foi medido como um índice de peroxidação lipídica no plasma de pacientes e indivíduos saudáveis. O valor médio de MDA no grupo Hanseníase D0 foi de  $1.33 \pm 0.21$  nmol/mL, enquanto que no grupo hanseníase D3 a média de MDA foi de  $1.12 \pm 0.24$  nmol/mL. Os pacientes do grupo controle apresentaram valores médios de MDA de  $1.56 \pm 0.20$ . Não houve diferença significativa dos pacientes D0 e D3 em relação ao controle ( $P > 0,05$ ) (figura 32).



**Figura 32-Níveis de Malondialdeído em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).** As concentrações de MDA foram determinadas pela capacidade de reação desta substância com o ácido tiobarbitúrico. A reação foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 535nm. Os valores apresentados no gráfico estão expressos como média  $\pm$  D.P. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA).

Com relação à porcentagem de metemoglobina não se observou diferença significativa entre o percentual de MetHb em amostras de sangue de pacientes com hanseníase sem tratamento (D0) quando comparado ao grupo controle. Nos pacientes com hanseníase D0, o valor médio de MetHb foi de  $0.75 \pm 0.07\%$ , enquanto os indivíduos saudáveis (controle) apresentaram média de  $0.66 \pm 0.05\%$ . No entanto, estes mesmos indivíduos após a terceira dose supervisionada de PQT (D3) apresentaram percentual de MetHb com valores acima dos considerados normais ( $< 2\%$ ), com média de  $3,29 \pm 0.74\%$  (Figura 33).



**Figura 33-Percentual de metemoglobina em indivíduos saudáveis do grupo controle e pacientes com hanseníase antes do tratamento (D0) e após a terceira dose supervisionada de tratamento (D3).** As dosagens de MetHb foram realizadas em duplicata e imediatamente após a coleta das amostras, sendo considerados como normais os valores  $< 2\%$ . Os valores apresentados no gráfico estão expressos como média  $\pm$  D.P. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA).

Com relação presença de corpúsculo de Heinz, os resultados expressos na Tabela 3 mostram que somente um paciente D0 apresentou corpúsculo de Heinz no sangue, na proporção de 1 corpúsculo a cada 500 células contadas. Enquanto, cinco pacientes pertencentes ao grupo D3 apresentaram este efeito hematológico, porém em maior proporção (dois ou mais corpúsculo para cada 500 células contadas - Tabela 3).

Tabela 3: Presença de corpos de Heinz em esfregaços sanguíneos dos indivíduos participantes do estudo.

GRUPOS	Corpúsculo de Heinz		TOTAL DE PACIENTES
	Ausente	Presente	
Controle	20	0	20
Hanseníase D0	22	1	23
Hanseníase D3	8	5	13

Hanseníase D0= Grupo de pacientes com hanseníase antes do tratamento; Hanseníase D3= grupo de pacientes com hanseníase na terceira dose supervisionada.

A partir do teste de correlação de Spearman foi possível avaliar a correlação entre as variáveis de estresse oxidativo e os níveis de concentração plasmática de dapsona nos pacientes com hanseníase D3, mostrando que não houve correlação significativa entre estes parâmetros (Tabela 4).

Tabela 4. Correlação entre concentrações de dapsona e parâmetros indicativos de estresse oxidativo em amostras biológicas de pacientes com hanseníase após a terceira dose supervisionada de PQT.

Variáveis	r de Spearman	P valor
Dapsona x NO	0.3796	0.2007
Dapsona x metemoglobina	0.2036	0.5047
Dapsona x TEAC	0.4099	0.1641
Dapsona x glutathiona	0.2213	0.4674
Dapsona x SOD	-0.2814	0.3517
Dapsona x MDA	-0.0718	0.8156

## 6. DISCUSSÃO

O monitoramento terapêutico de fármacos ou seus metabólitos é fundamental para promover ajuste posológico, sempre que são obtidas evidências de que existe correlação entre as concentrações obtidas da substância analisada e os efeitos tóxicos ou terapêuticos observados (LINDER e KECK, 1998; MITCHELL, 2000).

Nesse sentido, há muitos trabalhos que têm procurado avaliar as concentrações plasmáticas de fármacos e estabelecer uma correlação com eventos tóxicos visualizados *in vivo* após o uso dos mesmos (CARRAZZA et al. 2000; MALFARÁ et al. 2005; LINDEN, 2006; MALINTAN e MOHD,2006; DE MORAES et al.2008, VIEIRA e VALENTE , 2009; FERREIRA, 2010).

Neste trabalho, foram mensuradas as concentrações plasmáticas de dapsona por CLAE. Os resultados obtidos desta aferição mostram que pacientes com hanseníase após a terceira dose supervisionada de PQT apresentam concentrações plasmáticas médias de dapsona de  $0.552 \pm 0.037$   $\mu\text{g/mL}$ . Estes resultados foram similares aos obtidos por Vieira et al. (2010), onde 90% dos pacientes com hanseníase em uso de PQT, apresentaram níveis terapêuticos de dapsona no plasma que variavam de 0,5-5  $\mu\text{g/mL}$ .

Estudo realizado por Zuidema et al. (1986) mostrou que após a administração de dapsona em dose única de 100 mg/dia em pacientes voluntários, as concentrações plasmáticas variavam em torno de 0,4 a 1,2  $\mu\text{g/mL}$ . Além disso, há relatos de que vinte e quatro horas após a ingestão oral de 100 mg de dapsona, suas concentrações plasmáticas variam de 0,4 a 1,2  $\mu\text{g/mL}$  , e que 100 mg/dia deste fármaco produz uma concentração plasmática no estado estacionário de 2 a 6  $\mu\text{mol/L}$  (ELLARD, 1966; ZUIDEMA et al. 1986). Queiroz (1997) também verificou que os níveis plasmáticos terapêuticos de dapsona nas doses de 100mg/dia em pacientes em uso crônico encontravam-se na faixa de 1,04 a 3,05  $\mu\text{g/mL}$ . Outros estudos mostraram que, após a ingestão de doses de 50 à 300mg de dapsona, as concentrações séricas máximas atingidas variam de 0,63 e 4,82 mg / L (ZUIDEMA et al. 1986; WOZEL, 1996). Segundo, Mc Evoy (2009) as doses preconizadas de 100 mg/dia de dapsona, resulta em concentrações séricas máximas de 3,26 e 1,95 mg / L (após 24 horas).

Nesse sentido, a literatura mostra que as concentrações deste fármaco no plasma de pacientes com hanseníase são variáveis, contudo, permanecem dentro do limite terapêutico. Além disso, os valores encontrados neste trabalho não correspondem a concentrações tóxicas. Segundo Carraza et al. (2000), quadros de intoxicação leve por dapsona foram encontrados em paciente que apresentavam concentrações médias deste fármaco no plasma de 6.7 µg/mL, correspondendo a administração de 6,5 comprimidos de dapsona de 100mg de uma única vez.

Os relatos de reações adversas associadas ao uso da dapsona, geralmente, são dose-dependente ou independente da dose. A maioria das reações adversas, comumente são de caráter dose-dependente, no entanto estas reações são incomuns em doses de 50 e 100 mg/dia, geralmente preconizadas em esquemas poliquimioterápicos (GRUNWALD e AMICHAH, 1996; WOZEL, 1996; ZHU e STILLER, 2001; MC EVOY, 2009).

As reações adversas relacionados ao uso da dapsona variam desde problemas digestivos, como: náuseas, vômitos e estomatite. Outras manifestações menos comuns são: hepatites tóxicas, icterícia colestática reações cutâneas por fotossensibilidade, psicoses, e uma síndrome que ficou conhecida como a “Síndrome da Sulfona” (“rash” cutâneo, aumento de linfonodos, icterícia, hepatoesplenomegalia e linfocitose com linfócitos atípicos (SÁNCHEZ- SALDAÑA, 2008). Além disso, distúrbios hematológicos, como a metemoglobinemia (MetHb) e hemólise são os achados tóxicos mais frequentes durante o tratamento com este fármaco (GOULART et al. 2002) e se mostram significativos, mesmo em doses usadas normalmente para tratar a hanseníase (100 mg dapsona / dia) (HALIM e OGBEIDE, 2002).

A MetHb é uma situação clínica, caracterizada pelo aumento do percentual de MetHb no sangue (UDEH et al.2001). A MetHb é a forma oxidada da Hb eritrocitária, em que os íons  $Fe^{+2}$  desta metaloproteína se encontram oxidados à  $Fe^{+3}$  e nesta forma, a Hb eritrocitária tem baixa afinidade pelo oxigênio, não conseguindo se ligar ao mesmo (KERN et al. 2000; BARAKA et al. 2001; HAYMOND et al. 2005). Normalmente, a Hb é oxidada formando MetHb, contudo os sistemas redutores presentes no interior do eritrócito, como a citocromo B5 redutase e a metemoglobina redutase NADPH dependente, conseguem manter estes níveis dentro dos valores considerados normais ( $\leq$  de 2%) (CHUI et al. 2005; SUYAMA et al. 2005).

Entretanto, em condições patológicas, o percentual de MetHb pode se encontrar aumentado em virtude de doenças congênitas relacionadas à síntese/metabolismo da Hb ou por indução devido à exposição aguda de fármacos e agentes químicos com potencial oxidante que provocam desequilíbrio redox nos sistemas biológicos do organismo (BARKER et al. 2006). A forma adquirida da MetHb é a mais freqüente, sendo que fármacos como, benzocaína, cloroquina dapsona, lidocaína e primaquina estão frequentemente associados a indução de MetHb (WRIGHT et al. 1999).

Com relação à Dapsona, muitos estudos têm investigado o potencial metemoglobinizante deste fármaco. Dentre estes, Queiroz et al. 1997 afirma que o tratamento a longo prazo com dapsona (100mg/dia) pode resultar em MetHba e hemólise significativa, sugerindo que a Dapsona é a principal responsável por estes achados hematológicos e que o uso da rifampicina e clofazimina não aumentam a incidência de MetHba durante o tratamento.

Neste estudo, também se observou aumento significativo no percentual de MetHb dos pacientes com hanseníase após a administração de PQT (D3), cujo percentual médio de MetHb foi de  $3,29 \pm 0.74\%$ . Nestes casos nenhuma sintomatologia característica dos processos de metemoglobinemia, como cianose, taquicardia etc. Este dado sugere que a alteração neste parâmetro hematológico, deve-se a administração da PQT, e principalmente em virtude da dapsona, visto que esta droga está associada a altos índices de MetHba.

Estudo conduzido por Dalpino (1997) mostrou que o percentual de MetHb de pacientes hansênicos que se encontravam sob tratamento de dapsona (100mg/dia), estavam aumentados de forma significativa quando comparados ao grupo controle, e que em alguns casos foram observados níveis de MetHb superiores a 2%. Neste sentido, a literatura relata que, geralmente, pacientes que apresentam taxas de MetHb abaixo de 10% não apresentam nenhuma sintomatologia. Contudo, a partir de 10-20% de MetHb no sangue, percebe-se o desenvolvimento de sinais clínicos leves como cianose, e em casos mais graves onde estes valores se encontram acima de 50%, os sintomas exibidos pelos pacientes são mais graves, podendo se observar desde convulsões, arritmias, acidose à quadros de coma e morte (SALAS, 2006).

Os dois relatos de caso de intoxicação por dapsona descritos por Hansen et al. 1994, mostram que os pacientes intoxicados por este fármaco apresentavam MetHb sintomática, com concentrações de MetHb de 35% e 37%. Em crianças apresentando quadros de intoxicação aguda por dapsona foram encontradas taxas de MetHb que variavam de 23,5 a 49,7%, sendo que nestas situações foram visualizadas manifestações clínicas como cianose, taquicardia, taquipnéia, vômitos, dispnéia, agitação e diarreia (BUCARETCHI et al. 2000).

Estudos têm mostrado que os dois principais metabólitos da dapsona (DDS-NOH e o MDDS-NOH) apresentam papel fundamental na formação de MetHb. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a DDS-NOH e MDDS-NOH apresentam um potencial citotóxico maior que outros metabólitos hidroxilados e que a capacidade de formar MetHb da DDS-NOH é dose-dependente (RELLY et al. 1998; RELLY et al. 1999). Além disso, Vage et al. 1994 relatam que tanto a DDS-NOH quanto a MDDS-NOH são capazes de induzir a formação de MetHb *in vitro* em amostras de sangue de seres humanos.

Trabalho realizado por Ciccoli et al. (1999) mostraram que células tratadas com DDS-NOH apresentaram aumento significativo na formação de MetHb quando comparados ao controle, sugerindo desta forma que a presença deste metabólito hidroxilado é essencial para desenvolvimento de efeitos hematotóxicos observados durante tratamento com dapsona.

Um dos mecanismos sugeridos na literatura que explica o processo de formação de MetHb por parte DDS-NOH é que a Hb eritrocitária sofreria oxidação por parte deste composto, levando a formação de MetHb e um composto derivado da dapsona denominado de nitrosobenzeno, que é reduzido pela enzima NADH-metemoglobina redutase e pela glutathione reduzida novamente à Dapsona, dando continuidade ao processo de oxidação da Hb. Estima-se que este processo se repita até que os níveis de glutathione estejam esgotados (KRAMER e GRADER, 1972; COLEMAN e JACOBUS. 1993).

Geralmente, em pacientes portadores de MetHb é possível observar os produtos da agressão oxidativa no interior dos eritrócitos, denominados de corpúsculo de Heinz. Os corpúsculos de Heinz são precipitados insolúveis formados em decorrência da desnaturação irreversível da Hb. Quando presentes, estas alterações hematológicas são indicativas de processos oxidativo no interior dos

eritrócitos, em virtude de doenças hereditárias ou devido à indução por substâncias de caráter oxidante, como a dapsona (WINTERBOURN, 1990).

Neste estudo, observou-se a presença de corpúsculos de Heinz principalmente em esfregaços sanguíneos de pacientes sob tratamento com PQT. Estes resultados foram similares aos relatados por Rimiolli e Godoy (2001), onde foram visualizados presença de corpúsculo de Heinz na maioria dos esfregaços sanguíneos de pacientes hansênicos que estavam realizando tratamento poliquimioterápico para hanseníase. Outros estudos também têm associado o uso de dapsona com o aparecimento deste achado hematológico no sangue. Uma série de quatro casos foi apresentada por Smith e Alexander (1959), onde pacientes que estavam fazendo uso de dapsona em doses que variavam de 50 a 100 mg/dia apresentaram corpúsculo de Heinz no decorrer do tratamento. Uma das hipóteses propostas a cerca da formação induzida de corpúsculo de Heinz, sugere que fármacos de caráter oxidante são responsáveis pela produção de espécies reativas, como,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , entre outras) no interior de eritrócitos e que estas moléculas levariam a oxidação da Hb, através de uma seqüência de etapas oxidativas, que culminariam na formação de intermediários da metemoglobina, e produtos solúveis e insolúveis resultantes da desnaturação da Hb (BEAVEN e WHITE, 1954; MILLS e RANDALL, 1958; JANDL et al. 1960).

Contudo, além da exposição à dapsona, outro fator pode estar relacionado com a formação de corpúsculo de Heinz em pacientes com hanseníase sob esquema PQT, que é a presença de um tipo específico de Hb denominada HbE. Há relatos de que indivíduos que expressam a HbE podem ter maior sensibilidade ao estresse oxidativo e por isso, estariam mais propensos a desenvolver anemia hemolítica com formação de corpúsculo de Heinz quando em uso de dapsona na dose de 50mg/dia (LACHANT e TANAKA, 1987).

Com o objetivo de proteger células, como os eritrócitos, das condições oxidativas apresentadas acima, o organismo conta com a presença de agentes antioxidantes. Nesse sentido, estes agentes desempenhariam o papel de regenerar substratos ou prevenir significativamente a oxidação dos mesmos, mantendo o equilíbrio dos processos de oxi-redução celular (HALLIWELL, 2000). Um dos mecanismos de defesa do organismo contra fenômenos oxidativos intracelulares é o antioxidante não enzimático glutatona reduzida (GSH). A glutatona é um tripeptídeo presente em altas concentrações no meio intracelular de células animais e na

maioria das plantas e bactérias. No interior destas células pode se apresentar na forma oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH), sendo que nos eritrócitos humanos cerca de 99, 75% do total da glutathiona encontrada está na forma reduzida (MEISTER, 1983).

Neste estudo, a mensuração dos níveis de GSH em pacientes antes do tratamento com a PQT (D0) mostrou que não houve diferença significativa entre as concentrações desta molécula nestes pacientes comparados ao grupo controle. Estes dados não foram similares aos relatados em outros estudos que investigam a capacidade antioxidante de pacientes com hanseníase, visto que geralmente tem se observado redução nos níveis de antioxidantes não enzimáticos como a GSH (VIJAYARAGHAVAN et al. 2005; PRASAD et al. 2008).

Com relação aos níveis de GSH encontrados no sangue dos pacientes após a administração da 3ª dose de PQT, nossos dados mostraram que as concentrações de GSH estavam aumentadas de forma significativa quando comparadas aos pacientes sem tratamento e ao controle ( $p < 0, 001$ ).

Os trabalhos que tentam elucidar o mecanismo de ação da dapsona e de seus metabólitos nos sistemas redutores, como a GSH, têm sugerido que outros fatores, que não sejam a depleção de GSH estejam relacionados com os eventos oxidativos visualizados nas células do organismo em decorrência da administração deste fármaco (RELLY et al. 1999; DE MORAES et al. 2008; VEGGI et al. 2008). Neste sentido, Veggi et al. 2008 relataram que as concentrações de GSH no fígado de camundongos machos se encontravam aumentados durante tratamento com DDS-NOH, no entanto nas fêmeas as concentrações de GSH foram similares ao grupo controle.

Costagliola (1990) estima que a taxa de recuperação eritrocitária da GSH ocorre em menos de 10 minutos, com isso, mesmo que o eritrócito esteja exposto aos compostos de caráter oxidante, a taxa de recuperação da GSSG para forma GSH ocorre de forma sustentada visando o aumento deste peptídeo na célula. Esta hipótese também foi sustentada por Relly et al. (1999), que mostraram que os metabólitos hidroxilados da dapsona (DDS-NOH) não são os responsáveis pela redução significativa de GSH de eritrócitos humanos, pois a GSH que é consumida nos processos de reciclagem das hidroxilaminas é rapidamente regenerada (KRAMER et al. 1972;. GLADER e CONRAD, 1973; RASBRIDGE e SCOTT , 1973).

Além das defesas antioxidantes não enzimáticas, existem os antioxidantes enzimáticos. Estas moléculas são um grupo de enzimas especializadas, cuja finalidade é reagir com compostos que causam danos oxidantes e detoxificá-los do organismo. Todas as células eucarióticas contam com numerosas enzimas que desempenham esta tarefa, todavia, a GSH-Px, SOD, CAT são as três principais classes de enzimas mais investigadas neste processo.

A enzima CAT é uma heme-proteína tetramérica considerada a principal responsável pela degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de organismos aeróbicos e anaeróbicos (SWITALA e LOEWEN, 2002). Em mamíferos, incluindo o homem, a CAT é expressa em todos os tecidos, sendo encontrada em elevadas quantidades, no fígado, eritrócitos e rins (SCHISLER e SINGH, 1987; DEISSEROTH e DOUNCE, 1970).

Em relação aos resultados referentes aos pacientes com hanseníase sem tratamento, os níveis de CAT se apresentaram reduzidos, mas não significativamente quando comparado ao controle. Estes resultados diferem dos encontrados na literatura, visto que a maioria dos estudos relata que as concentrações de CAT se mostram reduzidas significativamente no soro e sangue de pacientes com hanseníase. Tal dado sugere que nestes indivíduos ocorre uma redução das defesas antioxidantes (REDDY et al. 2003; PRASAD et al. 2007).

Além disso, estudos têm mostrado que a redução da atividade da enzima CAT pode estar relacionada a fatores inerentes aos indivíduos, como no caso de deficiências enzimáticas em virtude de mutações genéticas (GÓTH et al. 2004) ou na redução da síntese desta enzima devido alteração na sua expressão gênica (MASTERS et al. 1986; REIMER et al. 1994). Estudos mostram que vários fatores podem afetar a expressão gênica de CAT, tais como presença de certos íons (LAI et al. 1995), citocinas (YASMINEH et al. 1991) e fármacos (VEGGI et al. 2008). No caso da infecção por *Mycobacterium leprae*, acredita-se que possivelmente este agente infeccioso necessite de íons e/ou metais presentes no hospedeiro, para regular a expressão de alguns de seus fatores de resistência, afetando negativamente a oferta destes compostos para síntese de metaloproteínas como a CAT no organismo do hospedeiro (BANERJEE et al. 2011).

Em relação ao uso de dapsona, mostrou-se que o estresse oxidativo induzido por este fármaco é mediado principalmente por seu metabólito hidroxilado, levando ao desequilíbrio pró-oxidante que envolve desde a produção de espécies reativas,

como um comprometimento nas atividades de enzimas antioxidantes, como a CAT, SOD, GSH-PX, levando à danos em macromoléculas (VEGGI et al. 2008). Neste contexto, a SOD desempenha um papel importante na remoção dos radicais livres no organismo, pois é responsável pela eliminação do  $O_2^-$  produzido em processos oxidativos (FRIDOVICH, 1995).

Neste estudo, observou-se que as concentrações eritrocitárias de SOD foram significativamente menores nos pacientes antes da administração da PQT do que nos indivíduos controle. Estes resultados foram similares a outros estudos que reportam que pacientes com hanseníase sem tratamento apresentam níveis reduzidos de SOD quando comparado aos indivíduos saudáveis (PRASAD et al.2007), e que mesmo após o uso da PQT, os níveis de SOD permaneceram reduzidos (VIJAYARAGHAVAN et al. 2005).

Possivelmente, a diminuição nas concentrações sangüíneas de SOD observados nos pacientes com hanseníase sem nenhum tratamento, esteja relacionada à ligação de antígenos do bacilo de hansen, como o PGL-1 à enzima SOD, bloqueando assim sua atividade. Além disso, pode estar associado à inibição da expressão gênica da SOD no núcleo celular, o que acarreta diminuição nas concentrações desta enzima nos eritrócitos e macrófagos (WHEELER e GREGORY, 1980; BHADWAT e BORADE, 2000). Outra hipótese que explica a redução de SOD é consumo de biometais presentes no tecido do hospedeiro pelo bacilo. Neste caso, metais presentes no meio intracelular, como o Zn, são necessários para sobrevivência e multiplicação do *M. leprae*, e o consumo destes metais pelo bacilo afeta a disponibilidade dos mesmos, interferindo assim negativamente à atividade de metaloenzimas, como a SOD, já que a mesma necessita de metais como o cobre e o zinco para exercer sua atividade (JAIN et al. 1995).

Com relação aos níveis de SOD após a administração da PQT, os pacientes também apresentaram valores diminuídos desta enzima comparados ao controle, mostrando que a administração das drogas contribuiu muito pouco para a redução da atividade enzimática. Estudos mostram a ação indireta da dapsona na redução dos níveis de SOD, visto que o metabólito DDS-NOH ao sofrer auto-oxidação pelo oxigênio leva a formação de derivados arilnitrosos (nitrosobenzeno) e à produção de radical  $O_2^-$  e outros radicais livres de oxigênio (CRIBB et al. 1991). O  $O_2^-$  pode sofrer reação não-enzimática com o óxido nítrico levando a formação do potente

oxidante - ONOO<sup>-</sup>, que além inibir a SOD, também desempenha um papel importante na destruição do *M. leprae* (MACMILLAN-CROW et al. 1996).

Tão importante quanto a mensuração da atividade de enzimas antioxidantes individual, é a avaliação da capacidade antioxidante total (AC) ou “status” antioxidante total que tem se mostrado relevante para a análise de agentes antioxidantes em amostras biológicas. A análise da AC pode fornecer informações biológicas gerais do sistema antioxidante total do organismo, visto que detecta a presença de agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos ao invés da determinação das concentrações destes antioxidantes de forma individual (GHISELLI et al.2000).

Nesse sentido, a utilização do método TEAC para avaliação de AC tem sido preconizada para avaliar este parâmetro em diversas amostras como, alimentos, extratos e amostras biológicas como o plasma (VAN DEN BERG et al. 1999). Em nosso estudo, observou-se que o TEAC no plasma dos pacientes com hanseníase sem tratamento (D0) e com tratamento (D3) apresentou nível elevado quando comparado ao controle. Acredita-se que os dados encontrados neste estudo, não foram provocados pela agente etiológico da hanseníase e nem pela administração de PQT.

Estudos relacionados a AC relatam que a interpretação da análise dos sistemas antioxidantes no organismo está associada ao tipo de amostra analisada, visto que em amostras de plasma tem se atribuído a presença de AC aos antioxidantes de baixo peso molecular de origem alimentar, enquanto, a determinação da AC em células está relacionada principalmente ao sistema antioxidante enzimático, como SOD e CAT (GHISELLI et al.2000). Os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem que o aumento observado de AC possa estar relacionado aumento de antioxidantes tíois GSH ou não-tíois, cuja síntese está relacionada principalmente com fatores nutricionais. Além disso, muitas proteínas como a ceruloplasmina, transferrina, e pequenas moléculas antioxidantes tais como, vitaminas C e E, e ácido úrico contribuem para os níveis de TEAC no plasma (RAHMAN et al. 2000).

Além da avaliação do sistema enzimático, em casos de estresse oxidativo acarretados por processos infecciosos, torna-se necessário a avaliação de espécies reativas como o NO. Este radical é uma das principais defesas contra patógenos, e são produzidos por células como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais

ativadas no local da infecção, que reagem entre si, para produzir potentes oxidantes, mais reativos e tóxicos, como o ONOO<sup>-</sup> (DARLEY-USMAR et al. 1995; EISERICH, 1996; HALLIWELL 2000).

Neste trabalho, foi evidenciado que os níveis de NO nos pacientes com hanseníase antes da administração da PQT se apresentavam elevados quando comparados ao controle e que o tratamento não contribuiu na promoção de alterações nas concentrações desta espécie reativa, visto que os níveis de NO nos pacientes em PQT foram similares aos pacientes sem tratamento. Estes dados mostram que a doença é a principal responsável pelo aumento deste radical no organismo.

A literatura mostra que níveis elevados de NO em pacientes com hanseníase é consequência da resposta imunológica desses pacientes frente à infecção bacteriana. Tal fato se explica pelo *M. leprae* ser um microrganismo intracelular, cujos mecanismos imunológicos para sua eliminação dependem principalmente de células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos). Estas células uma vez recrutadas para o sítio de infecção, produzem uma variedade de espécies reativas como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> e o NO, que atuam diretamente contra esse perfil de bactérias (RAUPACH e KAUFMAN, 2001; LE-BARILLEC et al. 2005).

Vários estudos relatam intensa expressão de iNOS em células epitelióides e células gigantes multinucleadas de granulomas induzida por *M. Leprae* e *M. tuberculosis* (KHANOLKAR-YOUNG et al.1998; FACCHETTI et al. 1999; LITTLE et al. 2001). Nesse sentido, Schön et al. (2001 ) avaliaram a produção de NO e ONOO<sup>-</sup> utilizando imunomarcadores (anti-iNOS e anti-nitrotirosina-NT) em macrófagos dos granulomas infiltrados dos nervos dérmicos de pacientes dimorfos não tratados com e sem reação reversa, nos quais detectaram forte imunomarcagem para iNOS e NT nestes macrófagos, indicando que as espécies reativas de nitrogênio possam estar envolvidos no dano neural apresentado por estes pacientes. Acredita-se que estímulos antigênicos como, lipopolissacarídeos fragmentos antigênicos de micobactérias, e citocinas imunorreguladoras como IL (Interleucina)-1, TNF (Fator de Necrose Tumoral)-α, TNF-β, IFN-γ seriam os responsáveis pela indução da expressão de iNOS em células inflamatórias (LIEW 1993; GOULART et al. 1996).

Os níveis de peroxidação lipídica nos indivíduos participantes deste estudo foi avaliado pela mensuração das concentrações plasmáticas de MDA. O MDA comumente é utilizado como indicador peroxidação lipídica e dano celular ocasionado pela ação de espécies reativas no organismo, bem como de processos oxidativos de membrana (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; DEL RIO et al. 2005; ÖZGÜNER et al. 1999). Uma vez produzido o MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (ANDRADE JR et al. 2005; STEGHENS et al. 2001; BAGIS et al. 2005).

Neste estudo, observou-se que os valores de MDA nos pacientes hansênicos sem tratamento mostraram níveis similares ao controle e o tratamento com PQT não alterou os níveis de MDA nestes pacientes. Estes dados mostram que não está ocorrendo peroxidação lipídica no plasma destes pacientes.

Um aspecto importante que pode explicar os níveis normais de MDA nos pacientes com hanseníase após o início do PQT foi à elevada concentração de GSH, visto que este antioxidante está associado à regulação dos níveis de MDA a valores normais nestes pacientes. Estudos mostram que a GSH é considerada um potente inibidor do processo de peroxidação lipídica, no entanto, os mecanismos pelo qual a GSH realiza esta função protetora ainda não estão claros (GIBSON et al. 1980; MCCAY et al. 1981).

A partir dos resultados, em conjunto, sugere-se que os pacientes com hanseníase sem tratamento não apresentam estresse oxidativo, haja vista que antes do início da terapia, os mesmos apresentam elevada produção de espécies reativas como o NO e redução de agentes antioxidantes enzimáticos, principalmente a SOD. Tal fato possivelmente ocorre em decorrência de estímulos antigênicos ou por indução de citocinas inflamatórias que estimulam a produção de NO nas células do hospedeiro e que inibem/reduzem direta ou indiretamente a expressão gênica de enzimas antioxidantes. Além do consumo de substratos como metais e íons essenciais pelo bacilo, os quais são importantes para atividade destas enzimas antioxidantes no organismo.

Por outro lado, o uso da PQT foi o responsável pela instalação de um quadro de estresse oxidativo, caracterizado por dano celular evidenciado pela formação de metemoglobina, presença de corpúsculo de Heinz (Figura 34). Ao que parece a dapsona não é o principal responsável pelos eventos oxidativos visualizados neste

estudo, pois, não observou-se correlação significativa entre as concentrações de dapsona encontradas e os parâmetros de estresse oxidativo avaliados. Outro aspecto importante foi que os antioxidantes não enzimáticos como GSH e TEAC não pareceram ser afetados pelo uso da dapsona, e que possivelmente o aumento destes compostos observados neste estudo foi em decorrência de fatores nutricionais dos pacientes.

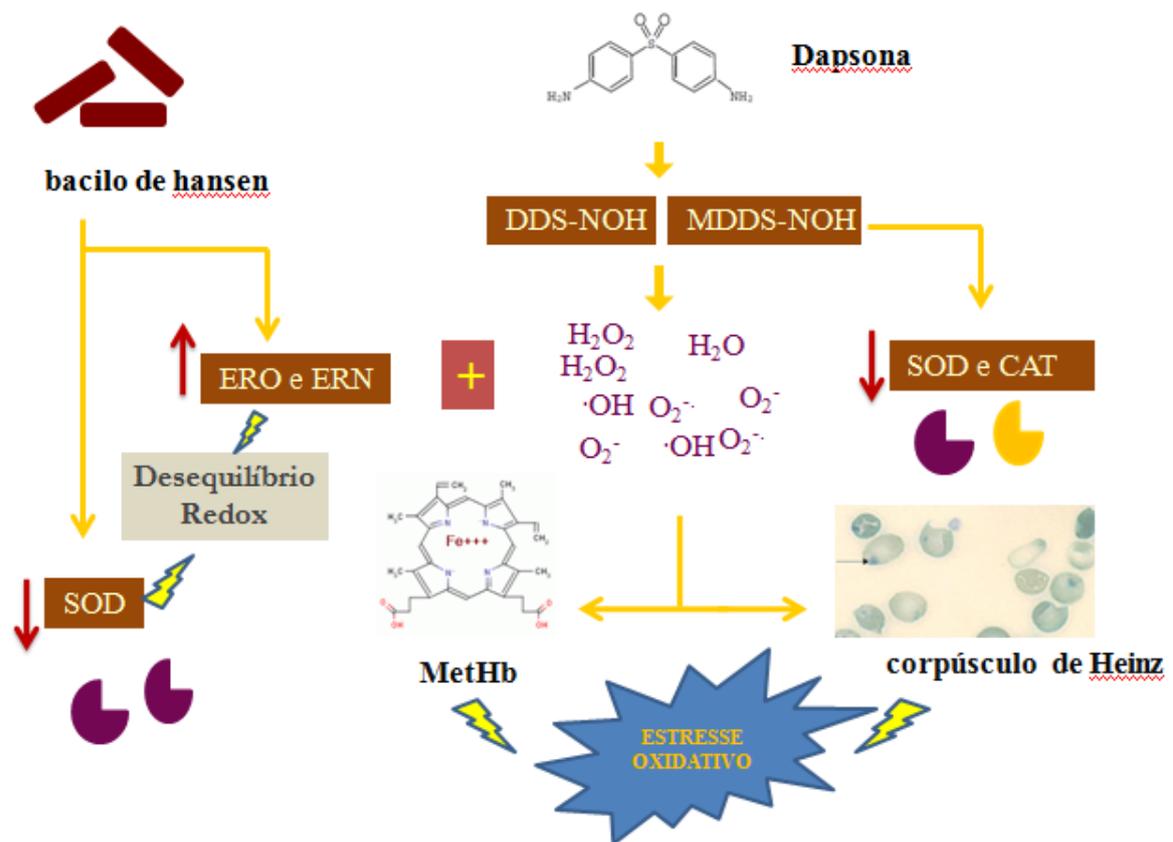


Figura 34- Hipótese sobre a geração de estresse oxidativo provocado pelo uso de dapsona.  
Fonte: Acervo Pessoal

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados pode-se concluir que:

- A média das concentrações plasmáticas de dapsona após a terceira dose supervisionada de poliquimioterapia foi de  $0.552 \pm 0.037$   $\mu\text{g/mL}$ , níveis estes que segundo a literatura não são considerados tóxicos ao organismo.
- Nos pacientes com hanseníase sem tratamento, os níveis de GSH se apresentavam aumentados significativamente, contudo a atividade de enzimas antioxidantes como SOD se apresentava reduzida em relação ao grupo controle. Em relação aos pacientes em tratamento, os níveis de GSH permaneceram aumentados e observou-se uma redução na atividade da enzima SOD, assim como da catalase.
- Em pacientes sem e com o tratamento, a capacidade antioxidante total mostrou-se aumentada de forma significativa em relação ao grupo controle.
- Os níveis de NO tanto em pacientes sem e com o tratamento se apresentaram elevados.
- Com relação aos danos oxidativos, observou-se que em pacientes sem tratamento os níveis de MDA, MetHb não diferiram em relação ao controle. Nos pacientes sob tratamento, os níveis de MDA permaneceram inalterados, no entanto o percentual de MetHb aumentou significativamente em relação ao controle e pacientes sem o tratamento.
- No que se refere a presença de corpúsculo de Heinz, este achado hematotóxico estava presente principalmente em esfregaços de pacientes em tratamento com poliquimioterapia.
- Não se observou correlação significativa entre os parâmetros indicativos de estresse oxidativo avaliados neste trabalho e as concentrações plasmáticas de dapsona.

Com isso, pode-se sugerir que o processo infeccioso desencadeado pelo *M. leprae* não foi o responsável pelo estresse oxidativo, somente por um desequilíbrio redox observado nas amostras dos pacientes com hanseníase sem tratamento. Enquanto, a Poliquimioterapia induziu o estresse oxidativo através do aumento da geração de radicais e redução das defesas antioxidantes enzimáticas, levando principalmente a formação de metemoglobina e corpúsculo de Heinz nos pacientes com hanseníase em tratamento.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados expostos neste estudo, é importante continuar investigando o estresse oxidativo ocasionado pelo uso de fármacos na hanseníase e avaliar os mecanismos de ação pelos quais as defesas antioxidantes nessa doença estão reduzidas. Além de verificar os mecanismos de evasão do *M. leprae* frente ao quadro oxidativo causado pelas defesas imunológicas do organismo e pela administração de PQT. Estes estudos poderão contribuir na investigação de futuras terapias antioxidantes que permitam minimizar o estresse oxidativo nos pacientes com hanseníase e outras doenças.

Além, disso, este estudo avaliou apenas alguns parâmetros oxidativos, desta forma, há necessidade de investigar outros efeitos observados no estresse oxidativo, como a formação de proteínas carboniladas e danos ao DNA em pacientes com hanseníases.

## 9. REFERÊNCIAS

ABDEL-HAFEZ, H.Z.; MOHAMED, E.E.; ABD-ELGHANY, A.A. Tissue and blood superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in leprosy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.24, n.6, p.704-8, Jun.2010.

AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, n. 4, p. 829-43, apr. 2003.

AHMAD, R.A.; ROGERS, H.J.; VANDENBURG, M.; WRIGHT, P. Effects of concurrent administration of other substrates of N-acetyltransferase on dapsone acetylation, **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.12,n.1, p.83-6, Jul.1981.

ANDERSON, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 111-112, p.1-14, Apr. 1998.

ANDRADE JUNIOR., D.R., SOUZA, R.B., SANTOS, S.A., ANDRADE, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.31, n. 1, p.60-68, Fev.2005.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.3, p.373-82, Mai/Jun. 2003.

BAGASRA, O.; MICHAELS, F.H.; ZHENG, Y.M.; BOBROSKI, L.E.; SPITSIN, S.V.; FU, Z.F.; TAWADROS, R.; KOPROWSKI, H. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.26, p.12041-5, Dec. 1995.

BAGIS, S.; TAMER, L.; SAHIN, G.; BILGIN, R.; GULER, H.; ERCAN, B.; ERDOGAN, C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder?. **Rheumatology International**, v.25, n.3, p.188-190, Apr. 2005.

BANERJEE, S.; FARHANA, A.; EHTESHAM, N.Z.; HASNAIN, S.E. Iron acquisition, assimilation and regulation in mycobacteria. Infection, genetics and evolution. **Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v.11, n.5, p.825-38, Jul. 2011.

BARAKA, A.S.; AYOUB, C.M.; KADDOUM, R.N.; MAALLOULI, J.M.; CHEHAB, I.R.; HADI, U.M. Severe oxyhemoglobin desaturation during induction of anesthesia in a patient with congenital methemoglobinemia. **Anesthesiology**, v.95,n.5, p.1296-7, Nov. 2001.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação de Marcadores, Nutrire: **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição**, v. 33, n. 2, p. 111-28, Ago. 2008.

BARKER, S.J.; CURRY, J.; REDFORD, D.; MORGAN, S. Measurement of Carboxyhemoglobin and Methemoglobin by Pulse Oximetry, **Anesthesiology**, v. 105, n.5, p.892-7, Nov. 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers?. **Biochemical Pharmacology**, v.77, n.8, p.1303-15, Apr.2009.

BEAVEN, G.H.; WHITE, J.C. Oxidation of phenylhydrazines in the presence of oxyhaemoglobin and the origin of Heinz bodies in erythrocytes. **Nature**, v. 173, n. 4400, p.389-91, Feb.1954.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, v.65, n.18-19, p.1865-74, 1999.

BERNABÉ, D.G.; de MORAES, N. P.; CORREIA, C. M.; FURUSE, C. F.; CRIVELINI, M. M. Tratamento do pêfigo vulgar oral com corticosteróides tóxico e sistêmico associados a dapsona e pentoxifilina, **Revista de Odontologia da Universidade Estadual Paulista**, v. 34, n. 1, p. 49-55, 2005.

BERNARDI, C.; FERREIRA, J.; DEL PINO, G.; BAKOS, L.; GERBASE, A.C.; GERVINIR, L.; GUTIERRES, M. Leprosy classification for use in control programs. **Hansenologia Internationalis**, v.6, n.2, p.130-5, 1981.

BEUTLER, E. The preparation of red cells for assay. In Beutler, E. (ed.) Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. p.8-18, Grune Straton, New York, 1975.

BEUTLER, E.; MIWA, S.; PALEK, J. Hemolytic anemias. **Revista de Investigación Clínica; Organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición** Suppl:162-8, Apr.1994.

BHADWAT, V.R.; BORADE, V.B. Increased lipid peroxidation in lepromatous leprosy. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v.66, n.3, p.121-5, May/June.2000.

BRADSHAW, T.P.; MCMILLAN, D.C.; CROUCH, R.K.; JOLLOW, D.J. Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsona hydroxylamine, **Free Radical Biology & Medicine**, v.22, n.7, p.1183-93, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005. 320 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL, Ministério da Saúde. Define ações de controle da hanseníase. Portaria Conjunta nº 125, de 26 de março de 2009. Disponível em <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2009/poc0125\\_26\\_03\\_2009.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2009/poc0125_26_03_2009.html)>. Acessado em 10 de abril de 2011.

BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D.N. Leprosy. **Lancet**, v.363, n.9416, p.1209-19, Apr. 2004.

BUCARETCHI, F.; MIGLIOLI, L.; BARACAT, E. C.E.; MADUREIRA, P.R.; DE CAPITANI, E.M.; VIEIRA, R.J. Exposição aguda à dapsona e metemoglobinemia em crianças: tratamento com doses múltiplas de carvão ativado associado ou não ao azul de metileno. **Jornal de Pediatria**, v.76, n.4, p.290-4, 2000.

BUTTERY, L.D.; SPRINGALL, D.R.; CHESTER, A.H.; EVANS, T.J.; STANDFIELD, E.N.; PARUMS, D.V.; YACOUB, M.H.; POLAK, J.M. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. **Laboratory Investigation, a Journal of Technical Methods and Pathology**, v.75, n.1, p.77-85, Jul.1996.

CAMBAU, E.; PERANI, E.; GUILLEMIN, I.; JAMET, P.; JI, B. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in Mycobacterium leprae. **The Lancet**, v.349, n. 9045 p.103-4, Jan. 1997.

CARRAZZA, M.Z.N.; **A metemoglobinemia e a dapsonemia como indicadores na intoxicação aguda por dapsona**. 101f. Tese de doutorado, (doutorado em Toxicologia), Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo , 1998.

CARRAZZA, M.Z.N; CARRAZZA, F.R.; OGA, S. Parâmetros clínicos e laboratoriais na intoxicação aguda pela dapsona. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n.4, p.396-401, Ago.2000.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v.59, n. 3, p.527-605, Jul. 1979.

CHO, S.C.; RHIM, J.H.; SON, Y.H.; LEE, S.J.; PARK, S.C. Protective effect of 4,4'-diaminodiphenylsulphone against oxidative stress but not to apoptotic stress in human diploid fibroblasts. **Free Radical Biology & Medicine**, v.44,n.8, p.871-80, Aug. 2010a.

CHO, S.C.; RHIM, J.H.; SON, Y.H.; LEE, S.J.; PARK, S.C. Suppression of ROS generation by 4,4-diaminodiphenylsulfone in non-phagocytic human diploid fibroblasts. **Experimental & Molecular Medicine**, v.42, n.3, p.223-32, Mar. 2010b.

CHUI, J.S.; POON, W.T.; CHAN, K.C.; CHAN, A.Y.; BUCKLEY, T.A. Nitrite-induced methaemoglobinaemia - aetiology, diagnosis and treatment, **Anaesthesia**, v.60, n.5, p.496-500, may 2005.

CICCOLI, L.; FERRALI, M.; ROSSI, V.; SIGNORINI, C.; ALESSANDRINI, C.; COMPORTI, M. Hemolytic drugs aniline and dapsone induce iron release in erythrocytes and increase the free iron pool in spleen and liver. **Toxicology Letters**, v.29; v.110, n.1-2, p.57-66, Oct. 1999.

COLEMAN, M.D.; JACOBUS, D.P. Reduction of dapsone hydroxylamine to dapsone during methaemoglobin formation in human erythrocytes in vitro, **Biochemical Pharmacology**, v.45, n.5, p.1027-33, mar.1993.

COLEMAN, M.D.; COLEMAN, N.A. Drug-induced methaemoglobinaemia. Treatment issues. **Drug Safety: an International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience**, v.14n.6,p.394-405,Jun1996.

COSTAGLIOLA, C. Oxidative state of glutathione in red blood cells and plasma of diabetic patients: in vivo and in vitro study. **Clinical Physiology and Biochemistry**, v.8, n.4, p.204-10, 1990.

CRIBB, A.E.; MILLER, M.; LEEDER, J.S.; HILL, J.; SPIELBERG, S.P. Reactions of the nitroso and hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole with reduced glutathione. Implications for idiosyncratic toxicity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 19.n. 5, p. 900-6, Sep.-Oct.1991.

DALPINO, D. **Atividade da NADH-redutase de metemoglobina em hemolisado e membranas eritrocitárias de pacientes hansenianos sob tratamento sulfônico**. 85f. Tese de doutorado, (doutorado em Medicina), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWELL B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Letters**, v.369, n.2-3, p.131-5, Aug. 1995.

DA-SILVA, S.S.; SAJAN, I.S.; UNDERWOOD 3RD, JP. Congenital methemoglobinemia: a rare cause of cyanosis in the newborn-a case report. **Pediatrics**, v.112, n.2, p.158-61, Aug. 2003.

DEISSEROTH, A.; DOUNCE, A.L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiological Reviews**, v.50, n.3, p.:319-75, Jul.1970.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v.15, n.4, p.316-28, Aug. 2005.

DE MORAES, N.V. : DE MELLO, M. H.; DE SOUZA, A. M.; SAMPAIO, S. V.; QUEIROZ, R. H. C. Potencialização do efeito metemoglobinizante da dapsona em ratos pela N-acetilcisteína. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p.97-104, Jan./Mar., 2008.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, **Physiological Reviews**, v. 82, n.1, p.47-95, jan.2002.

EDSTEIN, M.D.; VEENENDAAL, J.R.; NEWMAN, K.; HYSLOP, R. Excretion of chloroquine, dapsone and pyrimethamine in human milk. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.22, n.6, p.733-5, Dec. 1986.

EISERICH, J.P.; CROSS, C.E.; JONES, A.D.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. **The Journal of Biological Chemistry**, V.271, n.32, p.19199-208, Aug. 1996.

ELLARD, G.A. Absorption, metabolism and excretion of di(rhoaminophenyl) sulphone (dapsona) and di(rho-aminophenyl) sulphoxide in man, **British Journal of Pharmacology**, v.26, n.1, p.212-7, Jan.1966.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-7, May 1959.

EL-SADR, W.M.; MURPHY, R.L.; YURIK, T.M.; LUSKIN-HAWK, R.; CHEUNG, T.W.; BALFOUR JR, H.H.; ENG, R.; HOOTON, T.M.; KERKERING, T.M.; SCHUTZ, M.; VAN DER HORST, C; HAFNER, R. Atovaquone compared with dapsona for the prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection who cannot tolerate trimethoprim, sulfonamides, or both. Community Program for Clinical Research on AIDS and the AIDS Clinical Trials Group. **The New England journal of medicine**, v.339, p.26, n.1889-95, Dec. 1998.

DUSTING, G.J.; MACDONALD, P.S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Annals of Medicine**, v.27,n.3,p.395-406, Jun. 1995.

FACCHETTI, F. ;VERMI, W.; FIORENTINI, S.; CHILOSI, M.; CARUSO, A.; MARZIA DUSE, M.; NOTARANGELO, L.D.; BADOLATO, R. Expression of inducible nitric oxide synthase in human granulomas and histiocytic reactions. **The American Journal of Pathology**, v.154, n.1,p.145-52, Jan. 1999.

FARACI, F.M.; DIDION, S.P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.24, n.8, p.1367-73, Aug.2004.

FARHI, D.; BÉGON, E.; WOLKENSTEIN, P.; CHOSIDOW O. Dapsone in dermatology, **EMC-Dermatologie Cosmétologie**, v.2, n.2, p.103–117, May 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-8, Jan./Mar.1997.

FERREIRA, M.E.S. **Concentrações plasmáticas de primaquina e metemoglobinemia em pacientes com malária por plasmodium vivax**. 95f. Dissertação, (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

FORD,P.G. Dapsone. **Current Problems in Dermatology**, v. 12, n.5, p. 242-5, Sept./Oct. 2000.

FOSS N. T.; OLIVEIRA, M. S. DE A.; SILVA, C. L. Avaliação da atividade macrofagica na hanseníase Virchowiana e tuberculóide. **Hansenologia Internationalis**, v.20, n.1; p. 5-10, Jan/Jun.1995.

FOSS, N.T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 74, n.2, p. 113-119. Mar./Abr. 1999.

FOSTER, R.; SANCHEZ, A.; FOULKES, J.; CAMERON, L.J.Profile of blood elements in leprosy patients. **Indian Journal of Leprosy**, v.63, n1, p. 12-33, Jan./Mar. 1991.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.97-112, 1995.

GALLO, M.E.N.; NERY, J.A.C.; GARCIA, C.C. Intercorrências pelas drogas utilizadas nos esquemas poliquimioterápicos em hanseníase. **Hansenologia Internationalis**,. v. 20, n. 2, p. 46-50, Dez. 1995.

GATTI, G.; HOSSEIN, J.; MALENA, M.; CRUCIANI, M.; BASSETTI, M. Penetration of dapsone into cerebrospinal fluid of patients with AIDS. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, n.1, p.113-5, Jul. 1997.

GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Trends in Sharmacological sciences**, v.26, n.4, p.190-5, Apr.2005.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F. SCACCINI, C.Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n.1, p. 1106-14, Dec.2000.

GIBSON, D.D.; HORNBROOK, K.R.; MCCAY, P.B. Glutathione-dependent inhibition of lipid peroxidation by a soluble, heat-labile factor in animal tissues, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v.620, n. 3, p. 572-82, Dec.1980.

GILL, H.J.; TINGLE, M.D.; 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, Dec. 1995.

GLADER, B.E.; CONRAD, M.E. Hemolysis by diphenylsulfones: comparative effects of DDS and hydroxylamine-DDS. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.81,n.2, p.267-72, Feb.1973.

GLAZKO, A.J.; DILL, W.A.; MONTALBO, R.G.; HOLMES, E.L. A new analytical procedure for dapsone. Application to blood-level and urinary-excretion studies in normal men. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.17, n.3, p.465-73, May 1968.

GÓTH, L.; RASS, P.; PÁY, A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. **Molecular Diagnosis : A Journal Devoted to the Understanding of Human Disease Through the Clinical Application of Molecular Biology**, v.8,n.3, p.141-9, 2004.

GOULART, I.M.B.; FIGUEIREDO, F.; COIMBRA, T.; FOSS, N.T. Detection of transforming growth factor-b1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. **American Journal of Pathology**, v.148, n.3, p.911-7, Mar.1996.

GOULART,I.M.B.; PENNA,G.O.; CUNHA,G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.4, July/Aug. 2002.

GRANGER, D.L.; ANSTEY, N.M.; MILLER, W.C.; WEINBERG, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. **Methods in Enzymology**, v.301, p.49-61, 1999.

GREER, F.R.; SHANNON, M. Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water. **Pediatrics**, v.116, n.3, p.784-6, Sep. 2005.

GRENFELL, A.M.G.; GONZÁLEZ, A.V; VARGAS, M.P.S.Óxido nítrico, estrés nitrosante y función Mitocondrial. **Revista de Endocrinología y Nutrició**, v. 14, n. 4, p. 227-32,.Oct./Dic. 2006

GRUNWALD, M.H.; AMICHAÏ, B. Dapsone - the treatment of infectious and inflammatory diseases in dermatology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.7; n.3; p.187-92, Aug.1996.

GOW, A.J.; ISCHIROPOULOS, H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. **Journal of Cellular Physiology**, v.187,n.3, p,277-82, Jun. 2001.

GUERRA E. J. I.. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. **Anales de Medicina Interna**, v.18, n.6, p. 326-35, Jun. 2001.

HAGE, R. **Efeitos do fracionamento da dose de energia na Terapia fotodinâmica em tumor de cólon em ratos**. 68f.Tese de doutorado. (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-graduação em Cirurgia e Experimentação. Universidade Federal de São Paulo,2008.

HALIM, N.K.; OGBEIDE, E. Haematological alterations in leprosy patients treated with dapsone. **East African Medical Journal**, v.79,n.2,p.100-2, Feb.2002.

HALLIWELL, B. Still life in oxidation hypothesis of atherogenesis. **The Lancet**, v. 356, n.9224, p. 165 - 166, Jul. 2000.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, v.142, n. 2, p.231-255, May 2004.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press ,2007.

HAMID, Q.; SPRINGALL, D.R.; RIVEROS-MORENO, V.; CHANEZ, P.; HOWARTH, P.; REDINGTON, A.; BOUSQUET, J.; GODARD, P.; HOLGATE, S.; POLAK, J.M. Induction of nitric oxide synthase in asthma. **The Lancet**, v.342, n.8886-8887, p.1510-3, Dec. 1993.

HANSEN, D.G.; CHALLONER, K.R.;SMITH, D.E. Dapsone intoxication: two case reports. **The Journal of Emergency Medicine**, v.12, n.3, p.347-51, May-Jun. 1994.

HAYMOND, S.; CARIAPPA, R.; EBY, C.S.; SCOTT, M.G. Laboratory assessment of oxygenation in methemoglobinemia. **Clinical Chemistry**, v.51, n.2, p.434-44, Feb. 2005.

HEGESH, E.; GRUENER, R.N.; COHEN, S.; BOCHKOVSKY, R.; SHUVAL, H.I. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. **Clinica Chimica Acta**, v.30, n.3, p. 679- 82, Dec. 1970.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K.A.; GABBITA, S.P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R.A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Biology & Medicine**,v.28,n.10, p.1456-62, May 2000.

HICKS, J.J.; TORRES-RAMOS Y.D.; SIERRA-VARGAS, M.P. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. **Revista de Endocrinología y Nutrición**, v. 14, n. 4, p. 223-226, Oct-Dic 2006.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-9, 2008.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology & Medicine**,v.34,n.2,p.145-69, Jan.2003.

JAIN, A.; MUKHERJEE, A.; CHATTOPADHYA, D.; SAHA, K. Bio metals in skin and sera of leprosy patients and their correlation to trace element contents of *M. leprae* and histological types of the disease; a comparative study with cutaneous tuberculosis. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases: Official Organ of The International Leprosy Association**, v.63, n.2, p.249-58, jun. 1995.

JANDL, J. H.; ENGLE, L. K.; ALLEN, D.W. Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. I. Heinz body anemia as an acceleration of red cell aging. The **Journal of Clinical Investigation**, v.39, n.12, p.1818-1836, Dec.1960.

JL, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222 n.3, p.283-92, Dec. 1999.

JOSEPH, P. D.; MANNERVIK, B.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.; Molecular Toxicology, 1st ed., Oxford University Press: New York, 1997, p.152-186.

KANIAS, T.; ACKER, J.P. Biopreservation of red blood cells--the struggle with hemoglobin oxidation. **The FEBS journal**, v.277, n.2,p.343-56, Jan.2010.

KERN, K.; LANGEVIN, P.B.; DUNN, B.M. Methemoglobinemia after topical anesthesia with lidocaine and benzocaine for a difficult intubation. **Journal of Clinical Anesthesia**, v.12, n.2, p.167-72, Mar. 2000.

KHANOLKAR-YOUNG, S.; SNOWDON, D.; LOCKWOOD, D.N.J. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TFG- $\beta$ ) in leprosy lesions. **Clinical and Experimental Immunology**, v.113, n.3, p.438-42, sep. 1998.

KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, n.13, p.5159-62, Jul. 1989.

KRAMER, P.A.; GLADER, B.E.; LI, T.K. Mechanism of methemoglobin formation by diphenylsulfones. Effect of 4-amino-4'-hydroxyaminodiphenylsulfone and other p-substituted derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 21, n.9:p.1265-74, May 1972.

KRINSKY, N.I. Mechanism of action of biological antioxidants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.200, n.2, p.248-54, Jun. 1992.

KWADIJK, S.; TORAÑO, J.S. High-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of dapsone and its hydroxylated metabolite in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v.16, n.3, p.:203-8, May 2002.

LACHANT, N.A.; TANAKA, K. R. Dapsone-Associated Heinz Body Hemolytic Anemia In a Cambodian Woman with Hemoglobin E Trait. **American Journal of the Medical Sciences**, v.294, n.5, Nov.1987.

LAI, C.C.; HUANG, W.H.; ASKARI, A.; KLEVAY, L.M.; CHIU, T.H. Expression of glutathione peroxidase and catalase in copper-deficient rat liver and heart. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.6, n.5, p.256-62, May 1995.

LAMMKAUSTA, K.; KANGAS, L.; LAMMINTAUSTA, R. The pharmacokinetics of dapsone and acetylated dapsone serum and saliva. **International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy**, v.17, n.4, p.159-63, Apr. 1979.

LE-BARILLEC, K.; MAGALHAES, J.G.; CORCUFF, E.; THUIZAT, A.; SANSONETTI, P. J.; PHALIPON, A.; DI SANTO, J. P. Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*. **The Journal of Immunology**, v.175, n.3, p.1735-40, Aug. 2005.

LIEW, F.Y. The role of nitric oxide in parasitic disease. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.87, n.6, p.634-42, dec.1993.

LIMA, E.S.; ROLAND, I.A.; MAROJA, M.F.; MARCON, J.L. vitamin a and lipid peroxidation in patients with different forms of leprosy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 49, n.4, p.211-4, jul./Aug. 2007.

LINDEN, R. **Análise toxicológica sistemática e fenotipagem de YP2C19: contribuição ao monitoramento terapêutico da amitriptilina**. 148f. Tese, (doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LINDER, M.W.; KECK, P.E Jr. Standards of laboratory practice: antidepressant drug monitoring. **National Academy of Clinical Biochemistry. Clinical chemistry**, v.44, n.5, p. 1073-84, May 1998.

LITTLE, D.; KHANOLKAR-YOUNG S.; COULTHART, A.; SUNEETHA, S.; LOCKWOOD, D.N.J. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. **Infection and Immunity**, v.69, n.5, p.3413- 7, May. 2001.

MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.125, n.3, p. 376–93, Mar.2010.

MALFARÁ, W. R.; UYEMURA, S. A.; QUEIROZ, R. H. C. Correlação entre dose/concentração plasmática e avaliação de alterações hepáticas e renais em ratos Wistar tratados com o esquema ROM. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n.2, p. 167-172, Mar/Apr. 2005.

MALINTAN, N.T.; MOHD, M.A. Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography. A**, v. 1127, n.1-2, p.154-60, Sep. 2006.

MANNICK, E.E.; BRAVO, L.E.; ZARAMA, G.; REALPE, J.L.; ZHANG, X.J.; RUIZ, B.; FONTHAM, E.T.; MERA, R.; MILLER, M.J.; CORREA, P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. **Cancer Research**, v.56, n.14, p.3238-43, Jul. 1996.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v.78, n.6, p.927-30, Sep.1994.

MASTERS, C.; PEGG, M.; CRANE, D. On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.70, n.2, p.113-20, May, 1986.

MAYNE, S.T. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, Supplement 3, p. 933S-940S, Mar. 2003.

MCCAY, P.B.; GIBSON, D.D.; HORNBROOK, K.R. Glutathione-dependent inhibition of lipid peroxidation by a soluble, heat-labile factor not glutathione peroxidase, **Federation Proceedings**, v.40, n.2, p.199-205, Feb.1981.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, n.2, p.6049-55, Nov.1969.

MC EVOY, G.K.; editor. AHFS drug information. Bethesda (MD): **American Society of Health-System Pharmacists**, p. 605–9, 2009.

MACMILLAN-CROW, L.A.; CROW, J.P.; KERBY, J.D.; BECKMAN, J.S.; THOMPSON, J.A. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, n.21, p.11853-8, Oct. 1996.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science**, v. 220, n. 4596, p. 472-7, apr.1983.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal: Applications in research and therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v.51, n.2, p.155-94, 1991.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research**,v.674, n.1-2,p.73-84, Mar.2009.

MILLS, C.C.; RANDALL, H.P. Hemoglobin catabolism. II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. **The Journal of Biological Chemistry**, v.232, n.2, p.589-98, jun.1958.

MITCHELL, P.B. Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications. **British Journal of Clinical Pharmacology**,v.49,n.4, p.303-12, Apr.2000.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation**, v.21.n.4,p.361-74, Aug. 1991.

MONTERO, M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes revisión. **Anales de la Facultad de Medicina**. v.57, n.4, p.278-281, 1996.

NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA, MDA G., LAPA E SILVA, J.R.; NATHAN, C.; XIE, Q.W.; MUMFORD, R.; WEIDNER, J.R.; CALAYCAY, J.; GENG, J.; BOECHAT, N.; LINHARES, C.; ROM, W.; HO, J.L. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.183, n.5, p.2293-302, May 1996.

NONAKA, H.; TSUJINO, T.; WATARI, Y.; EMOTO, N.; YOKOYAMA, M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. **Circulation**, v.104, n.10, p.1165-70, Sep. 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, n.2, p.351-8. Jun. 1979.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Weekly epidemiological record, v.84, n. 33, p. 333–340, 14 august 2009. Disponível em: < <http://www.who.int/wer/2009/wer8433/en/index.html>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Weekly epidemiological Record. v.85, n.35, p. 337–48, Aug. 2010 . Disponível em: < <http://www.who.int/wer/2010/wer8535/en/index.html>>.

OURY, T.D.; CRAPO, J.D.; VALNICKOVA, Z.; ENGHILD, J.J. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. **The Biochemical journal**, v.317, n. Pt 1, p.51-7, Jul. 1996.

ÖZGÜNER M.F.; DEL BA N.; TAHAN, V.; KOYU, A.; KÖYLÜ H. Effects of industrial noise on the blood levels of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and malondialdehyde. **Eastern Journal of Medicine**, v.4, n.1, p.13-5, 1999.

PANIKER, U.; LEVINE, N. Dapsone and sulfapyridine, **Dermatologic Clinics**, v. 19, n. 1, p.79-85, Jan. 2001.

PARDILLO, F.E.; FAJARDO, T.T.; ABALOS, R.M.; SCOLLARD, D.; GELBER, R.H. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. **Clinical infectious disease**, v.44,n.8, p.1096-9, Apr. 2007.

PENNA, M.L.; DE OLIVEIRA, M.L.; PENNA, G.O. The epidemiological behaviour of leprosy in Brazil., **Leprosy Review**.80,n.3,p.332-44, Sep. 2009.

PÉREZ-MATUTE,P.; ZULET, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. **Current Opinion in Pharmacology**, v.9, n. 6, p.771–779, Dez. 2009

PERVAIZ, S.; CLEMENT, M.V. Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species?.**The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.7-8, p. 1297-304, 2007..

PETERS, J.H.; GORDON, G.R.; KARAT, A.B. Polymorphic acetylation of theantibacterials sulfamethazine and dapsone in South Indian subjects.**The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n.4, p.641-8, Jul. 1975.

PIETERS, F.A.; ZUIDEMA, J. The pharmacokinetics of dapsone after oral administration to healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 22, n.4, p.491-4, Oct.1986.

PRASAD, C.V.B.; KODLIWADMATH, M.V.; KODLIWADMATH, G.B. Erythrocyte superoxide dismutase, catalase activities and hydrogen peroxide induced lipid peroxidation in leprosy. **Leprosy Review**. v.78, n.4, p.391–7, dec. 2007.

PRASAD C.V.B.; KODLIWADMATH,M.V.; KODLIWADMATH,G.B Erythrocyte glutathione peroxidase, glutathione reductase activities and blood glutathione content in leprosy. **The Journal of Infection**, v.56, n.6, p.469-473, Jun. 2008.

PODZAMCZER, D.; SALAZAR, A.; JIMÉNEZ, J.; CONSIGLIO, E.; SANTÍN, M.; CASANOVA, A.; RUFÍ, G.; GUDIOL, F. Intermittent trimethoprim-sulfamethoxazole compared with dapsone-pyrimethamine for the simultaneous primary prophylaxis of Pneumocystis pneumonia and toxoplasmosis in patients infected with HIV. **Annals of Internal Medicine**, v.122, n.10, p.755-61,May 1995.

QUEIROZ, R. H. C.; JUNIOR MELCHIOR, E.; DE SOUZA, A. M.; GOUVEIA, E.; BARBOSA, J. C.; DE CARVALHO, D. Haematological and biochemical alterations in leprosy patients already treated with dapsone and MDT, **Pharmaceutics Acta Helvetiae**, v. 72,n.4, p. 209-13,sep.1997.

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.12, n.3, p.87-8, Mar.1991.

RAHMAN, I.; SWARSKA, E.; HENRY, M.; STOLK, J.; MACNEE, W.Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax*, v. 55, n.3, p.189-93, Mar. 2000

RASBRIDGE, M.R., SCOTT, G.L. The haemolytic action of dapsone: the effect on red-cell glycolysis . *British journal of haematology*, v.24, n.2, p.169-81, Feb.1973.

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S.H. Immune responses to intracellular bacteria. **Current Opinion in Immunology**, v.13, n.4, p.417-28, Aug. 2001.

REDDY, Y.N.; MURTHY, S.V.; KRISHNA, D.R.; PRABHAKAR, M.C. Oxidative stress and anti-oxidant status in leprosy patients. **Indian Journal of Leprosy**, v.75, n.4,p.307-16, Oct./Dec.2003.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H. 3rd; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone **Biochemical Pharmacology**, v.55, n.6, p.803-10, Mar. 1998.

REILLY, T.P.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Methemoglobin formation by hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone: implications for differences in adverse drug reactions. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.288, n.3, p. 951-9, Mar. 1999.

REIMER, D.L.; BAILLEY, J.; SINGH, S.M. Complete cDNA and 5' genomic sequences and multilevel regulation of the mouse catalase gene. **Genomics**, v.21, n.2, p.325-36, May, 1994.

REPETTO, M.; REIDES, C.; GOMEZ CARRETERO, M.L.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LLESUY S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v.255, n.2, p.107-17, Nov. 1996.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. Brazilian journal of medical and biological research, v.35, n.5, p.523-34, May 2002.

REYES, G.C.; SÁNCHEZ, I.R.; CALZADA-MENDOZA, C.C.; OLIVARES-CORICHI, I.M. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. **Revista de Endocrinología y Nutrición**, v. 14, n.4, p. 233-6, Oct. 2006.

RIMIOLLI, L.F.; GODOY, M.F. Quantificação do estresse oxidativo no sangue de hansenianos sob efeito ou não de tratamento específico. **Hansenologia Internationalis**, v.26, n.2, p. 93-98, Dez. 2001.

RIMOLLI, L.F. **Efetividade da vitamina E na redução do estresse oxidativo, em hansenianos da forma multibacilar sob tratamento**. Tese de doutorado-Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP, 2006.

ROCHE, E.; ROMERO-ALVIRA, D. Changes in DNA induced by oxidative stress. **Medicina Clínica**, v.106, n.4, p.144-53. Feb. 1996.

RÓDENAS, J.; MITJAVILA, M.T.; CARBONELL, T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. **The American Journal of Physiology**, v.274, n.3 Pt 1, p.C827-30, Mar.1998.

RONALD, F.R. Methemoglobinemia and sulphhemoglobinemia. In: WYNGAARDEN, J.B., SMITH Jr., L.H., eds. Cecil textbook of medicine. 17. ed. Philadelphia: Saunders, 1985. p. 934-935.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n. 1, p.112-9, Jan./Fev.2001.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J. & SAURA-CALIXTO, F. D. (2007). Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado técnico, Embrapa Agroindústria Tropical, 1-4.

SAKURAI, H.; KOHSAKA, H.; LIU, M.F.; HIGASHIYAMA, H.; HIRATA, Y.; KANNO, K.; SAITO, I.; MIYASAKA, N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. **The Journal of Clinical Investigation**, v.96, n.5, p.2357-63, Nov. 1995.

SALAS, J. N. Metahemoglobinemias adquiridas. **JANO, Medicina y Humanidades**, n. 1625, Oct./Nov. 2006.

SÁNCHEZ- SALDAÑA, L. Medicamentos antiguos y vigentes en dermatología. **Dermatología Peruana**, v.18, n.3, p. 229-26, Jul./Set. 2008.

SCHMIDT, H.H.; WALTER, U. NO at work. **Cell**, v.78, n.6, p.919-25, Sep.1994.

SCHISLER, N.J.; SINGH, S.M. Inheritance and expression of tissue-specific catalase activity during development and aging in mice. **Genome**, v. 29, n.5, p.748-60, Oct. 1987.

SCIBIOR, D.; CZECZOT, H. Catalase: structure, properties, functions. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej**, v.60, p. 170-80, 2006.

SCHÖN, T.; HERNANDEZ-PANDO, R.H.; NEGESSE, Y.; LEEKASSA, R.; SUNDQVIST, T.; BRITTON, S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. **The British Journal of Dermatology**, v.145, n. 5, p.809-15, Nov. 2001.

SCHÖN, T.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; BAQUERA-HEREDIA, J.; NEGESSE, Y.; BECERRIL-VILLANUEVA, L.E.; EON-CONTRERAS, J.C.; SUNDQVIST, T.; BRITTON, S. Nitrotyrosine localization to dermal nerves in borderline leprosy. **The British Journal of Dermatology**, v.150, n.3, p.570-4, Mar.2004.

SHEPARD, C.C. Combinations involving dapsone, rifampin, clofazimine, and ethionamide in the treatment of *M. leprae* infections in mice. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v.44, n. 1-2, p.135-9, Jan./Jun.1976.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**. v. 91; n.3C, p. 31S-38S, Set. 1991.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v.215, n. 2, p.213-9, Jul. 1993.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82,n.2,p.291-5, Mar.1997.

SINAN/SVS/MS. Hanseníase Coeficiente de detecção geral de casos novos de hanseníase Brasil e regiões, 1990 a 2009. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/graf5\\_coef\\_geral\\_br\\_regioes\\_1990\\_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/graf5_coef_geral_br_regioes_1990_2009.pdf)>. Acesso em 16 de maio de 2010a.

SINAN/SVS/MS. Hanseníase - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, Ano 2009. Disponível em <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em 16 de maio de 2010b.

SINAN/SVS/MS. Hanseníase - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, Ano 2010. Disponível em <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em 16 de maio de 2010c.

SMITH, R. S.; ALEXANDER, S. Heinz-body Anaemia Due to Dapsone. **British Medical Journal**, v. 1, n.5122, p. 625–7, Mar. 1959.

SOHAL, R.S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, n.5271, p.59-63, Jul. 1996.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. **Comptes Rendus Biologies**, v.327,n.7, p.649-62, Jul.2004.

SOUZA, C.S.Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina, Ribeirão Preto*, Simpósio: HANSENÍASE, .30, n. 325-34, Jul./Set. 1997.

STEGHENS, J.P.; KAPPEL, A.L.V.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.2, p.242-9, Jul. 2001.

STRALIN, P.; KARLSSON, K.; JOHANSSON, B.O.; MARKLUND, S.L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, V.15, n.11, p.2032-6, Nov.1995.

SUYAMA, H.; MORIKAWA, S.; NOMA-TANAKA, S.; ADACHI, H.; KAWANO, Y.; KANEKO, K.; ISHIHARA,S. Methemoglobinemia induced by automobile exhaust fumes. **Journal of Anesthesia**, v.19, n.4, p.333-5, 2005.

SWITALA, J.; LOEWEN, P.C. Diversity of properties among catalases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.401, n.2, p.:145-54, May 2002.

TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, n.4, p.189–198, Sep. 2001.

TEMPLE, M.D.; PERRONE, G.G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **TRENDS in Cell Biology**, v.15, n.6, p. 319-26, Jun. 2005.

THORPE, G.W. ; FONG, C.S. ; ALIC, N. ; HIGGINS, V.J. ; DAWES, I.W. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 17, p. 6564-9, Apr.2004.

UDEH, C.; BITTIKOFER, J.; SUM-PING, S.T. Severe methemoglobinemia on reexposure to benzocaine. **Journal of Clinical Anesthesia**, v.13, n.2, p. 128-30, Mar. 2001.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSNER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VAGE, C.; SAAB, N.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. 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, Dec.1994.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G.R.M.M; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v.66, n.4, p.511-517, Sep.1999.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B.; BENFATO, V.M.M.S.; KUBOTA, C.T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 5, n. 3, p. 1323 – 38, 2007.

VEGGI, L.M.; PRETTO, L.; OCHOA, E.J.; CATANIA, V.A.; LUQUITA, M.G.; TABORDA, D.R.; SÁNCHEZ POZZI, E.J., IKUSHIRO, S.; COLEMAN, M.D.; ROMA, M.G.; MOTTINO, A.D. Dapsone induces oxidative stress and impairs antioxidant defenses in rat liver. **Life Sciences**, v.83, n.5-6, p.155-63, Aug. 2008.

VIEIRA, J.L.; VALENTE, MDO S. Thalidomide levels in patients with erythema nodosum leprosum, **Therapeutic Drug Monitoring**, v.31, n.5, p.602-3, Oct. 2009.

VIEIRA, J.L.; RIVEIRA, J.G.; MARTINS, ADE N.; SILVA, J.P.; SALGADO, C.G. Methemoglobinemia and dapsone levels in patients with leprosy. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, n.3, p.319-21, May/Jun.2010.

VIJAYARAGHAVAN, R.; SURIBABU, C.S.; SEKAR, B.; OOMMEN, P.K.; KAVITHALAKSHMI, S.N.; MADHUSUDHANAN, N.; PANNEERSELVAM C. Protective role of vitamin E on the oxidative stress in Hansen's disease (Leprosy) patients. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.59, n.10, p.1121-8, Oct. 2005.

VODOVOTZ, Y.; LUCIA, M.S.; FLANDERS, K.C.; CHESLER, L.; XIE, Q.W.; SMITH, T.W.; WEIDNER, J.; MUMFORD, R.; WEBBER, R.; NATHAN, C.; ROBERTS, A.B.; LIPPA, C.F.; SPORN, M.B. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. **The Journal of Experimental Medicine**, v.184, n.4, p.1425-33, Oct. 1996.

ZAGO, A.S.; ZANESCO, A. Óxido Nítrico, Doenças Cardiovasculares e Exercício Físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.87 n.6, Dec. 2006.

ZHU, Y.I.; STILLER, M.J. Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.45, n.3, p.420-34, Sep. 2001.

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

WELLS, P.G.; MCCALLUM G.P. ; CHEN C.S. ; HENDERSON J.T. ; LEE C.J. ; PERSTIN, J. ; PRESTON, T.J. ; WILEY, M.J. ; WONG, A.W. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. **Toxicological Sciences**, v.108, n.1, p.4-18, Mar. 2009.

WHEELER, P.R.; GREGORY, D. Superoxide dismutase activity and catalase in *M. laprae* purified from armadillo liver. **Journal of General Microbiology**, v.121, n.2, p.457-64, dec. 1980.

WINTERBOURN, C.C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Seminars in Hematology**, v.27, n.1, p.41-50, jan.1990.

WOLF, R.; TÜZÜN, B.; TÜZÜN, Y. DAPSONE: Unapproved Uses or Indications. **Clinics in Dermatology**, v.18, n.1, p.37-53, Jan./Feb. 2000.

WOLVERTON, SE. Monitoring for adverse effects from systemic drugs used in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 26, n.5 Pt 1, p.661-79, May 1992.

WOZEL, G. editor. Dapson—Pharmakologie, Wirkmechanismus und klinischer Einsatz. Stuttgart (Germany): Georg Thieme Verlag, New York, 1996.

WOZEL, V.E. Innovative Use of Dapsone. **Dermatologic Clinics**, v.28, n3, p.599-610, Jul. 2010.

WRIGHT, R.O.; LEWANDER, W.J.; WOOLF, A.D. Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management. **Annals of Emergency Medicine**, v.34, n.5, p.646-56, Nov. 1999.

WU, G.; FANG, Y.Z.; YANG, S.; LUPTON, J.R.; TURNER, N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**, v.134, n.3, p. 489–92, Mar. 2004.

YASMINEH, W.G.; PARKIN, J.L.; CASPERS, J.I.; THEOLOGIDES, A. Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of rat liver. **Cancer Research**, v.51, n.15, p.3990-5, Aug. 1991.

YOUNGSON, R. Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes. p.168, Rio de Janeiro, 1995.

# APÊNDICE

## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Concordo em participar da Pesquisa: **“CORRELAÇÃO ENTRE DOSAGEM DE DAPSONA E ESTRESSE OXIDATIVO EM AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES COM HANSENÍASE EM USO DE POLIQUIMIOTERAPIA”** cujos objetivos são:

- Dosagem da concentração plasmáticas da Dapsona, um dos medicamentos que constituem o esquema PQT.
- Verificar se existe relação entre a administração da Dapsona e o aparecimento de estresse oxidativo, através da determinação da concentração sanguínea de enzimas sanguíneas e avaliação de dano celular.
- Avaliar como a administração deste fármaco pode provocar dano as hemácias.

Ressaltamos que, os pacientes que decidirem participar deste estudo, têm assegurados os seguintes itens, conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde:

- o A garantia de receber esclarecimento a qualquer dúvida a respeito da pesquisa;
- o A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento da pesquisa;
- o A segurança de que não haverá divulgação personalizada das informações;
- o As informações sobre o resultado do estudo.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito. Autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.  
 Belém, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
 Paciente/Responsável legal

Responsáveis pelo Projeto:

\_\_\_\_\_  
 Mst. TAYSA RIBEIRO SCHALCHER

Telefone: (91) 81577151

Endereço: Passagem Santa Clara, 25

Marco/Belém- PA.

\_\_\_\_\_  
 Dra. MARTA CHAGAS MONTEIRO

Telefone: (91) 92072276

Endereço: Rua Rodolfo Chermont, 318,

cond. Murtosa, casa 15. Marambaia, Belém/PA

\_\_\_\_\_  
 Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA) – Complexo de sala de Aula/ ICS-sala 13- Campus Universitário, nº1, Guamá- CEP: 66075-110 – Belém-Pará. Tel/Fax. 3201-7735. e-mail: cepccs@ufpa.br.

# **ANEXO**

**ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM  
SERES HUMANOS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**



Carta Provisória: 100/09 CEP-ICS/UFPA

Belém, 14 de outubro de 2009.

À  
Prof<sup>ma</sup>. Dra. Marta Chagas Monteiro

Senhora Pesquisadora,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa "**Correlação entre dosagem de dapsona e estresse oxidativo em amostras sanguíneas de pacientes com hanseníase em uso de poliquimioterapia**" de CAAE 0006.0.073.000-09 e parecer nº 079/09 CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 07 de outubro de 2009.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar o relatório parcial do mesmo até o dia 15 janeiro de 2011, no CEP-ICS/UFPA, situado na Cidade Universitária Professor José da Silveira Netto - Guamá, Campus profissional, no Complexo de sala de aula do ICS – sala 13 (Altos).

Atenciosamente,

Prof. Dr. Wallace Raimundo Araújo dos Santos.  
Coordenador do CEP-ICS/UFPA

## ANEXO B- Autorização da Unidade de Referência Especializada Dr. Marcello Cândia



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA  
SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE  
INSTITUTO POBRES SERVOS DA DIVINA PROVIDÊNCIA  
URE DR. MARCELLO CÂNDIA



### TERMO DE ACEITE

Informamos para os devidos fins que o Conselho Técnico-Científico da Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Cândia deu parecer favorável a acadêmica Taysa Ribeiro Schalcher para realizar a Pesquisa para obtenção de grau de Mestre intitulado: “Correlação entre dosagem de dapsona e desenvolvimento do estresse oxidativo em pacientes com hanseníase em uso de poliquimioterapia”.

Outrossim, ressaltamos que a aluna tem autorização para realizar sua pesquisa nessa Instituição, consultar informações pertinentes, sem, no entanto, retirar da Unidade qualquer documento sem autorização. Informamos ainda que as informações fornecidas por esta Unidade devem ser necessariamente registradas no trabalho segundo as normas da ABNT, assim como, feita a devida referência à Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Cândia.

Marituba, 20 de Maio de 2010.

Renata Pamplona Novaes de Oliveira  
Diretora da URE Marcello Cândia.

## ANEXO C - AUTORIZAÇÃO DA SECRETÁRIA DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DE BELÉM.

  
 PREFEITURA MUNICIPAL DE BELÉM  
 SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE  
 NÚCLEO DE PROMOÇÃO A SAÚDE - NUPS

### COMISSÃO PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA - CAPP

#### Autorização

Em atenção a carta de solicitação, datada de 07/10/2010 assinada pela Dr<sup>a</sup> Maria Chagas Monteiro – Diretora da Faculdade de Farmácia do Instituto de Ciências – UFPA –, solicitando autorização para execução do Projeto de mestrado, intitulado “Correlação entre dosagem da dapsona e estresse oxidativo em amostras sanguíneas de pacientes com hanseníases em uso de poliquimioterapia”. De autoria da aluna Taysa Ribeiro Schalcher do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas/ PPGCF.

O projeto visa determinar as concentrações plasmáticas de dapsona em pacientes com hanseníases com a forma multibacilar e paucibacilar, correlacionando-as com desenvolvimento do estresse oxidativo.

Esta Comissão autoriza a realização da pesquisa, na Unidade de Saúde do Guamá/ Belém-PA. A pesquisadora fica ciente, conforme o termo de compromisso assinado, de encaminhar a este CAPP/SESMA o relatório final da pesquisa realizada.

Informamos que a Portaria de autorização ainda será publicada.

Belém, 05 de Novembro de 2010

Atenciosamente,

UPS - SESMA

Belém, em 10/11/2010

Dr. Sérgio

Taysa Ribeiro Schalcher

  
 Odineia Maria da Silva

Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPP

Odineia M<sup>a</sup> da Silva  
 Educação Permanente CAPP  
 NUPS / SESMA

- Odineia com 16/12/10  
  
 Odineia M<sup>a</sup> da Silva  
 Educação Permanente CAPP  
 NUPS / SESMA