



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

**O EFEITO *in vitro* DOS COMPOSTOS ÁCIDO ALFA-LIPOICO E
RESVERATROL EM PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO
DURANTE O USO DA POLIQUIMIOTERAPIA PARA HANSENÍASE**

MARIELY CRISTINE AMADOR PESSÔA

BELÉM - PA
2014



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

O EFEITO *in vitro* DOS COMPOSTOS ÁCIDO ALFA-LIPOICO E
RESVERATROL EM PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO
DURANTE O USO DA POLIQUIMIOTERAPIA PARA HANSENÍASE

Aluno: Mariely Cristine Amador Pessôa

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

Dissertação 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
2014

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

Pessôa, Mariely Cristine Amador, 1989-

O efeito in vitro dos compostos ácido alfa-lipoico e resveratrol em parâmetros do estresse oxidativo durante o uso da poliquimioterapia para hanseníase / Mariely Cristine Amador Pessôa ; orientador, Marta Chagas Monteiro. — 2014.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2014.

Inclui bibliografias.

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

CDD 22. ed. 616.998

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIELY CRISTINE AMADOR PESSÔA

“O EFEITO *in vitro* DOS COMPOSTOS ÁCIDO ALFA-LIPOICO E RESVERATROL EM PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO DURANTE O USO DA POLIQUIMIOTERAPIA PARA HANSENÍASE”

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 em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Marta Chagas Monteiro, PPGCF/UFPA
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a Lilian Lund Amado
PPGEAP/UFPA

Prof^a. Dr^a Márcia Cristina Furtado Nascimento
PPGNMT/UFPA

AGRADECIMENTOS

Ao Onipotente.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/PPGCF-UFPA, por fornecerem as ferramentas necessárias para a conclusão dessa etapa.

À Prof^a. Dra. Marta Chagas Monteiro pela confiança, pelo conhecimento repassado e pelos conselhos em boa hora.

Às instituições de saúde que me permitiram realizar essa pesquisa: UBS Pedreira e URE Dr. Marcello Candia, assim como aos enfermeiros e técnicos de enfermagem responsáveis pelo setor da PQT.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral de Belém, pelo auxílio na leitura dos exames hematológicos.

Ao laboratório de Controle de Qualidade, na pessoa da Prof^a. Dra. Roseane Ribeiro Costa, por contribuir para a realização dos experimentos.

À família, pelo incentivo para seguir adiante e por cada vitória conquistada.

Aos inúmeros amigos, por compreenderem as ausências, pelas palavras amigas e risadas compartilhadas.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, em nome dos momentos de descontração em meio aos experimentos de todo santo dia!

Ao meu amor, pela paciência infindável, companheirismo e mensagens de apoio.

E não menos importante, a todos os que contribuíram para a realização desse estudo.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

(Albert Einstein)

RESUMO

“O EFEITO *in vitro* DOS COMPOSTOS ÁCIDO ALFA-LIPOICO E RESVERATROL EM PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO DURANTE O USO DA POLIQUIMIOTERAPIA PARA HANSENÍASE”

A hanseníase é uma doença infecciosa que ainda representa uma preocupação na saúde pública mundial no século XXI. A poliquimioterapia preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), apesar de ser a barreira mais eficaz no combate ao *Mycobacterium leprae*, é um dos responsáveis pela produção de EROs e desenvolvimento de metemoglobinemia e anemia hemolítica nos pacientes em tratamento. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi verificar os possíveis danos oxidativos em pacientes hansenianos em uso de poliquimioterapia (PQT), ao avaliar parâmetros hematológicos e o perfil oxidativo em eritrócitos, e detectar os efeitos do tratamento *in vitro* com os antioxidantes resveratrol (RSV) e ácido alfa-lipoico (ALA) na prevenção da metemoglobinemia e na atividade de enzimas antioxidantes. Os resultados obtidos demonstraram diminuição dos valores de hemácias e reticulocitose nos pacientes entre o quarto e o sétimo mês de tratamento com PQT, comparados aos valores encontrados no grupo controle. A formação de metemoglobina (MetHb) aumentou a partir do 5º mês de tratamento com PQT, e a utilização de RSV e ALA na concentração de 100 µM manteve o percentual de MetHb somente em amostras de pacientes que estavam entre o 4º e 6º mês de uso de PQT. Observou-se nos pacientes hansenianos uma atividade de SOD similar ao controle e uma decrescida atividade de CAT, o que possivelmente implica maior produção de H₂O₂. O tratamento com RSV e ALA nas concentrações de 100 e 500 µM elevou em duas vezes a atividade de SOD em amostras de pacientes na 4ª dose de PQT; no entanto, não alterou a atividade enzimática de CAT e SOD observada nos pacientes com hanseníase. Dessa forma, os resultados descritos sugerem que os antioxidantes RSV e ALA, nas concentrações testadas *in vitro*, não mostram atividade antioxidante quando utilizados em situações de estresse oxidativo previamente estabelecidas, porém estudos posteriores são necessários para verificar os efeitos dose e tempo-dependentes de RSV e ALA como prevenção de danos oxidativos nas doenças infecciosas crônicas.

PALAVRAS-CHAVE: hanseníase, poliquimioterapia, dapsona, estresse oxidativo, antioxidantes, ácido α -lipoico, resveratrol, suplementação

ABSTRACT

The leprosy is an infectious disease that represents a major preoccupation in global public health in 21st century. The treatment with Multi Drug Therapy (MDT) approved by the World Health Organization (WHO) is the best treatment to *Mycobacterim leprae* infection; however, is one of the factors of increasing Reactive Oxygen Species (ROS) production and the development of methemoglobinemia and hemolytic anemia in these patients. The aim of this study was to verify the oxidative damage in leprosy patients receiving MDT, by evaluation of hematological and oxidative stress biomarkers, and identify the effects of *in vitro* treatment with antioxidants alpha-lipoic acid (ALA) and resveratrol (RSV) in antioxidant enzymes activity and prevention of methemoglobinemia. The results revealed a decrease in RBC count and reticulocytosis in patients receiving MDT during the 4th and 7th month of treatment. The percentual of methemoglobin increased since the fifth month of treatment with MDT, and the treatment with 100 μ M RSV-treated and ALA-treated preserved the values similar to control group only in 4th to 6th month of MDT samples. The leprosy patients presented values of SOD activity similar to the control group and a decreased CAT activity, leading to an imbalance in the ratio of both enzymes and possibly resulting in an over-producing of H₂O₂. The treatment with RSV and ALA in 100 μ M and 500 μ M concentrations increases twice the SOD activity in 4th month patient samples; however, these concentrations did not change CAT and SOD activities found in leprosy patients. Such results demonstrate that RSV and ALA did not show antioxidant activity in installed oxidative stress, and subsequent studies are necessary to evaluate dose-dependent and time-dependent concentrations of RSV and ALA to prevent oxidative damage in chronic infectious diseases.

KEYWORDS: leprosy, Multi Drug Therapy, dapsone, oxidative stress, antioxidants, alpha-lipoic acid, resveratrol, supplementation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Prevalência da hanseníase no Brasil no ano de 2013.	20
Figura 2: Estrutura química da dapsona..	21
Figura 3: Biotransformação da dapsona e monoacetildapsona.....	22
Figura 4: Mecanismos de redução da metemoglobina.....	24
Figura 5: Estrutura química do ácido alfa-lipoico.....	29
Figura 6: Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol.....	30
Figura 7: Delineamento da pesquisa.....	34
Figura 8: Procedimento para determinação do percentual de metemoglobina.	37
Figura 9: Procedimento para a determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase.	38
Figura 10: Procedimento para determinação da atividade enzimática da catalase.	39
Figura 11: Procedimento da determinação de malondialdeído.	40
Figura 12: Procedimento da determinação de nitritos.....	40
Figura 13: Determinação de nitritos em pacientes hansenianos em uso de PQT.	44
Figura 14: Determinação de MDA em pacientes hansenianos em uso de PQT.....	44
Figura 15: Determinação do percentual de metemoglobina em pacientes hansenianos em uso de PQT.....	45
Figura 16: Percentual de metemoglobina em eritrócitos de pacientes hansenianos em uso de PQT, em comparação aos tratamento <i>in vitro</i> com RSV 100 μ M e 500 μ M.....	46
Figura 17: Percentual de metemoglobina em eritrócitos de pacientes hansenianos em uso de PQT, em comparação ao tratamento <i>in vitro</i> com ALA 100 μ M.....	47
Figura 18: Atividade enzimática de SOD em eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, em comparação aos tratamentos <i>in vitro</i> com RSV 100 μ M e 500 μ M.	49
Figura 19: Atividade enzimática de SOD em eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, em comparação aos tratamentos <i>in vitro</i> com ALA 100 μ M e 500 μ M.	50
Figura 20: Atividade enzimática de CAT em eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, em comparação ao tratamento <i>in vitro</i> com RSV 100 μ M.....	51

Figura 21: Atividade enzimática de CAT em eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, em comparação ao tratamento *in vitro* com RSV 500 μ M..... 52

Figura 22: Atividade enzimática de CAT em eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, em comparação aos tratamentos *in vitro* com ALA 100 μ M e 500 μ M 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados epidemiológicos dos participantes do estudo.	42
Tabela 2: Valores de índices hematimétricos de hansenianos em uso de poliquimioterapia. ..	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALA: Ácido alfa-lipoico

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

ATP: Adenosina trifosfato

CAT: Catalase

CFZ: Clofazimina

CHCM: concentração hemoglobínica corpuscular média

Cu^{2+} : Íon cúprico

DADS: Diacetildiaminosulfona

DATASUS: Departamento de Informática do SUS

DDS: Dapsona

DDS-NOH: Dapsona hidroxilamina

DHLA: Ácido dihidrolipoico

D4: Paciente hanseniano em uso da 4ª dose da poliquimioterapia para hanseníase

D5: Paciente hanseniano em uso da 5ª dose da poliquimioterapia para hanseníase

D6: Paciente hanseniano em uso da 6ª dose da poliquimioterapia para hanseníase

D7: Paciente hanseniano em uso da 7ª dose da poliquimioterapia para hanseníase

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO: Espécies reativas de oxigênio

ERN: Espécies reativas de nnitrogênio

Fe^{2+} : Íon ferroso

Fe^{3+} : Íon férrico

G-6-PD: Glicose-6-fosfato desidrogenase

GPx: Glutathiona peroxidase

GR: Glutathione redutase

GSH: Glutathione reduzida

GSSG: Glutathione oxidada

H⁺: Íon hidrogênio

HCM: Hemoglobina corpuscular média

HO[•]: Radical hidroxila

IB: Índice baciloscópico

κ: Kappa

MADDS: Monoacetildapsona

MDA: Malondialdeído

MADDS-NOH: Monoacetildapsona hidroxilamina

MetHb: Metemoglobina

mL: mililitro

μL: microlitro

μM: milimolar

NADH: nicotinamida adenosina dinucleotídeo reduzida

NADPH: nicotinamida adenosina fosfato reduzida

NAT: N-acetiltransferase

NaCl: Cloreto de sódio

NO₂⁻: Nitrito

O₂^{•-}: Radical ânion superóxido

OMS: Organização Mundial da Saúde

PABA: Ácido para-amino-benzoico

Prx: Peroxiredoxina

PQT: poliquimioterapia

RO[•]: Radical alcóxila

RO₂[•]: Radical peróxila

RMP: Rifampicina

Rpm: Rotação por minuto

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SOD: Superóxido dismutase

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Hanseníase e poliquimioterapia.....	19
2.2 Dapsona.....	21
2.3 Metemoglobinemia e oxidação em eritrócitos.....	23
2.4 Eritrócitos como biomarcadores de estresse oxidativo	25
2.5 Antioxidantes: terapia complementar na prevenção do estresse oxidativo	28
2.5.1 Ácido alfa-lipoico.....	29
2.5.2 Resveratrol	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Geral	32
3.2 Específicos	32
5 METODOLOGIA.....	33
5.1 Materiais	34
5.2 Análise Hematológica.....	35
5.3 Tratamento in vitro com RSV e ALA	35
5.3.1 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE METEMOGLOBINA	36
5.3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	37
5.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE (CAT).....	38
5.3.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	39
5.4 Determinação de Malondialdeído (MDA)	39
5.5 Determinação de Nitritos (NO ₂ ⁻)	40
5.6 Análise estatística.....	41
6 RESULTADOS	42
6.1 Análise hematológica	43

6.2 Determinação de nitritos e malondialdeído em pacientes hansenianos em uso de PQT	43
6.3 Determinação do percentual de metemoglobina e efeitos do tratamento in vitro com ALA e RSV	45
6.5 Determinação da atividade enzimática de SOD e efeitos do tratamento in vitro com ALA e RSV	48
6.6 Determinação de atividade enzimática de CAT e efeitos do tratamento in vitro com ALA e RSV	51
7 DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO.....	61
PERSPECTIVAS.....	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterim leprae* e ainda é considerada problema de saúde pública no século XXI. O tratamento preconizado pela OMS consiste na administração da poliquimioterapia composta por dapsona (DDS), ripampicina (RMP) e clofazimina (CFZ), sendo o tempo estabelecido conforme a classificação operacional da doença (paucibacilar ou multibacilar). Embora o esquema terapêutico seja a barreira mais eficaz no combate ao bacilo, a poliquimioterapia é responsável por inúmeros efeitos colaterais. A dapsona é apontada na literatura como causadora dos seguintes efeitos: cefaleia, nefrites, confusão mental, síndrome sulfônica e, dentre os mais graves, metemoglobinemia e hemólise (GOULART et al., 2002; GREBOGI, 2009).

Dentre as células mais afetadas, os eritrócitos têm risco aumentado ao estresse oxidativo, visto que transportam oxigênio em altas concentrações e estão continuamente expostos aos radicais livres, inclusive aos xenobióticos oxidantes absorvidos pelo organismo (OGA, 2008). Com isso, a administração de dapsona pode levar a vários danos nessas células, promovendo lipoperoxidação e formação de radicais livres, com conseqüente depleção de enzimas responsáveis pelo equilíbrio redox, induzindo assim metemoglobinemia nesses pacientes (COLEMAM e HOLDEN, 2004; VEGGI et al., 2008).

Nesse sentido, novas alternativas são avaliadas para minimizar os danos oxidativos, tais como o uso de antioxidantes naturais e sintéticos. Os estudos com ácido α -lipoico (ALA) na última década relatam atividades contra intoxicação por metais pesados, danos causados por isquemia-reperfusão, doenças neurodegenerativas e em síndromes metabólicas; são relatadas na literatura a capacidade de regeneração de agentes antioxidantes, incluindo vitaminas C, E e glutathiona (GSH), inibição de danos ao DNA mediados por peroxinitritos e remoção de espécies reativas de nitrogênio (BRANDÃO, 2008; SHAY et al, 2009; ABDEL-ZAHER et al, 2011; GOLBIDI et al, 2011). O resveratrol é um polifenol encontrado em uvas, vinho tinto e algumas espécies de plantas, cujas funções variam desde a ação sequestradora de radicais livres à atuação no sistema cardiovascular, na inibição da agregação plaquetária e prevenção da peroxidação lipídica (RICE-EVANS et al, 1997; FRÉMONT, 2000; SPANIER

et al, 2009). Portanto, o presente estudo propõe verificar a ação dos antioxidantes RSV e ALA frente ao quadro de estresse oxidativo apresentado por pacientes hansenianos submetidos à poliquimioterapia, visando a implementação de terapias suplementares com antioxidantes na prevenção de danos oxidativos e melhoria da qualidade de vida nesses pacientes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Hanseníase e poliquimioterapia

Nos dias atuais, a hanseníase ainda se configura como agravo de saúde pública mundial. Os esforços para melhor enfrentar a doença, como a detecção precoce e o tratamento com a poliquimioterapia, são metas da Estratégia Global para Maior Redução da Carga da Hanseníase – Anos 2006-2015, onde o alvo é a redução de novos casos com incapacidade grau 2 por 100 mil habitantes em até 35% (WHO, 2013).

O Brasil figura entre os 10 países com maiores taxas de detecção (WHO, 2013) e, no ano de 2013, os casos concentraram-se nos estados de Mato Grosso, Tocantins, Maranhão, Pará e Rondônia (DATASUS, 2014; Fig. 1). No mesmo ano, os municípios paraenses que apresentaram maior número de notificações foram Belém, Rurópolis, Parauapebas, Marabá, Altamira, Redenção e Oriximiná.

A hanseníase é causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, pertencente à ordem Actinomycelalis e à família Mycobacteriaceae; o gênero *Mycobacterium* tem como particularidades a membrana rica em ácido micólico, o que a torna resistente às colorações usuais; o crescimento lento e ser hospedeiro intracelular obrigatório. O bacilo é transmitido pelas vias aéreas e, uma vez no organismo humano – o qual é seu principal hospedeiro - apresenta tropismo por nervos periféricos, células de Schwann e macrófagos. Os sintomas aparecem entre 2 a 5 anos após a exposição ao patógeno, e manifestam-se como manchas esbranquiçadas, acastanhadas ou avermelhadas, com alterações de sensibilidade; espessamento dos nervos periféricos e diminuição ou perda de força nos músculos inervados por esses nervos (BRASIL, 2008).

Desde 1981 o tratamento terapêutico preconizado pela OMS consiste em esquemas poliquimioterápicos na finalidade de reduzir a resistência bacteriana (AMADOR, 2004; BRASIL, 2008; SUZUKI et al, 2012), apresentando diferenciações dependendo da

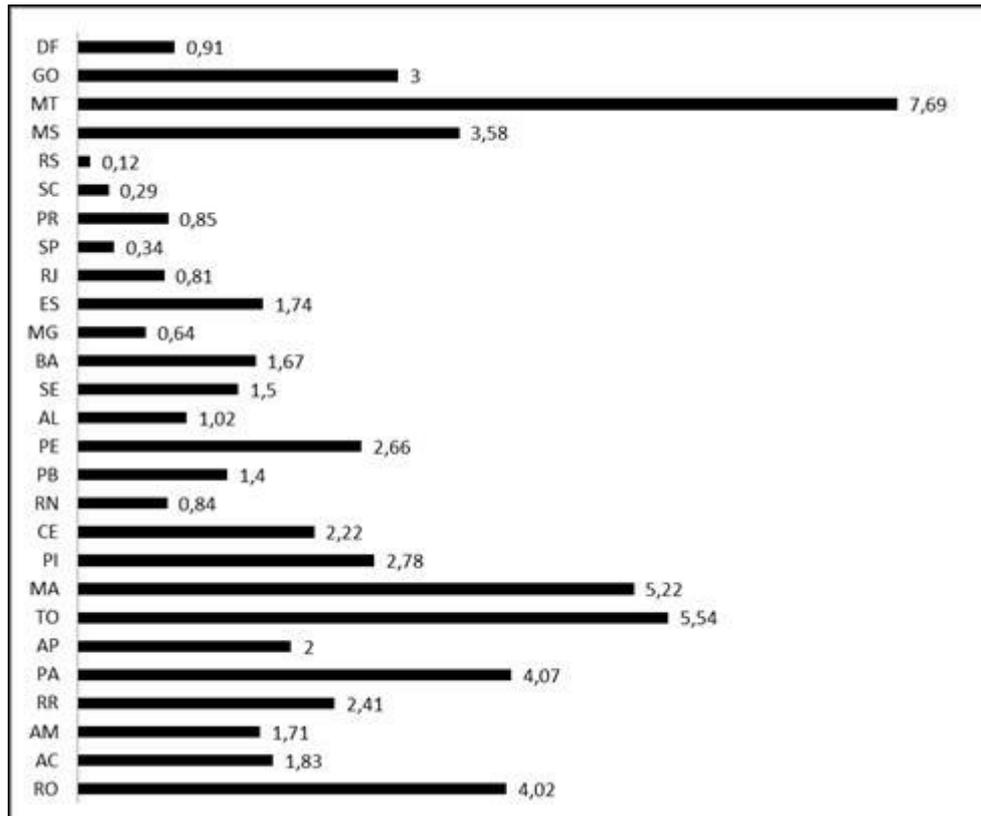


Figura 1: Prevalência da hanseníase no Brasil no ano de 2013. Fonte: DATASUS - Ministério da Saúde (2014)

classificação operacional da doença em paucibacilar (PB) ou multibacilar (MB). As recomendações da OMS quanto aos tratamentos são:

- a) O esquema PB combina os fármacos dapsona e rifampicina nesta forma: seis doses mensais supervisionadas de 600 mg de rifampicina e doses diárias autoadministradas de 100 mg de dapsona;
- b) O esquema MB combina os fármacos dapsona, clofazimina e rifampicina nesta forma: rifampicina em 12 doses mensais supervisionadas de 600 mg; clofazimina em 12 doses mensais supervisionadas de 300 mg e doses diárias autoadministradas de 50 mg; e doses diárias autoadministradas de 100 mg de dapsona.

A adesão à poliquimioterapia constitui-se como etapa primordial para a quebra da transmissão da doença: a primeira dose elimina cerca de 90% da carga bacteriana (OPROMOLLA, 2000), e a associação entre fármacos bactericidas (rifampicina e clofazimina) e bacteriostáticos (dapsona) minimiza o desenvolvimento de resistência e reduz a duração de tratamento (BRUNTON et al, 2010), comparados aos riscos da monoterapia.

As reações adversas mais frequentes durante o tratamento variam entre eventos dermatológicos, como a dermatite esfoliativa e eritrodermia; hepáticos, como a hepatite medicamentosa; e hematológicos, como a trombocitopenia, agranulocitose, metemoglobinemia e anemia hemolítica (BRASIL, 2008).

2.2 Dapsona

Utilizada inicialmente como monoterapia para o tratamento da hanseníase, a dapsona (4,4'-diaminodifenilsulfona) apresenta-se como um pó cristalino levemente amarelado, inodoro, pouco solúvel em água, fotossensível e de fórmula molecular $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ (Fig. 2).

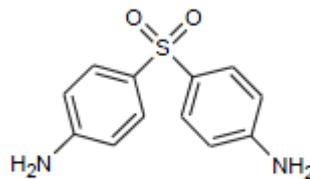


Figura 2: Estrutura química da dapsona. Fonte: GREBOGI, 2009.

Seu mecanismo de ação frente ao *M. leprae* é bacteriostático, inibindo a síntese proteica de ácido fólico por competição com o ácido para-aminobenzoico (PABA; GREBOGI, 2009). Além disso, é droga de escolha no tratamento de dermatites, artrite reumatoide, infecções por *Pneumocystis carinii* e *Toxoplasma gondii* e em casos de malária por *P. falciparum* resistente à cloroquina (BRASIL, 2006; REIS NETO et al, 2006).

Quando administrada oralmente, a dapsona apresenta absorção quase completa pelo trato gastrointestinal – entre 80 a 90% - e difunde-se por todos os tecidos, concentrando-se preferencialmente em pele, músculos, fígado e rins (REIS NETO et al, 2006; BRAGHETTO, 2007; WOZEL e BLAZUM, 2014) e permanecendo nesses órgãos até 3 semanas após a interrupção do tratamento. O pico plasmático é alcançado entre 2 a 8h, e após a ingestão de uma dose de 50 – 300 mg de dapsona, a concentração plasmática máxima varia entre 0,63

mg/L a 4,82 mg/L; em doses de 100 mg do fármaco, as concentrações séricas variam entre 3,26 mg/L a 1,95 mg/L após 24h (WOZEL e BLAZUM, 2014).

Após a absorção, a dapsona é biotransformada por processos de acetilação e hidroxilação (Fig. 3): o primeiro mecanismo origina o composto monoacetildapsona (MADDS), cuja ligação às proteínas plasmáticas é superior a 90%; por sua vez, o segundo mecanismo produz os metabólitos dapsona hidroxilamina (DDS-NOH) e monoacetildapsona hidroxilamina (MADDS-NOH), responsáveis pelos efeitos hematotóxicos do fármaco (BRAGUETTO, 2007).

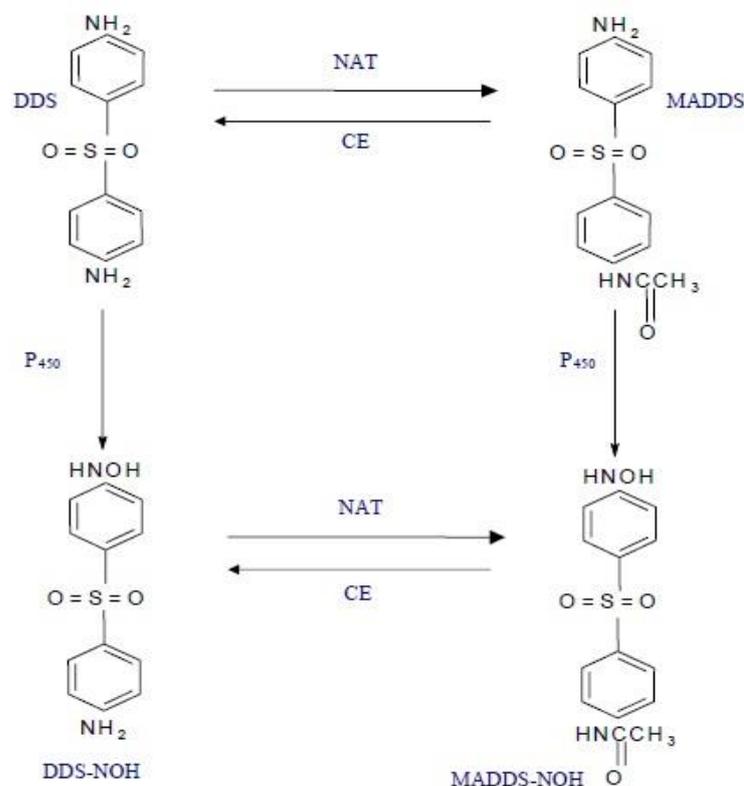


Figura 3: Biotransformação da dapsona e monoacetildapsona. NAT= N-acetiltransferase; CE= Carboxiesterase, P450= citocromo P450, DDS= dapsona, DDS-NOH= dapsona hidroxilamina, MADDS= monoacetildapsona, MADDS-NOH= monoacetildapsona hidroxilamina. Fonte: BRAGHETTO, 2007

Por sofrer recirculação enterohepática, a meia-vida da dapsona varia de 24 a 36 horas. Sua excreção é biliar, sob a forma de conjugados com ácido glicurônico (MELLO, 2005;

GREBOGI, 2009), e em pequenas quantidades na saliva e no leite materno (CARRAZZA, 1998).

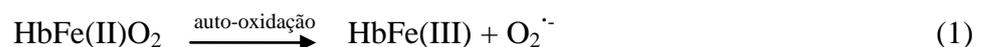
São relatados inúmeros efeitos adversos da administração de dapsona, embora os de ordem hematológica possuam maior gravidade.

2.3 Metemoglobinemia e oxidação em eritrócitos

Denomina-se metemoglobinemia o estado clínico onde mais de 1% da hemoglobina do eritrócito tem o íon Fe^{2+} convertido para a forma Fe^{3+} , a qual não é capaz de ligar-se reversivelmente ao oxigênio (MELLO, 2005).

A hemoglobina (Hb) é um tetrâmetro formado por duas cadeias α -globínicas e duas cadeias β -globínicas. Cada globina possui um radical heme como grupo prostético, o qual é composto por um átomo de ferro – na conformação ferrosa – coordenado a quatro anéis pirrólicos. Uma ligação covalente é formada com um resíduo de histidina da cadeia globínica; a sexta ligação é realizada com ligantes exógenos, a exemplo do oxigênio e gás carbônico (MELLO, 2005; KANIAS e ACKER, 2010).

No eritrócito, a auto-oxidação da hemoglobina ocorre continuamente, gerando radical ânion superóxido,



e a forma predominante de redução endógena ocorre por meio do sistema NADH desidrogenase ou diaforase I: a metemoglobina formada é reduzida pelo citocromo-b5 por ação de NADH e, indiretamente, a hemoglobina tem o íon Fe^{3+} convertido em Fe^{2+} . Existe uma segunda via de redução e dependente de NADPH, denominada NADPH-metemoglobina redutase ou diaforase II, onde este cofator é associado ao sistema glicose-6- fosfato desidrogenase (G-6-PD; MARTINS, 1995; OGA, 2008; BREGHETTO, 2007; Fig. 4.): essa via é expressa na presença de azul de metileno, o qual é utilizado na prática clínica em casos de metemoglobinemia sintomática.

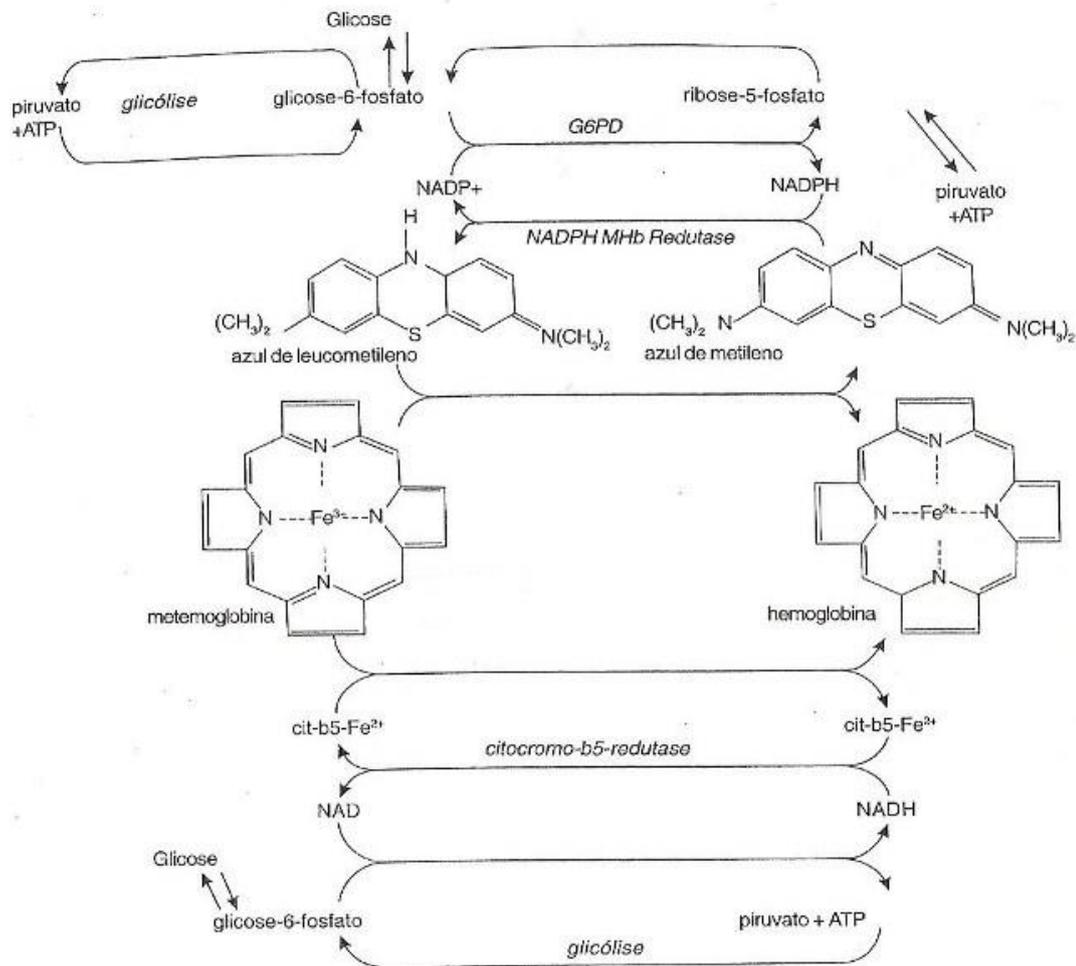
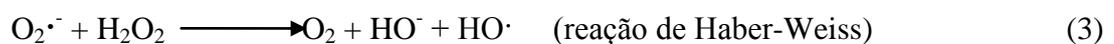


Figura 4: Mecanismos de redução da metemoglobina. ATP= trifosfato de adenosina, G6PD= Glicose 6-Fosfato Desidrogenase, MHb= metemoglobina, NAD= nicotiamida adenosina dinucleotídeo, NADP= nicotiamida adenosina dinucleotídeo fosfato. Fonte: OGA, 2008.

A partir dos produtos $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 oriundos de processos metabólicos normais, há formação de inúmeras espécies lesivas aos eritrócitos por reações espontâneas ou com a presença de metais como cofatores, característica das reações de Fenton e Haber-Weiss (ÇIMEN, 2008; KANIAS e ACKER, 2010; VAN ZWIETEN et al, 2014):



A exposição do eritrócito aos metabólitos hidroxilados da dapsona, DDS-NOH e MADDS-NOH, desencadeia eventos diversos que finalizam com a morte celular, clinicamente diagnosticada como anemia hemolítica. Além dos eventos colocados anteriormente, as reações entre a hemoglobina e produtos da dapsona geram O_2^- e compostos nitrosos, a exemplo da dapsona-nitrosobenzeno. Esses últimos são detoxificados pelo sistema NADH metemoglobina redutase eritrocitário ou pelo complexo GSH-GPx à hidroxilamina, formando um círculo vicioso: à medida que a hidroxilamina é regenerada, há novos ataques às moléculas de hemoglobina, formando novos radicais (COLEMAN, 1995; COLEMAN e HOLDEN, 2004; BREGHETTO, 2007; VEGGI et al, 2008). Ao esgotar as reservas de glutathiona, os compostos nitrosos são livres para reagir com agrupamentos tiois ou outras regiões da membrana (COLEMAN, 1995).

Os danos à membrana celular culminam nos eventos de peroxidação lipídica e formação de neoantígenos. O ferro livre é fator desencadeante de reações de oxidação cujos resultados se refletem na alteração do citoesqueleto e na exposição da porção lipídica intracelular e na conseqüente oxidação de ácidos graxos pelo peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, os produtos da oxidação do ferro acumulam-se na membrana eritrocitária e ativam macrófagos (ÇIMEN, 2008; KANIAS e ACKER, 2010), concluindo o processo de remoção precoce dos eritrócitos.

2.4 Eritrócitos como biomarcadores de estresse oxidativo

Os eritrócitos são componentes majoritários do tecido sanguíneo, e a forma que o conhecemos é o resultado de um longo processo de diferenciação celular iniciado na medula óssea: originalmente como células-tronco, passam a ser células nucleadas após a ação de fatores de crescimento, sofrem processo de extrusão dos núcleos e são lançadas à circulação como reticulócitos, último estágio de maturação (OLIVEIRA e SALDANHA, 2010). Suas características únicas – capacidade biossintética limitada e o acúmulo de agressões físicas e químicas – fazem do eritrócito o modelo experimental ideal pela facilidade de obtenção, baixo custo e sensibilidade aos testes.

O eritrócito maduro é estruturalmente diferente das outras células do organismo: é anucleado, possui citoplasma sem organelas e adquire forma de disco bicôncavo, medindo 8µm de diâmetro. Dada a importância dos eritrócitos no bom funcionamento das demais células no organismo, esta célula é dotada de elementos e funções que garantem a sobrevivência de 120 dias:

- a) **Composição da membrana:** A membrana eritrocitária é composta por 60% de lipídios, essencialmente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomiéline; 30% de colesterol e 10% de glicolipídios. Ela é didaticamente dividida em dois domínios: o primeiro domínio corresponde a uma dupla camada lipídica atravessada por proteínas transportadoras e estruturais, onde as concentrações de esfingomiéline e fosfatidilcolina, localizadas na porção exterior da membrana, e o colesterol são determinantes para a deformabilidade celular; o segundo domínio corresponde ao citoesqueleto, onde a associação entre filamentos de espectrina e actina forma redes que cobrem toda a superfície interna do eritrócito. Logo, a manutenção da superfície celular é definida pelas interações entre os dois domínios, interações mediadas por multicomplexos proteicos (SMITH, 1987; OLIVEIRA e SALDANHA, 2010; PANTALEO et al, 2010; MANKELOW et al, 2012);
- b) **Metabolismo do eritrócito:** A ausência de núcleo e mitocôndrias torna inviável a geração de energia pelo ciclo de Krebs; portanto, o eritrócito lança mão de vias diferenciadas para obtenção de energia. A via anaeróbia, ou via de Embden-Meyerhof, é responsável por 90% do metabolismo eritrocitário e produz 2 mols de adenosina trifosfato (ATP); a via das hexoses-monofosfato ou shunt de Rapaport-Luebering regula a afinidade da hemoglobina por oxigênio ao produzir 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e se configura como a única fonte de produção de nicotinamida adenosina fosfato (NADPH)/NADP na célula (MARTINS, 1995; VAN WIJK e VAN SOLINGE, 2005);
- c) **Defesa antioxidante:** Os eventos de oxi-redução são intrínsecos à manutenção da vida aeróbia e, nesse contexto, há um constante equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e moléculas antioxidantes. As EROs são resultantes da redução monoelétrica de O_2 à H_2O e podem ser não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou radicalares, como os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}), peroxila (RO_2^{\cdot}) e alcóxila (RO^{\cdot}). Quando produzidas em proporções menores, integram mecanismos endógenos (inflamação, fagocitose, sinalização intracelular e

reparo tecidual) e, em condições patológicas, são mediadoras de danos em estruturas celulares, DNA, lipídios e proteínas (VALKO et al, 2007; ÇIMEN, 2008).

Nesse contexto, os eritrócitos tornam-se mais suscetíveis ao ataque de EROs que os demais tecidos. A exposição a altas concentrações de oxigênio, o transporte de xenobióticos oxidantes absorvidos pelo organismo, a ameaça constante de oxidação da hemoglobina e o acúmulo de agressões físicas e químicas sem capacidade de reparação reduzem a sobrevivência da célula; tal situação exige um sistema antioxidante capaz de conter os danos provocados e conferir proteção ao eritrócito (MARTINS, 1995; OGA, 2008). Dentre as enzimas fundamentais nesse processo, figuram a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e o sistema glutationa-glutationa peroxidase (GSH-GPx).

A SOD compreende uma família de enzimas onde a principal característica é a presença de metais em sua constituição; em humanos, as isoformas existentes são Mn-SOD (mitocondrial), Cu/Zn-SOD (citossólica) e a SOD extracelular (RATMAN et al, 2006; ÇIMEN, 2008). A forma citossólica é abundante em eritrócitos, onde converte $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 em uma taxa de dismutação de $2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$, representado no mecanismo abaixo:



O complexo GSH-GPx tem papel determinante na neutralização de espécies reativas. A GSH é um tripeptídeo abundante nos eritrócitos (na ordem de 2 – 10 mM) e consegue detoxificar H_2O_2 em baixas concentrações, especialmente quando este é produzido pela autooxidação da hemoglobina. Duas moléculas de GSH agem como doador de elétrons, gerando duas moléculas de água e glutationa oxidada (GSSG) por intermédio da glutationa peroxidase (GPx; ÇIMEN, 2008; ZWIETEN et al, 2014), como mostra a equação:



A CAT localiza-se nos peroxissomas e funciona como mecanismo adicional de defesa, dada a sua melhor atuação quando o eritrócito é exposto a altas concentrações de H_2O_2 (ÇIMEN, 2008). Adicionalmente, a enzima exerce ação peroxidativa em

compostos tóxicos como fenois, formaldeído e álcoois (RATMAN et al, 2008). O mecanismo catalítico produz água e oxigênio, sem produção de outros radicais, e é expresso na equação abaixo:



2.5 Antioxidantes: terapia complementar na prevenção do estresse oxidativo

Nos últimos anos, os potenciais profilático e terapêutico dos antioxidantes têm ganhado importância. A descoberta do papel dos radicais livres na patogênese do câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas direcionou as pesquisas para novas alternativas de prevenção de danos oxidativos.

Tradicionalmente, a humanidade faz uso de frutas, vegetais, grãos e ervas com notórios efeitos antioxidantes. Em sua maioria, a função antioxidante é atribuída à presença de compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides e compostos tiólicos, os quais protegem o meio celular de danos provocados pelo estresse oxidativo e reduzem o risco de desenvolver doenças crônicas (LÜ et al, 2010).

Ainda que o organismo humano seja dotado de mecanismos antioxidantes endógenos, nas doenças crônicas a defesa antioxidante encontra-se diminuída ou depletada em razão do aumento de oxidantes. Dessa forma, a suplementação externa com elementos antioxidantes se faz essencial para contrabalancear os efeitos deletérios provocados pelo estresse oxidativo (RATNAM et al, 2006).

Atualmente, novas alternativas terapêuticas são estudadas no intuito de minimizar os efeitos do estresse oxidativo em quadros de metemoglobinemia. Segundo Lima et al (2007), elementos com conhecido potencial antioxidante, tais como vitaminas A, C e E, zinco, magnésio e selênio, têm obtido bons resultados na diminuição de MetHb; estudos com cimetidina (COLEMAN et al, 1992), isossorbida (INAL e EGÜZ, 2004), N-acetilcisteína (MELLO, 2005) e arginina (BRAGUETTO, 2007) atestam que a busca por novos antídotos é válida e promissora.

2.5.1 Ácido alfa-lipoico

O ácido alfa-lipoico (ALA; ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico, $C_8H_{14}O_2S_2$; Fig. 5) é um composto presente em eucariontes e procariontes e é produzido naturalmente a partir de ácido octanoico e cisteína (BRANDÃO, 2008; GOLBIDI et al 2011). Nos alimentos, pode ser encontrado em carne vermelha (preferencialmente nos músculos e coração), fígado, rins e, em menor quantidade, em frutas e hortaliças (SHAY et al, 2009).

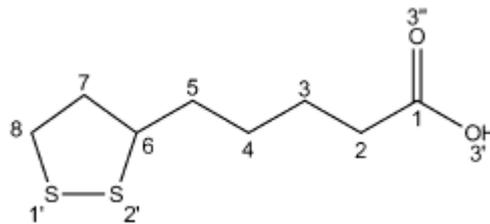


Figura 5: Estrutura química do ácido alfa-lipoico. Fonte: SZELAG et al, 2011.

No organismo o ALA aparece associado a resíduos de lisina, formando lipolisina, e atua indiretamente no metabolismo da glicose como cofator para enzimas dos complexos piruvato desidrogenase e α -ceto-glutarato desidrogenase (BUSTAMANTE et al, 1998; SHAY et al, 2009; GOLBIDI et al, 2011).

As condições do trato gastrointestinal durante a administração de ALA tornam sua absorção variável (SHAY et al, 2009): esse composto é extensivamente metabolizado no fígado e apenas 20-30% escapa da biotransformação hepática (BRANDÃO, 2008). Intracelularmente, ALA é reduzido em ácido dihidrolipoico (DHLLA) por ação de enzimas desidrogenases (KARAKOYUN et al, 2009; SZELAG et al, 2011); sua excreção é predominantemente renal, na forma de 4,6-bismetilmercapto-hexanoico.

As formas oxidada e reduzida de ALA são conhecidas por notória capacidade antioxidante, visto que a estrutura química permite atuação em fases aquosa e lipídica – diferentemente dos demais antioxidantes. Dentre as propriedades do ALA, estão: a capacidade de quelar metais, reter EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs); regenerar

antioxidantes endógenos, a exemplo da GSH e vitaminas C e E (PACKER et al, 1995; SHAY et al, 2009; GOLBIDI et al, 2011).

Nos últimos anos, há estudos de utilização clínica de ALA na intoxicação por metais, em danos provocados por isquemia-reperfusão, doenças neurodegenerativas e em síndromes metabólicas, demonstrando que esse composto pode ser alternativa para o tratamento de doenças crônicas (KARAKOYUN et al, 2009; TRIVEDI et al, 2004; KÜLKAMP et al, 2009).

2.5.2 Resveratrol

O resveratrol (RSV; 3,5,4-trihidroxiestilbeno; Fig. 6) é uma fitoalexina produzida em plantas como Kojo-kon (*Polygonum cuspidatum*), Kashuwu (*Polygonum multiflorum*), eucaliptos, amora e amendoim em resposta a injúrias (SAUTTER et al, 2005). O composto foi detectado pela primeira vez em 1976, onde descobriu-se que o resveratrol era produzido em folhas de parreira (*Vitis vinífera*) em resposta ao ataque pelo fungo *Botrytis cinerea* (FRÉMONT, 2000).

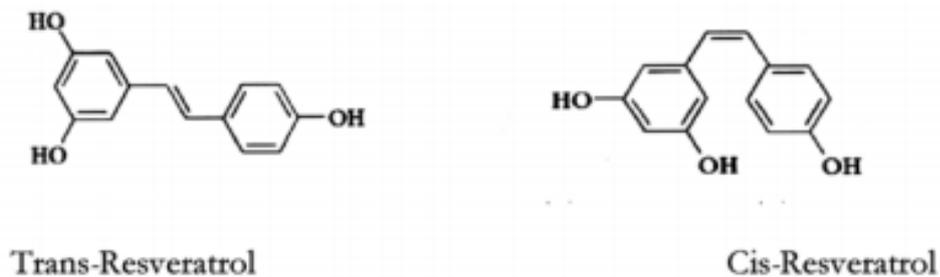


Figura 6: Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol. Fonte: SAUTTER et al, 2005.

RSV é sintetizado nas plantas sob as formas isômeras cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). A forma *trans* é majoritária e mais estável no ambiente natural, e facilmente muda para a conformação *cis* quando é exposta à radiação UV (DELMAS et al, 2011).

A administração oral de RSV tem boa absorção no trato gastrointestinal, porém com baixa biodisponibilidade. A facilidade do resveratrol em ligar-se às proteínas plasmáticas,

especialmente à albumina e à hemoglobina, e a recirculação êntero-hepática de seus metabólitos contribui para a permanência do antioxidante por maior tempo no organismo e uma melhor distribuição pelos tecidos. As concentrações do polifenol na circulação sanguínea não excedem 2 μM ; o RSV é rapidamente metabolizado e distribuído para os tecidos: fígado, rins, coração, pulmões e cérebro são os órgãos nos quais o antioxidante apresenta altas concentrações. Sua excreção ocorre na forma de sulfatos e derivados do ácido glicurônico na urina (DELMAS et al, 2011; SCHMATZ, 2011).

A ação antioxidante de RSV é atribuída à presença de grupos hidroxila em sua estrutura química, os quais são potenciais doadores de íons H^+ . Dessa forma, RSV consegue sequestrar íons HOO^- , HO^\cdot e $\text{O}_2^\cdot^-$ e atuar como quelante de metais, principalmente íons Cu^{2+} e Fe^{3+} (RICE-EVANS et al, 1997). Também são relatadas na literatura atividades biológicas relacionadas à modulação do metabolismo lipídico e inibição da peroxidação lipídica, inibição da agregação plaquetária, atividades antitumoral, estrogênica, vasodilatadora e anti-inflamatória (FRÉMONT, 2000; SPANIER et al, 2009).

Nesse contexto, a utilização de antioxidantes como terapia suplementar ao tratamento de diversas patologias tem como finalidades aumentar a resistência ao estresse oxidativo e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos que os consomem. Assim, com a análise dos componentes do sangue, de marcadores do estresse oxidativo e da atividade de enzimas antioxidantes em pacientes hansenianos em uso de PQT pode-se estabelecer uma relação entre a administração da poliquimioterapia e a ocorrência de danos oxidativos nesses parâmetros e abrir possibilidades para terapias que visem minimizar esses eventos. Ao realizar o tratamento desses eritrócitos *in vitro* com RSV e ALA, dois promissores antioxidantes, estima-se encontrar concentrações para uso terapêutico que possam aliar a remoção eficaz de EROs ao estímulo da atividade das enzimas SOD e CAT e, dessa forma, promover uma melhor resposta antioxidante frente ao quadro de estresse oxidativo característico da hanseníase e melhorar a qualidade de vida dos pacientes em uso de poliquimioterapia.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos dos compostos ácido alfa-lipoico e resveratrol em parâmetros do estresse oxidativo e na prevenção de danos oxidativos em pacientes hansenianos em uso de poliquimioterapia.

3.2 Específicos

- Avaliar alterações quantitativas em hemácias, hemoglobina, plaquetas e reticulócitos em pacientes hansenianos durante o uso de PQT.
- Determinar as concentrações de nitritos e malondialdeído em pacientes hansenianos durante o uso de PQT.
- Determinar o percentual de metemoglobina em eritrócitos de pacientes hansenianos durante o uso de PQT e após o tratamento *in vitro* com ALA e RSV, nas concentrações de 100 e 500 μM .
- Determinar a atividade das enzimas CAT e SOD em eritrócitos de pacientes hansenianos durante o uso de PQT e após o tratamento *in vitro* com ALA e RSV, nas concentrações de 100 e 500 μM .

5 METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada a partir de coleta de amostras sanguíneas de pacientes das instituições de saúde Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcello Cândia”, situada no município de Marituba (PA), e na Unidade Básica de Saúde da Pedreira, situada no município de Belém. Tais instituições foram escolhidas por serem pontos de diagnóstico e tratamento ambulatorial da hanseníase na região metropolitana de Belém (ANEXOS 2 e 3).

O grupo de estudo compreendeu pacientes portadores de hanseníase, em tratamento regular do 4º ao 7º mês, todos voluntários e com idade entre 18 e 65 anos. Foram excluídos da pesquisa os pacientes com histórico de etilismo, tabagismo, diabetes, problemas cardíacos e coinfeções que pudessem interferir nos parâmetros avaliados. A punção venosa era realizada após a administração das doses supervisionadas (D4, D5, D6 e D7) da poliquimioterapia nesses pacientes.

O grupo controle foi composto por voluntários saudáveis e sem a doença, de mesma faixa etária que o grupo de estudo e atendendo aos critérios de exclusão estabelecidos. Ambos os grupos foram esclarecidos das finalidades, benefícios e riscos da pesquisa, assim como a não obrigatoriedade de adesão, por meio de Termo de Compromisso Livre e Esclarecido conforme as diretrizes da Resolução 196/96 (ANEXO 4).

Da coleta de 10 mL de material venoso dos participantes do estudo, 2 mL foram conservados em EDTA dissódico para a investigação de alterações hematológicas e 8 mL foram conservados em heparina para a obtenção de plasma e demais procedimentos (Fig. 7).

Ressalta-se que o projeto para realização desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará e está de acordo com as diretrizes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. A aprovação foi registrada sob o parecer nº 157.263 e CAAE 07763212.7.0000.0018 (ANEXO 1).

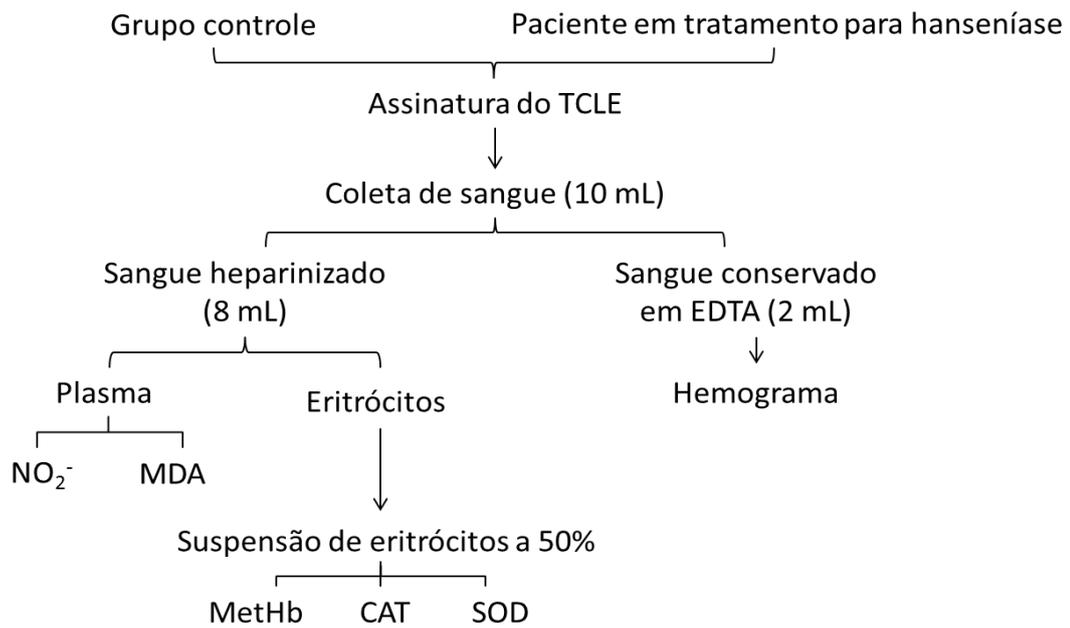


Figura 7: Delineamento da pesquisa.

5.1 Materiais

A pesagem de reagentes foi realizada em balança semi-analítica Celtac (modelo FA2104N). O pH dos tampões utilizados nos procedimentos foi aferido em pHmetro Gehaka (PG-1800). As amostras sanguíneas foram centrifugadas em centrífuga clínica de ângulo fixo (CentriBio). As leituras de absorvância dos testes foram realizadas no espectrofotômetro Spectrum (SP-2000 UV) e no leitor de placa de ELISA TP Reader (Thermoplate). Na necessidade de agitação vigorosa ou de aquecimento das amostras utilizaram-se vortex Certomat e banho-maria Sieger, respectivamente.

Para o teste de determinação do percentual de metemoglobina, foram utilizados ferricianeto de potássio e cianeto de sódio P.A (Dinâmica) e Triton-X (Sigma). No teste de determinação da atividade enzimática de SOD, foram utilizados Hypoxanthine (minimum 99%, Sigma), Xanthine Oxidase from bovine milk (Sigma) e Cytochrome C from bovine heart (95%, Sigma). Para determinar a atividade enzimática de CAT, foram utilizados Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) e peróxido de hidrogênio, ambos da Dinâmica®. Os testes de determinação de nitritos utilizaram N-(1-naphthyl)-ethylenediamine-dihydrochloride

(Sigma) e Sulfanilamide (minimum 99%, Sigma). O tratamento *in vitro* dos eritrócitos foi realizado com os compostos Resveratrol e Ácido α -(\pm) lipoico, ambos daSigma®.

5.2 Análise Hematológica

A amostra conservada em EDTA dissódico foi utilizada para a investigação de possíveis alterações hematológicas. Para tanto, as análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral de Belém (HGEBE) utilizando o contador automático XT 4000i (Sysmex). Para o presente estudo, foram avaliados: contagem de hemácias, hemoglobina, contagem de plaquetas e percentual de reticulócitos.

5.3 Tratamento *in vitro* com RSV e ALA

Para o tratamento *in vitro*, foram preparadas soluções-mãe dos antioxidantes ácido alfa-lipoico (ALA) e resveratrol (RSV) em tampão fosfato de sódio 0,5 M, na concentração de 1 mg/mL. A partir de resultados de estudos anteriores de nosso grupo, foram escolhidas as concentrações de 100 μ M e 500 μ M para as soluções-trabalho de RSV e ALA deste estudo, as quais foram obtidas pela diluição em tampão fosfato de sódio 0,5 M.

A amostra heparinizada foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos para a separação de plasma e eritrócitos. A porção de plasma foi armazenada em tubos cônicos tipo *Eppendorf* (capacidade de 2 mL) para as determinações de peroxidação lipídica e nitritos. Os eritrócitos foram lavados com solução de NaCl a 0,9% por três vezes, com rotação de 3000 rpm por 5 minutos. Ao final do processo, preparou-se uma suspensão de eritrócitos a 50% para cada material colhido.

Os experimentos foram realizados em duplicata e cada suspensão de eritrócitos a 50% obtida foi submetida a cinco condições experimentais diferentes, totalizando 10 grupos para cada participante. Em tubos de ensaio, uma alíquota de 400 μ L foi retirada de cada suspensão

e foi adicionada a 200 μL do antioxidante avaliado. As condições experimentais impostas foram:

- a) Amostra sem tratamento com antioxidante (controle)
- b) Amostra tratada com 200 μL de solução de ALA 100 μM ;
- c) Amostra tratada com 200 μL de solução de ALA 500 μM ;
- d) Amostra tratada com 200 μL de solução de RSV 100 μM ;
- e) Amostra tratada com 200 μL de solução de RSV 100 μM

Esses grupos foram incubados por uma hora, em temperatura ambiente a ao abrigo da luz. Após o tempo determinado, foram separadas em tubos de ensaio as seguintes alíquotas:

- a) 100 μL para as determinações de atividade enzimática de CAT;
- b) 50 μL para as determinações de atividade enzimática da SOD;
- c) 200 μL para a determinação do percentual de metemoglobina.

5.3.1 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE METEMOGLOBINA

A metodologia seguida foi adaptada de Hegesh (1970). O teste consiste na leitura de absorvâncias de oximetahemoglobina e MetHb, naturalmente presentes nos eritrócitos, com a adição de ferricianeto de potássio (agente metemoglobinizante) e após a utilização de um agente neutralizador, como é apresentado na Figura 8.

As leituras foram realizadas em duplicata em leitor de ELISA (TP Reader). Determinou-se a porcentagem de metemoglobina utilizando os valores de absorbância anotados e empregados na fórmula

$$\% \text{ MetHb} = \frac{A_1 - A_3}{12 - (A_2 - A_4)} \times 100 \quad (1)$$

onde:

A_1 representa a MetHb encontrada no sangue;

A_2 representa a transformação de oxihemoglobina em MetHb;

A_3 representa a transformação de MetHb em cianometemoglobina;

A_4 representa a transformação de MetHb em cianohemoglobina.

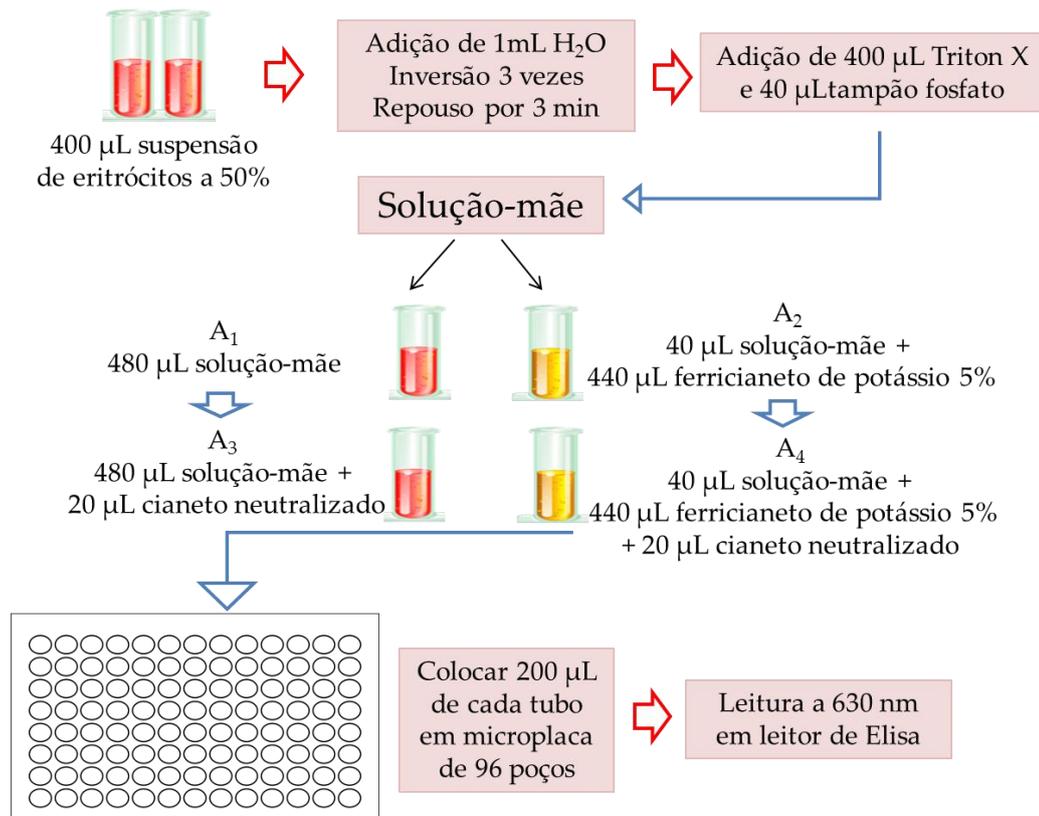


Figura 8: Procedimento para determinação do percentual de metemoglobina.

5.3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Foi utilizada a metodologia de Mc Cord e Fridowich (1969), com adaptações. O teste mensura a atividade da enzima de forma indireta ao verificar a inibição da redução do citocromo C mediado pela SOD no sistema enzimático xantina/xantina oxidase em pH 7,8, a 25°C.

Após a separação de alíquotas para os testes, descrita no item 5.3, obteve-se um hemolisado a partir dos 50 µL da suspensão de eritrócitos de cada grupo estudado. Uma alíquota deste hemolisado foi adicionada a uma mistura de tampão, citocromo C 0,075mM, hipoxantina 1,5 mM e xantina oxidase 56 mM. A solução resultante foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e, após 15 min, foi realizada uma única leitura na

faixa de 550 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimatzu). O procedimento se encontra esquematizado na figura abaixo (Fig.9):

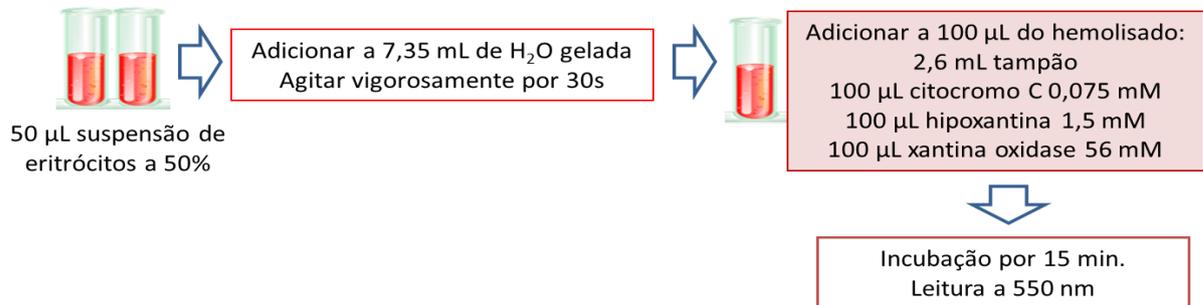


Figura 9: Procedimento para a determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase.

Os valores de absorbância foram aplicados em curva padrão de citocromo C para determinação da atividade enzimática, expressa em Unidade SOD/mg proteína: uma unidade de SOD é a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a velocidade de redução do citocromo C a 550 nm.

5.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE (CAT)

Foi realizada conforme metodologia proposta por Beutler (1975), onde é observada a reação cinética de consumo de H₂O₂ pela enzima em um minuto.

Após a separação de alíquotas para os testes, descrita no item 5.3, obteve-se um hemolisado a partir dos 100 µL da suspensão de eritrócitos de cada grupo estudado. Após a adição de TRIS a 8 µL do hemolisado, 100 µL da nova solução foi adicionada à solução de reação de H₂O₂ e lida em espectrofotômetro UV-1800 (Shimatzu) por um minuto, na faixa de 240 nm, em ambiente escuro.

Foram anotados os valores de absorbância nos tempos zero (T₀) e após um minuto (T₁) para cálculo de atividade enzimática. Os valores foram expressos em Unidade CAT/mg proteína, onde uma unidade da enzima corresponde ao consumo de 1 µMol de H₂O₂ em um minuto, em pH 8 e à temperatura de 25°C. O procedimento encontra-se esquematizado na Fig. 10.

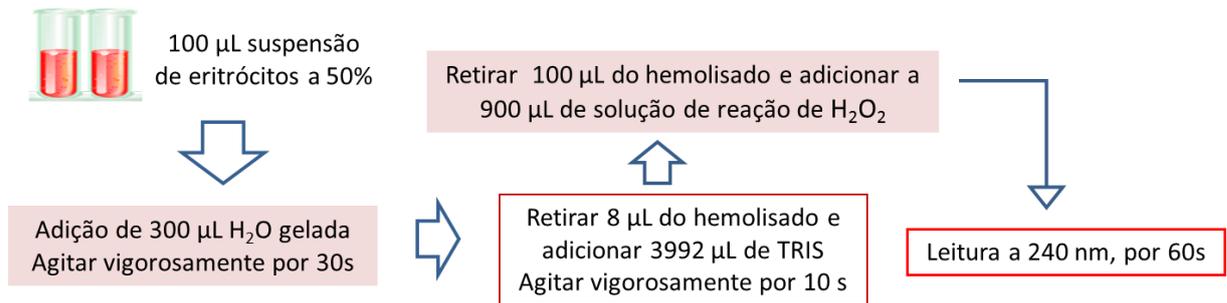


Figura 10: Procedimento para determinação da atividade enzimática da catalase.

5.3.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para a mensuração das atividades enzimáticas, foi realizada a determinação de proteínas totais utilizando-se o kit Proteínas Totais (Doles). À uma solução de biureto foram adicionados 25 µL da amostra e duas gotas de NaOH 6M e após 5 min foi realizada leitura em leitor de ELISA (TP Reader), na faixa de 550 nm. Foi utilizado como padrão albumina bovina a 4 mg/ dL.

5.4 Determinação de Malondialdeído (MDA)

Foi utilizada a metodologia adaptada de Ohkawa et al (1979). O teste quantifica a presença de hidroperóxidos (primeiro estágio de degradação de lipídios) em amostras a partir da adição de ácido tiobarbitúrico: a solução levemente rosada é facilmente lida em espectrofotômetro entre 525 nm a 545 nm.

Adicionou-se uma alíquota de 100 µL de plasma às soluções de ácido tricloroacético a 10% p/v e ácido tiobarbitúrico a 1% p/v e a mistura foi levada a banho-maria por 1h, a 90°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro SP-2000 (Spectrum) na faixa de 530 nm. O procedimento encontra-se esquematizado na Figura 11.

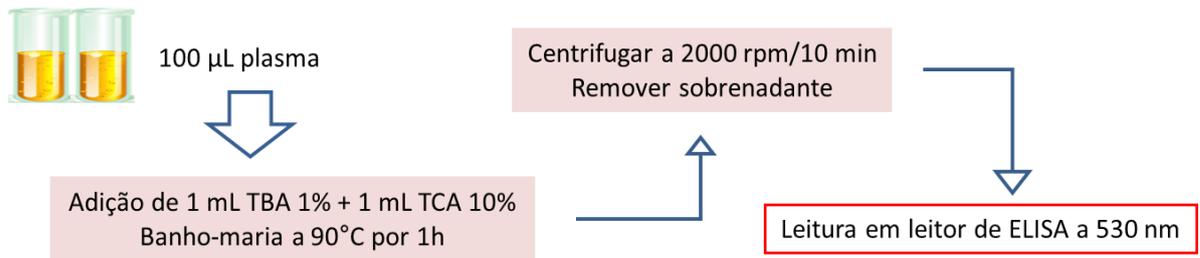


Figura 11: Procedimento da determinação de malondialdeído.

Os valores de absorvância foram aplicados em curva padrão de malondialdeído para determinação das concentrações do analito. Os resultados foram expressos em nmol MDA/mL de plasma.

5.5 Determinação de Nitritos (NO_2^-)

Foi realizada conforme o método de Granger (1999). O método avalia quantitativamente a produção de metabólitos oriundos do óxido nítrico (NO), o qual está relacionado indiretamente com o status imunológico do indivíduo.

O plasma utilizado foi adicionado ao reagente de Griess em proporção 1:1, incubado por 10 min, e lido em leitor de ELISA (TP Reader) na faixa de 540 nm. Os valores de absorvância foram aplicados em curva padrão de nitrito e os resultados expressos em mMol NO_2^- /mL de plasma. O procedimento encontra-se esquematizado na ilustração abaixo (Fig 12).

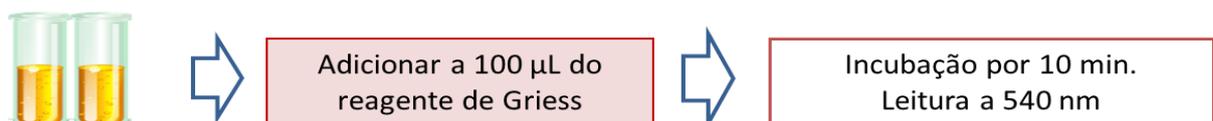


Figura 12: Procedimento da determinação de nitritos.

5.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos aos testes: ANOVA-*one way* para determinar diferenças entre as doses trabalhadas e teste T para análise de tratamentos. Foi utilizado o teste Bonferroni para identificação de diferenças entre doses estudadas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

A coleta das amostras de pacientes em tratamento para hanseníase e voluntários sadios ocorreu no período de janeiro de 2013 a maio de 2014. A pouca adesão dos pacientes à pesquisa e ajustes na metodologia do preparo de suspensões de eritrócitos reduziram o número total de participantes do estudo, totalizando 13 pacientes em uso de poliquimioterapia: 3 pacientes que receberam a 4ª dose de PQT (D4), 3 pacientes que receberam a 5ª dose (D5), 4 pacientes na 6ª dose (D6) e 3 pacientes na 7ª dose (D7). O grupo controle foi composto por 7 voluntários saudáveis, nas faixas etárias e critérios de exclusão semelhantes aos pacientes com hanseníase. A tabela 1 resume as características dos pacientes participantes do estudo.

Tabela 1: Dados epidemiológicos dos participantes do estudo.

	% (n=13)
Gênero	
Masculino	53,8 (n=7)
Feminino	46,2 (n=6)
Faixa etária	
18-40	7,7 (n=1)
41-65	92,3 (n=12)
Forma clínica	
Paucibacilar	30,8 (n=4)
Multibacilar	69,2 (n=9)
IB	
0-1	61,6 (n=8)
1-2	-
+ de 3	23,2 (n=3)
Não relatado	15,2 (n=2)

IB: índice baciloscópico

6.1 Análise hematológica

O perfil hematológico dos pacientes em tratamento para hanseníase fornece dados que podem justificar possíveis intervenções na poliquimioterapia, visto que são relatados pela literatura quadros de anemia decorrentes de tratamento terapêutico com drogas oxidantes, a exemplo da dapsona.

Na Tabela 2 é possível observar que todos os pacientes com hanseníase em uso de PQT apresentaram diminuição nos valores de hemácias e aumento de reticulócitos em relação aos indivíduos saudáveis (controle). Além disso, os pacientes que estavam na 7ª dose de PQT (grupo D7) também apresentaram diminuição nos valores de plaquetas quando comparado ao controle e as demais doses terapêuticas de PQT.

Tabela 2: Valores de índices hematimétricos de hansenianos em uso de poliquimioterapia.

	Controle (n=7)	D0 _{Lit}	D4 (n=3)	D5 (n=3)	D6 (n=4)	D7 (n=3)
Hemácias (x10 ⁶ /mL)	4,88±0,47	5,5±0,7	3,94±0,24**	4,08±0,62**	3,94±0,41**	3,32±0,2**
Hb (g/dL)	14,47±1,37	14,67±1,14	12±0,82	13±2,17	12,65±1,26	10,7±0,75
Plaquetas (U/mm ³)	221,5±74,2	265	220,33±39,5	183,67±52,8	187±32,6	167,33±11,02*
Reticulócito (%)	1,02±0,34	0,2	4,22±3,27*	3,45±0,64*	2,98±1,1*	3,1±0,43*

Lit: valores baseados em resultados de Ranawaka et al, 2008, Deps et al, 2012 e Al-Sieni et al, 2013;

*p<0,05 em relação ao grupo controle;

**p<0,01 em relação ao grupo controle

6.2 Determinação de nitritos e malondialdeído em pacientes hansenianos em uso de PQT

Através das determinações de nitritos e MDA nos pacientes com hanseníase sob tratamento com PQT, pode-se mensurar a extensão dos danos provocados pelo tratamento poliquimioterápico. Observou-se que os pacientes hansenianos em uso de PQT não apresentaram alteração significativa nesses parâmetros (Fig. 13 e Fig. 14) durante os meses de

tratamento com PQT quando comparado aos indivíduos saudáveis (NO_2^- : $4,46 \mu\text{mol/mL} \pm 3,8$; MDA: $3,14 \text{ nmol/mL} \pm 0,06$).

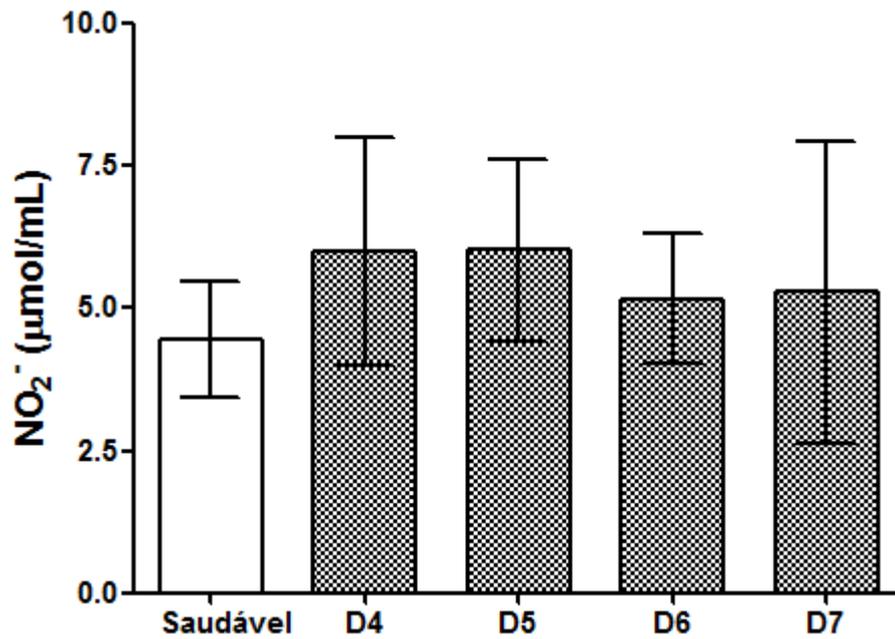


Figura 13: Determinação de nitritos em pacientes hansenianos em uso de PQT. D4: paciente no 4º mês de PQT; D5: paciente no 5º mês de PQT; D6: paciente no 6º mês de PQT; D7: paciente no 7º mês de PQT. Resultados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

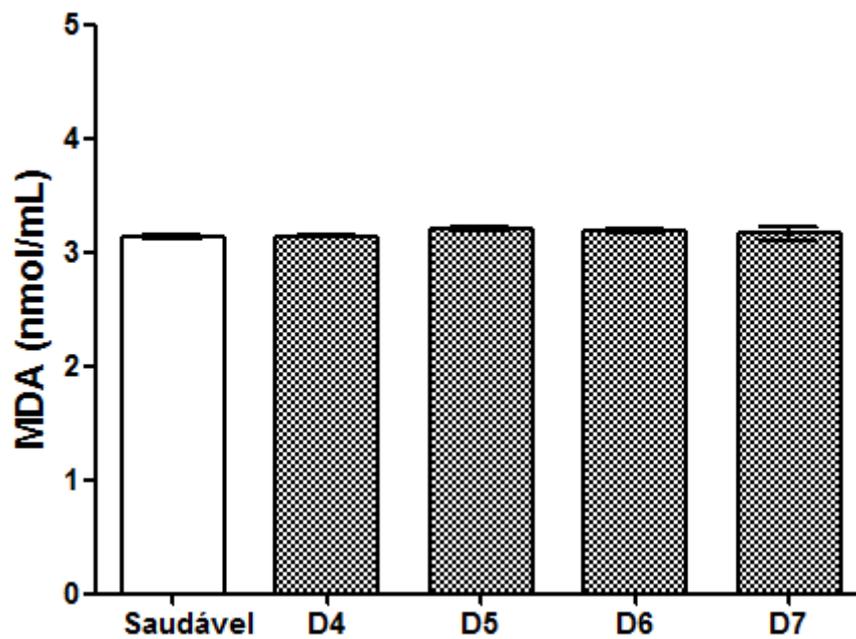


Figura 14: Determinação de MDA em pacientes hansenianos em uso de PQT. D4: paciente no 4º mês de PQT; D5: paciente no 5º mês de PQT; D6: paciente no 6º mês de PQT; D7: paciente no 7º mês de PQT. Resultados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

6.3 Determinação do percentual de metemoglobina e efeitos do tratamento *in vitro* com ALA e RSV

A determinação do percentual de metemoglobina avalia a proporção entre os estados de oxidação/redução do ferro contido no grupamento heme. Notou-se que os pacientes hansenianos a partir da quinta dose de PQT apresentaram aumento significativo do percentual de metemoglobina, com valores acima de 5% quando comparados a indivíduos sem a doença ($1,48\% \pm 1,33$), como mostra a Figura 15.

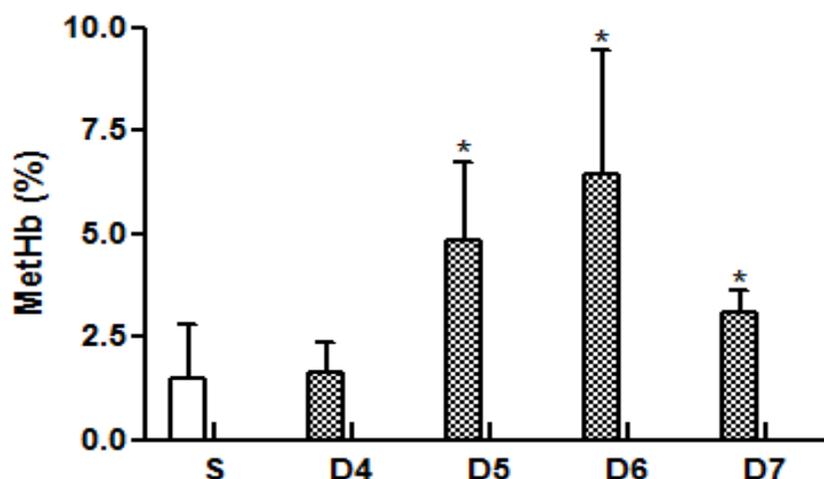


Figura 15: Determinação do percentual de metemoglobina em pacientes hansenianos em uso de PQT. Resultados expressos em média \pm erro padrão (ANOVA). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Após uma hora do tratamento *in vitro* com o composto RSV, a concentração de $100 \mu\text{M}$ reduziu o percentual de MetHb somente em amostras de pacientes em uso da 5ª dose do tratamento com PQT ($2,2\% \pm 1,2$), em relação às amostras sem RSV ($5,1\% \pm 1,9$). Por outro lado, RSV potencializou significativamente o aumento do percentual de MetHb nas amostras de pacientes em uso da 7ª dose de PQT ($11,8\% \pm 2,5$) e em indivíduos sem a doença ($5,4\% \pm 2,6$), em relação a esses mesmos grupos sem o tratamento *in vitro* ($3,1\% \pm 0,6$ e $1,5\% \pm 1,3$, respectivamente).

Com exceção do grupo em uso da 5ª dose de PQT, o tratamento *in vitro* com 500 μM de RSV foi capaz de potencializar o aumento dos percentuais de MetHb em todas as amostras de pacientes em uso de PQT, elevando principalmente o percentual de metemoglobina (aproximadamente 5 vezes maior que o controle) das amostras de pacientes em uso da 7ª dose de PQT (Fig. 16).

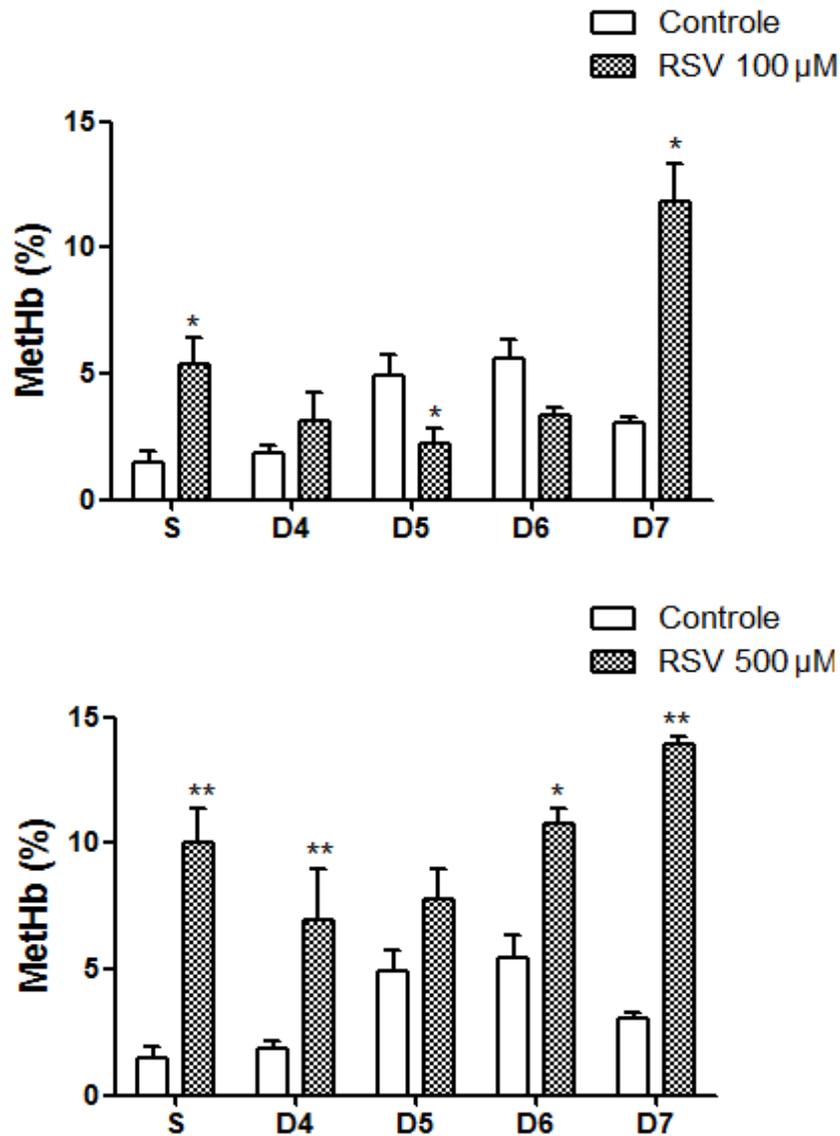


Figura 16: Percentual de metemoglobina em eritrócitos de pacientes hansenianos em uso de PQT, em comparação aos tratamento *in vitro* com RSV 100 μM e 500 μM . S: indivíduos sem a doença; D4: amostra de paciente no 4º mês de uso de PQT; D5: amostra de paciente no 5º mês de PQT; D6: amostra de paciente no 6º mês de uso de PQT; D7: amostra de paciente no 7º mês de uso de PQT. Resultados expressos em média \pm erro padrão (Teste T). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle.

O tratamento com eritrócitos com ALA na concentração de 100 μM não alterou o percentual de metemoglobina nos grupos correspondentes à quarta, quinta e sexta doses de PQT, em comparação aos mesmos grupos sem tratamento *in vitro*, e somente potencializou o aumento de MetHb no grupo correspondente à 7ª dose do tratamento com PQT. A incubação com 500 μM do antioxidante, por sua vez, aumentou a formação de MetHb na amostra referente à 7ª dose de PQT e em indivíduos sem a doença, ao passo que não provocou diferenças nas amostras correspondentes às demais doses de PQT (Fig. 17).

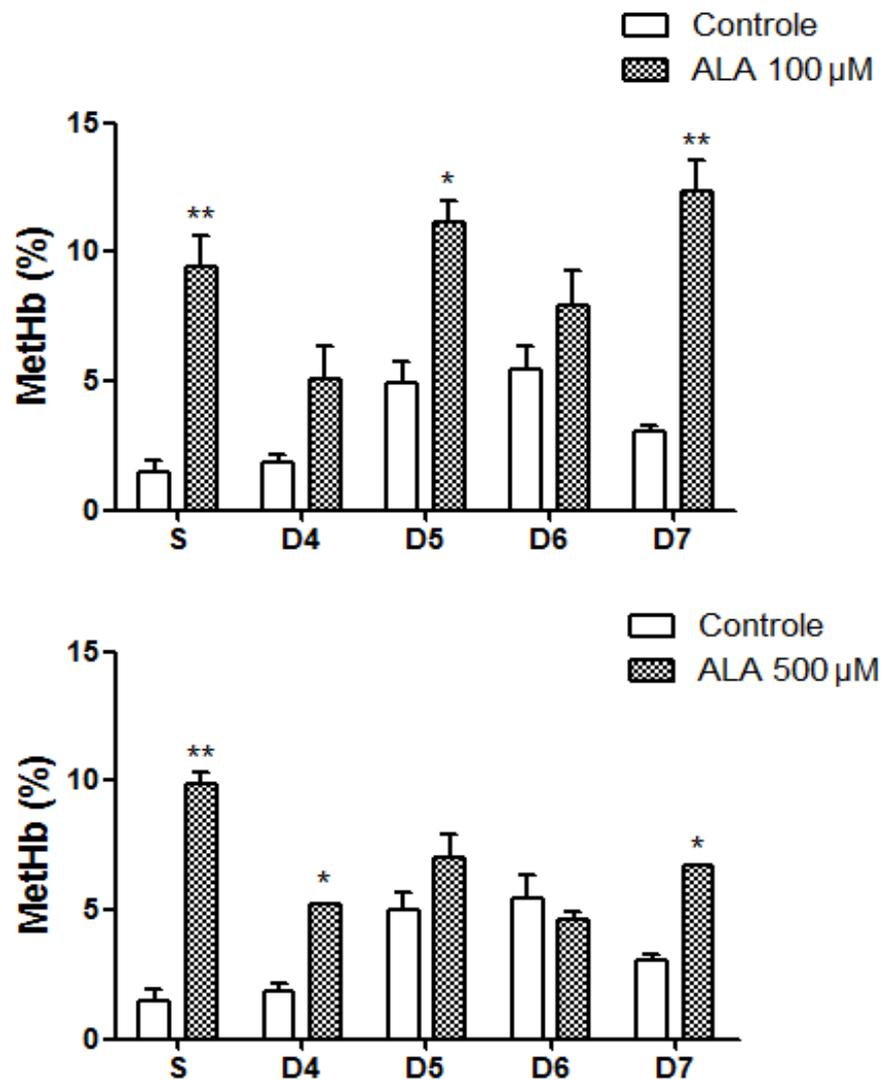


Figura 17: Percentual de metemoglobina em eritrócitos de pacientes hansenianos em uso de PQT, em comparação ao tratamento *in vitro* com ALA 100 μM . S: indivíduos sem a doença; D4: amostra de paciente no 4º mês de uso de PQT; D5: amostra de paciente no 5º mês de PQT; D6: amostra de paciente no 6º mês de uso de PQT; D7: amostra de paciente no 7º mês de uso de PQT. Resultados expressos em média \pm erro padrão (Teste T). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle.

6.5 Determinação da atividade enzimática de SOD e efeitos do tratamento *in vitro* com ALA e RSV

A avaliação da atividade enzimática de SOD em pacientes hansenianos em uso de PQT mostrou que o tratamento com o poliquimioterápico não alterou a atividade enzimática da enzima (D4: 199,7 U/mg proteína \pm 1,7; D5: 197 U/mg proteína \pm 3,7; D6: 197,3 U/mg proteína \pm 8,7; D7: 200,5 U/mg proteína \pm 3,8), apresentando valores semelhantes aos encontrados nos voluntários saudáveis (196,5 U/mg proteína \pm 11,7).

O tratamento *in vitro* dos eritrócitos de pacientes em uso de PQT com o composto RSV nas concentrações de 100 e 500 μ M não modificou o desempenho enzimático de SOD, ao comparar com os resultados obtidos nos respectivos controles. Os dados mostram que somente as amostras de pacientes no 4º mês de uso de PQT apresentaram aumento significativo de atividade da SOD em relação ao mesmo grupo sem o antioxidante. Esse resultado foi visto tanto no tratamento com a concentração de 100 μ M de RSV (209,1 U/mg proteína \pm 6,3) quanto com a concentração de 500 μ M (209 U/mg proteína \pm 4,6), como visto na Figura 18.

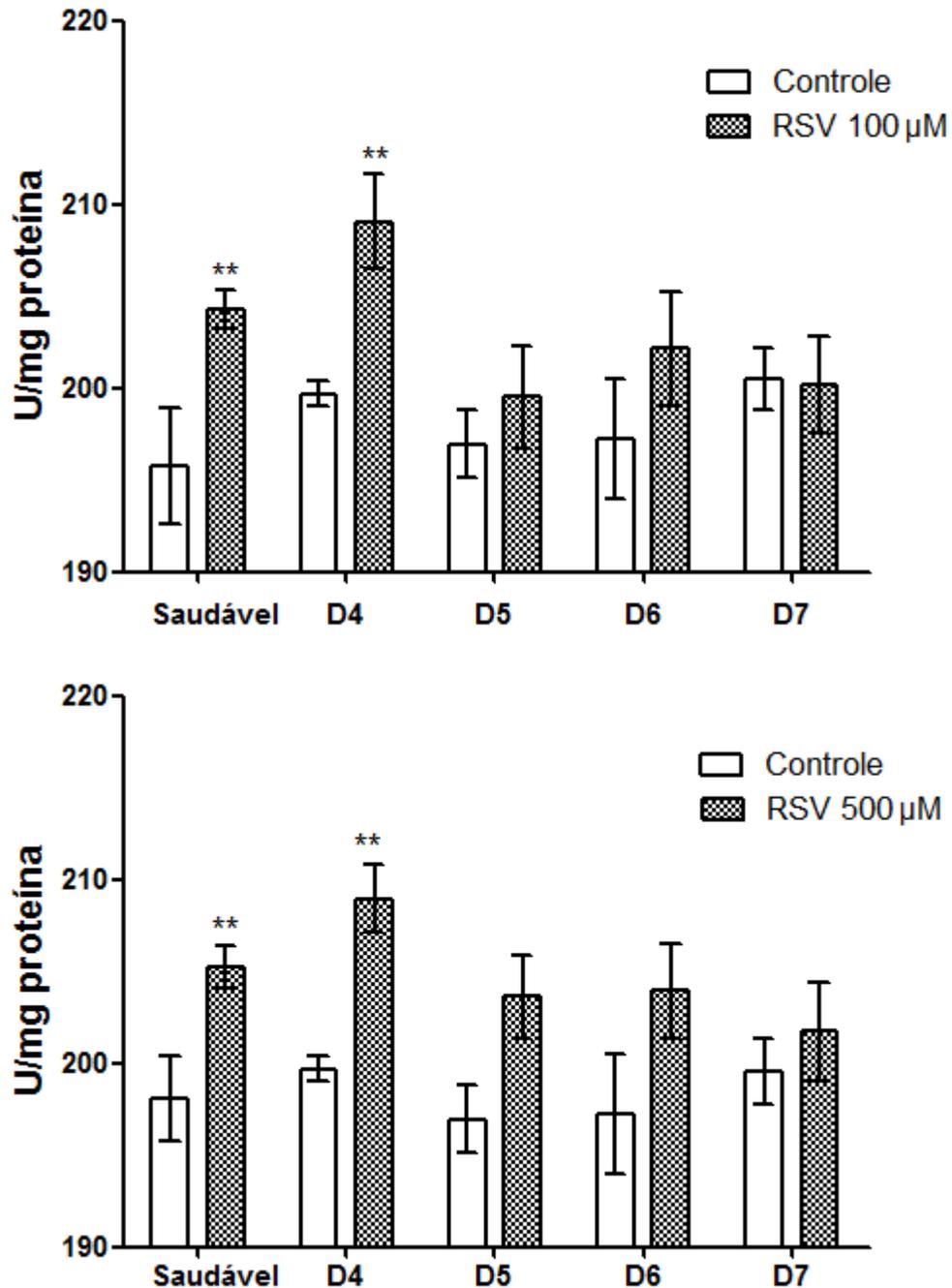


Figura 18: Atividade enzimática de SOD em eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, em comparação aos tratamentos *in vitro* com RSV 100 µM e 500 µM. D4: amostra de paciente no 4º mês de uso de PQT; D5: amostra de paciente no 5º mês de uso de PQT; D6: amostra de paciente no 6º mês de uso de PQT; D7: amostra de paciente no 7º mês de uso de PQT. Resultados expressos em média ± erro padrão (Teste T). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle.

A respeito do tratamento *in vitro* com ALA, as concentrações de 100 e 500 µM não alteraram o desempenho enzimático de SOD nos eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, visto que os resultados obtidos com a incubação com o antioxidante

assemelharam-se aos valores obtidos sem a adição de ALA em todos os grupos estudados (Figura 19).

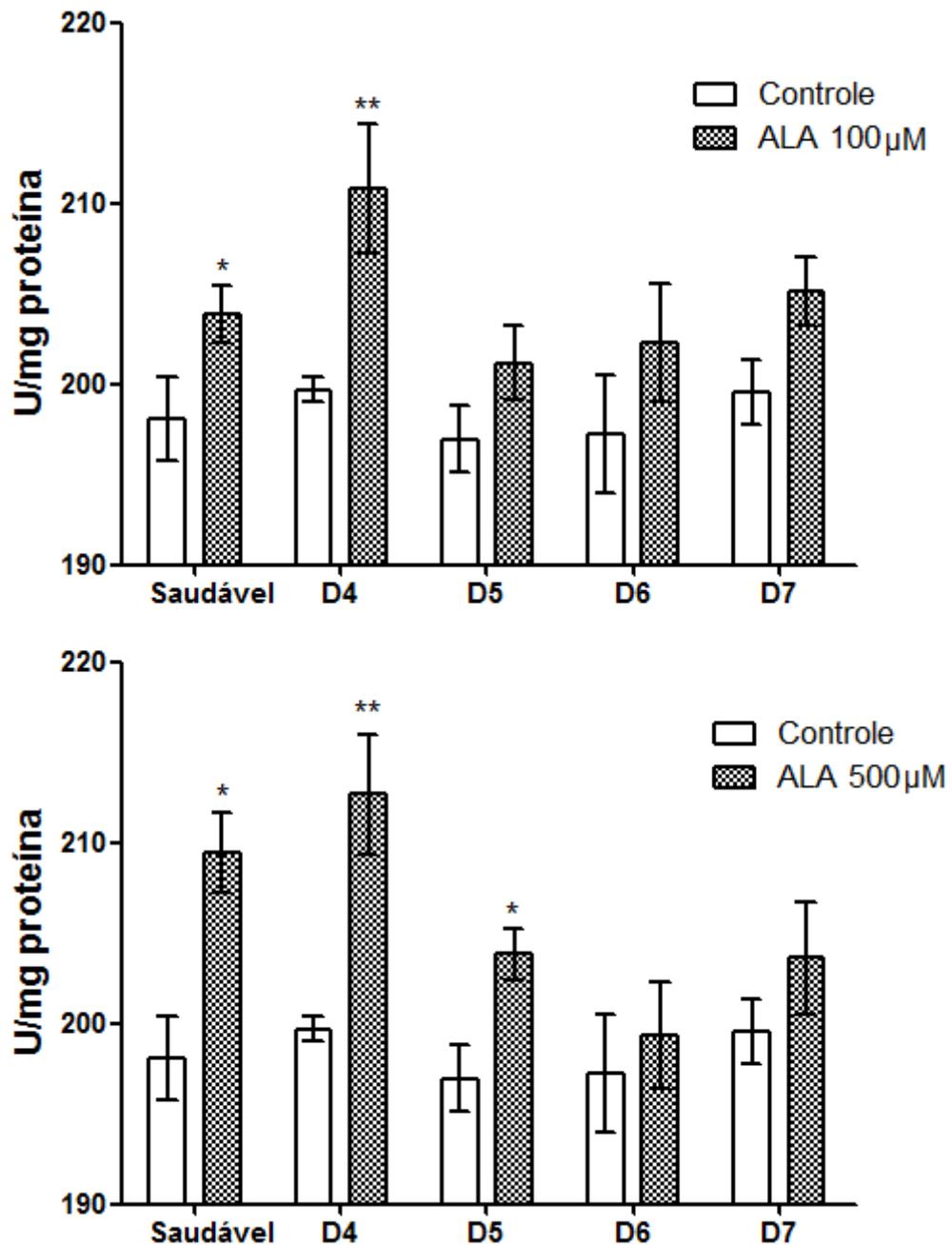


Figura 19: Atividade enzimática de SOD em eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, em comparação aos tratamentos *in vitro* com ALA 100 µM e 500 µM. D4: amostra de paciente no 4º mês de uso de PQT; D5: amostra de paciente no 5º mês de PQT; D6: amostra de paciente no 6º mês de uso de PQT; D7: amostra de paciente no 7º mês de uso de PQT. Resultados expressos em média ± erro padrão (Teste T). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle.

6.6 Determinação de atividade enzimática de CAT e efeitos do tratamento *in vitro* com ALA e RSV

Sobre a atividade da enzima catalase (CAT), os hansenianos em uso de PQT apresentaram diminuição significativa da atividade de CAT a partir do quarto mês de tratamento, em comparação aos indivíduos sem a doença. No entanto, as concentrações de 100 μM e 500 μM de RSV não foram capazes de aumentar a atividade de CAT nos eritrócitos de pacientes em uso de PQT após o tratamento *in vitro* (Figuras 20 e 21).

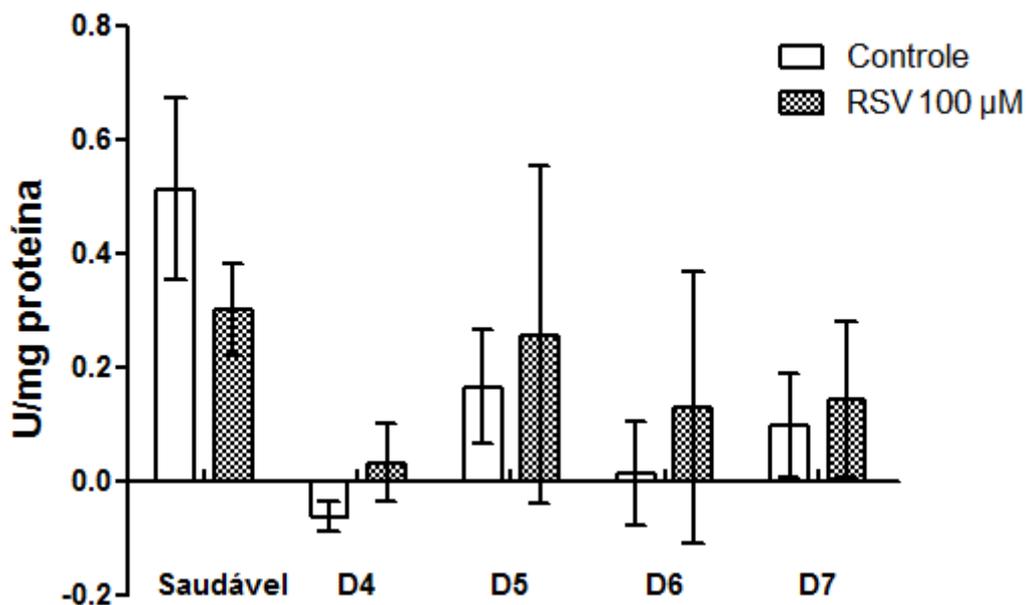


Figura 20: Atividade enzimática de CAT em eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, em comparação ao tratamento *in vitro* com RSV 100 μM . D4: amostra de paciente no 4º mês de uso de PQT; D5: amostra de paciente no 5º mês de PQT; D6: amostra de paciente no 6º mês de uso de PQT; D7: amostra de paciente no 7º mês de uso de PQT. Resultados expressos em média \pm erro padrão (Teste T). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle.

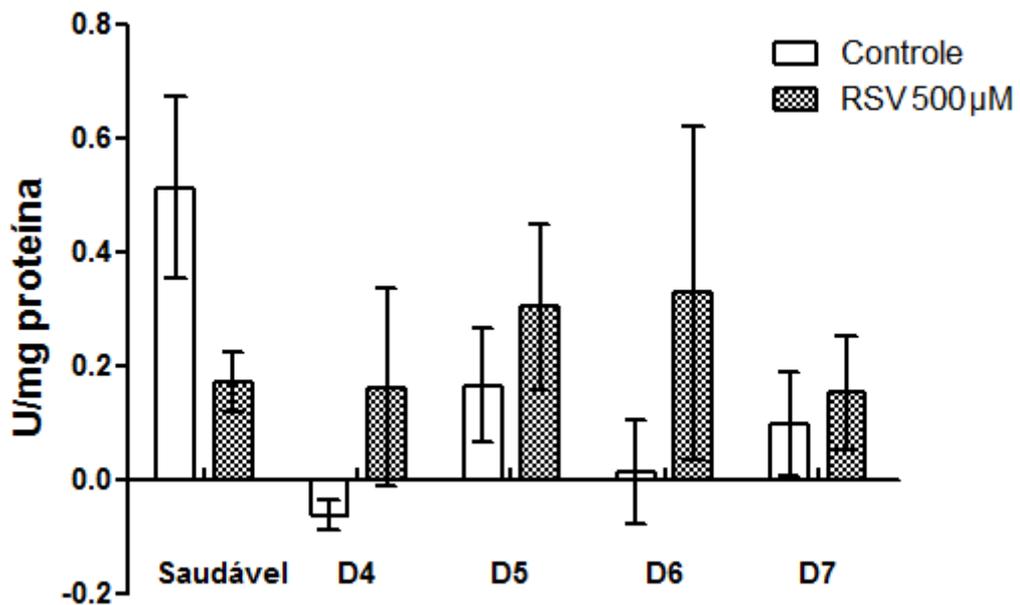


Figura 21: Atividade enzimática de CAT em eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, em comparação ao tratamento *in vitro* com RSV 500 µM. D4: amostra de paciente no 4º mês de uso de PQT; D5: amostra de paciente no 5º mês de PQT; D6: amostra de paciente no 6º mês de uso de PQT; D7: amostra de paciente no 7º mês de uso de PQT. Resultados expressos em média ± erro padrão (Teste T). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle.

Quanto ao tratamento de eritrócitos *in vitro* com ALA, os resultados foram semelhantes aos encontrados com o tratamento com RSV: em todos os grupos analisados, as concentrações de 100 e 500 µM não alteraram a atividade de CAT em comparação aos mesmos grupos sem a adição do antioxidante (Figura 22).

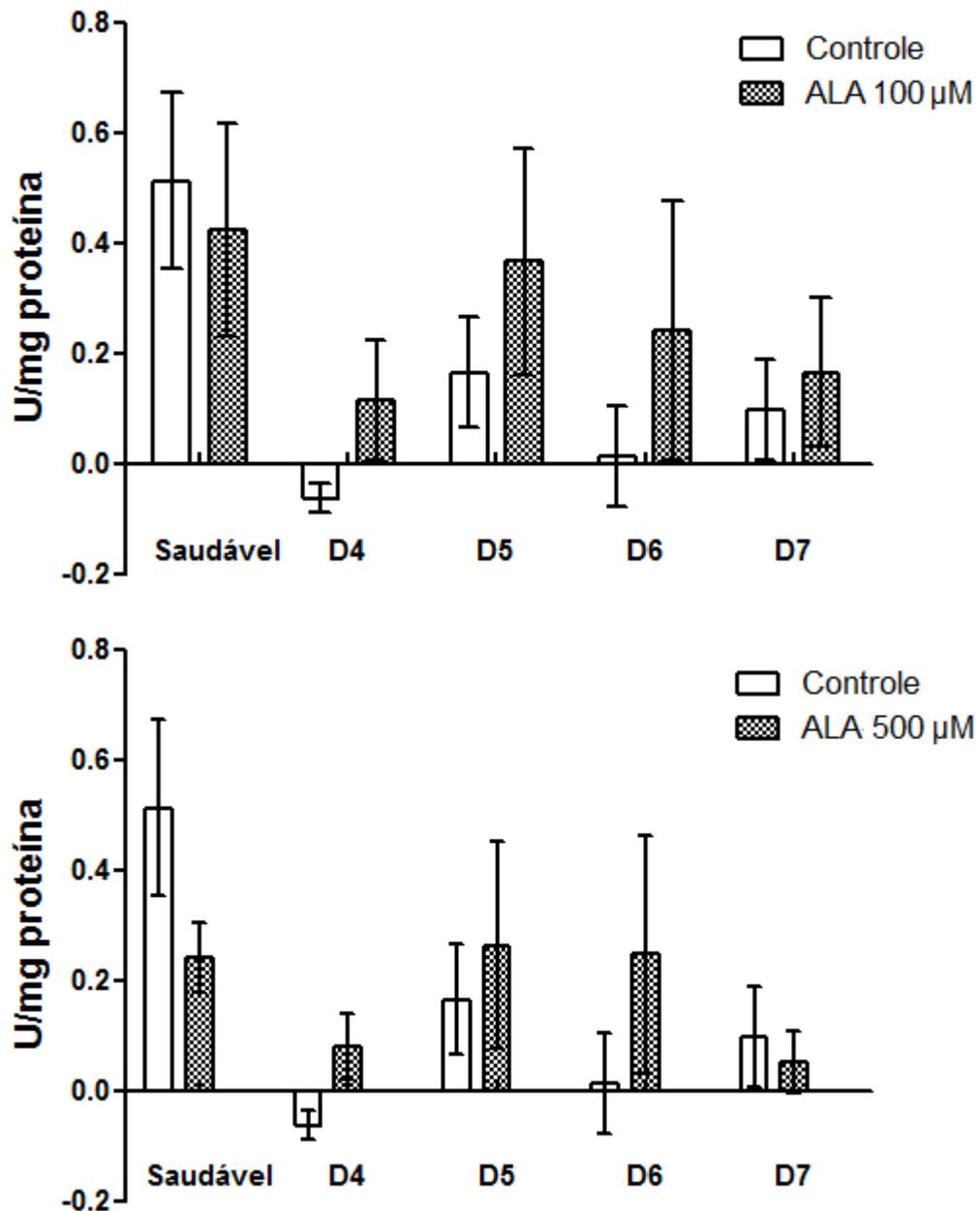


Figura 22: Atividade enzimática de CAT em eritrócitos de pacientes com hanseníase em uso de PQT, em comparação aos tratamentos *in vitro* com ALA 100 µM e 500 µM. D4: amostra de paciente no 4º mês de uso de PQT; D5: amostra de paciente no 5º mês de PQT; D6: amostra de paciente no 6º mês de uso de PQT; D7: amostra de paciente no 7º mês de uso de PQT. Resultados expressos em média ± erro padrão (Teste T). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo controle.

7 DISCUSSÃO

A investigação de efeitos hemolíticos decorrentes do tratamento para hanseníase é um passo importante para a identificação de possíveis disfunções hematológicas hereditárias e adoção de terapêuticas que possam prevenir esses danos e trazer qualidade de vida aos pacientes.

Dois dos efeitos adversos da poliquimioterapia conhecidos por sua gravidade são a anemia hemolítica e a metemoglobinemia. Tais efeitos estão relacionados com a dapsona, bacteriostático que integra o esquema de tratamento, que em doses terapêuticas produz os compostos DDS-NOH e MADDS-NOH (CARRAZZA, 1995): estes metabólitos são conhecidos na literatura por sua hematotoxicidade, pois, ao ligar-se à membrana eritrocitária, formam sítios antigênicos e ativam o sistema imunológico, favorecendo a retirada precoce dessas células por macrófagos e levando o indivíduo a um quadro de anemia (COLEMAN, 1995; BRADSHAW et al, 1997; REILLY et al, 1999 COLEMAN e HOLDEN, 2004; BORDIN et al, 2010). Conseqüentemente, a anemia hemolítica encontrada nesses pacientes é caracterizada pela reticulocitose - resposta normal do organismo à perda de hemácias no sangue periférico – e diminuição dos níveis de hemoglobina e dos índices hematimétricos HCM e CHCM (DHALIWAL et al, 2002).

Nesse sentido, o presente estudo mostrou que os pacientes com hanseníase em uso de PQT a partir da 4ª até a 7ª dose apresentaram diminuição do número de hemácias e aumento de reticulócitos em até três vezes em comparação aos indivíduos saudáveis. Dados da literatura sugerem que esses efeitos hematológicos estão associados ao tratamento com PQT, visto que pacientes com hanseníase sem tratamento apresentaram valores normais do número de hemácias e reticulócitos quando comparado aos indivíduos saudáveis (RANAWAKA et al, 2008, DEPS et al, 2012; AL-SIENI et al, 2013).

A metemoglobinemia, por sua vez, está ligada à incapacidade de transporte do oxigênio pela hemoglobina quando o íon ferro está na forma oxidada. Nesse estudo foi observado que os pacientes em tratamento para hanseníase apresentaram percentual de metemoglobina com valores próximos de 5% a partir do quinto mês de uso da PQT, índice que se manteve até o sétimo mês de tratamento, mostrando que a poliquimioterapia induziu metemoglobinemia nesses pacientes. Outros trabalhos desenvolvidos por nosso grupo, como os de Schalcher et al (2013) e Schalcher et al (2014), encontraram valores de metemoglobina

de pacientes hansenianos similares aos valores de indivíduos sem a doença e, em estudo posterior, observaram o aumento da produção de MetHb em pacientes hansenianos após o início do tratamento com PQT, sustentando a ideia de que o tratamento com a poliquimioterapia induz o quadro de metemoglobinemia. Segundo Oga (2008), com valores de metemoglobina inferiores a 10%, similar a este estudo, o paciente pode apresentar sinais e sintomas como cansaço, cefaleia e dores nos membros inferiores. Os níveis de metemoglobina superiores a 30% são acompanhados de sintomas como vertigem, cefaleia, ansiedade e taquicardia, e níveis acima de 70% levam a convulsões, arritmias e morte. Esses sintomas podem se intensificar quando há deficiência de G-6-PD, condição essa já relatada na literatura (GROSSMAN et al, 1995; RANAWAKA et al, 2008).

Além das alterações hematológicas citadas, o paciente hanseniano é acometido por danos provocados pelo sistema imunológico em resposta à infecção. As alterações na resposta imune estão associadas às distintas formas clínicas apresentadas: a presença da resposta celular define a forma clínica mais branda da doença (tuberculoide) e a ausência desta, a forma mais severa (virchowiana; MENDONÇA et al, 2008). Os macrófagos, primeira linha de células atuantes no combate à infecção, são ativados e produzem óxido nítrico (NO) e outros intermediários que reagem entre si para formar reativos mais tóxicos; no entanto, NO é rapidamente convertido em nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^- ; MOHANTY et al, 2007). Neste trabalho não houve diferença na concentração de nitritos encontrados em pacientes em tratamento para hanseníase e a encontrada no grupo de indivíduos saudáveis, indicando que a PQT não influencia a produção desse mediador.

As concentrações de NO e seus derivados também estão associadas ao aparecimento de reações hansenianas tipo 1 e 2 em pacientes com hanseníase. As reações hansenianas ou estado reacionais são descritas como fenômenos inflamatórios agudos, que podem ser localizados ou sistêmicos, e que ocorrem antes, durante ou após o tratamento da hanseníase (MENDONÇA et al, 2008). Nesse sentido, Schön et al (1999) verificaram níveis elevados dos metabólitos do NO em pacientes hansenianos reacionais tipo 1 em comparação aos pacientes hansenianos sem episódios reacionais e indivíduos saudáveis; e Mohanty et al (2007), que encontraram altos níveis de metabólitos de NO na urina de pacientes hansenianos multibacilares reacionais tipo 2 antes da terapia com corticosteroides, quando comparado aos pacientes hansenianos sem estados reacionais e pacientes reacionais sem uso de corticoides. Esse elevado nível do NO em pacientes reacionais sem uso de corticoide pode ser explicado pela elevada carga bacilar (IB maior que 3), visto que vários estudos, incluindo o divulgado

por nosso grupo, já relataram que o *M. leprae* pode levar ao aumento de NO e que esse mediador pode estar envolvidos nos danos neurais observados nos pacientes com hanseníase (SCHALCHER et al, 2013; SCHALCHER et al, 2014). Corroborando com os resultados apontados por Schön et al (1999) e Mohanty et al (2007), os baixos níveis de NO encontrados nos pacientes de nosso estudo podem estar associados a vários aspectos, tais como a baixa carga bacilar encontrada nesses pacientes (IB entre 0 e 1), em sua maioria, e sem histórico de estados reacionais, assim como o pequeno número de amostra dos grupos em tratamento e a baixa sensibilidade da técnica usada para detecção desse radical.

A produção de EROs com potencial antimicrobiano para o *M. leprae* pode se difundir para além dos locais de infecção e afetar os constituintes lipídicos de membrana, em especial os ácidos graxos poli-insaturados, que são degradados e formam malondialdeído (MDA; TRIMBAKE et al, 2013). Quando a defesa antioxidante é baixa, há maior propensão à instalação da peroxidação lipídica; nestas condições, o MDA constitui um dos principais indicadores de danos celulares provocados pela ação de EROs.

Os pacientes multibacilares tendem a apresentar maior dano celular em órgãos e tecidos, como evidenciado nos trabalhos de Vijayaraghavan et al (2009), que identificou níveis de MDA semelhantes em pacientes MB sem tratamento e em uso de PQT, e de Abdel-Hafez et al (2010), no qual os pacientes MB apresentaram níveis séricos de MDA mais elevados que os pacientes PB. Esses resultados se contrapõem aos encontrados por nosso grupo, que relatou recentemente que os níveis de MDA em pacientes hansenianos não são alterados com o uso da PQT (SCHALCHER et al, 2013; SCHALCHER et al, 2014). No presente estudo, o número amostral reduzido e pouca sensibilidade do método resultaram em baixos níveis de MDA nos pacientes hansenianos, dando falsa sugestão que o PQT não induz dano a membrana celular e não eleva a peroxidação lipídica em órgãos e tecidos.

Para conter o avanço de EROs e seus efeitos deletérios em macromoléculas, o organismo dispõe de um elaborado sistema antioxidante formado por componentes enzimáticos e não-enzimáticos: estes elementos conseguem promover o balanço redox quando o sistema se expõe temporariamente às EROs e ERNs. Dentre outros componentes, o sistema não-enzimático compreende elementos hidrossolúveis (por exemplo, ascorbato, urato, flavonoides e glutathiona) e componentes lipossolúveis (como os tocoferóis, carotenoides e ubiquinol); e o sistema enzimático conta com as defesas primárias (SOD, CAT, GPx) e secundárias, a exemplo da GR e da G-6-PD (RATNAM et al, 2006).

A SOD compreende uma família de enzimas com capacidade de dismutar $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e oxigênio, e a presença das formas mitocondrial, citosólica e extracelular de SOD no organismo amplia a capacidade de captação desse radical e evita possíveis danos teciduais. No presente estudo, a atividade dessa enzima não apresentou alteração nos pacientes hansenianos em uso de PQT durante o período de quatro meses e nem em comparação com indivíduos saudáveis.

A redução das taxas de H_2O_2 produzidas nos processos endógenos envolve a ação de uma terceira enzima, além do complexo GSH-GPx e da CAT. As peroxiredoxinas (Prx) são a terceira classe de enzimas mais abundantes nos eritrócitos, apresentam sensibilidade a pequenas quantidades de H_2O_2 e protegem a Hb da oxidação endógena, além de promover a retirada de hidroperóxidos presentes na membrana eritrocitária (LOW et al, 2007). Estudos apontam que a ausência de Prx2 em ratos promoveu o desenvolvimento de anemia hemolítica, com danos oxidativos em eritrócitos (LEE et al, 2003) e que o metabolismo de peróxidos no organismo não é exclusivo de CAT e Gpx, mas requer ação de Prx (LOW et al, 2003; JOHNSON et al, 2005). O baixo nível de atividade de CAT verificado nesse estudo pode estar relacionado à maior ação de Prx, uma vez que a ação de CAT é dependente das concentrações de H_2O_2 . Além disso, fatores ligados à própria doença e a falta de uma dieta alimentar adequada podem reduzir elementos essenciais para a manutenção da defesa antioxidante, assim como diminuir a função enzimática, como verificado por Vijayaraghavan et al (2005) e Vijayaraghavan e Paneerselvam (2011).

Nesse sentido, as buscas por antioxidantes mais potentes têm norteado as pesquisas nas últimas décadas, assim como desvendar seus complexos mecanismos de ação. De maneira geral, os antioxidantes podem reduzir o dano oxidativo diretamente, reagindo com espécies reativas radicalares e não radicalares, ou de forma indireta por duas formas: inibição da atividade ou de expressão de enzimas geradoras de EROs e com a ativação da atividade de enzimas antioxidantes intracelulares ou elevação da atividade enzimática destas (LÜ et al, 2012).

O RSV é um polifenol encontrado em uvas, amoras e vinho tinto que tem despertado a atenção de pesquisadores pelos inúmeros benefícios aos organismos vivos, desde plantas a mamíferos. Relata-se que esse composto atua na inibição da agregação plaquetária, na modulação do metabolismo lipídico, na inibição da peroxidação lipídica e na vasodilatação, além de ter atividades antitumoral e estrogênica. Como antioxidante, o RSV tem reduzida ação direta sobre radicais superóxido, hidroxila e na formação de radicais induzida por

metais; no entanto, os efeitos protetores deste são atribuídos à regulação positiva da expressão dos antioxidantes endógenos (FRÉMONT, 2000; SPANIER et al, 2009). Por sua vez, ALA é encontrado no organismo de eucariontes e participa como cofator no metabolismo da glicose, reduz compostos antioxidantes em sua forma oxidados (como a GSH e as vitaminas C e E) e vários estudos comprovam a capacidade de sequestro dos radicais hidroxila, ácido hipocloroso e oxigênio singlete (PACKER et al, 1995).

A ação de antioxidantes sobre o Fe^{2+} ligado à hemoglobina, assim como na sua forma livre na circulação sanguínea, é de fundamental importância para a quebra do ciclo vicioso Hb-MetHb-Hb com depleção de antioxidantes endógenos e para impedir a formação de metemoglobina e de outros elementos mais tóxicos através das reações de Fenton e Haber-Weiss, nas quais os metais exercem função de catalisadores. Nesse sentido, o presente trabalho mostrou que somente houve ação antioxidante de RSV e ALA frente ao Fe^{3+} quando utilizados na concentração de 100 μM e em um seletivo grupo de amostras.

Os mecanismos de ação dos antioxidantes utilizados frente a metais de transição diferem entre si, como os polifenóis que tem na sua estrutura química a presença de muitos grupos hidroxila, que apresentam facilidade de doar H^+ aos íons HOO^\cdot , HO^\cdot e $\text{O}_2^\cdot-$, inativando-os (SCHMATZ, 2011). Mecanismo semelhante é visto em fenômenos apoptóticos induzidos pelo RSV, onde se formam complexos ternários DNA-RSV- Cu^{2+} que facilitam a clivagem do DNA. No entanto, alguns trabalhos apontam que o RSV não atua sobre íons Fe^{3+} , restringindo a ação antioxidante do RSV somente a íons Cu^{2+} (RICE-EVANS et al, 1997; FRÉMONT, 2000; LASTRA e VILLEGAS, 2007; MIURA et al, 2008). Por outro lado, os efeitos quelantes de ALA e DHLA são controversos, visto que ambos formam complexos estáveis com metais, permitindo uma fácil eliminação de metais pesados dos sistemas biológicos. Enquanto ALA tem afinidade para quelar Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} , sua forma reduzida desempenha funções quelante/redutor frente aos íons Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} e Hg^{2+} , além de formar complexos mais estáveis com Fe^{3+} que os formados com Fe^{2+} (BIEWENGA et al, 1997; NAVARI-IZZO et al, 2002).

Alguns estudos levantam a hipótese de que ALA e DHLA têm ação reduzida em situações onde há prévia formação de metemoglobina e que o pré-tratamento com antioxidantes pode prevenir o estresse oxidativo causado por agentes oxidantes. O estudo de Coleman e Walker (2000) verificou que a utilização de ALA 1 mM favoreceu a formação de MetHb *in vitro* em eritrócitos de pacientes diabéticos - os quais são propensos a formar metemoglobina - expostos ao metabólito MADDS-NOH 0,1 mM por 5, 10 e 15 min, mesmo

com prévia incubação do antioxidante por uma hora. Em outro trabalho envolvendo a redução da formação de MetHb *in vitro* com o uso de antioxidantes em tempos de 30, 60 e 120 min de incubação, Coleman e Taylor (2003) observaram que ALA 1mM somente conseguiu reduzir a formação de MetHb *in vitro* após o pré-tratamento de eritrócitos e após a administração simultânea com DDS 0,15 mM no tempo de 120 min; no entanto, os mesmos autores relataram que DHLA, na mesma concentração de 1 mM, apresentou maior efeito redutor que seu precursor no pré-tratamento de eritrócitos e na administração simultânea com DDS 0,15 mM nos três tempos observados.

Em situações de desequilíbrio redox, o balanço na atividade de SOD e CAT se faz essencial na regulação dos níveis dos radicais superóxido e H₂O₂ nas células, visto que detoxificam estes reativos e evitam a formação e acúmulo de radical hidroxila, extremamente deletério para macromoléculas. O presente trabalho mostrou que, em relação à SOD, as concentrações de 100 µM e 500 µM de RSV aumentaram a atividade enzimática de SOD somente em amostras de indivíduos sem a doença e em amostras de pacientes no 4º mês de tratamento para hanseníase, enquanto a atividade foi mantida nas demais doses terapêuticas; ALA 100 µM estimulou a atividade enzimática em amostras de indivíduos sadios e em amostras de pacientes na 4ª dose de PQT para hanseníase e a concentração de 500 µM aumentou a atividade de SOD em amostras de pacientes hansenianos no 5º mês de tratamento poliquimioterápico, além dos grupos estimulados com ALA 100 µM. Ao avaliar a atividade de CAT, os antioxidantes RSV e ALA diminuíram a função enzimática em amostras de indivíduos sadios nas duas concentrações utilizadas; no entanto, as concentrações de 100 µM e 500 µM de ambos os antioxidantes mantiveram a atividade de CAT nos pacientes em tratamento para hanseníase.

Estudos mostram que o *up-regulation* da atividade enzimática de enzimas antioxidantes pode auxiliar na profilaxia ou tratamento de distúrbios metabólicos que tenham como ponto de partida a elevação de EROs, além de facilitar a remoção de radicais lesivos, conferir resistência ao estresse oxidativo e aumentar a sobrevivência de indivíduos (MOKNI et al, 2007). Há relatos de que os antioxidantes RSV e ALA possam atuar indiretamente na regulação da expressão gênica ao interagir com o fator nuclear NF-κB, o qual é relacionado com a expressão de inúmeros mecanismos antioxidantes (PACKER, 1995). Contudo, a regulação positiva ou negativa desses antioxidantes é dependente dos tipos celulares, da concentração utilizada e do tempo de exposição. Neste trabalho as particularidades do estudo *in vitro* não permitem avaliar de fato a atividade de regulação enzimática de RSV e ALA,

visto que eritrócitos não apresentam capacidade biossintética, e um estudo *in vivo* certamente permitiria essa avaliação com maior clareza.

Visto que os antioxidantes estudados são sugestão de terapêutica para minimizar os danos tóxicos causados pelo tratamento vigente para o combate da hanseníase e pela produção de reativos tóxicos causados pela doença *per se*, estudos posteriores são necessários no intuito de avaliar modelos experimentais que reproduzam melhor as condições *in vivo* e verificar ações antioxidantes de RSV e ALA tempo-dependentes nas doenças infecciosas crônicas.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados, pode-se concluir que:

- Os pacientes que fazem uso de poliquimioterapia para hanseníase apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos, como diminuição nos valores de hemácias e aumento na porcentagem de reticulócitos, o que reforça os efeitos hemolíticos da administração do tratamento poliquimioterápico;
- O reduzido número amostral da pesquisa e a baixa sensibilidade das técnicas para determinação de MDA e nitritos resultaram em valores subestimados desses analitos nos pacientes estudados;
- O percentual de metemoglobina aumentou nos pacientes hansenianos durante os meses de tratamento com PQT. O tratamento com RSV e ALA nas concentrações de 100 μM e 500 μM não alterou o percentual de MetHb em amostras de pacientes que estavam entre o 4^o e 6^o mês de uso de PQT; no entanto, potencializou a formação de MetHb nas amostras referentes à 7^a dose de tratamento com PQT;
- Observou-se nos pacientes hansenianos uma atividade de SOD similar ao controle e uma decrescida atividade de CAT, esta possivelmente diminuída pela ação de enzimas secundárias como a Prx;
- O tratamento com RSV na concentração de 100 μM elevou em duas vezes a atividade de SOD somente em amostras de pacientes na 4^a dose de PQT; a concentração de 500 μM de RSV, assim como as concentrações de ALA, não alteraram a atividade enzimática de CAT e SOD nos eritrócitos de pacientes com hanseníase.

PERSPECTIVAS

A poliquimioterapia para hanseníase é a barreira mais eficaz contra o avanço da infecção pelo *Mycobacterium leprae*, apesar de ser conhecida pelos diversos efeitos colaterais causados ao longo do tratamento (alteração da pigmentação da pele, distúrbios gastrintestinais, hepatite medicamentosa, hipersensibilidade à dapsona, metemoglobinemia, anemia) e por muitas vezes vista pelos pacientes como causa das complicações decorrentes da doença. No entanto, os eventos que ocorrem na hanseníase e durante a poliquimioterapia são eventos multifatoriais, envolvendo mecanismos de resistência do bacilo, a resposta imune do hospedeiro e a ação da poliquimioterapia no combate ao patógeno. Desta forma, vale ressaltar a importância de estudos com novas alternativas terapêuticas com menor toxicidade e que possam melhorar a vida do paciente, principalmente com diminuição dos efeitos adversos e das complicações neuro-imunológicas ocasionadas pela patologia e pela poliquimioterapia.

REFERÊNCIAS

ABDEL-ZAHER, A. O.; ABDEL-HADY, R. H.; MONEIM, W. M. A.; SALIM, S. Y. Alpha-lipoic acid protects against potassium cyanide-induced seizures and mortality. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, pp. 161–165, 2011.

AL-SIENI, A. I.; AL-LAYATI, W. Z.; AL-ABBASI, F. A. Temporal adverse effects in leprosy Saudi patients receiving multi drug therapy. **Clinical & Experimental Pharmacology**, v. 4, n. 1, 2013. DOI:10.4172/2161-1459.1000141

AMADOR, M. P. S. C. Soroprevalência para hanseníase em áreas endêmicas do estado do Pará. 2004. 126 f. Dissertação (Mestrado) – **Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais**, Universidade Federal do Pará, Belém, 2004.

ANTUNES, D. E; ARAÚJO, S.; FERREIRA, G. P.; DA CUNHA, A. C. S. R.; DA COSTA, A. V.; GONÇALVES, M. A.; GOULART, I. M. B. Identification of clinical, epidemiological and laboratory risk factors for leprosy reactions during and after multidrug therapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 7, pp. 901-908, 2013.

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.

BIEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R; M. M.; BAST, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. **Gen. Pharmac.** v. 29, n. 3, pp. 315-331, 1997

BINITHA, M; JYOTHI, P.; NANDAKUMAR, G; RIYAZ, N. A study of oxidative stress in paucibacillary and multibacillary leprosy. **Indian Journal of Dermatology, Venerology and Leprology**, v. 74, pp. 80-85, 2008.

BORDIN, L.; FIORE, C.; ZEN, F.; COLEMAN, M. D.; RAGAZZI, E.; CLARI, G. Dapsone hydroxylamine induces premature removal of human erythrocytes by membrane reorganization and antibody binding. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, pp. 1186-1199, 2010.

BRADSHAW, T.P.; MCMILLAN, D. C.; CROUCH, R. K.; JOLLOW. Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsone hydroxylamine. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 7, pp. 1183–1193, 1997

BRAGHETTO, J. B. Avaliação do potencial da arginina na prevenção da hemotoxicidade induzida pela dapsona em ratos. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado) - **Programa de Pós-Graduação em Toxicologia**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BRANDÃO, V. D. M. Efeitos do ácido lipoico sobre parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos traço falsiforme ou pacientes falsiformes. 2008. 109 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção a Saúde, Departamento de Atenção Básica . - 2. ed. rev. - Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Dermatologia na Atenção Básica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde.- 1ª edição. - Brasília: Ministério da Saúde, 2002. (Série Cadernos de Atenção Básica; n. 09) - (Série A. Normas e Manuais Técnicos; n. 174)

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Osvaldo Cruz. **Memento Terapêutico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. (Série B. Textos Básicos de Saúde)

BRUNTON, L. L.; PARKER, K. L.; BLUMENTAL, D. K.; BUXTON, I. L. O. **Goodman e Gilman: manual de farmacologia e terapêutica**. Porto Alegre: AMGH, 2010.

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

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

COLEMAN, M. D.; RHODES, L. A.; SCOTT, A. K.; VERBOV, J.; FRIEDMANN, P.; BRECKENRIDGE, A. M.; PARK, B. K. The use of cimetidine to reduce dapsone-dependent methaemoglobinaemia in dermatitis herpetiformis patients. **Br J Clin Pharmacol** 34: 244-249, 1992.

COLEMAN, M. D. Dapsone toxicity: some current perspectives. **General Pharmacology**, v. 26, n. 7, pp. 1461-1467, 1995

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

COLEMAN, M.D.; HOLDEN, L. J. The methaemoglobin forming and GSH depleting effects of dapsone and monoacetyl dapsone hydroxylamines in human diabetic and non-diabetic erythrocytes in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 17, pp. 55-59, 2004.

DELMAS, D.; AIRES, V.; LIMAGNE, E.; DUTARTRE, P.; MAZUÉ, F.; GHIRINGHELLI, F.; LATRUFFE, N. Transport, stability and biological activity of resveratrol. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1215, pp. 48-59, 2011.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**, v. 82, pp. 47-95, 2002.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, pp. 663-673, 2000.

GOLBIDI, S.; MOHAMMAD, B.; LAHER, I. Diabetes and alpha lipoic acid. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2, n. 69, 2011.

GOULART, I. M. B.; ARBEX, G. L.; CARNEIRO, M. H.; RODRIGUES, M. S.; GADIA, R. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n.5, pp. 453-460, set-out, 2002.

GREBOGI, I. H. Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários da dapsona. 2009. 98 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

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, pp.49-61, 1999.

GROSSMAN, S. J.; SIMSON, J.; JOLLOU, D. J. Dapsone-induced hemolytic anemia: effect on N-hydroxy dapsone on the sulfhydryl status and membrane proteins of rat erythrocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 117, pp. 208-217, 1992.

HALIM, N.K.D.; OGBEIDE, E. Haematological alterations in leprosy patients treated with dapsone. **East African Medical Journal**, v. 79, n. 2, pp. 100-102, 2002.

HARRIS, E. D. Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB Journal**, vol. 6, pp. 2.675-2.683, 1992.

INAL, M. E.; EGÜZ, A. M. The effects of isosorbide dinitrate on methemoglobin reductase enzyme activity and antioxidant states. **Cell Biochemistry and Function**, vol. 22, pp. 129-133, 2004.

JOHNSON, RM.; GOYETTE, G JR, RAVINDRANATH Y, HO Y-S. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 39, pp. 1407-1417, 2005.

KANIAS, T.; ACKER, J. P. Biopreservation of red blood cells - the struggle with hemoglobin oxidation. **FEBS Journal**, v. 277, pp. 343-356, 2010.

KARAKOYUN, B.; YÜKSEL, M.; ERCAN, F.; ERZİK, C.; YEGEN, B. Ç. Alpha-Lipoic Acid Improves Acetic Acid-Induced Gastric Ulcer Healing in Rats. **Inflammation**, v. 32, n. 1, February 2009.

LEE, T. -H.; KIM, S. -U.; YU, S. -L.; KIM, S. H.; PARK, D. S.; MOON, H. -B.; DHO, S. H.; KWON, K. -S.; KWON, H. J.; HAN, Y. -H.; JEONG, S.; KANG, S. W.; SHIN, H. -S.; LEE, K. -K.; RHEE, S. G.; YU, D. -Y. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. **Blood**, v. 101, pp. 5033-5038; 2003.

LIMA, C. S. Mecanismos de patogénia do Mycobacterium lepra: análise de proteínas extracelulares e efeitos sobre o metabolismo lipídico do hospedeiro. 2008. 157 f. Tese

(Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

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 de S. Paulo**, v. 49, n. 4, pp. 211-214, July-August, 2007

LIMA, L. W. O. Avaliação imunohistoquímica da atividade macrofágica e sua relação com o fenômeno de apoptose na hanseníase. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

LOW, F. M.; HAMPTON, M. B.; PESKIN, A. V., WINTERBOURN, C. C. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. **Blood**, v. 109, pp. 2611-2617, 2007.

LÜ, J. M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 4, pp. 840–860, 2010.

MARTINS, M.A.S.S.G. O eritrócito como indicador de stress in vivo, no exercício físico e nas doenças cardiovasculares. 1995. 235 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1995.

MANKELOW, T. J.; SATCHWELL, T. J.; BURTON, N. M. Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 49, pp. 1-10, 2012.

MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, n.2, p.6049-6055, Nov.1969.

MELLO, M. H. N-acetilcisteína e dapsona: avaliação da toxicidade hematológica e bioquímica em ratos Wistar. 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado) - programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MENDONÇA, V.A.; COSTA, R. D.; BRITO-MELO, G. E.; ANTUNES, C. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 4, pp. 343-350, 2008.

MIURA, T.; MURAOKA, S.; IKEDA, N.; WATANABE, M.; FUJIMOTO, Y. Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. **Pharmacology & Toxicology**, v. 86, pp. 203-208, 2000.

MOHANTY, K. K.; GUPTA, M.; GIRDHAR, B. K., GIRDHAR, A.; CHAKMA, J. K.; SENGUPTA, U. Increased level of urinary patients during Type 2 reactions and decreased after antireactional therapy. **Leprosy Review**, v. 78, pp. 386-390, 2007.

MORAES, N. V.; MELLO, M. H., 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, jan/mar, 2008.

NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M. F.; SGHERRI, C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 40, pp. 463-470, 2002.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos da Toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OHKAWA, H.; OHISHI, M.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, pp. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, S.; SALDANHA, C. An overview about erythrocyte membrane. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v. 44, pp. 63-74, 2010

OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 19, n. 2, pp. 227-250, 1995.

PANTALEO, A.; DE FRANCESCO, L.; FERRU, E.; VONO, R.; TURRINI, F. Current knowledge about the functional roles of phosphorylative changes of membrane proteins in normal and diseases red cells. *Journal of Proteomics*, v. 73, pp. 445-455, 2010.

RANAWAKA, R. R.; MENDIS, S.; WEERAKOON, H. S. Dapsone-induced haemolytic anaemia, hepatitis and agranulocytosis in a leprosy patient with normal glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity. *Leprosy Review*, v. 79, pp. 436-438, 2008.

RATMAN, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; RAVI KUMAR, M. N. V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, v. 113, pp. 189-207, 2006.

REIS NETO, E. T.; NEVES JÚNIOR, M. T.; PUCCINELLI, M. L.; SATO, E. I. Dapsona no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico com manifestações cutâneas, relato de dois casos e uma breve revisão de literatura. *Sinopse de Reumatologia*, n. 3, pp. 72-81, set 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, v. 2, n. 4, pp. 152-159, 1997.

RODRIGUES, L. C.; LOCKHOOD, D. N. J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infectiology Diseases*, v. 11, pp. 464-470, 2011.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 3, pp. 437-442, 2005.

SCHMATZ, R. Efeitos do resveratrol, do suco de uva e do vinho tinto nos biomarcadores de estresse oxidativo e na atividade de ectoenzimas em ratos diabéticos. 2011. 144 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SCHÖN, T.; GEBRE, N.; SUNDGVIST, T.; HABETMARIAM, H. S.; ENGEDA, T.; BRITTON, S. Increased levels of nitric oxide metabolites in urine from leprosy patients in reversal reaction. **Leprosy Review**, v. 70, n. 1, pp. 52-55, 1999.

SMITH, J. E. Erythrocyte membrane: structure, function and pathophysiology. **Vet Pathol**, v. 24, pp. 471-476, 1987.

SPANIER, G.; XU, H.; XIA, N.; TOBIAS, S.; DENG, S.; WOJNOWSKI, L.; FORSTERMANN, U.; LI, H. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (sod1), glutathione peroxidase 1 (gpx1) and NADPH oxidase subunit (nox4). **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, suppl 4, pp. 111-116, 2009.

SUZUKI, K.; AKAMA, T.; KAWASHIMA, A.; YOSHIHARA, A.; YOTSU, R. R.; ISHII, N. Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives. **Journal of Dermatology**, n. 39, pp. 121-129, 2012.

SZELAG, M.; MIKULSKI, D.; MOLSKI, M. Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of alpha-lipoic acid and its metabolites. **Journal of Molecular Modeling**, vol. 18, n. 7, pp. 2907-2916, 2011.

TRIMBAKE, S. B.; SONTAKKE, A. N.; DHAT, V. V. Oxidative stress and antioxidant vitamins in leprosy. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 1, n. 3, pp. 226-229, 2013.

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

VAN WIJK, R.; VAN SOLINGE, W. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. **Blood**, v. 106, n. 13, pp. 4034-4042, 2005.

VAN ZWIETEN, R.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the antioxidant system of human red blood cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, pp. 377-386, 2014.

VEGGI, L. M.; PRETTO, L.; OCHOA, E.; CATANIA, V. A.; LUQUITA, M. G.; TABORDA, D. R.; POZZI, E. J. S.; 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, pp. 155-163, 2008.

VIJAYARAGHAVAN, R.; PANEERSELVAM, C. Erythrocyte antioxidant enzymes in multibacillary leprosy patients. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 2., pp. 409-412, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, R.; SURIBABU, C. S.; OOMMEN, P; K.; PANNEERSELVAM, C. Vitamin E reduces reactive oxygen species mediated damage to bio-molecules in leprosy during multi-drug therapy. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 3, n. 4, pp. 428-439, 2009.

WOZEL, G.; BLASUM, C. Dapsone in dermatology and beyond. **Arch Dermatol Res**, v. 306, pp. 103-124, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Leprosy: update on the 2012 situation. **Weekly Epidemiological Record**, n. 35, pp. 365-380, 2013.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (sod1), Mn-SOD (sod2), and EC-SOD (sod3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, pp. 337–349, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1: Parecer de autorização para desenvolvimento da pesquisa emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O EFEITO DO ÁCIDO ALFA-LIPOICO NA METEMOGLOBINA INDUZIDA PELA POLIQUIMIOTERAPIA EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM HANSENÍASE in vitro

Pesquisador: Marta Chagas Monteiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07763212.7.0000.0018

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 157.263

Data da Relatoria: 27/11/2012

Apresentação do Projeto:

A Hanseníase ou Mal de Hansen (MH) é uma doença infectocontagiosa, crônica, curável, causada pelo bacilo álcool-ácido resistente, intracelular obrigatório, denominado *Mycobacterium leprae*. A poliquimioterapia (PQT) padronizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é constituída pelos medicamentos, rifampicina, dapsona e clofazimina, e se constitui hoje como a principal estratégia para interromper a cadeia de transmissão do

M. leprae. Todos os fármacos empregados no PQT são capazes de provocar reações adversas; contudo, a dapsona é responsável por grande número de intoxicações, principalmente a formação de metemoglobinemia. Esse efeito tóxico é indicativo de aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Desta forma, compostos considerados potentes antioxidantes, como o ácido γ -lipóico, apresentam um grande potencial de utilização na terapêutica de metemoglobinemia. Assim, o presente projeto visa avaliar o efeito do ácido γ -lipóico na metemoglobina induzida pela dapsona em modelo in vitro, correlacionando ao desenvolvimento do estresse oxidativo. Para tanto, será determinado o efeito da administração do ácido γ -lipóico na reversão da metemoglobinemia induzida pela dapsona em amostras de pacientes com hanseníase. Além disso, será possível verificar se ação do ácido γ -lipóico dependem de agentes antioxidantes, como glutatona (GSH), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), bem como de óxido nítrico (NO). Assim, a presente proposta possibilitará a determinação da viabilidade de utilização de compostos antioxidantes, como o ácido γ -lipóico na terapêutica de metemoglobinemia. Desta forma, os resultados obtidos poderão

ANEXO 2: Autorização para desenvolvimento da pesquisa emitido pela Unidade de Referência Especializada “Dr. Marcello Cândia”.

SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE
INSTITUTO POBRES SERVOS DA DIVINA PROVIDÊNCIA
1º CENTRO REGIONAL DE SAÚDE
URE DR. MARCELLO CANDIA

Secretaria de
Estado de
Saúde Pública



TERMO DE ACEITE

Informamos para os devidos fins que o Conselho Técnico-Científico da Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia deu parecer favorável a mestranda do programa de **Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/PPGCF**, Mariely Cristine Amandor Pessoa sob a orientação da Profª. Marta Chagas Monteiro para realizar o Projeto de mestrado denominado “ **O efeito do ácido alfa-lipoico na metemoglobinemia induzida pela poliquimioterapia em amostras de pacientes com hanseníase *in vitro***”.

Outrossim, ressaltamos 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 Candia.

Marituba, 17 de Outubro de 2012

Renata Pamplona Noyes de Oliveira
Diretora URE Dr. Marcello Candia

Renata Pamplona Noyes de Oliveira
Diretora da URE Marcello Candia.

ANEXO 3: Autorização para desenvolvimento de pesquisa na UBS Pedreira emitido pela Secretaria de Saúde do Estado do Pará- SESP



1º Centro Regional de Saúde

Secretaria de
Estado de
Saúde Pública



Memo. Nº 186 /1º CRS/SESPA
À Direção da UBS Pedreira
Dra. Maria do Socorro Monteiro Cavalcante

Belém, 13 de fevereiro de 2014.

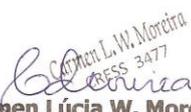
Assunto: **Autorização de Pesquisa**

Senhora Diretora,

Autorizamos **Mariely Cristine Amador Pessôa**, aluna do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará – **UFPA**, para desenvolver nessa Unidade, pesquisa intitulada “**O Efeito do Ácido Alfa-Lipoico na Metemoglobina Induzida pela Poliquimioterapia em Amostras de Pacientes com Hanseníase in vitro**”, para trabalho de conclusão de curso – nível de mestrado, conforme solicitado através de Documentos datados de 17/01/14 sob números de protocolo e 22438/2013- 1º CRS

A aluna realizará o estudo no **primeiro trimestre de 2014**, sob a orientação da **Profª. Dra. Marta Chagas Monteiro**, segundo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Pará (cópia em anexo).

Atenciosamente,


Carmen Lúcia W. Moreira
RESS 3477

Educação em Saúde/1º CRS/SESPA


Ana Amélia Santos Ramos de Oliveira
Diretora do 1º CRS /SESPA

Ana Amélia S. Ramos de Oliveira
Diretora do 1º CRS

ANEXO 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado com pacientes participantes do estudo.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O §g(a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa “O EFEITO DO ÁCIDO ALFA-LIPOICO NA METEMOGLOBINA INDUZIDA PELA POLIQUIMIOTERAPIA (PQT) EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM HANSENIASE *in vitro*” que tem como finalidade avaliar os efeitos colaterais da dapsona em pacientes com hanseníase em uso de PQT. Além disso, verificar se o tratamento com o ácido α -lipoico, um eficiente antioxidante, consegue reverter os níveis de metemoglobina e efeitos causados pela dapsona.

Esta pesquisa será realizada através da coleta de sangue de pacientes com hanseníase voluntários que estejam sob tratamento na URE “Dr. Marcello Candia”. Ao participar deste estudo o (a) §g(a) permitirá que a pesquisadora obtenha dados que possibilitem o desenvolvimento dessa pesquisa, assim auxiliando no surgimento de nova linha de tratamento aos efeitos adversos da PQT. O (a) §g(a) terá liberdade de recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o (a) §g(a). Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone da pesquisadora abaixo descrito. A participação na pesquisa não traz complicações legais, a nenhum dos participantes. Os procedimentos adotados nessa pesquisa obedecem a Resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde. Todas as informações coletadas nesse estudo são estritamente confidenciais, somente a pesquisadora e orientadora terão conhecimentos dos dados.

Eu, _____
RG nº _____ declaro ter sido informado (a) e concordo em participar, como voluntário (a), 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:

_____ MSc. MARIELY CRISTINE A. PESSÔA Telefone: (91) 8211-2434 Endereço: Passagem Coletiva, 54 Coqueiro, Ananindeua-PA	_____ Dra. MARTA CHAGAS MONTEIRO Telefone: (91) 92072276 Endereço: Rua Rodolfo Chagasmonte, 318, cond. Murtoza, casa 15. Marambaia, Belém-PA
--	--