



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

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO SOBRE A LESÃO
HEPÁTICA, INDUZIDA POR DAPSONA EM MODELO ANIMAL**

JONI TETSUO SAKAI

**BELÉM-PA
2018**



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

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO SOBRE A LESÃO
HEPÁTICA, INDUZIDA POR DAPSONA EM MODELO ANIMAL**

Autor: Joni Tetsuo Sakai

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

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

Área: Fármacos e medicamentos.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S111e Sakai, Joni Tetsuo
Efeito protetor do Ácido Alfa Lipóico sobre a lesão hepática, induzida por dapsona em modelo animal. / Joni Tetsuo Sakai. — 2018
74 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro
1. Dapsona. 2. Antioxidante. 3. Ácido Alfa Lipóico. 4. Estresse oxidativo. 5. Ferro. I. Monteiro, Marta Chagas, *orient.* II. Título
-

JONI TETSUO SAKAI

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO SOBRE A LESÃO
HEPÁTICA, INDUZIDA POR DAPSONA EM MODELO ANIMAL**

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

Área: Fármacos e medicamentos.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

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

Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia (PPGCF/UFPA) – Examinadora

Profa. Dr. Rafael Rodrigues Lima (PPGCF/UFPA) – Examinador

BELÉM-PA
2018

DEDICATÓRIA

A minha esposa Elaine Tays, a minha mãe Akiko e em memória do meu pai Kiyosi, que sempre estão ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao grande Deus pai pelo seu amor e sua fidelidade para vencer as minhas fraquezas e obstáculos da vida. Em tua palavra encontrei força para caminhar nessa jornada e sua benção sempre me conduziu para alcançar meus objetivos;

A minha esposa Tays que sempre está ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri e nas horas que me lamentei. Você fez, faz e fará sempre parte de minha vida;

Aos meus amigos Everton Varela, Paulo Mendes e o Ricardo pela ajuda que me ofereceram em um momento em que eu tanto precisei;

A minha mãe Akiko, a minha família, e em memória do meu pai Kiyosi, obrigado por todos momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos conselhos, pelo amor, pela honestidade, pelo afeto e pela amizade;

A professora Dra. Marta Chagas Monteiro, pela oportunidade quando eu mais precisei, acreditou em mim e nas minhas capacidades. Seu ensinamento, dedicação, humildade e amizade sempre serão importantes para minha vida. E Palavras de gratidão serão sempre escassas para quem dá tanto de si mesmo e de forma tão constante;

Ao laboratório LBEIM pelo apoio e pelas amizades firmadas durante o trabalho, a Carla Mendonça, Bruno Quadros, Sávio Monteiro, Carolina Azulay, Pricila Gonçalves e a todos os integrantes do laboratório;

A professora e Dra. Barbarella pelo auxílio na realização do experimento;

A secretaria do PPGCF, a Cliciane e a Brasília pelo serviço eficiente;

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio profissional, estrutural e financeiro durante o curso de mestrado.

RESUMO

SAKAI, J.T. **Efeito protetor do Ácido Alfa Lipóico sobre a Lesão hepática, induzida por dapsona em modelo animal.** 72 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

O fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação dos xenobióticos, com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo. A dapsona (DDS) faz parte da poliquimioterapia (PQT) do tratamento da hanseníase, seu metabólito está relacionado com a formação de radicais livres em células hematológicas e neurais, estando assim, diretamente envolvido nas principais reações adversas ocasionadas pela sua utilização. Devido ao seu ciclo de conversão, que envolve a reação com o ferro presente no fígado, a DDS também se acumula no fígado, permanecendo por mais tempo nesse órgão, favorecendo, assim, o dano tecidual, como a hepatite medicamentosa. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito protetor do Ácido Alfa Lipóico (ALA) sobre os danos hepáticos provocados pela DDS em camundongos, em pós-tratamento. Neste estudo, o tratamento com a dapsona induziu dano hepático, com aumento do Aspartato aminotransferase e da Fosfatase alcalina, assim como o estresse oxidativo, mediante o aumento de peroxidação lipídica e diminuição tanto dos níveis da glutathiona como dos antioxidantes totais. Estes processos podem estar associados com o acúmulo de ferro hepático no organismo. Já o pós-tratamento com o antioxidante Ácido alfa lipóico, este foi capaz de diminuir os níveis do Aspartato aminotransferase e da Fosfatase alcalina, reverter a peroxidação lipídica e elevar os níveis de GSH e antioxidantes totais. Além disso, o ALA também inibiu o acúmulo de ferro hepático, induzida pela dapsona em camundongos. Nossos resultados indicam que o antioxidante testado apresenta um potencial terapêutico contra o dano hepático, ocasionado pela dapsona em uso dos pacientes com hanseníase.

Palavras-Chave: Dapsona; antioxidante; Ácido Alfa Lipóico; Estresse oxidativo; ferro.

ABSTRACT

SAKAI, J. T. **Protective effect of alpha lipoic acid on hepatic injury, induced by dapsone in animal model.** 72 f. Dissertation (Master's), Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2018.

The liver is the main organ involved in the biotransformation of xenobiotics, with the ability to convert hydrophobic compounds into water soluble, more easily eliminated by the body. Dapsone (DDS) is part of the multidrug therapy (MDT) of leprosy treatment, its metabolite is related to the generation of free radicals in hematological and neural cells, being thus directly involved in the main adverse reactions caused by its use. Due to its conversion cycle, which involves the reaction with iron present in the liver, DDS also accumulates in the liver, remaining longer in this organ, thus favoring tissue damage, such as drug hepatitis. In this context, the objective of the present study was to evaluate the protective effect of Alpha Lipoic Acid (ALA) on the liver damage caused by DDS in mice, after treatment. In this study, treatment with dapsone induced hepatic damage, with increase of Aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase, as well as oxidative stress, by increasing lipid peroxidation and decreasing both glutathione levels and total antioxidants. These processes may be associated with accumulation of hepatic iron in the body. Already post-treatment with the antioxidant Alpha Lipoic Acid, this was able to decrease the levels of Aspartate aminotransferase and Alkaline Phosphatase, reverse lipid peroxidation and raise levels of GSH and total antioxidants. In addition, ALA also inhibited the accumulation of hepatic iron induced by dapsone in mice. Our results indicate that the antioxidant tested has a therapeutic potential against hepatic damage caused by dapsone in patients with leprosy.

Keywords: Dapsone; Antioxidant; Alpha Lipoic Acid; Oxidative stress; iron.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1	Estrutura molecular da dapsona	14
Figura 2	Mecanismo de ação da dapsona	15
Figura 3	Sistema de biotransformação da dapsona	17
Figura 4	Reações de Haber Weiss e Fenton	19
Figura 5	Sistema de proteção do sistema antioxidante	20
Figura 6	A absorção do ferro heme nos enterócitos, mediada pela Proteína transportadora do Heme-1 (HCP-1)	22
Figura 7	O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro	23
Figura 8	A síntese de hepcidina pelo hepatócito e liberação da mesma sobre a ferroportina (Frpt), bloqueando a liberação de ferro para o plasma	24
Figura 9	Estrutura química do Ácido alfa lipóico e da sua forma reduzida, Ácido Diidrolipóico.	28
Figura 10	Estrutura da Coleta das amostras dos animais de sangue e fígado dos animais.	33
Figura 11	Demonstração da dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).	35
Figura 12	Apresentação da determinação da glutathiona reduzida (GSH)	36
Figura 13	Demonstração da determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC)	37
Figura 14	Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis do Aspartato aminotransferase no plasma dos camundongos	39
Figura 15	Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis da alanina aminotransferase no plasma dos camundongos	40
Figura 16	Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis da Fosfatase alcalina no plasma dos camundongos	41
Figura 17	Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de malondialdeído em homogeneizados de fígados dos camundongos tratados com DDS	42
Figura 18	Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de glutathiona em homogeneizados de fígados dos camundongos tratados com DDS	43
Figura 19	Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre a capacidade antioxidante total em homogeneizados de fígados dos camundongos tratados com DDS	44
Figura 20	Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de ferro em homogeneizados de fígados dos camundongos tratados com DDS	45
Figura 21	Estrutura proposta do mecanismo da formação do radical superóxido a partir da Dapsona hidroxilamina e da representação do processo da peroxidação lipídica	48
Figura 22	Estrutura proposta do mecanismo da formação do radical superóxido a partir da Dapsona hidroxilamina e do consumo da GSH	50
Figura 23	Estrutura proposta do mecanismo da formação do radical superóxido a partir da Dapsona hidroxilamina e da representação do processo da lesão hepática	53
Tabela 1	Principais Espécies Reativas do Oxigênio e Nitrogênio	18

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADHL	Ácido Diidrolipóico
ALA	Ácido Alfa Lipóico
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CAT	Enzima Catalase
DcytB	Citocromo Duodenal B
DDS	Dapsona
DDS-NOH	Dapsona-hidroxilamina
DMT 1	Proteína Transportadora de Metal Divalente 1
DTNB	Ácido 5,5'- ditio-bis (2-nitrobenzóico)
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FA	Fosfatase Alcalina
Fe	Ferro
Fe ²⁺	Ferro ferroso
Fe ³⁺	Ferro férrico
Fr	Ferritina
Frpt	Ferroportina
GPx	Glutaciona peroxidase
GPx 1	GPx clássica ou citosólica
GPx 2	GPx gastrointestinal
GPx 3	GPx plasmática ou extracelular
GPx 4 ou GPx-PH	GPx fosfolipídio hidroperóxido
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hef	Hefaestina
Hemsd	Hemossiderina
Hep	Hepcdina
HNO ₂	Ácido nitroso
HPC-1	Proteína Transportadora do Heme-1
L•	Radical Lipídico
LA	Ácido lipóico
LO•	Radicais Alcoxí
LO ₂ •	Radical Peróxido
LOO•	Radical Peróxil
LOOH	Hidroperóxido Lipídico
MADDS	Monoacetildapsona
MADDS-NOH	Monoacetildapsona-hidroxilamina
MB	Multibacilar
MDA	Malondialdeído
MetHb	Metemoglobina
N ₂ O	Óxido Nitroso

NADH-MR	NADH metemoglobina redutase
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAT	N-acetiltransferase
NFκ-β	Fator Nuclear kappa Beta
NO ⁻	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Oxido Nítrico Sintetase
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
OH [•]	Radical Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzoico
PB	Paucibacilar
PQT	Poliquimioterapia
RO [•]	Alcoxila
ROO	Peróxido Orgânico
ROO [•]	Radical Peroxila
ROOH	Hidroperóxido Orgânico
SOD	Enzima Superóxido Dismutase
TA	Ácido Tiótico
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TNB	Ácido Nitrobenzóico
Trf	Transferrina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Hanseníse e a poliquimioterapia	13
2.2 Dapsona e Dapsona-hidroxilamina	14
2.3 Estresse Oxidativo e o Sistema Antioxidante	17
2.4 Ferro e o seu metabolismo	21
2.5 Fígado e o estresse oxidativo	25
2.6 Terapia com antioxidante para proteção do estresse oxidativo	27
2.6.1 ÁCIDO ALFA LIPÓICO	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Obtenção e cuidado dos Animais	31
4.2 Preparação da Dapsona e do Ácido alfa lipópico	31
4.3 Divisão dos grupos de animais	32
4.4 Coleta das amostras dos animais	33
4.5 Análises das amostras	34
4.5.1 ANÁLISE DOS MARCADORES HEPÁTICOS	34
4.5.2 DOSAGEM DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO	35
4.5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA	36
4.5.5 DETERMINAÇÃO DO FERRO SÉRICO	38
4.5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis do Aspartato aminotransferase no plasma dos camundongos	39
5.2 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis da Alanina aminotransferase no plasma dos camundongos	40
5.3 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis da Fosfatase alcalina no plasma dos camundongos	41
5.4 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de TBARS em homogeneizados de fígados dos camundongos	42
5.5 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de glutathione em homogeneizados de fígados dos camundongos	43
5.6 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre a capacidade antioxidante total em homogeneizados de fígados dos camundongos	44
5.7 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de ferro em homogeneizados de fígados dos camundongos	45
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	55
8 REFERÊNCIAS	56
ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

A dapsona (4,4'-diaminodifenilsulfona) é utilizada como um dos fármacos na poliquimioterapia (PQT) no tratamento da hanseníase (BRASIL, 2016). A DDS é biotransformada no fígado através da N-acetilação e da N-hidroxilação, originando a dapsona hidroxilamina (DDS-NOH) e monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH; MITRA *et al.*, 1995). O uso da dapsona, principalmente pelo seu metabólito DDS-NOH pode ocasionar o estresse oxidativo. Estudos realizados por Timothy *et al.* (1997) em humanos, atribuíram o efeito da DDS-NOH aos distúrbios hematológicos e produção de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO).

Clinicamente foi comprovado que a DDS pode ocasionar hepatotoxicidade, a reação adversa deste medicamento está relacionada com a síndrome da sulfona, uma reação idiossincrática que acontece de forma independente (Zhu e Stiller, 2001; Johnson *et al.*, 1986). Os danos hepáticos também podem ser propiciados pelo acúmulo de ferro e pela oxidação de células ocasionadas por ERO (SALONEN *et al.*, 1992). Desse modo, tem se discutido o papel das ERO e das defesas antioxidantes durante a progressão da hanseníase, assim como o potencial benéfico da suplementação com antioxidantes (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2005; ABDEL-HAFEZ *et al.*, 2009).

É possível que substâncias antioxidantes como o Ácido Alfa Lipóico, possam prevenir o estresse oxidativo durante o tratamento da hanseníase, constituindo-se em estratégia de proteção a indivíduos que utilizem a DDS (ALBUQUERQUE, 2013; VARELA, 2017). Estudos evidenciam que o ALA demonstra determinadas propriedades antioxidantes, como sequestrar diretamente ERO e, indiretamente de regenerar antioxidantes endógenos, como GSH, vitamina E e vitamina C (MAITRA *et al.*, 1995; ROY *et al.*, 1997; HAGER *et al.*, 2001). O ALA revela capacidade de quelar metais, como o ferro, prevenindo a produção de ERO (PACKER *et al.*, 1995; MATSUGO *et al.*, 1996). Dessa forma é importante investigar os parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes envolvidos no equilíbrio redox celular e melhorar a adesão dos pacientes com hanseníase durante o tratamento terapêutico com a dapsona.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Hanseníase e a poliquimioterapia

A hanseníase é uma doença crônica, infectocontagiosa, cujo agente etiológico é o bacilo álcool ácido resistente, denominado, *Mycobacterium leprae* (SALGADO et al., 2018). Esse agente apresenta uma particularidade do gênero, visto que acomete os nervos periféricos, especificamente as células de Schwann e provoca paralisia e perda da sensibilidade do local acometido, trazendo prejuízo para o paciente infectado (BRASIL, 2017). Mediante a isso, a hanseníase é considerada uma enfermidade de notificação compulsória em todo território nacional. De acordo com o Ministério da Saúde (MS), através da portaria N° 1.217, de 6 de junho de 2014, a comunicação deste agravo deve ser realizada em até 7 dias à Secretaria de Saúde do município local (BRASIL, 2014).

A hanseníase é um problema de saúde pública global, e em 2016, foram relatados 214.783 casos novos da doença no mundo (SALGADO et al., 2018). O Brasil é o segundo país com o maior número de casos novos, com 25.218 casos, embora tenha havido uma redução nesses casos em relação a 2015, a hanseníase ainda constitui um sério problema de saúde pública que exige vigilância epidemiológica no Brasil (OMS, 2017). Neste sentido, somente no ano de 2016, os Estados brasileiros da Amazônia Legal apresentaram os maiores índices de registros de casos novos da doença, entre os quais o Pará, Tocantins, Maranhão e Mato Grosso se destacam. Dados do Sistema de Informação de Agravos de notificação do MS evidenciam que o Maranhão foi líder de notificações no país, visto que foram registrados 3.298 casos e no segundo lugar o estado do Pará com 2.527 casos (BRASIL, 2017).

O diagnóstico da Hanseníase é fundamental para o início do tratamento. Para isso, classificações, como a de Madri (1953) preconiza os critérios de polaridade com as características clínicas, bacteriológicas, imunológicas e histológicas da doença. A classificação de Ridley e Jopling (1966) avalia parâmetros clínicos e bacteriológicos, evidenciando critérios imunológicos e histopatológicos. E por fim, os critérios clínicos preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) levam em consideração o número de lesões cutâneas, sendo: Paucibacilar (PB) com até 5 lesões cutâneas e Multibacilar (MB) com mais de 5 lesões, critérios que ao longo dos anos facilitaram o diagnóstico e o tratamento da doença. A hanseníase tem cura, no entanto, quando

diagnosticada e tratada tardiamente pode trazer graves consequências para os portadores e seus familiares, pelas lesões que os incapacitam fisicamente (MADRID PENNA *et al.*, 2017).

O processo contínuo da capacitação dos profissionais de saúde, a educação sobre o autocuidado para o paciente e o tratamento poliquimioterápico são os pontos fundamentais na erradicação da hanseníase (BARRETO e SALGADO, 2010). A Poliquimioterapia (PQT) é indicado pelo Ministério da Saúde e padronizado pela OMS. Esse tratamento elimina o bacilo, tornando-o inviável, com isso evita a evolução da doença, prevenindo as incapacidades e deformidades causadas pela doença. Assim sendo, logo no início da terapêutica, a transmissão da doença é interrompida, e, sendo realizada de forma completa e correta, garante a cura da doença. A PQT é baseada em três princípios ativos: a Rifampicina (bactericida), Dapsona (quimioterápico bacteriostático) e Clofazimina (corante fenazínico, bacteriostático contra o bacilo de hansen) e segue critérios do doente em PB ou MB, conforme determinado pela OMS (BRASIL, 2016).

2.2 Dapsona e Dapsona-hidroxilamina

A 4,4'-diaminodifenilsulfona (Figura 1), é também denominada como, dapsona (DDS), diadifenilsulfona, sulfonildianilina, disulfona e sulfona. É um pó branco cristalino, inodoro, pouco solúvel em água, fotossensível, massa molar de 248,31 g/mol e fórmula molecular $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ (GRUNWALD e AMICHAH, 1996; GOULART *et al.*, 2002). A DDS é utilizada no tratamento de hanseníase, devido sua ação bacteriostática para o *Mycobacterium leprae* (DHOPLÉ, 1999). Além disso, possui ação anti-inflamatória (FORD, 2000; PANIKER e LEVINE, 2001), sendo utilizada em doenças, como dermatite herpetiforme e psoríase pustulosa (THUONG-NGUYEN *et al.*, 1993) e efeito antiprotozoário para infecções causadas por *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* (AMUKOYE *et al.*, 1997; EL-SADR *et al.*, 1998; ZHU e STILLER, 2001).

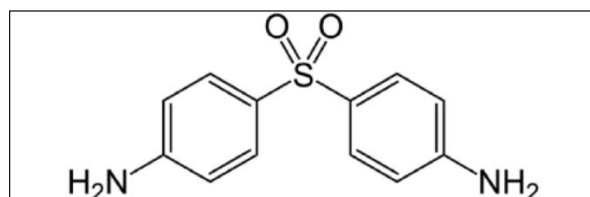


Figura 1: Fórmula estrutural da Dapsona. Fonte Zhanel e Del Rosso, 2016.

O mecanismo de ação da DDS, referente à classe das sulfonas, apresenta similaridade estrutural do ácido *p*-aminobenzoico (PABA). Esse fármaco inibe a enzima diidropteroato sintetase, impossibilitando a formação do ácido fólico (Figura 2), e impedindo a síntese de purinas e pirimidinas, para constituição do DNA e RNA bacteriano (WOLVERTON, 1992; COLEMAN *et al.*, 1993; FARHI *et al.*, 2005). Esse mecanismo evidencia a ação da DDS como agente antibacteriano (AMUKOYE *et al.*, 1997; DHOPLE, 1999).

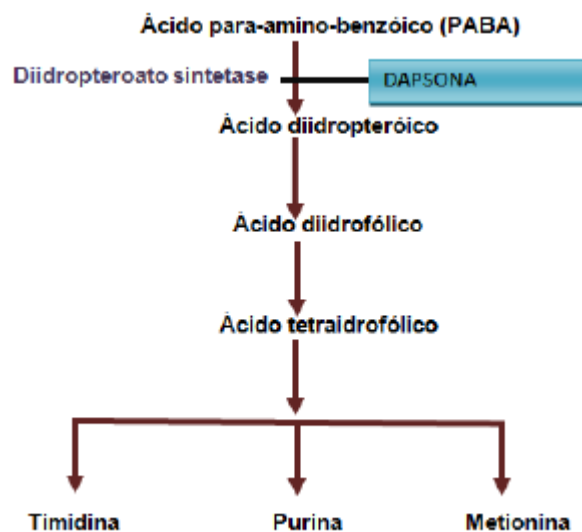


Figura 2: Mecanismo de ação da Dapsona (DDS). A inibição da enzima diidropteroato sintetase, impedindo a síntese de ácido fólico e a formação do DNA e RNA bacteriano. Fonte: Adaptado de Farhi *et al.*, 2005.

Além das atividades antibacterianas e antiprotozoários, a DDS também demonstra alguns efeitos anti-inflamatórios. Por essa razão, este fármaco é utilizado para o tratamento de inflamações na pele, como a dermatite herpetiforme (COLEMAN *et al.*, 1993; THUONG-NGUYEN *et al.*, 1993; WOLF *et al.*, 2000). A DDS reduz a infiltração de neutrófilos no local da infecção, principalmente em casos de doenças inflamatórias (LANG, 1979), pois impede os mecanismos de adesão mediados pelas integrinas (BOOTH *et al.*, 1992). A ação anti-inflamatória da DDS está relacionada com a inibição da atividade da enzima mieloperoxidase e lisossomais, presente nos neutrófilos (WOLF *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Conforme relatado, a DDS é usada no tratamento de todas as formas de hanseníase, multibacilar ou paucibacilar, durante o esquema de PQT. O seu uso prolongado provoca reações adversas, como a anemia hemolítica e a

metemoglobinemia, são efeitos dose-dependente e prejudiciais ao paciente, podendo levar a morte (COLEMAN, 1995; LANDERS *et al.*, 1996; QUEIROZ *et al.*, 1997; WARD e MCCARTHY, 1998; SALAMAT e WATSON, 2003). Pode ocasionar também, reações hepáticas, como icterícia e cutâneas, como síndrome Stevens-Johnson, dermatite esfoliativa, eritrodermia, cefaléia, náusea, vômito, tremores, dispnéia, taquicardia, anorexia, desmaios e outros raramente, como insônia e neuropatia periférica (COLEMAN, 1995; PAVITHRAN e SATISH, 1997; LESLIE *et al.*, 2003).

A DDS é ativamente absorvida pelo trato gastrointestinal e sua concentração máxima sérica é alcançada entre 2 a 8 horas com variação na meia vida de 20 a 30 horas. A ingestão oral da DDS de 100 mg/dia, após 24 horas, faz com que sua concentração plasmática seja alcançada em torno de 0,4 a 1,2 µg/mL e uma dose diária de 100 mg ocasiona uma concentração constante de 0,1 a 0,3 µg/mL de DDS livre (ZUIDEMA *et al.*, 1986; ELLARD 1966). A biodisponibilidade da DDS é em torno de 70% a 80%, sendo distribuída em todo organismo. Geralmente, acumula-se na pele, nos músculos, no fígado e rins. Mesmo após a interrupção da terapia, os resquícios do fármaco podem ser detectados em até 3 semanas. A DDS é excretada na urina em forma de mono-N-glicuronídeo e mono-N-sulfamato (WOLF *et al.*, 2000).

A DDS é biotransformada no fígado através da N-acetilação e da N-hidroxilação. Na N-acetilação, a enzima N-acetiltransferase metaboliza a DDS, produzindo monoacetildapsona (MADDS). Este metabólito pouco reativo é facilmente excretado (ZUIDEMA *et al.*, 1986). Na N-hidroxilação, a DDS e a MADDS são metabolizadas pelo citocromo P450, especificamente pelas isoenzimas CYP2E1 e CYP2C (WINTER *et al.*, 2000), originando a dapsona hidroxilamina (DDS-NOH) e monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH), demonstrado na figura 3 (MITRA *et al.*, 1995). Esses metabólitos são agentes pró-oxidantes, considerados como causadores das reações adversas à terapia, pois são capazes de induzir a formação de Metemoglobina (MetHb; ELLARD *et al.*, 1972; VAGE *et al.*, 1994; SCHIFF *et al.*, 2006).

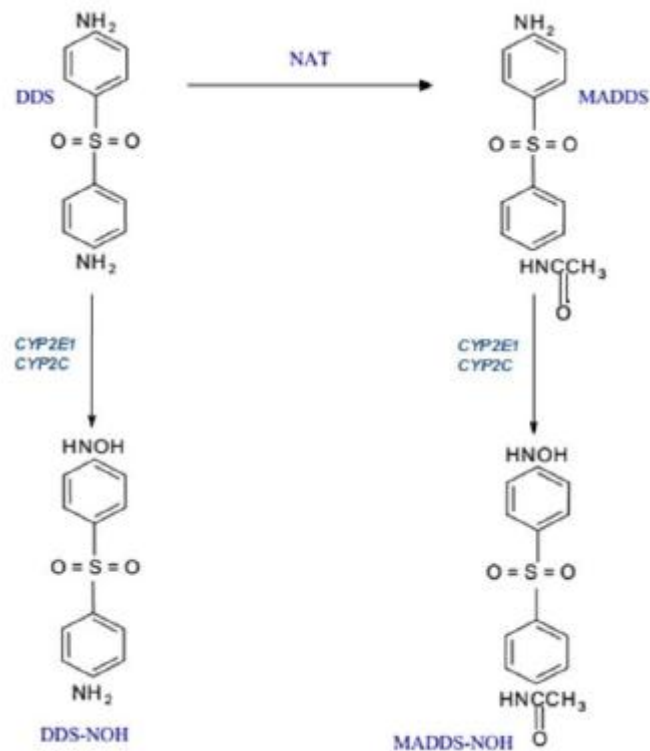


Figura 3: Sistema de biotransformação da dapsona. P450, citocromo P450; DDS, dapsona; DDS-NOH, dapsona-hidroxilamina; MADDS, monoacetildapsona; MADDS-NOH, monoacetildapsona-hidroxilamina; NAT, N-acetiltransferase. Fonte: Adaptado de GILL *et al.*, 1995.

O uso da dapsona, principalmente pelo seu metabólito DDS-NOH pode ocasionar o estresse oxidativo. Estudos realizados por Timothy *et al.* (1997) em humanos, atribuíram o efeito da DDS-NOH aos distúrbios hematológicos e produção de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO). A DDS-NOH induz o aumento da formação de MetHb e reduz a concentração de glutathione, deixando o eritrócito vulnerável ao estresse oxidativo (TIMOTHY *et al.* 1997; CICCOLI *et al.* 1999; REILLY *et al.* 2000).

2.3 Estresse Oxidativo e o Sistema Antioxidante

A variação na homeostasia celular é ocasionada pelo aumento da produção de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) e/ou diminuição das defesas celulares antioxidantes, responsáveis pela neutralização dos ERO (SIES, 2015). Essas alterações provocam o estresse oxidativo, que como consequência ocasiona a lesão celular, acarretada pela oxidação das proteínas e lipídios (TEDESCO *et al.*, 2000; RAHAL *et al.*, 2014).

As ERO podem ser espécies radicalares e não radicalares e junto as Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN) mais significativas, estão descritas na Tabela 1, abaixo (BARREIROS *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2008).

Tabela 1: Principais Espécies Reativas do Oxigênio e Nitrogênio. Fonte adaptado de Barbosa et al. 2008

ERO		ERN
Radicalares	Não Radicalares	
Radical hidroxila (OH•)	Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)	Óxido nítrico (NO^-)
Radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Óxido nitroso (N_2O)
Peroxila (ROO^-)		Ácido nitroso (HNO_2)
Alcoxila (RO^-)		Nitrito (NO_2^-)
		Nitrato (NO_3^-)
		Peroxinitrito (ONOO^-)

O aumento da concentração intracelular de ERO desencadeia danos celulares, nos quais substâncias antioxidantes podem ser importantes na prevenção, intervenção, reparo e inibição (SIES, 1997; VALKO *et al.*, 2007; PERVAIZ e CLEMENT, 2007). Os agentes antioxidantes são capazes de regenerar ou prevenir a oxidação de um substrato, conservando os padrões de equilíbrio dos processos de oxi-redução (HALLIWELL, 2000). De forma geral, o sistema de defesa antioxidante pode ser classificado em enzimáticos e não enzimáticos (HICKS *et al.*, 2006).

Os antioxidantes não enzimáticos atuam protegendo ao agravo oxidante, como co-fatores das enzimas antioxidantes ou inativando diretamente as ERO produzidas (KRINSKI, 1992; SIES, 1997). Essas substâncias podem ser NADP e NADPH e algumas vitaminas provenientes da dieta, como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), glutatona reduzida (GSH), flavonóides, ácido úrico e algumas proteínas de transporte de metais de transição, como a ferritina (Fr), transferrina (Trf) e ceruloplasmina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007; KOURY e DONANGELO, 2003).

Os principais antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), que são especializadas em neutralizar as ERO, como $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , detoxificando assim o organismo (SIES, 1997). Embora, as espécies $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 apresentem pouca reatividade com biomoléculas, mas na

presença com metais de transição, como ferro ou cobre, podem gerar espécies altamente reativas, como radical hidroxila, através da reação de Fenton e da reação de Haber-Weiss (Figura 4; DIZDAROGLU *et al.*, 1991, MELLO-FILHO e MENEHINI, 1984; VALKO *et al.*, 2007). Além de tudo, as fontes exógenas como luz ultravioleta, radiação ionizante, drogas ou exposição a contaminantes ambientais, similarmente também podem gerar radicais livres (RAHAL *et al.*, 2014).

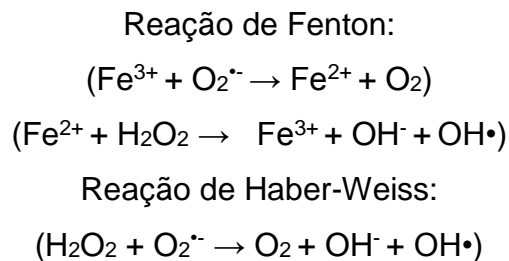


Figura 4: Reações de Haber Weiss e Fenton. Na reação de Haber Weiss o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reage com o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) na presença de metal de transição e dá origem ao radical hidroxila (OH^{\cdot}), hidroxila (OH^-) e oxigênio molecular (O_2); na reação de Fenton o peróxido de hidrogênio na presença de ferro no estado férrico (Fe^{3+}) dá origem ao radical hidroxila.

Uma das espécies reativa do oxigênio mais importante, o ânion superóxido é formado espontaneamente da redução do oxigênio, através de processos fisiológicos. Este radical é produzido em uma quantidade considerável dentro das células, tanto no citosol, como nas mitocôndrias, que em seguida é dismutado pelo SOD em H_2O_2 . Depois a CAT, uma enzima citoplasmática, degrada parte deste H_2O_2 em H_2O e O_2 . Outra parte do H_2O_2 aciona o sistema da glutathione. A glutathione peroxidase (GPx) reduz o H_2O_2 à H_2O , oxidando a Glutathione. Esta glutathione oxidada (GSSG) é reduzida pela glutathione redutase (GR) NADPH dependente, em glutathione reduzida (GSH; Figura 5; HARRIS, 1991; COLEMAN, 1995; CIESLA, 2007; ÇIMEN, 2008).

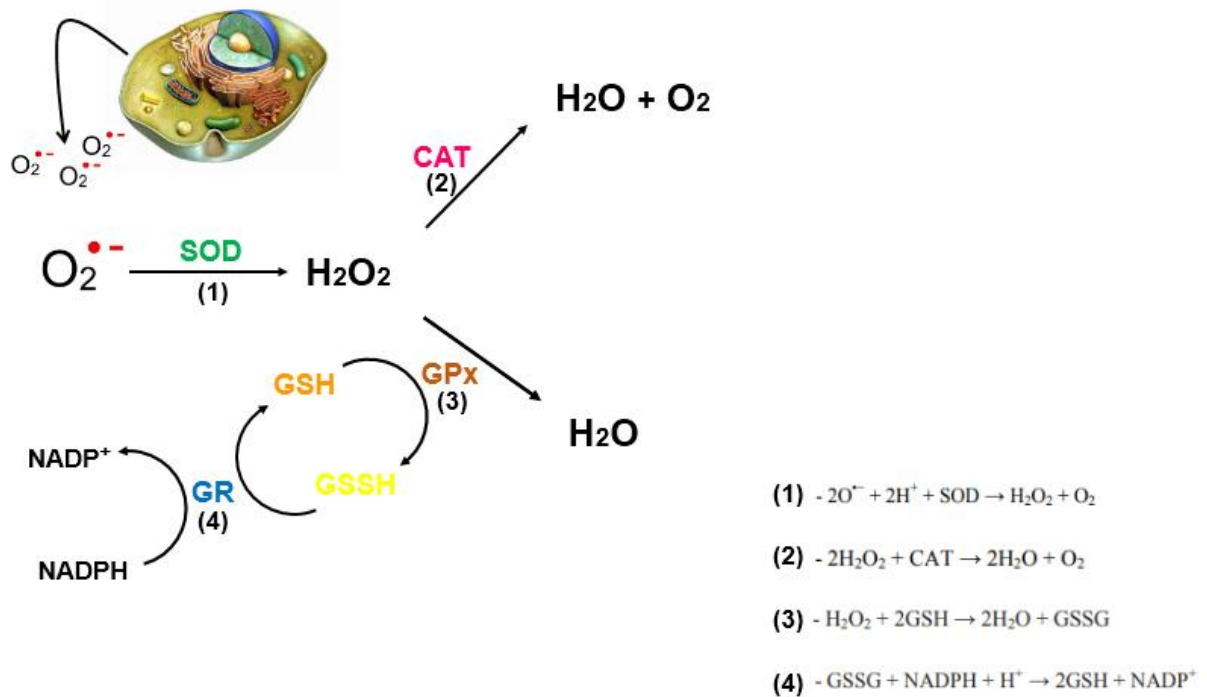


Figura 5: Sistema de proteção do sistema antioxidante a partir da produção do Radical ânion superóxido. Fonte: NORDBERG e ARNÉR (2001).

A GSH é um tripeptídeo solúvel em água, constituído com base do glutamato, cisteína e glicina (ROVER JUNIOR *et al.*, 2001). Desempenha atividade de cofator da família de enzimas GPx, removendo agentes pró-oxidantes e atua na eliminação de compostos eletrofílicos e peróxidos via catalisação por Glutathione S-Transferase (GST; ANDERSON, 1998).

A GPx utiliza o cofator GSH para catalisar, reduzindo o H₂O₂ e os hidroperóxidos orgânicos (ROOH), respectivamente em H₂O e álcool (ROH). O grupo da GPx é dividida em seis classes conforme a sequência de aminoácidos, o substrato específico e a localização subcelular: i) a clássica ou citosólica (GPx 1), a primeira GPx identificada; ii) a gastrointestinal (GPx 2); iii) a plasmática ou extracelular (GPx 3); iv) a fosfolípido hidroperóxido (GPx-PH ou GPx 4); v) a epididimal (GPx 5); vi) e a do epitélio olfativo (GPx 6). Exceto a GPx 5 e GPx 6, todas as selenoproteínas contém em seu sítio ativo, o selênio (Se; AMAYA-FARFAN *et al.*, 2001; HERBETTE *et al.*, 2007).

A GSH é encontrada em grande parte das células, principalmente no meio intracelular e a presença do grupo tiol (-SH) na cisteína, que favorece a sua ação

reduzida, protege contra a agressão do estresse oxidativo, decorrente da exposição de agentes como os íons ferro (GALLEANO e PUNTARULO, 1995). Em algumas doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, o ferro na forma reduzida encontra-se em maior proporção comparada ao ferro oxidado, isto ocasiona a formação de radicais hidroxilas através da reação de Fenton, devido à baixa concentração de GSH presente no sistema nervoso central (SIAN *et al.*, 1994, 2011).

2.4 Ferro e o seu metabolismo

O estresse oxidativo pode ser desencadeado por alguns metais como o ferro, que ao mesmo tempo colabora de forma fundamental nas atividades fisiológicas, como também coopera nos sistemas pró-oxidante, como a reação de Fenton (KILLILEA *et al.*, 2003). Esse fato permite lesões em inúmeras células, sucedendo variação na atividade metabólica e no funcionamento dos processos físico-químicos dos seres vivos (SOHAL e WEINDRUCH, 1996; HICKS *et al.*, 2006).

O ferro é um metal de transição essencial para inúmeras atividades metabólicas para os diversos organismos (PONKA, 2000). Esse íon colabora no transporte do oxigênio, transferência de elétrons, síntese do DNA, produção de neurotransmissores e nos processos de oxidação do oxigênio (HALKHATEEB e CONNOR, 2010; GODOY *et al.*, 2007; GROTO, 2010). Para realizar essas ações, a ingestão diária recomendada de ferro, pelo *Institute of Medicine's and Food and Nutrition Board* para crianças de 1 a 3 anos, 4 a 8 anos e 9 a 13 anos são de 7, 10 e 8 mg/dia, nesta ordem. E para homens e mulheres, acima de 13 anos de idade, os valores dietéticos de ferro são de 8 a 11 mg/dia e 15 a 27 mg/dia, respectivamente. Esses valores recomendados foram delineados de acordo com o estado fisiológico em caso de parto, fluxo menstrual e metabolismo placentário (RODRIGUES e JORGE, 2010).

Em relação ao ferro dietético, o ferro heme e o ferro inorgânico (Fe^{+3}) ou forma não heme são adquiridos através da alimentação, porém é fundamental que o Fe^{+3} seja reduzido para a forma ferro ferroso (Fe^{+2}) para ser absorvido (MIRET *et al.*, 2003). A absorção do ferro heme é mediada através da Proteína transportadora do Heme-1 (HPC-1), que está situada nas microvilosidades dos enterócitos e também são evidenciados no fígado e nos rins (Figura 6). De acordo com a homeostasia do ferro a HPC-1 demonstra um sistema mediador, ou seja, na carência do ferro, a proteína

se realoca do citoplasma para a membrana e no excesso de ferro, o movimento inverso (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2007).

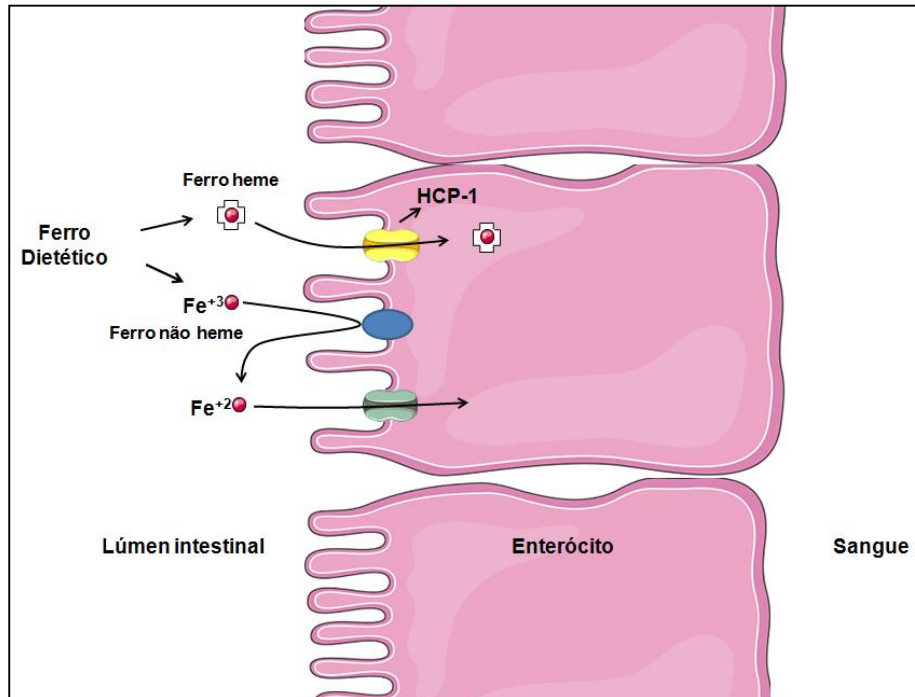


Figura 6: A absorção do ferro heme nos enterócitos, mediada pela Proteína transportadora do Heme-1 (HCP-1). Fonte: SAKAI (2017).

A média corporal do ferro total no homem é de aproximadamente 3,5 g e na mulher é de 2,3 g, dos quais, o ferro excedente, ou seja, cerca de 0,2 g são armazenados no fígado e o restante nos macrófagos do retículo endotelial e na medula óssea (GANZ e NEMETH, 2012). A partir de uma dieta tradicional, compreendida em torno de 15 a 20 mg de ferro, apenas 1 a 2mg são absorvidos, seja na forma heme, proveniente da fragmentação da Hb contida nas carnes vermelhas, ou na forma não heme, oriundas de vegetais e cereais (GROTTO, 2008). Apesar do ferro inorgânico apresentar menor disponibilidade e maior disposição na dieta, este precisa ser reduzido para forma Fe^{+2} para que seja absorvido no intestino (CANÇADO *et al.*, 2007). A absorção média do ferro é proporcionada com a eliminação do mesmo por meio da descamação de células epiteliais e de cabelo, menstruação e transpiração (EVSTATIEV e GASCHÉ, 2012).

Prevalentemente, o ferro dietético é absorvido no duodeno e jejuno proximal, sendo tanto na forma férrica ou ferroso, que são obrigados a permear a membrana apical e basal dos enterócitos (GUJJA *et al.*, 2010). O Fe^{+3} sofre uma ação da enzima

heme ferreredutase, denominada de Citocromo duodenal B (DcytB), localizada na superfície apical do enterócito, que por sua vez reduz o Fe^{+3} extracelular para o Fe^{+2} . Esta forma do ferro é conduzida para o citoplasma celular por intermédio da proteína apical transmembranar dos enterócitos, o Proteína Transportadora de Metal Divalente 1 (DMT 1; SHAYEGHI *et al.*, 2005). Após o ferro ser absorvido para o enterócito, o mesmo é armazenado pela proteína Ferritina (Fr) ou reconduzido para membrana basal (Figura 7; LEVENSON e TASSABEHJI, 2004).

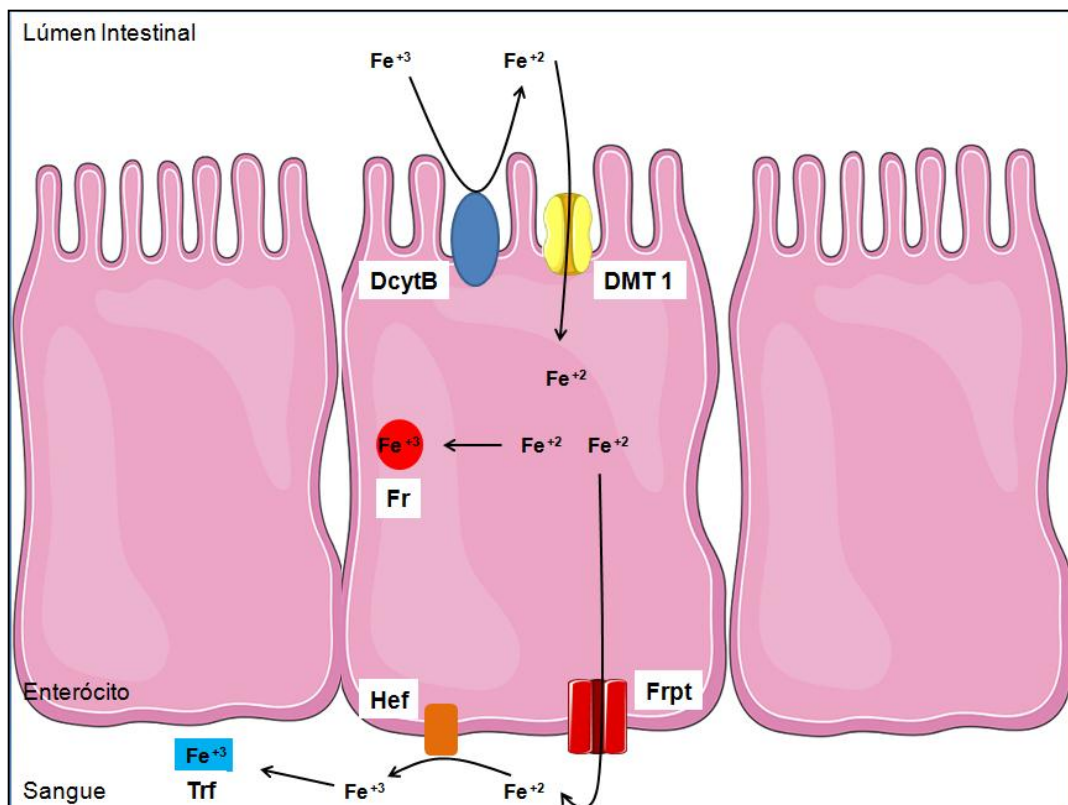


Figura 7: O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: Citocromo duodenal B; DMT 1: Proteína Transportadora de Metal Divalente 1; Fr: Ferritina; Hef: Hefaestina; Frpt: Ferroportina; Trf: Transferrina. Fonte: SAKAI (2017).

A proteína livre do átomo de ferro é denominada de Apoferritina, no momento que esta proteína engloba e condiciona o átomo de ferro, recebe outra denominação, ferritina, a forma solúvel. A Fr apresenta subunidades como a isoferritina, cadeia pesada com característica ácida, predominantemente no fígado, e a outra cadeia leve, básica, encontrado no coração e eritrócitos. E a forma degradada da Fr, a Hemossiderina (Hemsd) considerado como forma insolúvel (FAIRBANKS e BEUTLER, 2001; HOFFBRAND e PETTIT, 2006).

Para que o ferro absorvido pelo enterócito seja transferido para o plasma, é imprescindível a participação da proteína Ferroportina (Frpt), presente na mucosa duodenal e nos macrófagos. Nesse momento, o ferro é oxidado para Fe^{+3} pela Hefestina (Hef), uma enzima oxidase localizada na membrana basal do epitélio intestinal, para assim se complexar com a Transferrina (Trf) e ser transportado do plasma para os tecidos (DE DOMENICO *et al.*, 2007).

A Hefcidina (Hep) é um hormônio produzido pelo fígado, que coordena o ferro sistêmico, ou seja, acopla-se a Ferroportina dos enterócitos, hepatócitos e macrófagos, controlando a passagem do ferro para o plasma (PIETRANGELO, 2010). Em estados inflamatórios e elevados níveis do ferro, a hepcidina é sintetizada em maior quantidade e liberada na circulação. Já em caso de hipóxia, a produção de hepcidina é reduzida ou até mesmo inibida, este peptídeo atua como regulador positivo ou negativo do metabolismo do ferro (Figura 8; NICOLAS *et al.*, 2002).

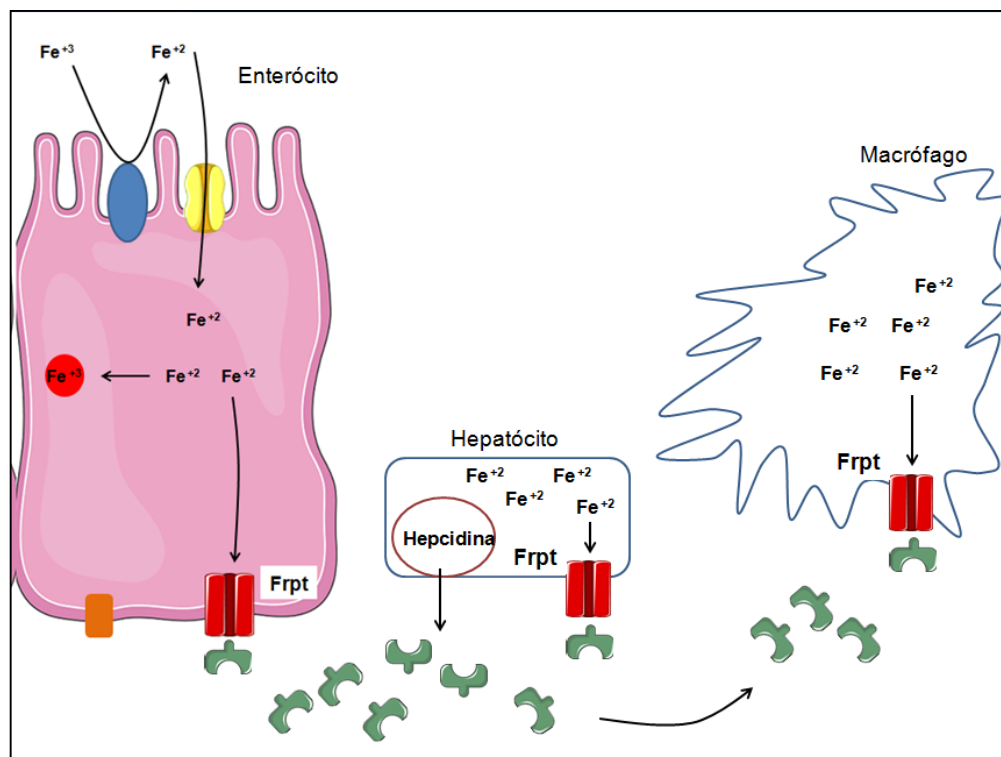


Figura 8: A síntese de hepcidina pelo hepatócito e liberação da mesma sobre a ferroportina (Frpt), bloqueando a liberação de ferro para o plasma. Fonte: SAKAI (2017).

O acúmulo excessivo do ferro no fígado pode ocasionar lesão ou até insuficiência hepática, pois o fígado é o órgão que mais armazena o ferro absorvido

no intestino, devido à presença repleta de receptores de transferrina (BRITTENHAM e BADMAN, 2003; BATTIS, 2007)

2.5 Fígado e o estresse oxidativo

O fígado apresenta diversas atividades como a síntese, metabolismo e armazenamento da glicose, proteínas e lipídios, associando-se com outras partes do organismo (HUFFMYER e NEMERGUT, 2007). O fígado, junto com o coração e o cérebro, são os tecidos que mais utilizam elevadas quantidades de oxigênio, devido suas intensas atividades metabólicas, necessitando assim de maior quantidade de enzimas oxidantes comparadas com outros órgãos (JENKINS, 1993).

Inúmeros eventos patológicos que acometem o fígado estão relacionados com o estresse oxidativo, estando principalmente associado com as enzimas do citocromo P450 nos hepatócitos e as células de Kupffer (JAESCHKE, 2011). A geração de ERO e o desequilíbrio no sistema oxidante e antioxidante colaboram para a lesão hepática ocasionada por fármacos e outros produtos como o etanol, conseqüentemente para a necrose hepática (HAGYMASI *et al.*, 2001; CREMONESE *et al.*, 2001; PEREIRA-FILHO *et al.*, 2008; VIERA, 2008).

A lesão nos hepatócitos pode ser ocasionada por inúmeros processos neste órgão como, peroxidação lipídica, reações de oxidação, ligação covalente e depleção de glutathione, que levam a desordem tanto na fisiologia como na estrutura celular, provocando assim o desequilíbrio iônico (NEIL, 2002). Essa injúria, da mesma forma poder ser provocada pela administração de fármaco, droga ou elemento químico, fato conhecido como hepatite tóxica (Figura 9; MATOS e MARTINS, 2005).

A lesão hepática provocada por medicamentos pode ser hepatocelular, que aumenta os níveis de biomarcadores, como aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT) ou hepatobiliar, o que eleva o nível das enzimas fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT) e da bilirrubina (BERTOLAMI, 2005).

O aspartato aminotransferase (AST), anteriormente conhecida como transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), uma enzima encontrada no citosol e nas mitocôndrias dos tecidos como o fígado, coração, músculo esquelético, rins, cérebro e pulmões. Realiza a catalisação de transaminação reversível de aspartato e 2-

cetogluturato em oxalacetato (GONZALEZ e SILVA, 2006). O AST é utilizado com simultaneidade com a alanina aminotransferase (ALT), pois o valor da relação entre essas enzimas serve de indicativo no diagnóstico da lesão hepática (MINUK, 1998).

A alanina aminotransferase (ALT), já foi denominada de transaminase glutâmico-pirúvica (TGP). Esta enzima citoplasmática catalisa a reação de transaminação reversível de alanina e 2-cetogluturato em piruvato e glutamato. Predominantemente no fígado, é o mais utilizado para rastrear a lesão hepática (WHITEHEAD, 1999; OZER, 2008). Tanto a AST como a ALT são enzimas liberadas na corrente sanguínea após a lesão das células hepáticas (MOTTA, 2000).

A fosfatase alcalina (FA) presente nos tecidos como o fígado, ósseo, rins e placenta. Esta enzima catalisa a reação da hidrólise de ésteres do ácido fosfórico. O nível desta enzima pode aumentar em caso de lesão celular biliar ou patologias ósseas. No sistema hepático essa lesão indica um dano no epitélio do ducto biliar (GAYOTTO, 2001)

Clinicamente foi comprovado que a DDS pode ocasionar hepatotoxicidade, a reação adversa deste medicamento está relacionada com a síndrome da sulfona, uma reação idiossincrática que acontece de forma independente (Zhu e Stiller, 2001; Johnson et al., 1986). Essa hepatotoxicidade pode ocorrer em duas condições. A primeira, forma direta, ou seja, a bioativação de medicamentos, produzindo metabólitos reativos que agem sobre os hepatócitos, induzindo dano a nível celular e disfunção mitocondrial, conseqüentemente a insuficiência hepática (THAMES, 2004). Já, a outra forma é a reação imune, ocasionado pelo estresse oxidativo ou injúria dos hepatócitos, que provoca liberação de sinais, posteriormente, a ativação de células Kupffer, natural killer e as células natural killer T. Essas células colaboram para o desenvolvimento da lesão hepática, através da produção de mediadores pró-inflamatórios e secreção de quimiocinas, que habilitam células inflamatórias para o fígado (BLAZKA *et al.*, 1995; 1996; ISHIDA *et al.*, 2002).

Os danos hepáticos também podem ser propiciados pelo acúmulo de ferro e pela oxidação de células ocasionadas por ERO (SALONEN *et al.*, 1992). Apesar do Fe ser o elemento fundamental para o organismo, pois apresenta um eficaz transporte de elétrons e a função catalisadora nas reações redox, também ao mesmo apresenta uma reatividade que provoca efeitos tóxicos, devido à catalisação na formação de ERO, que a partir da transferência de um elétron para o oxigênio molecular produz o

superóxido. Esse radical é o precursor do peróxido de hidrogênio e participa da reação de Fenton como descrito na Figura 4 (PIERRE e FONTECAVE, 1999).

2.6 Terapia com antioxidante para proteção do estresse oxidativo

Desse modo, tem se discutido o papel das ERO e das defesas antioxidantes durante a progressão da hanseníase, assim como o potencial benéfico da suplementação com antioxidantes (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2005; ABDEL-HAFEZ *et al.*, 2009). Substâncias antioxidantes já foram testadas quanto às suas propriedades antioxidantes, na intervenção do avanço da doença, através de modificações no equilíbrio redox. A suplementação com curcumina protegeu contra o estresse oxidativo e reduziu o percentual de formação de MetHb de ratos expostos a DDS (TAYYEM *et al.*, 2006). Dessa forma, é possível que substâncias antioxidantes como o Ácido Alfa Lipóico, possam prevenir o estresse oxidativo durante o tratamento da hanseníase, constituindo-se em estratégia de proteção a indivíduos que utilizem a DDS (ALBUQUERQUE, 2013; VARELA, 2017).

2.6.1 ÁCIDO ALFA LIPÓICO

O Ácido Alfa Lipóico (ALA; ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico), também conhecido como Ácido Lipóico (LA) ou Ácido Tiótico (TA; BUSBY *et al.*, 1999), é uma substância sintetizada em pequenas quantidades por enzimas de plantas e animais (REED, 2001). Mundialmente, o ALA foi revelado em 1937, isolado em 1951 e utilizado pela primeira vez em 1959, como terapêutica em intoxicação aguda e neuropatologias (SNELL *et al.*, 1933; RED *et al.*, 1951; BOCK e SCHNEEWEISS, 1959). Estudos evidenciam que o ALA demonstra determinadas propriedades antioxidantes, como sequestrar diretamente ERO e, indiretamente de regenerar antioxidantes endógenos, como GSH, vitamina E e vitamina C (MAITRA *et al.*, 1995; ROY *et al.*, 1997; HAGER *et al.*, 2001). O ALA revela capacidade de quelar metais, como o ferro, prevenindo a produção de ERO (PACKER *et al.*, 1995; MATSUGO *et al.*, 1996); opera como cofator para ação do piruvato desidrogenase (BRAMANTI *et al.*, 2010); colabora para processos metabólicos, como da glicose, em diferentes celulares (GRASSO *et al.*,

2014). Mediante a essas propriedades, o ALA foi eficiente em proteger contra o dano oxidativo, em inúmeros processos patológicos, incluindo diabetes, hipertensão, câncer, síndrome de isquemia e reperfusão e doenças neurodegenerativas (PACKER *et al.*, 1995; VASDEV *et al.*, 2000; AL ABDAN, 2012; EVANS e GOLDFINE, 2000).

O ALA é sintetizado enzimaticamente pelo ácido lipóico sintetase, de forma intrínseca a partir do ácido octanóico (MORIKAWA *et al.*, 2001). O ALA apresenta dois grupos tiol (-SH), um no C6 e outro no C8, que estão conectados por ponte dissulfeto, sendo capaz de ser oxidado ou reduzido. A forma oxidada, ALA, pode ser rapidamente reduzida no organismo, resultando na formação do Ácido Diidrolipóico (ADHL; Figura 9; KRAMER e PACKER, 2001; MOINI *et al.*, 2002).

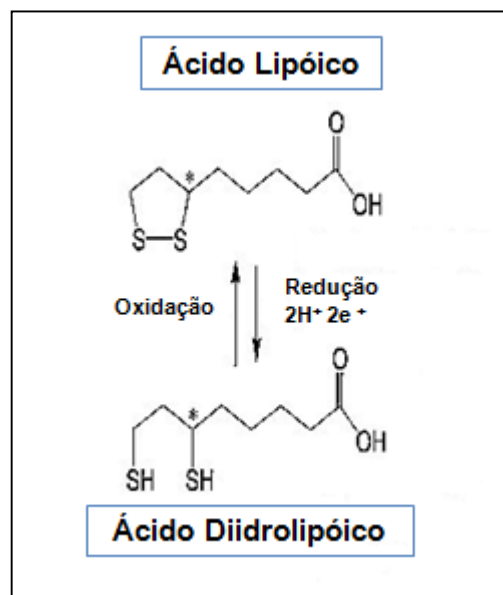


Figura 9: Estrutura química do Ácido α -lipóico e da sua forma reduzida, Ácido Diidrolipóico.

O ALA oriundo da dieta alimentar apresenta uma cinética simples, concentrando-se, sobretudo em alguns órgãos, como fígado, rins, coração e nas mitocôndrias, internamente, neste local o ALA é reduzido pela atividade da lipoamida desidrogenase ou pelo sistema da tioredoxina redutase, subjugado pela NADPH (PRASAD e GANAPATHY, 2000; GORACA *et al.*, 2011).

Tanto o ALA, como o ADHL evidencia alta capacidade de redução, pois sequestram íons metálicos de transição, além de que o ADHL também reduz o radical tocoferoxil e o dehidroascorbato, e aumenta a glutatona reduzida intracelular, devido a solubilidade de ambas as formas desse ácido, principalmente a característica

lipofílica que facilita a penetração em membranas celulares (SMITH *et al.*, 2004; SWARAN, 2009).

O ALA facilita a regeneração de danos celulares e diminui ação inflamatória através da ativação do fator Nuclear fator Kappa Beta (NFκ-B), devido seu perfil anfipático (MAGALHAES, 2000). Acredita-se que o ALA e o ADHL são agentes antioxidantes ativos, pois aprisiona os radicais superóxido, OH• e outros ERO, diminuindo a vulnerabilidade da membrana contra a oxidação (WOLLIN e JONES, 2003; MARANGON *et al.*, 1999).

Estudos recentes demonstram que o ALA é capaz de prevenir ou tratar a hepatite tóxica causada por medicamentos antituberculose, pois estas drogas alteram a morfofisiologia do fígado e os marcadores hepáticos (SAAD *et al.*, 2010). O ALA também comprovou a eficácia em reduzir a hepatotoxicidade produzida através de antineoplásico, no tratamento de carcinoma, já que este medicamento provoca estresse nas mitocôndrias do tecido hepático (TABASSUM *et al.*, 2010).

Dessa forma, é primordial avaliar o efeito dessa substância mencionada, que está envolvida direta ou indiretamente com o sistema de defesa antioxidante da GSH. Essa substância é capaz de executar o sequestro de ERO e ERN, e quelar o ferro, desempenhando uma função significativa na defesa antioxidante.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor do antioxidante Ácido Alfa Lipóico na lesão hepática induzida pela dapsona em modelo *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros bioquímicos, como a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) no plasma dos animais tratados com dapsona na presença ou ausência do antioxidante;
- Avaliar os parâmetros do estresse oxidativo, como o malondialdeído, a glutathiona reduzida e a capacidade antioxidante total no homogeneizado do fígado dos animais tratados com dapsona, na presença ou ausência do antioxidante;
- Quantificar os níveis de ferro no homogeneizado do fígado dos animais tratados com dapsona, na presença ou ausência do antioxidante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e cuidado dos Animais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade federal do Pará (CEUA/UFGPA), DOC N° 2411100816, conforme certificado em anexo.

Nesse experimento foram utilizados no total, 40 camundongos machos, *Mus musculus*, linhagem Swiss, adultos jovens com 8 semanas de idade, massa corpórea variando entre 35 a 40g. Esses animais foram adquiridos através do Instituto Evandro Chagas (IEC), órgão vinculado à Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS), localizado na Rodovia BR-316Km 7 S/N - LEVILÂNDIA - 67030-000 - ANANINDEUA / PARÁ / BRASIL.

Os camundongos foram alojados no biotério da Faculdade de Farmácia da UFGPA, em gaiolas de polipropeno com grade de inox, nas medidas 41x34x16cm, contendo cama em maravalha de Pinus. As gaiolas foram substituídas em dias alternados, lavadas com água, sabão e desinfetadas com hipoclorito de sódio, aclimatados com temperatura controlada entre 25 ± 1 °C, submetidos ao ciclo de luz/ escuridão de 12h/12h e alimentados “*Ad libitum*” com água e ração comercial, durante todos os experimentos.

4.2 Preparação da Dapsona e do Ácido alfa lipóico

- Solução de dapsona (40 mg/Kg). A dapsona foi dissolvida em 50 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) 2%.
- Solução de Ácido alfa lipóico (12,5 mg/Kg) e solução do Ácido alfa lipóico (25 mg/Kg). O Ácido alfa lipóico foram dissolvidos em 50 µL de Solução Salina a 0,9%.

Durante 5 dias consecutivos foi administrada a solução de DDS, via intraperitoneal em um total de 40 camundongos de diferentes grupos. Após 2 horas, foi administrado por gavagem, a solução de ALA (12,5 mg/Kg) no grupo DDS+ALA 12,5mg/Kg e a solução de (25 mg/Kg) no grupo DDS+ALA 25mg/Kg, durante 5 dias consecutivos. E os animais do grupo controle foram administrados apenas com veículo (DMSO e/ou Solução Salina), durante 5 dias consecutivos. No final, os

camundongos foram eutanasiados depois de 4 horas do último tratamento com a DDS e/ou ALA e outros após 24 horas do último tratamento com a DDS e/ou ALA.

4.3 Divisão dos grupos de animais

Os animais foram divididos em 8 grupos:

- **G-BASAL** (6 animais): Foi administrado DMSO 2%, via intraperitoneal. Após 2 horas, solução salina via gavagem. E foram eutanasiados após 4 horas no último dia do tratamento.
- **G-BASAL** (4 animais): Foi administrado DMSO 2%, via intraperitoneal. Após 2 horas, solução salina via gavagem. E foram eutanasiados após 24 horas do último dia do tratamento.
- **G-DDS** (6 animais): Foi administrado a solução de DDS via intraperitoneal. E foram eutanasiados após 4 horas no último dia do tratamento.
- **G-DDS** (4 animais): Foi administrado a solução de DDS via intraperitoneal. E foram eutanasiados após 24 horas do último dia do tratamento.
- **G-DDS+ALA 12,5** (6 animais): Foi administrado a solução de DDS via intraperitoneal. Após 2 horas foi administrado a solução do ALA (12,5 mg/Kg) via gavagem. E foram eutanasiados após 4 horas no último dia do tratamento.
- **G-DDS+ALA 12,5** (4 animais): Foi administrado a solução de DDS via intraperitoneal. Após 2 horas foi administrado a solução do ALA (12,5 mg/Kg) via gavagem. E foram eutanasiados após 24 horas do último dia do tratamento.
- **G-DDS+ALA 25** (6 animais): Foi administrado a solução de DDS via intraperitoneal. Após 2 horas foi administrado a solução do ALA (25 mg/Kg) via gavagem. E foram eutanasiados após 4 horas no último dia do tratamento.
- **G-DDS+ALA 25** (4 animais): Foi administrado a solução de DDS via intraperitoneal. Após 2 horas foi administrado a solução do ALA (25 mg/Kg) via gavagem. E foram eutanasiados após 24 horas do último dia do tratamento.

4.4 Coleta das amostras dos animais

Após o término do tratamento farmacológico com DDS e/ou ALA e dos grupos controles, os animais foram anestesiados com quetamina (1,5 $\mu\text{L/g}$ de peso corporal) e xilazina (0,5 $\mu\text{L/g}$ de peso corporal), submetidos à eutanásia por exsanguinação para a coleta de sangue total por punção cardíaca. Os camundongos foram presos a um suporte de isopor; borrifado etanol 70% para desinfecção dos pelos; a pele ventral foi levantada com o auxílio de duas pinças dente-de-rato e executada um corte longitudinal anatômico nos camundongos para coleta do sangue pela artéria aorta, com seringa plástica e agulha 25 X 0,8mm, distribuídos em tubos com 25 μL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O plasma foi separado por centrifugação a 2.500 rpm durante 10 minutos, adquirindo assim o plasma livre de hemólise para análises bioquímicas.

Os fígados dos camundongos foram coletados e dispostos em tubos do tipo eppendorf com 1000 μL de PBS, armazenado a -80°C para que posteriormente foram submetidos ao processo de ruptura de tecidos, para a obtenção do homogeneizado. Este foi utilizado para a análise laboratorial (Figura 10).

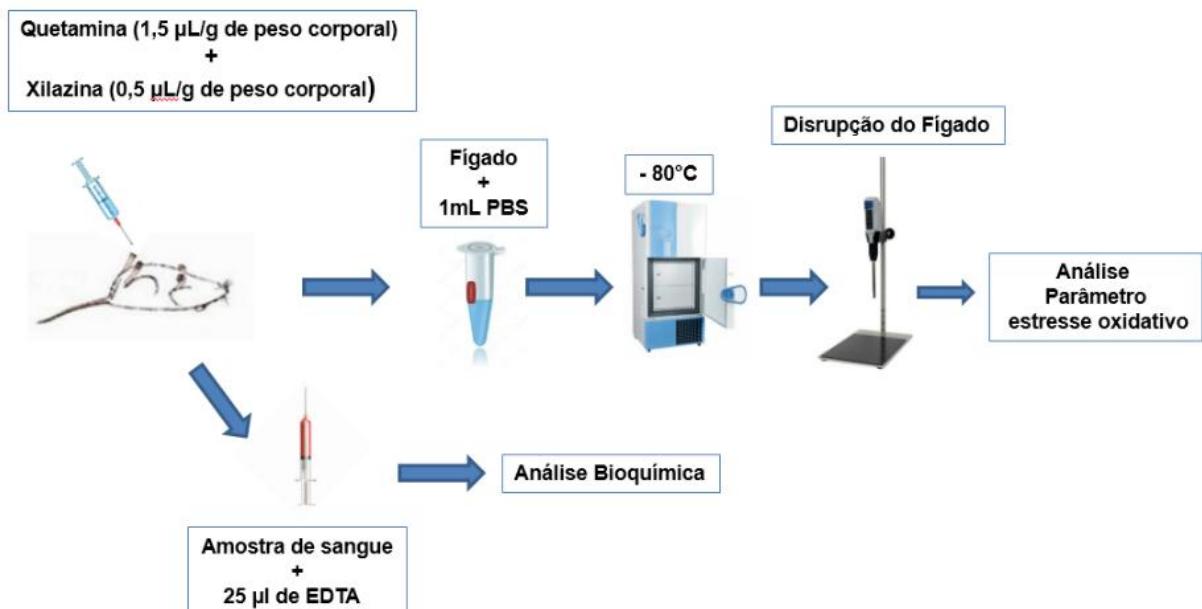


Figura 10: Estrutura da Coleta das amostras de sangue e fígado dos animais.

Todos os animais eutanasiados foram acondicionados em sacos plásticos de materiais biológicos, em seguida congelados até o seu recolhimento e descarte pela empresa especializada, contratada pela UFPA, de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos da Saúde (PGRS) da instituição.

4.5 Análises das amostras

4.5.1 ANÁLISE DOS MARCADORES HEPÁTICOS

A determinação das enzimas Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) foram feitas através dos kits comerciais da Bioliquid, métodos realizados por meio cinético UV e absorbância lida em 340nm. A Fosfatase Alcalina (FA) foi feita pelo kit comercial Bioclin, métodos realizados por meio cinético UV e absorbância lida em 578nm.

A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, formando o glutarato e o piruvato. O AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, formando o glutarato e o oxalacetato. Já a FA hidrolisa o substrato de timolftaleína monofosfato, formando timolftaleína e o fosfato inorgânico.

4.5.2 DOSAGEM DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada pelo método de Khonn & Livesedge (1944) e adaptado por Percário et al. (1994). Trata-se de uma técnica baseada na reação do malondialdeído (MDA) e outras substâncias com o ácido tiobarbitúrico (TBA; Sigma-Aldrich T5500), em pH 2,5 a 94°C, formando o complexo MDA-TBA de cor rósea, com absorvância em 535nm. Como a reação não é específica para o MDA, uma vez que o TBA pode reagir com açúcares, aminoácidos, proteínas e bilirrubina, utiliza-se o termo substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Mayne 2003). A concentração elevada de TBARS tem sido utilizada como um indicador do estresse oxidativo.

O procedimento técnico do método consiste no preparo inicial do fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4 75 mM, Synth, 35210) em água acidificada (pH 2,5). Esta solução é utilizada na preparação do TBA (10 nM). Adiciona-se 100 μl de amostra à 500 μl da solução de ácido tiobarbitúrico 10 nM. Em seguida leva-se ao banho-maria (94°C por 60 min); após a incubação deixa-se esfriar a temperatura ambiente por 10 minutos; adiciona-se 2,0 ml de álcool 1-butílico, homogeneiza-se vigorosamente em vórtex e posteriormente submete-se a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos; coleta-se 1,0 ml do sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535 nm. O padrão MDA (1,1,3,3,tetrahidroxipropano-Sigma-Aldrich,T9889) foi utilizado para a realização da curva padrão, sendo os resultados foram expressos em $\mu\text{M/L}$ (Figura11).

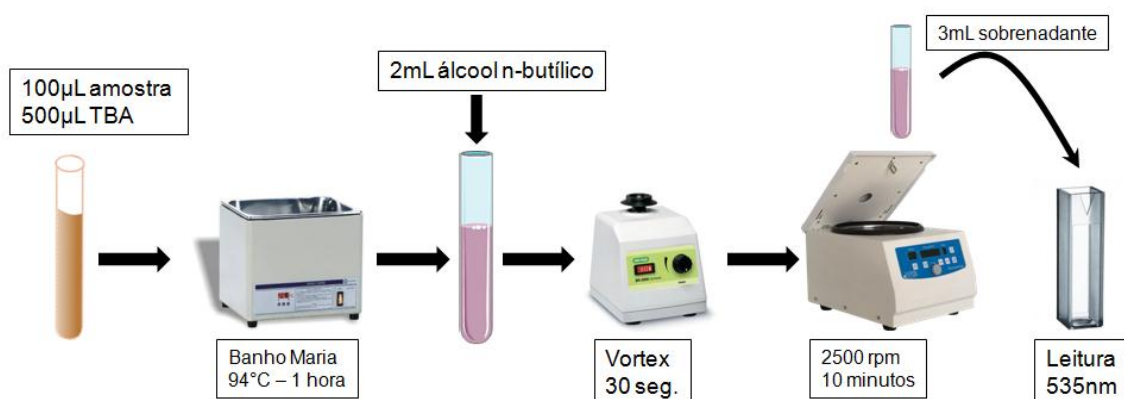


Figura 11: Demonstração da dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

4.5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA

A determinação das concentrações da glutatona reduzida (GSH) foi realizada de acordo com o método de Ellman (1959). Esta técnica baseia-se na capacidade da GSH em reduzir o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich) para ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), o qual foi quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

As amostras foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 2% e o sobrenadante coletado para análise após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Inicialmente, foi retirada uma alíquota de 20 μ L de cada amostra e colocada em tubo de ensaio contendo 3 mL de tampão PBS/EDTA e 20 μ L de água destilada para a realização da 1ª leitura da amostra (T0), em seguida foi adicionado 100 μ L de DTNB e após 3 minutos realizou a 2ª leitura da amostra (T3). A diferença nas absorvâncias (T3 – T0) é proporcional à concentração de GSH, expressa em μ M/mL (Figura 12).

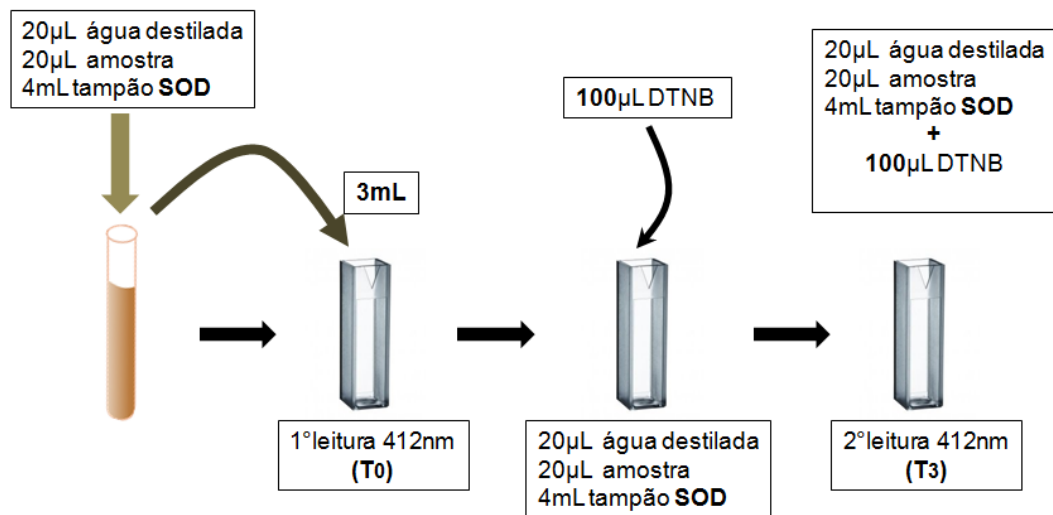


Figura 12: Apresentação da determinação da glutatona reduzida (GSH).

4.5.4 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A determinação da capacidade antioxidante total foi realizada através da técnica da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico; SigmaAldrich 23881-3) é um potente antioxidante análogo hidrossolúvel da vitamina E. Seguiu-se o método proposto por Miller et al. (1993) modificado por Re et al. (1999). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (SigmaAldrich A1888) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$; Sigma-Aldrich 60490), produzindo diretamente o cátion radical $ABTS^{+\bullet}$ (radical 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato], sal de diamônio), cromóforo de coloração verde/azul (VASCONCELOS et al., 2007). A adição de antioxidantes presentes na amostra a este cátion radical pré-formado o reduz novamente a ABTS, em escala dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante 5 minutos. Os resultados foram expressos em $\mu M/mL$ (Figura 13).

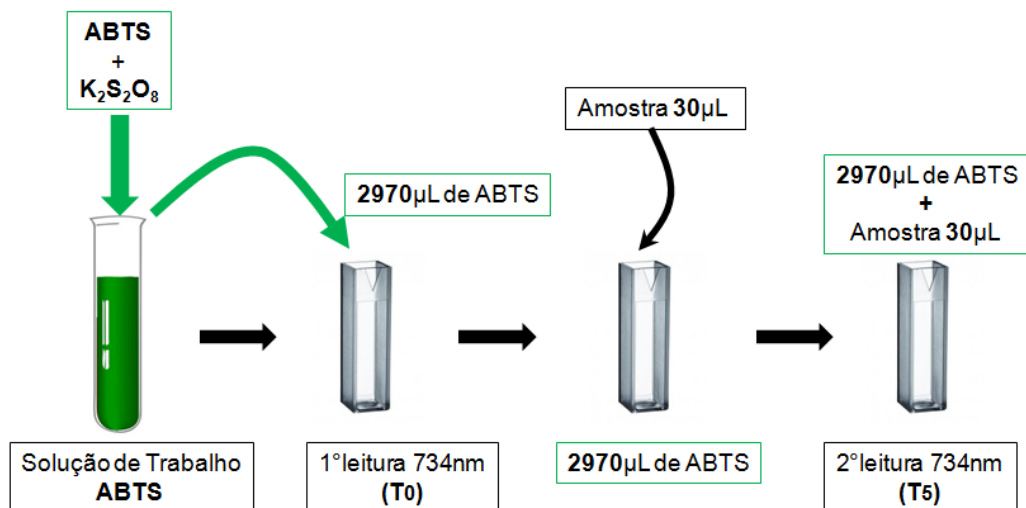


Figura 13: Demonstração da determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC).

4.5.5 DETERMINAÇÃO DO FERRO SÉRICO

O ferro sérico foi determinado pelo método colorimétrico de Goodwin modificado, utilizando o kit Labtest®. Para isso, foram utilizados 100µl do homogeneizado do fígado e as leituras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda 560nm. Os tubos utilizados na manipulação das amostras durante os procedimentos foram de plástico e descartável, para evitar a contaminação com traços de ferro. Na análise do ferro sérico, o ferro é liberado da transferrina em meio ácido tamponado e na presença de ácido tioglicólico é reduzido a Fe^{+2} . O íon reduzido liga-se ao reagente de cor (ferrozine), formando um complexo molecular de coloração rósea, cuja intensidade da cor produzida é diretamente proporcional à concentração de ferro na amostra.

4.5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente através do programa *Graphpad Prism 5.1*, 2007. Os dados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey múltiplas comparações. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e considerados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis do Aspartato aminotransferase no plasma dos camundongos.

A figura 14 mostra que o grupo DDS e o grupo pós-tratado ALA 25 mg/Kg, ambos de 4 horas, aumentaram significativamente ($p \leq 0,05$) os níveis da enzima aspartato aminotransferase (AST), em relação ao grupo controle (BASAL) 4 horas. O grupo DDS de 4 horas apresentou de forma significativa níveis mais elevados de AST, comparado ao grupo DDS de 24 horas. Os grupos pós-tratados, ALA 12,5 e 25 mg/Kg de 4 horas, ambos apresentaram um aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos níveis de AST, em relação aos grupos pós-tratados, ALA 12,5 e 25 mg/Kg de 24 horas. No entanto, os animais tratados com DDS e pós-tratados com ALA na dose de 12,5 mg/Kg de 4 horas, apresentou uma redução nos níveis de AST, em relação ao grupo DDS de 4 horas (Figura 14).

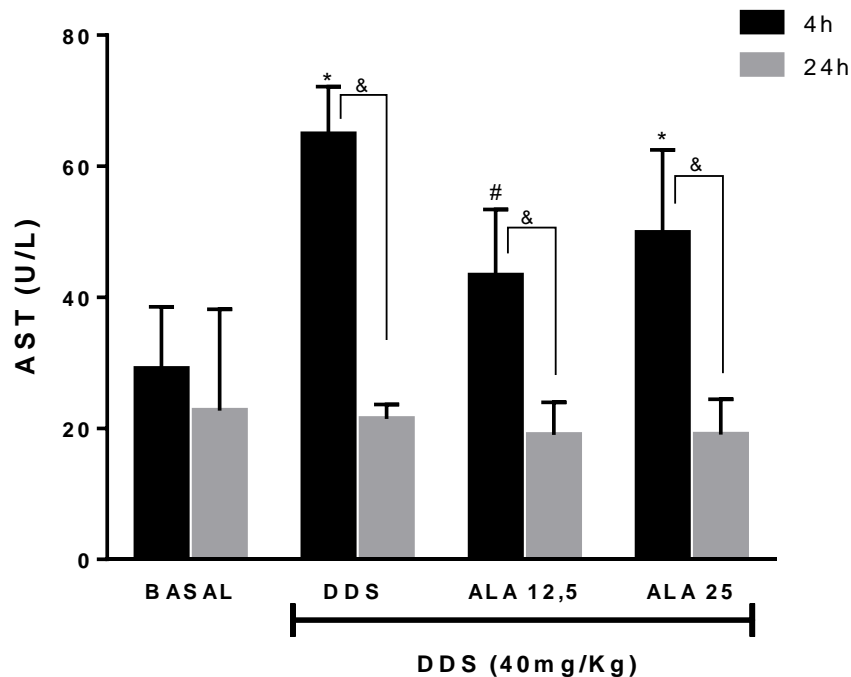


Figura 14: Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis do Aspartato aminotransferase no plasma dos camundongos, induzidos com DDS (40 mg/Kg) e pós-tratados com ALA (12,5 e 25 mg/Kg). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo BASAL 4h; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS 4h; & $p \leq 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo 24h. ALA, Ácido Alfa Lipóico; DDS, dapsona; AST, aspartato aminotransferase; h, horas.

5.2 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis da Alanina aminotransferase no plasma dos camundongos.

Em relação aos níveis da Alanina aminotransferase (ALT), nenhum grupo apresentou diferença significativa nos níveis desta enzima no plasma, nos tempos avaliados (Figura 15).

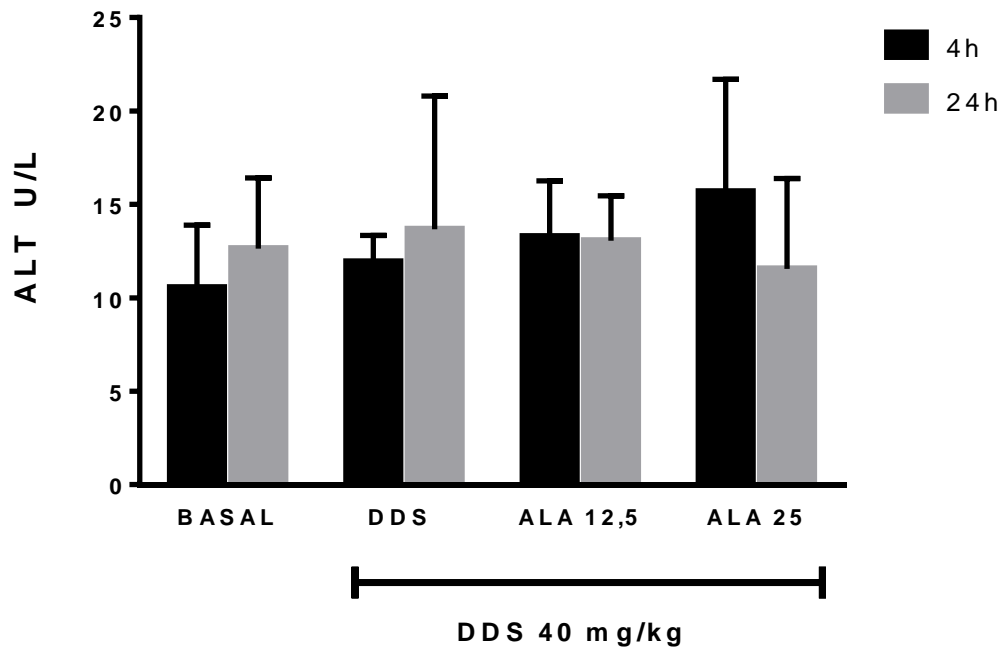


Figura 15: Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis da alanina aminotransferase no plasma dos camundongos, induzidos com DDS (40 mg/Kg) e pós- tratados com ALA (12,5 e 25 mg/Kg). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo BASAL 4h; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS 4h; & $p \leq 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo 24h. ALA, Ácido Alfa Lipóico; DDS, dapsona; ALT, alanina aminotransferase; h, horas.

5.3 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis da Fosfatase alcalina no plasma dos camundongos.

A figura 16 mostra que o grupo DDS de 24 horas apresentou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos níveis de Fosfatase Alcalina (FA) em relação, tanto ao grupo DDS de 4 horas, como ao grupo controle BASAL de 24 horas. O grupo pós-tratado com ALA na dose de 25 mg/Kg de 24 horas, apresentou também um aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos níveis de FA em relação, tanto ao grupo pós-tratado com ALA 25mg/kg de 4 horas, como ao grupo controle BASAL de 24 horas. No entanto, somente o grupo pós-tratado com ALA na dose de 12,5 mg/Kg de 24 horas apresentou uma redução significativa ($p \leq 0,05$) aos níveis de AST, comparado ao grupo DDS de 24 horas (Figura 16).

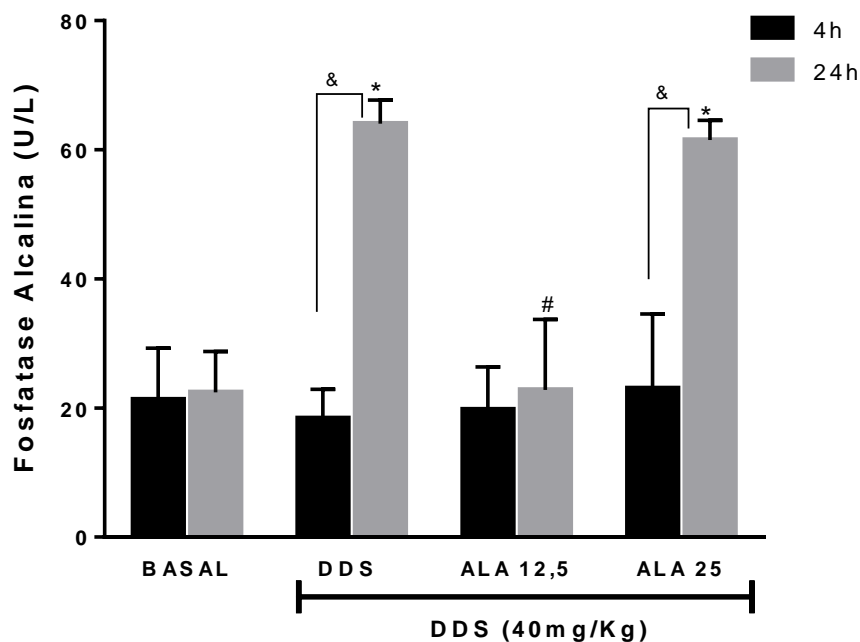


Figura 16: Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis da fosfatase alcalina no plasma dos camundongos, induzidos com DDS (40 mg/Kg) e pós- tratados com ALA (12,5 e 25 mg/Kg). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo BASAL 24h; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS 24h; & $p \leq 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo 24h. ALA, Ácido Alfa Lipóico; DDS, dapsona; FA, fosfatase alcalina; h, horas.

5.4 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de TBARS em homogeneizados de fígados dos camundongos.

A Figura 17 mostra que os animais tratados com dapsona (grupo DDS), tanto de 4 horas como de 24 horas, apresentaram níveis elevados de malondialdeído ($p \leq 0,05$) em relação aos seus respectivos grupos, BASAL de 4 horas e de 24 horas, mostrando que o tratamento com dapsona levou a um dano hepático nos animais. E o grupo DDS de 4 horas mostrou níveis mais elevados de malondialdeído ($p \leq 0,05$) comparado com o grupo DDS de 24 horas. Por outro lado, os animais tratados com dapsona que receberam pós-tratamento com o Ácido Alfa Lipóico, nas concentrações 12,5 e 25 mg/Kg, ambos de 4 horas apresentaram redução significativa nos níveis de malondialdeído ($p \leq 0,05$) comparado com grupo DDS de 4 horas (Figura 17).

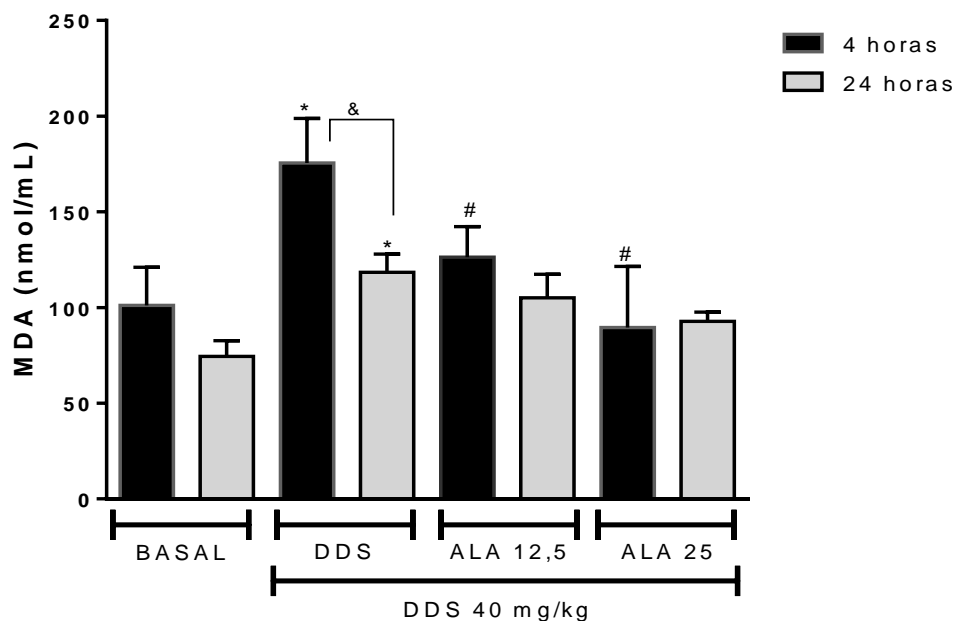


Figura 17 - Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de malondialdeído em homogeneizados de fígados dos camundongos tratados com DDS. Os camundongos foram pós-tratados com ALA (12,5 e 25 mg/Kg) e induzidos com DDS (40 mg/Kg), em seguida, os níveis de malondialdeído foram avaliados. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo BASAL 4h ou 24h; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS 4h; & $p \leq 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo 24h. ALA, Ácido Alfa Lipóico; DDS, dapsona; MDA, malondialdeído.

5.5 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de glutatona em homogeneizados de fígados dos camundongos.

Em relação a produção de antioxidantes, o grupo DDS de 4 e 24 horas apresentou redução significativa ($p \leq 0,05$) na concentração do tripeptídeo endógeno, GSH, comparado aos seus respectivos grupos, BASAL 4horas e 24 horas, mostrando que a DDS induziu um consumo ou redução nos níveis deste antioxidante *in vivo*. Em contrapartida, o pós-tratamento com ALA na concentração de 12,5 e 25 mg/Kg de 4 horas, nos animais tratados com dapsona foi capaz de reverter o efeito oxidativo da dapsona que ocasionou a redução de GSH, comparado ao grupo DDS de 4 horas. Inclusive esses mesmos grupos pós-tratados com ALA apresentaram um aumento na concentração de GSH, comparados com seus respectivos grupos ALA 12,5 e 25 de 24 horas ($p \leq 0,05$; Figura 18).

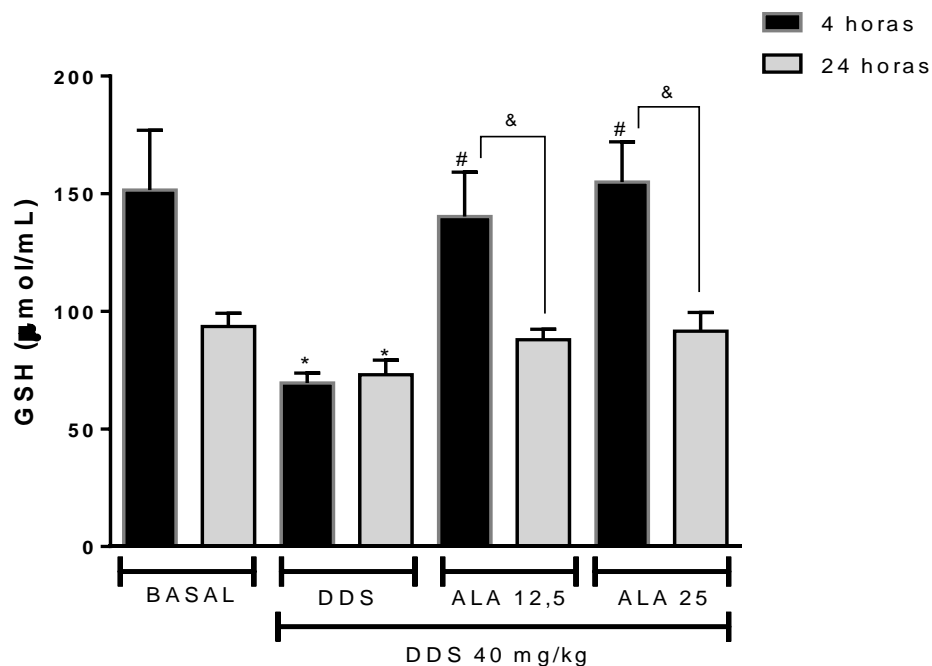


Figura 18 - Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de glutatona em homogeneizados de fígados dos camundongos tratados com DDS. Os camundongos foram pós-tratados com ALA (12,5 e 25 mg/Kg) e induzidos com DDS (40 mg/Kg), em seguida, a concentração de GSH foi avaliada. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo BASAL 4h ou 24h; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS 4h; & $p \leq 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo de 24h. ALA, Ácido Alfa Lipóico; DDS, dapsona; GSH, glutatona.

5.6 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre a capacidade antioxidante total em homogeneizados de fígados dos camundongos.

Quanto à capacidade antioxidante total detectada pelo método do TEAC, nossos dados mostraram que o grupo DDS de 4 horas foi capaz de reduzir a capacidade antioxidante total de forma significativa ($p \leq 0,05$) em relação, tanto ao grupo BASAL de 4 horas como ao grupo DDS de 24 horas. Por outro lado, os grupos pós-tratados com diferentes concentrações do ALA (12,5 a 25 mg/Kg) de 4 horas, apresentaram reversão significativa ($p \leq 0,05$) dos níveis da capacidade antioxidante total, em relação ao grupo DDS de 4 horas, mostrando novamente que o tratamento com ALA foi capaz de reverter o efeito oxidativo ocasionado pela dapsona no fígado (Figura 19).

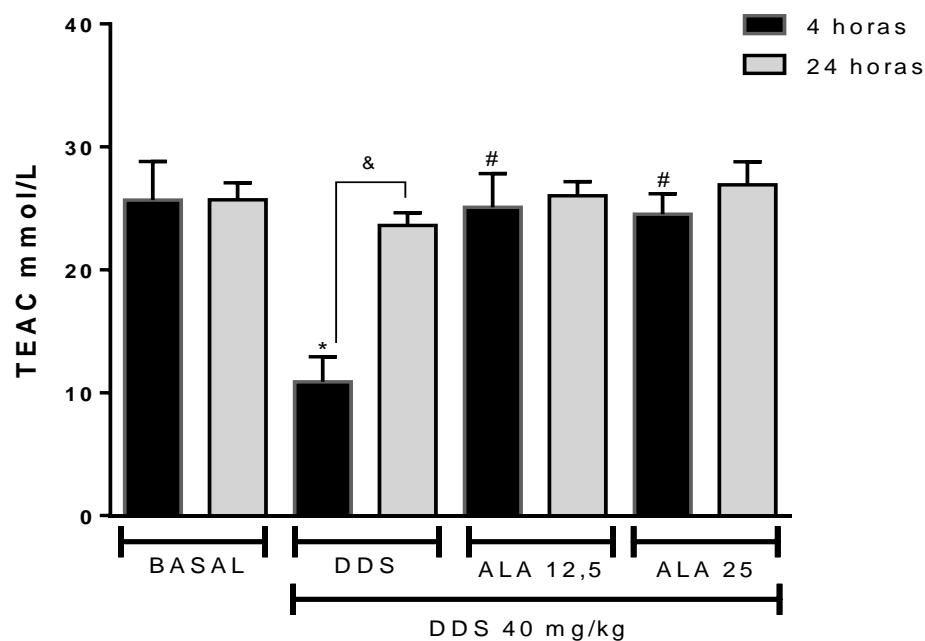


Figura 19 - Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre a capacidade antioxidante total em homogeneizados de fígados dos camundongos tratados com DDS. Os camundongos foram pós-tratados com ALA (12,5 e 25 mg/Kg) e induzidos com DDS (40 mg/Kg), em seguida, a capacidade antioxidante total foi avaliada. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS 4h; * $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo BASAL 4h; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS 24h; & $p \leq 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo de 24h. ALA, Ácido Alfa Lipóico; DDS, dapsona; TEAC, Capacidade antioxidante equivalente ao trolox.

5.7 Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de ferro em homogeneizados de fígados dos camundongos.

A Figura 20 mostra que os grupos DDS de 4 horas e 24 horas, ambos apresentaram aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos níveis de ferro, em relação aos respectivos grupos BASAL de 4 horas e 24 horas. O grupo DDS de 4 horas apresentou de forma significativa ($p \leq 0,05$), níveis mais elevados de ferro, comparado ao grupo DDS de 24 horas. E os grupos pós-tratamento, ALA 12,5 de 4 horas e o ALA 25 de 4 horas e 24 horas, apresentaram aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos níveis de ferro, acumulados no fígado, comparados, respectivamente ao grupo BASAL de 4 horas e 24 horas. Entretanto, o pós-tratamento com o ALA nas doses de 12,5 e 25 mg/Kg de 24 horas, foram capazes de reverter de forma significativa ($p \leq 0,05$) o aumento no acúmulo nos níveis de ferro comparado ao grupo DDS 24 horas e aos grupos respectivos do ALA 12,5 e 25 de 4 horas (Figura 20).

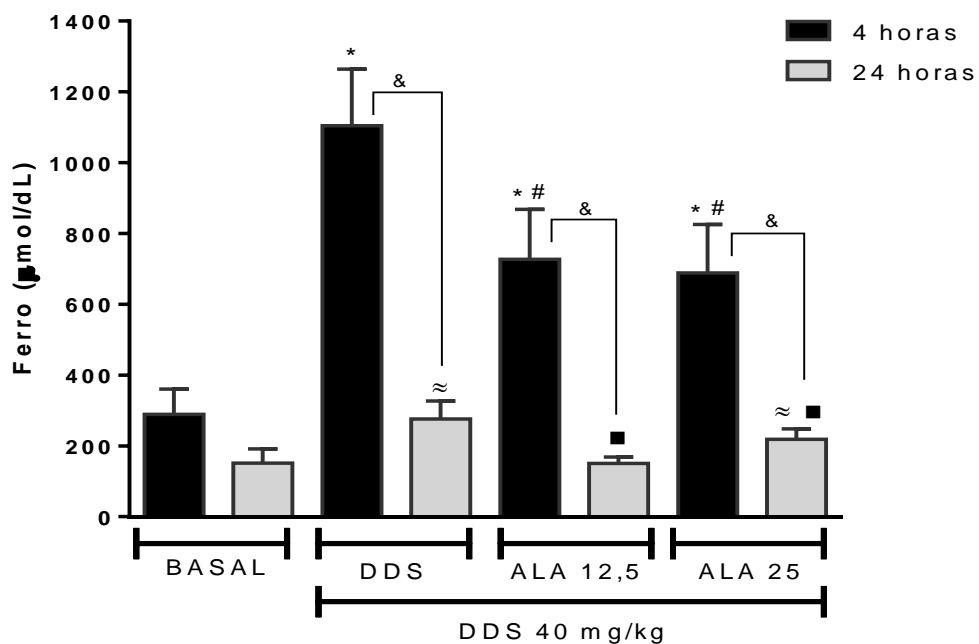


Figura 20 - Efeito do pós-tratamento com Ácido Alfa Lipóico sobre os níveis de ferro em homogeneizados de fígados dos camundongos tratados com DDS. Os camundongos foram pós-tratados com ALA (12,5 e 25 mg/Kg) e induzidos com DDS (40 mg/Kg), em seguida, os níveis de ferro foram avaliados. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS 4h; * $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo BASAL 4h; $\approx p \leq 0,05$ comparado ao grupo BASAL 24h; ■ $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS 24h; & $p \leq 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo de 24h. ALA, Ácido Alfa Lipóico; DDS, dapsona.

6 DISCUSSÃO

Este estudo evidenciou que a administração intraperitoneal de DDS na dose de 40 mg/Kg foi responsável em causar alterações no equilíbrio redox no fígado dos camundongos, ocasionando um aumento nos níveis da AST e FA, na peroxidação lipídica e na diminuição das defesas antioxidantes, como os níveis de GSH e na capacidade antioxidante total. Além disso, a administração da DDS nos camundongos também ocasionou uma elevação nos níveis do ferro hepático. Em contrapartida, o pós-tratamento com o antioxidante ALA, que foi capaz tanto de reverter os danos oxidativo, como reduzir os níveis de MDA e o acúmulo de Ferro no tecido hepático, induzido pelo tratamento com DDS nos animais.

Estudos relacionado com a lesão hepática aguda, demonstra que, inicialmente os níveis do aspartato aminotransferase (AST) são elevados e sua meia vida é em torno de 17 horas (XU *et al.*, 2015). Dessa forma, nossos dados mostraram que a DDS induziu a elevação dos níveis de AST em 4h, em relação ao tempo de 24 horas, fato que pode ser explicado por 4 horas estar dentro do intervalo de tempo de meia vida dessa enzima. No entanto, o pós-tratamento com ALA na dose de 12,5 mg/Kg inibiu os níveis de AST, induzida pela dapsona em 4 h, fato que pode ter ocorrido pela reversão ou diminuição do dano hepático e em outros tecidos, ocasionado pela regeneração da GSH e outros antioxidantes, que impedem a superprodução de ERO, consequentemente inibem o dano oxidativo.

Em relação ao outro marcador hepático, a alanina aminotransferase (ALT), estudos realizados por Reagan *et al.* (2012) utilizando camundongos tratados com dexametasona, demonstraram que os níveis de ALT não apresentaram aumento em 24 horas, e sim, em 72 horas. Com isso, provavelmente, os nossos resultados em relação a ALT não apresentaram diferenças estatísticas, pois os animais foram eutanasiados, em 4 horas e 24 horas. E a ALT também pode estar associada com a renovação celular, ou seja, seus níveis se dispõem a normalizar mesmo após vários dias de administração com fármacos (AMACHER, 1998). Com relação a fosfatase alcalina (FA), o grupo tratado apenas com DDS de 24 horas, demonstrou um aumento nos níveis de FA, em relação ao seu grupo respectivo de 4 h. Habitualmente, a FA é utilizada como marcador de colestase, seus níveis podem se elevar, mediante ao acúmulo de sais biliares nos hepatócitos, induzindo uma formação de FA intracelular (VEGGI, 2002). O pós-tratamento com ALA na dose de 12,5 mg/Kg, inibiu os níveis

de FA, induzida pela dapsona em 4 h, evento que pode ter ocorrido pela diminuição do dano hepático, ocasionado pela regeneração da GSH e outros antioxidantes, que impedem a superprodução de ERO, conseqüentemente inibem o dano oxidativo.

A DDS é classificada como um medicamento que induz a hepatite medicamentosa mesmo em doses recomendadas e permanece no organismo por até 35 dias após a administração (TAJIRI e SHIMIZU, 2008; ALVES-RODRIGUES *et al.*, 2005). De acordo com Videla (2009), o fígado é o órgão mais acometido pela toxicidade de droga, sendo que a hepatite medicamentosa é iniciada pela produção acentuada de ERO, induzida pela exposição aos fármacos oxidativos. No sistema normal da célula, o próprio sistema antioxidante é capaz de neutralizar as ações das ERO, tanto no meio intra como no meio extracelular. No entanto, uma alteração como, uma depleção do sistema antioxidante com o aumento da produção de ERO pode ocasionar danos oxidativos no organismo (RASHEED *et al.*, 2007).

Conforme relatado, a produção acentuada de ERO pode ocasionar elevação na peroxidação lipídica, devido uma degradação acentuada dos fosfolipídeos da membrana, gerando ácidos graxos poli-insaturados, que são tóxicas as células e levam a um dano celular (KWIECIEN *et al.*, 2002). Um dos principais produtos da peroxidação lipídica é o MDA, que serve como indicador de lesão tecidual provocados por ERO (KWIECIEN *et al.*, 2002; KWIECIEN *et al.*, 2010; ADAMCZYK-SOWA *et al.*, 2012). Mediante a isso, níveis elevados de peroxidação lipídica pode estar associado a lesão hepática, provocados pelo estresse oxidativo neste tecido (KURATA, *et al.*, 1993).

Estudo demonstra que os ratos machos, administrados com dose de 30 mg/Kg de DDS intraperitoneal, mostrou um aumento nos níveis de MDA nos hepatócitos dos mesmos, em relação ao grupo controle sem tratamento. Provável que o metabólito da dapsona, a dapsona hidroxilamina induziu a formação de ERO, conseqüentemente o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica (VEGGI *et al.*, 2008). Nesse sentido, nosso estudo mostrou, que o tratamento com DDS na dose de 40 mg/Kg de 4 horas, induziu um aumento nos níveis de MDA nos camundongos, comparado aos grupos BASAL e DDS de 24 horas. Possivelmente, esse aumento pode estar relacionado com a concentração plasmática da DDS que é de 2 a 8 horas.

A progressão do dano hepático pode estar associada a partir do momento da metabolização da dapsona hidroxilamina para a dapsona nitrosoareno, com a doação do elétron para o O₂ na formação do radical superóxido (VEGGI *et al.*, 2008). O ânion

superóxido é dismutado pelo SOD em H_2O_2 , que através da reação de Haber-weiss origina o radical OH^\bullet . Esse radical tem a capacidade de retirar um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados (LH) da membrana celular, formando o radical lipídico (L^\bullet), este pode interagir com o O_2 e originar o radical peróxido (LOO^\bullet), formando produtos como aldeídos, cetonas, ésteres e produtos secundários, como o MDA. Esse processo termina no momento que as reservas de LH e O_2 se esgotam no sistema (SANTOS *et al.*, 2007; Figura 21).

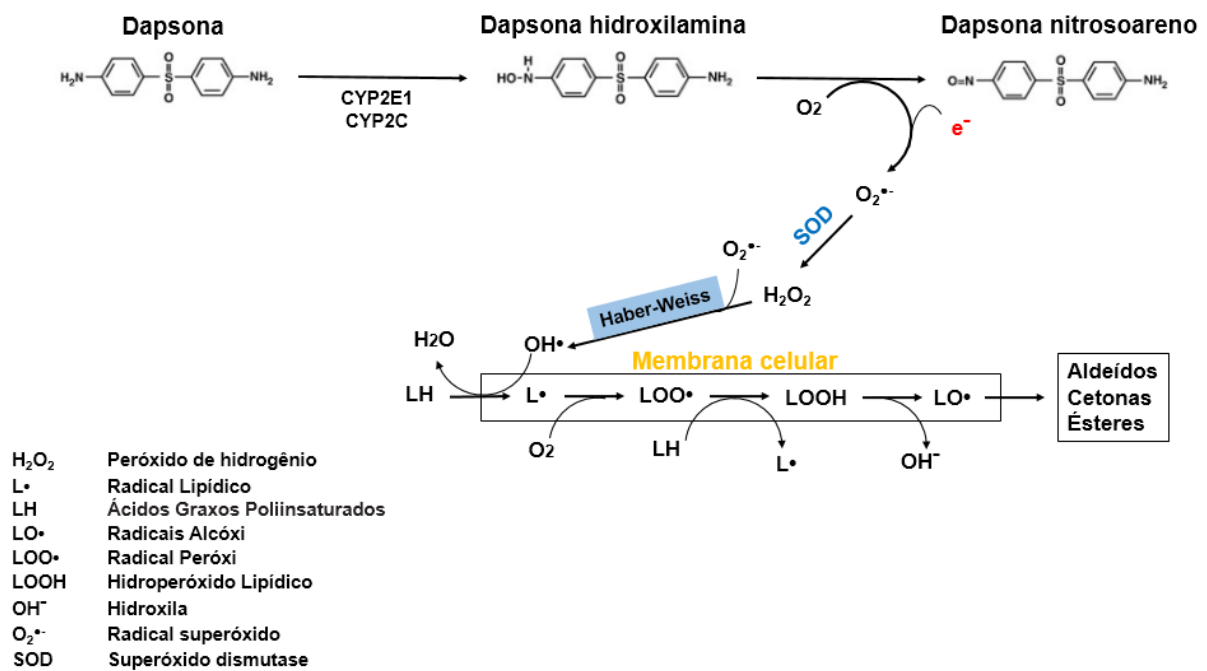


Figura 21: Estrutura proposta do mecanismo da formação do radical superóxido a partir da Dapsona hidroxilamina e da representação do processo da peroxidação lipídica. Fonte: Adaptado de Veggi *et al.*, 2008.

Evidências indicam que a produção acentuada de ERO e/ou a falha no sistema antioxidante possam colaborar em lesões, fibrose e doenças relacionadas ao fígado. No entanto o uso do ácido alfa Lipóico demonstra uma função protetora, como atividades antioxidante e anti-inflamatória, frente a esses agravos hepáticos (FOO *et al.*, 2011). Com isso, estudos realizados por El-Shenawy *et al.* (2017), utilizando dimetilnitrosamina, induziram um estresse oxidativo hepático nos camundongos. Os mesmos foram tratados com o ALA na dose de 16,12 mg/Kg, que conseguiu inibir os níveis de MDA. Esses resultados corroboram com nosso estudo, pois os animais tratados com dapsona que receberam pós-tratamento com o Ácido Alfa Lipóico, nas concentrações 12,5 e 25 mg/Kg de 4 horas, ambas conseguiram inibir de forma significativa os níveis de MDA em relação ao grupo DDS de 4 horas. Provável, que a

metabolização do ALA de 90 minutos, concomitantemente com a meia vida do GSH de 2 horas, este período, possa ter influenciado nos resultados dos grupos pós-tratados com ALA 12,5 e 25 de 4 horas (SHARMAN *et al.*, 2004; ORMSTAD e ORRENIUS, 1980) Estudos apontam que o ALA pode ativar um mecanismo molecular, através da sirtuína 1, que ativa o fator nuclear eritróide 2, responsável pela transcrição das enzimas antioxidante, como o superóxido dismutase e a catalase, responsáveis por catalisar, respectivamente o ânion $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , impedindo assim a peroxidação lipídica (YANG *et al.*, 2014).

O fígado é o local responsável pela metabolização de inúmeros compostos como metabólito reativo do acetaminofeno, o N-acetil-p-benzoquinona imina, que causam danos hepáticos através da produção de ERO (JAESCHKE *et al.*, 2012). Esses radicais como, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e HO^{\bullet} provocam lesões hepáticas, logo precisam ser eliminados pelo sistema antioxidante, seja enzimático ou não enzimático (MURIEL e GORDILLO, 2016; JAMES *et al.*, 2003; REID *et al.*, 2005). Em relação ao sistema antioxidante não enzimático, a GSH é um importante antioxidante que é sintetizado no fígado e fornece 90% da GSH circulante no organismo (SUN *et al.*, 2010). A atividade da GSH é complementar a glutathiona peroxidase, que catalisa o H_2O_2 em água e O_2 , para limitar a formação do radical OH^{\bullet} considerado altamente reativo (TURGUT *et al.*, 2006).

Sasaki *et al.* (2015) utilizaram 50 mg/Kg de fenitoína, via intraperitoneal em camundongos, induzindo uma injúria no fígado, que provocou uma diminuição nos níveis de GSH hepático. A depleção da GSH agravou as lesões hepáticas induzidas pela fenitoína, pois pela hipótese dos autores a GSH hepática é diminuída a partir da conjugação com o metabólito intermediário da fenitoína, o óxido areno. Diante disso, nossos dados também mostraram que o tratamento com DDS de 4 horas e 24 horas, ambas reduziram os níveis de GSH hepático em relação aos grupos BASAL de 4 horas e 24 horas, indicando o efeito oxidativo do fármaco *in vivo*. A GSH está associada com a eliminação de metabólitos reativos de drogas e pode auxiliar na redução das ERO, neutralizando condições oxidativas (RASHEED *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2006; ALMADORI *et al.*, 2007).

Com isso a diminuição do nível de GSH pode estar relacionado durante o processo de metabolização da dapsona hidroxilamina para a dapsona nitrosoareno, que libera um elétron para o O_2 , formando assim o radical superóxido. Esse radical é dismutado pela enzima superóxido dismutase, formando o H_2O_2 , que é reduzido em

H₂O e O₂ pela catalase e/ou glutaciona peroxidase, que tem como substrato a GSH. A dapsona nitrosoareno podem regenerar a dapsona hidroxilamina, através da GSH, formando o ciclo redox, que cessa apenas quando a GSH está praticamente depletada. Já a glutaciona redutase, NADPH dependente, reduz a glutaciona oxidada (GSSG) em glutaciona reduzida (GSH), mantendo seu estado redox no organismo (KRAMER *et al.*, 1976; VEGGI *et al.*, 2008). No momento que a GSH intervém sobre a glutaciona peroxidase, esta consegue inibir a peroxidação, pois transforma as ERO, em espécies menos reativas (KWIECIEN *et al.*, 2003; 2010). Com isso, a diminuição de GSH nos animais tratados com DDS pode ser indicativo de maior consumo de GSH pelo excesso de metabólitos reativos e/ou pela produção de ERO após a exposição a DDS (Figura 22).

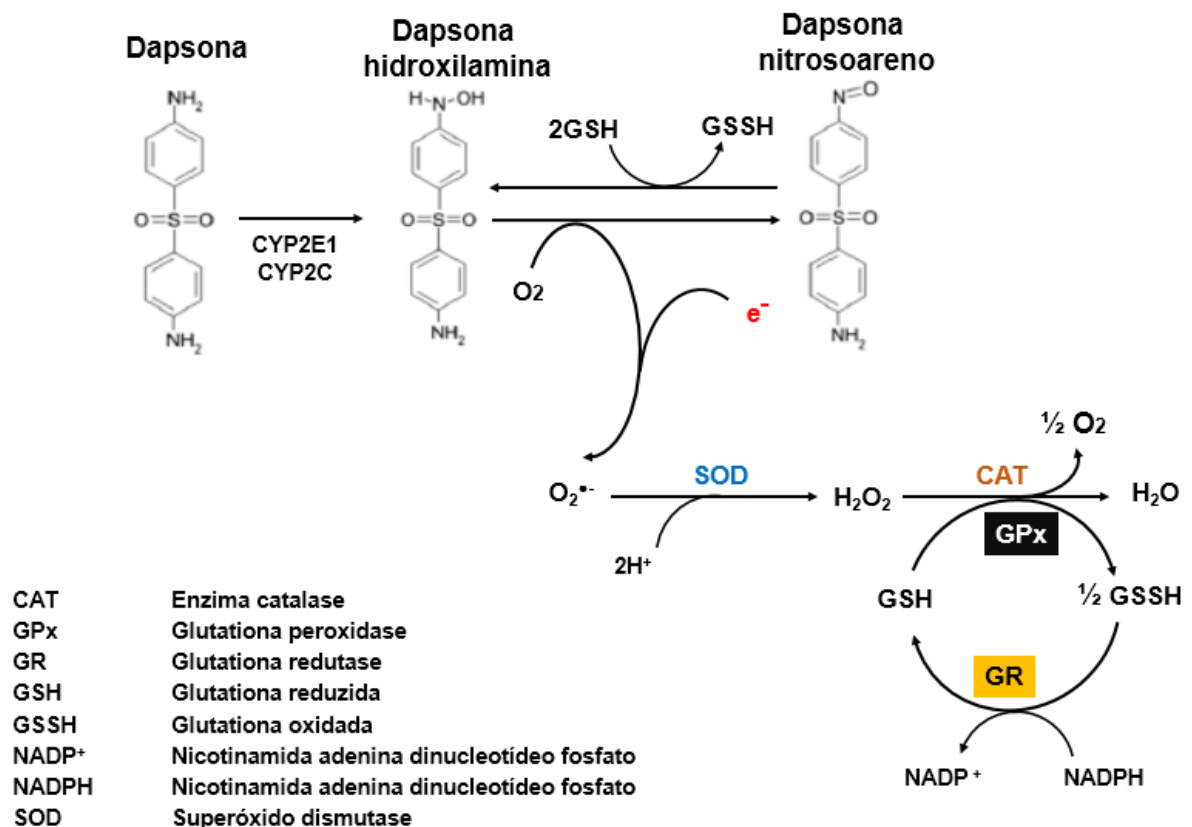


Figura 22: Estrutura proposta do mecanismo da formação do radical superóxido a partir da Dapsona hidroxilamina e do consumo da GSH. Fonte: Adaptado de Veggi *et al.*, 2008.

Estudos de Tian *et al.* (2013) mostraram níveis de GSH hepático em ratos com esteatose, induzidos por lipopolissacarídeos e tratados com o ALA na dose de 60 mg/Kg. O ALA possivelmente restaura o GSH ou o sistema antioxidante dependente de GSH. Dessa forma, nossos resultados também apresentou um aumento nos níveis

de GSH nos camundongos tratados com ALA na dose de 12,5 e 25 mg/Kg de 4 horas. É esperado que a metabolização do ALA de 90 minutos, concomitantemente com a meia vida do GSH de 2 horas, que este prazo possa ter influenciado nos resultados dos grupos pós-tratados com ALA 12,5 e 25 de 4 horas (SHARMAN et al., 2004; ORMSTAD e ORRENIUS, 1980). Esses antioxidantes enzimáticos são considerados como a primeira linha de defesa, devido sua agilidade em eliminar essas ERO (IGHODARO e AKINLOYE, 2017).

Os níveis de MDA e GSH, ambos são considerados como marcadores para avaliar a peroxidação lipídica (GARG et al., 2013). Com isso, estudos de Turgut et al. (2006) comprovaram que analisando danos oxidativos, perceberam um aumento nos níveis de MDA seguido de uma depleção concomitante nos níveis de GSH no fígado dos camundongos.

A capacidade antioxidante total está relacionada com a ação conjunta dos antioxidantes enzimáticos e/ou não enzimáticos presentes no organismo, com propósito de prevenir a formação de radicais livres ou restaurar danos oxidativos. Nos estudos de Niu et al. (2017) a cisplatina administrada via intraperitoneal, induziu lesão hepática aos camundongos, mostrando em seus resultados, uma redução significativa nos níveis da capacidade antioxidante total no grupo tratado apenas com cisplatina. Essa baixa capacidade antioxidante total pode indicar um estresse oxidativo ou uma maior disponibilidade a lesão oxidativa (KORACEVIC et al., 2001). Nesse sentido, em nossos resultados, os níveis da capacidade antioxidante total foi reduzido no grupo tratado apenas com DDS de 4 horas. É provável que isso, seja devido a alta reatividade do radical OH^{\bullet} , pois este reage com qualquer molécula biológica presente no organismo, seja carboidrato, lipídio, proteína ou DNA (PHANIENDRA et al., 2015). Essa deficiência no sistema antioxidante também pode ser devido ao consumo exacerbado das moléculas antioxidantes durante o processo de defesa frente ao dano oxidativo induzidas pelas ERO (SURESH et al., 2009).

Embora a capacidade antioxidante total pode ser considerado a somatória das atividades de inúmeras moléculas antioxidantes, também pode ser tratada como um equilíbrio dinâmico pela relação entre os antioxidantes (KORACEVIC et al., 2001). Os nossos resultados dos grupos pós tratados com ALA 12,5 e 25 mg/Kg de 4 horas pode ter relação, com a capacidade do ALA de regenerar os níveis de GSH e assim neutralizar as ERO (SUN et al., 2012; HAMDY et al., 2014).

A produção de ERO acontece de forma regular nas organelas, principalmente nas mitocôndrias, pois é onde transcorre a cadeia transportadora de elétrons, uma das etapas da respiração celular, fonte geradora de radicais livres (GREEN *et al.*, 2004). Particularmente, alguns metais de transição, como o ferro, podem reagir com ERO, através da reação de fenton e gerar radicais mais tóxicos ao organismo, e assim ocasionar lesões teciduais (KOURY e DONANGELO, 2003).

De acordo com estudos, animais tratados com dapsona apresentam tanto um aumento de MetHb, como a liberação contínua de ferro dos eritrócitos (CICCOLI *et al.*, 1999). Essa liberação provoca uma sobrecarga do ferro nas células de kupffer, que são macrófagos residentes nos sinusóides do fígado. É provável que essas células podem ser responsáveis pela captação de ferro férrico durante a reciclagem dos eritrócitos, mediado pelo aumento de MetHb, em que o ferro da molécula heme é oxidado do estado ferroso para o estado férrico (MISRA e FRIDOVICH, 1972; GREGG e PRCHAL, 2005). Nesse sentido, nossos dados mostraram que o tratamento com DDS também elevou um acúmulo maior de Ferro no fígado dos camundongos no grupo DDS de 4 horas, comparados aos grupos SHAM 4 horas e DDS 24 horas.

Mediante a isso, os metabólitos da DDS induzem a formação de metemoglobinas, sendo uma das principais causas do acúmulo de ferro (CICCOLLI *et al.*, 1999). O ferro férrico proveniente da Metemoglobina participa da reação de fenton, uma reação rápida, originando o ferro ferroso, este reage com o H_2O_2 , formando o radical $OH\cdot$. Esse radical inicia a peroxidação lipídica, onde tanto o Fe^{3+} e o Fe^{2+} catalisam hidroperóxidos lipídicos, respectivamente em radicais alcóxi ($LO\cdot$) e radicais peróxi ($LOO\cdot$), que levam a lesão hepática (Figura 23; FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Esse dano também pode ocorrer devido a degradação ou diminuição da disponibilidade da proteína ferritina, responsável em armazenar o ferro em seu núcleo, inibindo assim a reatividade do ferro e o seu acúmulo nos tecidos (STANKIEWICZ *et al.*, 2009).

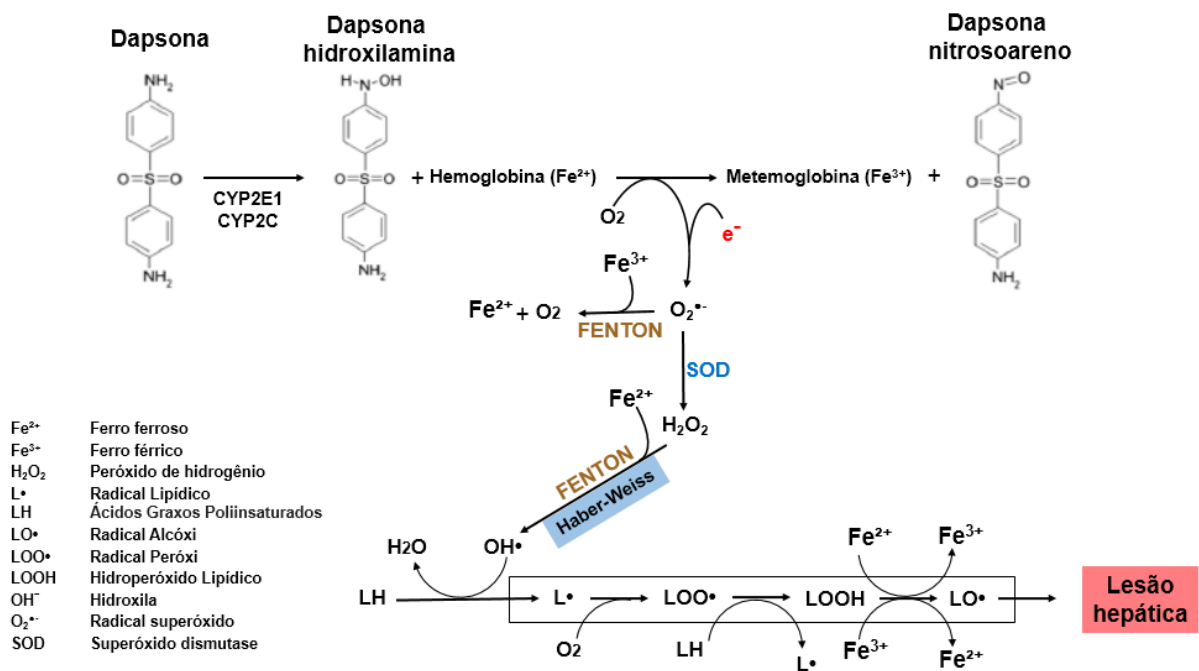


Figura 23: Estrutura proposta do mecanismo da formação do radical superóxido a partir da Dapsona hidroxilamina e da representação do processo da lesão hepática. Fonte: Adaptado de Veggi et al., 2008.

Através do efeito oxidativo da DDS no fígado em modelo animal, investigou-se o antioxidante ALA, quanto sua capacidade de reverter esse dano oxidativo. Estudos indicam que o ALA apresenta efeito redutor sobre o estresse oxidativo, principalmente a nível mitocondrial (EVANS e GOLDFINE, 2000). A forma reduzida do ALA, o ácido diidrolipóico ou ADHL é um potente redutor, pois quela metais como o ferro, elimina ERO e regenera outros antioxidantes, como ácido ascórbico, vitamina E e glutaciona (HAN *et al.*, 1995; XU e WELLS, 1996; GUO e PACKER, 2000).

Estudos de Ali et al. (2015) usaram sulfato ferroso em ratos, via intraperitoneal, dose de 5 mg/Kg, com intuito de provocar um acúmulo de ferro. O pós-tratamento foi feito com ALA, dose de 20 mg/Kg e determinando o acúmulo do ferro sérico. De acordo com os autores, essa dose conseguiu reverter o acúmulo de ferro, possivelmente, o ALA se acumulou no fígado, reduziu o radical OH[•], eliminou os radicais H₂O₂ e O₂^{•-}, e quelou o ferro através do grupo sulfidril presente na sua estrutura. Com isso, nossos resultados demonstraram que os grupos tratados com DDS e pós-tratados com ALA, na dose de 12,5 e 25 mg/Kg de 24 horas, ambos conseguiram reverter o acúmulo de ferro no fígado dos animais. De acordo com estudos o ALA consegue inibir a expressão da proteína transportadora de metal divalente 1, conseqüentemente a inibição da absorção do ferro nos enterócitos (CHEN et al., 2017). E Indiretamente, o ALA pode estimular a síntese do GSH ou induzir

mecanismo moleculares de antioxidantes via ativação da sirtuína 1, posteriormente a ativação do fator nuclear eritróide 2, e assim transcrevendo o superóxido dismutase e a Catalase (YANG *et al.*, 2014).

A reversão dos danos oxidativos ocasionados pela DDS, induzido pelo ALA foi comprovado na dosagem de MDA, onde os nossos dados mostraram o pós-tratamento com o ALA nas concentrações 12,5 e 25 mg/Kg de 4 horas, foram capazes de inibir a produção de MDA no fígado, induzidas pelo tratamento com DDS, mostrando que o ALA tem uma propriedade protetora, pois conseguiu reverter a lesão hepática induzida pelo fármaco. Possivelmente, o ALA pode ter sequestrado as ERO ou impedir outros mecanismos oxidativos induzidos por metais, inibindo assim a peroxidação lipídica.

A ação antioxidante do ALA também foi demonstrada na avaliação da capacidade antioxidante total, no qual o pós-tratamento com ALA nas concentrações de 12,5 e 25 de 4 horas, também foram capazes de reverter à diminuição na capacidade antioxidante induzida pelo tratamento com dapsona, mostrando que o ALA atua estimulando o sistema antioxidante enzimático e/ou não enzimático. Nesse contexto, nossos dados também mostraram que o pós-tratamento ALA 12,5 e 20 mg/Kg de 24 horas, também foram capazes de inibir o acúmulo de ferro no fígado ocasionada pelo tratamento com a DDS, mostrando que o ALA também pode atuar sobre outros mecanismos celulares, que levam a regulação dos níveis de ferro nos tecidos, assim como impedir a absorção do ferro pelo organismo.

7 CONCLUSÃO

Desta forma, conclui-se com este estudo que:

A dapsona induziu dano hepático, com aumento do Aspartato aminotransferase e da Fosfatase alcalina, assim como o estresse oxidativo, mediante o aumento de peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de glutathiona e de antioxidante total. Estes processos podem estar associados com o acúmulo de ferro hepático no organismo.

O pós-tratamento com o antioxidante Ácido alfa lipóico foi capaz de diminuir os níveis do Aspartato aminotransferase e da Fosfatase alcalina, reverter a peroxidação lipídica e elevar os níveis de GSH e antioxidantes totais. Além disso, o ALA também inibiu o acúmulo de ferro hepático, induzida pela dapsona em camundongos.

Dessa forma o Ácido alfa lipóico pode apresentar um potencial terapêutico na prevenção do dano hepático que podem ser ocasionados em pacientes com hanseníase, durante o tratamento com dapsona. Isso pode contribuir como alternativa de tratamento para prevenção de danos hepáticos ocasionados por fármacos oxidativos, como a dapsona.

8 REFERÊNCIAS

ABDEL-HAFEZ, H.Z.; MOHAMED E.E.M.; ABD-ELGHANY A.A.; Tissue and blood superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in leprosy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*; v. 24, p. 704-708, 2009.

ADAMCZYK-SOWA, M.; SOWA, P.; PIERZCHALA, K.; POLANIAK, R.; LABUZ-ROZAK, B. Antioxidative enzymes activity and malondialdehyde concentration during mitoxantrone therapy in multiple sclerosis patients. *J Physiol Pharmacol*, v.63, p.683-690. 2012.

AL ABDAN, M.; Alfa-Lipoic Acid Controls Tumor Growth and Modulates Hepatic Redox State in Ehrlich-Ascites-Carcinoma-Bearing Mice. *The Scientific World Journal*, 2012.

ALBUQUERQUE, R. D. F. V. D. Ação antioxidante do resveratrol e ácido α -lipóico no processo oxidativo induzido pelo metabólito dds-noh em eritrócitos de indivíduos saudáveis in vitro. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2013.

ALI, Y. F.; DESOUKY, O. S.; SELIM, N S.; EREIBA, K. M. Assessment of the role of α -lipoic acid against the oxidative stress of induced iron overload, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v. 8, n. 1, p. 26-35, 2015.

ALMADORI, G.; BUSSU, F.; GALLI, J.; LIMONGELLI, A.; PERSICHILLI, S.; ZAPPACOSTA, B. ET AL. Salivary glutathione and uric acid levels in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, v. 29, p. 648-654, 2007.

ALVES-RODRIGUES, E. N. et al. Dapsone syndrome with acute renal failure during leprosy treatment: case report. *Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 1, p. 84-86, 2005.

AMACHER, D.E. Serum Transaminase Elevations as Indicators of Hepatic Injury Following the Administration of Drugs, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v,27, 119-130, 1998.

AMAYA-FARFAN, J. et al. Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. *Rev. Nutr*, v. 14, n. 1, p. 71-78, 2001.

AMUKOYE, E. et al. Chlorproguanil-Dapsone: Effective Treatment for Uncomplicated Falciparum Malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 41, n. 10, p. 2261-2264, 1997.

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

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

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Química nova*, V. 29, n. 1, p. 113-126, 2006.

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

BARRETO, J.G. e SALGADO, C.G. Clinic-epidemiological evaluation of ulcers in patients with leprosy sequelae and the effect of low level laser therapy on wound healing: a randomized clinical trial. *BMC Infectious Diseases*, v.10, n.237, 2010.

BATTS, K.P. Iron overload syndromes and the liver. *Mod Pathol*, v.20, p.31-39, 2007.

BERTOLAMI, M. C. Mechanisms of hepatotoxicity. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 85, p. 25-27, 2005.

BLAZKA, M.E.; ELWELL, M.R.; HOLLADAY, S.D.; WILSON, R.E.; LUSTER, M.I. Histopathology of acetaminophen-induced liver changes: role of interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha. *Toxicol Pathol*, v.24, p.181–189, 1996.

BLAZKA, M.E.; WILMER, J.L.; HOLLADAY, S.D.; WILSON, R.E.; LUSTER, M.I. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.133, p.43–52,1995.

BOCK, E. e SCHNEEWEISS, J.: Ein Beitrag zur Therapie der neuropathia diabetic. *Munchner Med Wochenschrift*, v. 43, p.1911–1912, 1959.

BOOTH, S. A. et al. Dapsone suppresses integrin-mediated neutrophil adherence function. *Journal of investigative dermatology*, v. 98, n. 2, p. 135-140, 1992.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume 2 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Legislação da Saúde. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt1271_06_06_2014.html> Acessado em 28 de setembro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/11/Tabela%20Geral_12016.pdf> Acessado em 28 de setembro de 2017.

BRITTENHAM G.M.; BADMAN, D.G. Noninvasive measurement of iron: report of an NIDDK workshop. *Blood*, v.101, p.15–19, 2003.

BULMUS, F.G.; GURSU, M.F.; MUZ, M.H.; YAMAN, İ.; BULMUS, Ö.; SAKIN.; F. Protective Effects of Alpha-Lipoic Acid on Oleic Acid-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Balkan Medical Journal*, V.30, 2013.

BUSBY, R. W.; SCHELVIS, J. P. M.; YU, D.S.; BABCOCK, G. T.; MARLETTA, M. A. Lipoic acid biosynthesis: LipA is an iron–sulfur protein. *Journal of the American Chemical Society*, v. 121, p. 4706 – 4707, 1999.

CANÇADO, R.D.; FONSECA L.G.; CLARO, M.R.C.; TAJARA, FS.; LANGHI JUNIOR, D.M.; CHIATTONE, C.S. Avaliação laboratorial da deficiência de ferro em doadoras de sangue. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v.29, n.2, p.153-159, 2007.

CHEN, P.; LI, F-M.; ZHOU, Y-F.; QIAN, C.; LI, J.; JIANG, L-R.; QIAN, Z-M. Effects of alpha-lipoic acid on expression of iron transport and storage proteins in BV-2 microglia cells, *Pharmacological Reports*, v. 69, n. 1, p.1-5, 2017.

CICCOLI, L.; FERRALI, M.; ROSSI, V.; SIGNORINI, C.; ALESSANDRINI, C.; COMPORTI, M. Hemolytic drugs aniline and dapsone induce iron release in erythrocytes and increase the free iron pool in spleen and liver. *Toxicol Lett*, v.110, p.57–66, 1999.

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

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

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

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

CREMONESE, R.V. et al. Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation. *Arquivos de Gastroenterologia*, v.38, n.1, p.40-47, 2001.

DE DOMENICO, I., et al., Evidence for the multimeric structure of ferroportin. *Blood*, v.109, n.5, p. 2205-2209, 2007.

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

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

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

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

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

EI-SHENAWY, N. S.; HAMZA, R. Z.; ISMAIL, H. A. A.; KHALED, H E. Efficacy of α -lipoic Acid Against Oxidative Stress and Histopathological Changes Induced by Dimethylnitrosamine in Liver Male Mice. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 6: 102-112, 2016.

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

EVSTATIEV R., GASCHE C. Iron sensing and signalling. *Gut*, v. 61, n.6, p. 933-952, 2012.

FAIRBANKS, V.G., BEUTLER, E. Iron metabolism. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams- Hematology*. 6th ed. New York: Mcgraw-Hill, p. 295-304, 2001.

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

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB*. V.43, n.1, p.61-68, 1997.

FOO, N.P.; LIN, S.H.; LEE, Y.H.; WU, M.J.; WANG, Y.J. α -Lipoic acid inhibits liver fibrosis through the attenuation of ROS triggered signaling in hepatic stellate cells activated by PDGF and TGF- β . *Toxicology*, v.282, p.39-46, 2011.

FORD, P.G. Dapsone. *Current Problems in Dermatology*, v. 12, n.5, p. 242-245, Sept./Oct. 2000.

GANZ, T.; NEMETH, E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, v. 1823, n. 9, p.1434-43, 2012.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim Biophys Acta*, v.1271(2-3), p. 321-326, 1995.

GARG, K.N.; RAJ, V.; CHANDRA, S. Trends in frequency and duration of tobacco habit in relation to potentially malignant lesion: a 3 years retrospective study. *J Oral Maxillofac Pathol*, v.17, p.201-206, 2013.

GAYOTTO, L.C. da C. *Doenças do fígado e vias biliares*. 1ª Edição. Editora Atheneu. São Paulo, 2001.

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

GODOY, M.F.; et al. *Ferritina Sérica e Coronariopatia Obstrutiva: Correlação Angiográfica*. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Rio Preto – São José – São Paulo, v.88, nº 4, p.430-433. 2007.

GONZALEZ F.H.D.; SILVA, S.C. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. c. 8, p. 318-337, 2006.

GORACA, A.; HUK-KOLEGA, H.; PIECHOTA, A.; et al. Lipoic acid -biological and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*, v. 63, p. 849-58, 2011.

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

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

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, v.53, Suppl. 1, p. 110-118, 2004.

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

GROTTO, H.Z.W. Fisiologia e metabolismo do ferro. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Campinas – SP, v.32, n. 2, p.8-17, 2010.

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

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

GUJJA, P.; ROSING, D.R.; TRIPODI, D.J.; SHIZUKUDA Y. Iron Overload Cardiomyopathy, Better Understanding of An Increasing Disorder. Journal of the American College of Cardiology, v.56, n.13, p.1001-1012, 2010.

GUO, Q.; PACKER, L. Ascorbate-dependent recycling of the vitamin E homologue trolox by dihydrolipoate and glutathione in murine skin homogenates Free Radical Biology and Medicine, v.29, p. 368-374, 2000.

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

HAGYMASI, K.A. et al. Oxidative damage in alcoholic liver disease. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, v.13, n.1, p.49-53, 2001.

HALKHATEEB, A.A.; CONNOR, J.C. Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology. Biochimica and Biophysica Acta. Elsevier. USA, v.1800, p. 793-797, 2010.

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

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

HAMDY, A. A. A.; AHMED, M. M.; MEMY, H. H.; MOHAMED, F. A. Lipoic Acid Attenuates Aroclor 1260-Induced Hepatotoxicity in Adult Rats, Environ Toxicol, v.31, p.913–922, 2014.

HAN, D.; TRITSCHLER, H. J.; Packer, L. α -lipoic acid increases intracellular glutathione in human T-lymphocyte Jurkat cell line Biochemical and Biophysical Research Communications, v.207, p. 258-264, 1995.

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

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

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

HOFFBRAND, A.V., PETTIT, F.E., Moss PAH. *Essential Haematology*. Oxford (UK): Blackwell Publishing. Chapter 3, Hypochromic anaemias and iron overload, v.5, p. 28-43, 2006.

HUFFMYER, J.L.; NEMERGUT, E.C. Respiratory dysfunction and pulmonary disease in cirrhosis and other hepatic disorders. *Respiratory Care*, v.52, n.8, p.1030-1036, 2007.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, 2017.

Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intake for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. Washington DC: National Academic Press; 2002.

ISHIDA, Y.; KONDO, T.; OHSHIMA, T.; FUJIWARA, H.; IWAKURA, Y.; MUKAIDA N. A pivotal involvement of IFN-gamma in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J*, v.16, p.1227-1236, 2002.

JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: present concepts. *J of gastroent hepatol.*, v. 26, n. s1, p. 173-179, 2011.

JAESCHKE, H.; MCGILL, M. R.; RAMACHANDRAN, A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity *Drug Metab. Rev.*, v.44, p. 88-106, 2012.

JAMES, L. P.; MAYEUX, P.R.; HINSON, J.A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*, v. 31, p.1499-506, 2003.

JENKINS, R. R. Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Int J Sport Nutr*, v.3, p.356-375, 1993.

JOHNSON, D. A.; CATTANU Jr.E.L.; KURITSKY, J.N.; ZIMMERMAN, H.J. Liver involvement in the sulfone syndrome. *Archives of Internal Medicine*, v. 146, p. 5 875-877, 1986.

KILLILEA, D. W.; ATAMNA, H.; LIAO, C.; AMES, B.N. Iron accumulation during cellular senescence in human fibroblasts in vitro. *Antioxid Redox Signal*. v. 5, n.5, p. 507-516, 2003.

KORACEVIC, D.; KORACEVIC, G.; DJORDJEVIC, V.; ANDREJEVIC, S.; COSIC, V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology*, v.54, n.5, p.356-361, 2001.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr*, v.16, n.4, p.433-41, 2003.

KRAMER, K.; HOPPE, P.; PACKER, L. In *R-a-Lipoic Acid*; Krämer, K.; Packer, L., eds.; Marcel Dekker Inc, chapter 9, 2001.

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

KRISHNAMURTHY, P.; XIE, T.; SCHUETZ, J. D. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther*, v.114, n.3, p.345-358, 2007.

KRAMER, P. A.; GLADER, B. E.; LI, T. K. Mechanism of methemoglobin formation by diphenylsulfones. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v.21, p.1265-1274, 1972.

KURATA, M.; SUZUKI, M.; AGAR, N.S. Antioxidant systems and erythrocyte life span in mammals. *Comp Biochem Phys B*, v.106, p.477-487, 1993.

KWIECIEN, S.; BRZozowski, T.; KONTUREK, P.C, et al. The role of reactive oxygen species and capsaicin-sensitive sensory nerves in the pathomechanisms of gastric ulcers induced by stress. *J Physiol Pharmacol*, v.54, p.423-437, 2003.

KWIECIEN, S.; BRZozowski, T.; KONTUREK, S. J. Importance of aldehyde products of lipid peroxidation in the formation of gastric lesions induced by aspirin, ischemia-reperfusion and stress. *Gastroenterol Pol*, v.9, p.273-280, 2002.

KWIECIEN, S.; PAWLIK, M. W.; BRZozowski, T.; PAWLIK, W. W.; KONTUREK, S. J. Reactive oxygen metabolite action in experimental, stress model of gastric mucosa damage. *Gastroenterol Pol*, v.17, p.234-243, 2010.

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

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

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

LEVENSON, C.W.; TASSABEHJI, N. M. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. *Ageing Res Rev*, v.3, n.3, p.251-263, 2003.

MAGALHAES, J. O uso de cosmeticos atraves dos tempos, envelhecimento cutâneo. In: *Cosmetologia: com questões de avaliação*. Rio de Janeiro, p.33-42, 2000.

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

MARAGON, K.; DEVARAJ, S.; TIROSH, O.; PACKER, L.; JIALAL, I. Comparison of the effect of alphas-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. v.27, p. 1114-1121, 1999.

MATOS, L.C. e MARTINS, B. Hepatites tóxicas: revisão da literatura. *Med Intern*, v.12, n.4, p. 239-58, 2005.

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

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

MINUK, G.Y. Canadian Association of Gastroenterology Practice Guidelines: evaluation of abnormal liver enzyme tests. *Canadian Journal of Gastroenterology*, v.12, n.6, p.417-421, 1998.

MIRET, S.; SIMPSON, R.J.; MCKIE, A.T. Physiology and Molecular Biology of Dietary Iron Absorption. *Ann Rev Nutr*.23: 283-301, 2003.

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

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

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

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

MOTTA, V. T. *Bioquímica clínica: princípios e interpretações*. Editora: Médica Massau, 2000.

MURIEL, P. e GORDILLO, K.R. Role of Oxidative Stress in Liver Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

NEIL, K. Biochemical and Cellular Mechanisms of Toxic Liver Injury. *Semin Liver Dis*, v.22, n.2, p.137-144, 2002.

NICOLAS, G., et al., The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*, v. 110, n.7, p. 1037-1044, 2002.

NIU, C. et al. Hyperin protects against cisplatin-induced liver injury in mice. *Acta Cir. Bras.* [online], v.32, n.8, p.633-640, 2017.

NORDBERG, J. e ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

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

ORMSTAD, K. e ORRENIUS, S. "Metabolism of Extracellular Glutathione in Small Intestine and Kidney," in *Reference*, v. 44, p.107-125, 1980.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, v.245, n.3, p.194–205, 2008.

PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha lipoic acid as biological antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.* v.19, p.227–250, 1995.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem*, v.30, p.11–26, 2015.

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

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

PENNA G. O.; B-S, S.; KERR L. R. S.; STEFANI, M. M. d. A.; RODRIGUES, L. C.; DE ARAUJO, M. G., et al. Uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil (U-MDT/CT-BR): Results of an open label, randomized and controlled clinical trial, among multibacillary patients, 2017.

PEREIRA-FILHO, G. et al. Role of N-ace tylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arquivos de Gastroenterologia*, v.45, n.2, p.156-162, 2008.

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

PIERRE, J.L. e FONTECAVE, M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *BioMetals*, v.12, p.195-199, 1999.

PIETRANGELO A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol*, v.54, n.1, p.173-181, 2011.

PONKA, P. Iron Metabolism: Physiology and Pathophysiology. *The J Trace Elements in Experimental Medicine*, v. 13, p. 73-83, 2000.

PRASAD, P.D. e GANAPATHY, V. Structure and function of mammalian sodium-dependent multivitamin transporter. *Curr.Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, v. 3, p. 263–266, 2000.

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

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

RASHEED, M.H.; BEEVI, S.S.; GEETHA, A. Enhanced lipid peroxidation and nitric oxide products with deranged antioxidant status in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, v.43, p.333-338, 2007.

REAGAN, W.J.; YANG, R.Z.; PARK, S.; GOLDSTEIN, R.; BREES, D.; GONG, D. Metabolic Adaptive ALT Isoenzyme Response in Livers of C57/BL6 Mice Treated with Dexamethasone. *Toxicologic pathology*, v.40, n.8, p.1117-1127, 2012.

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

REED, L.J., DE BUSK, B.G., GUNSALUS, I.C., HORNBERGER, C.S.: Crystalline alpha-lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*, v.114, p.93–94, 1951.

REID, A.B.; KURTEN, R.C.; MCCULLOUGH, S.S.; BROCK, R.W.; HINSON, J.A.: Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. V. 312, p.509-516, 2005.

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

RODRIGUES, L. P.; JORGE, S. R. P. F. Deficiência de ferro na mulher adulta. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São Paulo, v. 32, supl. 2, p. 49-52, 2010.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, v.24, n. 1, p.112-119, 2001.

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

SAAD, E.I.; EI-GOWILLY, S.M.; SHERHAA, M.O.; BISTAWROOS, A.E. Role of oxidative stress and nitric oxide in the protective effects of -lipoic acid and

aminoguanidine against isoniazid-rifampicin-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol*, v.48, p.1869–1875, 2010.

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

SALGADO, C.G.; PINTO, P.; BOCA R.C.; et al. miRNome Expression Analysis Reveals New Players on Leprosy Immune Physiopathology. *Frontiers in Immunology.*, v.9: 463, 2018.

SALGADO, C. G.; et al. Are leprosy case numbers reliable? *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 2, p.135–137, 2018.

SALONEN, J.T.; NYSSONEN, K.; KORPELA, H.; TUOMILEHTO, J.; SEPPANEN, R.; SALONEN, R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation*, v.86, p.803-811,1992.

SANTOS, M. H. dos et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). *Quím. Nova* [online], vol.30, n.3, p.604-610, 2007.

SASAKI, E.; IWAMURA, A.; TSUNNEYAMA, K.; FUKAMI, T.; NAKAJIMA, M.; KUME T.; YOKOI, T. Role of cytochrome P450-mediated metabolism and identification of novel thiol-conjugated metabolites in mice with phenytoin-induced liver injury, *Toxicology Letters*, v. 232, n. 1, p. 79-88, 2015.

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

SHARMAN, J.E.; GUNARUWAN, P.; KNEZ, W.L.; et al. Alpha-lipoic acid does not acutely affect resistance and conduit artery function or oxidative stress in healthy men. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.58, n.3, p. 243-248, 2004.

SHAYEGHI, M., et al., Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, v.122, n.5, p.789-801, 2005.

SIAN, J.; DEXTER D.T.; LEES, A.J.; DANIEL, S.; AGID, Y.; JAVOY-AGID, F.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia *Ann Neurol*, v.36, p.348–355, 1994.

SIAN-HULSMANN, J.; MANDEL, S.; YODIM, M.B.; RIEDERER, P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*, v.118, p.939–957, 2011.

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

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

SMITH, A. R.; SHENVI, S. V.; WIDLANSKY, M.; SUH, J. H.; HAGEN, T. M. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, v. 11, p. 1135–1146, 2004.

SNELL, E.E., STRONG F.M., PETERSON W.H.: Growth factor for bacteria.VI Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacteria. *Bichem J* 31:1789–1799, 1933.

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

STANKIEWICZ, J.M. e S.D.; BRASS. Role of iron in neurotoxicity: a cause for concern in the elderly? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v.12, n. 1, p. 22-9, 2009.

SUN, L.; SHEN, W.; LIU, Z.; GUAN, S.; LIU, J.; DING, S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients, *Life Sciences*, v. 86, n. 1, p. 39-44, 2010.

SUN, L.Q.; CHEN, Y.Y.; WANG, X.; LI, X.J.; XUE, B.; QU, L.; ZHANG, T.T.; MU, Y.M.; LU, J.M. The protective effect of a-lipoic acid on Schwann cells exposed to constant or intermittent high glucose. *Biochem Pharmacol*, v. 84, p.961–973, 2012.

SURESH, D. R.; ANNAM, V.; PRATIBHA, K.; PRASAD, B. V. Total antioxidant capacity—a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *J. Biomed. Sci*, v.16, n.61, 2009.

SWARAN, J. S. F. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid. Med. Cell. Longev. Austin*, v. 2, n.4, p. 191-206, 2009.

TABASSUM, H.; PARVEZ, S.; PASHA, S.T.; BANERJEE, B.D.; RAISUDDIN, S. Protective effect of lipoic acid against methotrexate-induced oxidative stress in liver mitochondria. *Food Chem Toxicol*, v.48, p.1973–1979, 2010.

TAJIRI, K. e SHIMIZU, Y. Practical guidelines for diagnosis and early management of drug-induced liver injury. *World J Gastroenterol*, v.14, n.44, p.6774–6785, 2008.

TAYYEM, R.F.; HEATH, D.D.; AL-DELAIFY, W.K.; ROCK, C.L. Curcumin content of turmeric and curry powders. *Nutrition and Cancer*, v.55, p.126–131, 2006.

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

THAMES, G. Drug-induced liver injury: what you need to know. *Gastroenterol Nurs*, v.27, p.31–33, 2004.

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

TIAN, Y.F.; HE, C.T.; CHEN, Y.T.; HSIEH, P.S. Lipoic acid suppresses portal endotoxemia-induced steatohepatitis and pancreatic inflammation in rats. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v.19, n.18, p.2761-2771, 2013.

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

TURGUT, G.; ENLI, Y.; KAPTANOGLU, B.; TURGUT, S.; GENÇ, O. Changes in the levels of MDA and GSH in mice. *Eastern Journal of Medicine*, v.11, n. 1, p. 7-12, 2006.

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

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

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, v.160, p.1-40, 2006.

VARELA, E. L. P. Efeito protetor de antioxidantes na formação da metemoglobina induzida pelo metabólito dapsona-hidroxilamina in vitro. *Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2017.*

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

VASDEV, S.; FORD, C.A.; PARAI, S.; LONGERICH, L.; GADAG, V. Dietary lipoic acid supplementation prevents fructose-induced hypertension in rats. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v.10, n.6, p.339–346, 2000.

VEGGI, L. M.; PRETTO, L.; OCHOA, E. J.; CATANIA, A. V.; LUQUITA, M. G.; TABORDA, D. R.; SÁNCHEZ POZZI, E. J.; IKUSHIRO, S.; COLEMAN, M. D.; ROMA, M. G.; MOTTINO, A.D. Dapsone induces oxidative stress and impairs antioxidant defenses in rat liver, *Life Sciences*, v. 83, n. 5, p.155-163, 2008.

VEGGI, L. M.; CROCENZI, F. A.; ROMA, M. G.; DAWSON, P. A.; PELLEGRINO, J. M.; POZZI, E. J. S.; MOTTINO, A. D. Dapsone-induced cholestasis and impairment of bile salt output in the rat, *Biochemical Pharmacology*, v. 63, n. 8, p. 1553-1563, 2002.

VIDELA, L. A. Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. *World J. Hepatol*, v. 1, p.72–78, 2009.

VIERA, E. K. O efeito da quercetina no estresse oxidativo sistêmico em ratos cirróticos. 71f. 2008. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2008.

VIJAYARAGHAVAN, R.; SURIBABU, C.S.; SEKAR, B.; OOMMEN, P.K.; KAVITHALAKSHMI, S.N.; MADHUSUDHANAN, N.; PANNEERSELVAM, C. Protective role of vitamin E on the oxidative stress in Hansen's disease (Leprosy) patients. *Eur J Clin Nutr*; v. 59, p.1121–1128, 2005.

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

WHITEHEAD, M.W.; HAWKES, N.D.; HAINSWORTH, I.; KINGHAM, J.G. A prospective study of the causes of notably raised aspartate aminotransferase of liver origin. *Gut*, v.45, n.1, p.129–133, 1999.

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

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

WOLLIN, S. D. e JONES, P. J. H. Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition.*, v. 133, p. 3327-3330, 2003.

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

XU, D. P. E. e WELLS, W. α -Lipoic acid dependent regeneration of ascorbic acid from dehydroascorbic acid in rat liver mitochondria *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.28, p. 77-85, 1996.

XU, Q.; HIGGINS, T.; CEMBROWSKI, G.S. Limiting the testing of AST: a diagnostically nonspecific enzyme. *Am J Clin Pathol*, v.144, p.423–426, 2015.

YANG, Y.; LI, W.; LIU, Y.; SUN, Y.; LI, Y.; YAO, Q.; LI, J.; ZHANG Q.; GAO, Y.; GAO, L.; ZHAO, J. Alpha-lipoic acid improves high-fat diet-induced hepatic steatosis by modulating the transcription factors SREBP-1, FoxO1 and Nrf2 via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 25, n.11, 2014.

ZHANEL G. G. e DEL ROSSO, J.Q. Activity of Dapsone versus Community and Hospital Pathogens from the CANWARD Study. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. V. 9, n.3: 42-47, 2016.

ZHU, Y.I. e STILLER, M.J. Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 45, n.3, p.420–434, 2001.

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

ANEXO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA



UFPA
Universidade Federal do Pará

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ACIDO LIPÓICO NA FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA E ALTERAÇÕES NEUROCOMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA DAPSONA EM MODELO IN VIVO", protocolada sob o CEUA nº 2411100816, sob a responsabilidade de **Marta Chagas Monteiro e equipe; Marta Chagas Monteiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 29/09/2016.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF LIPOIC ACID IN METHEMOGLOBIN FORMATION AND NEUROBEHAVIORAL CHANGES INDUCED BY DAPSONE IN VIVO", utilizing 105 Isogenics mice (105 males), protocol number CEUA 2411100816, under the responsibility of **Marta Chagas Monteiro and team; Marta Chagas Monteiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 09/29/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2016** a **12/2017** Área: **Neurociências**

Origem: **Biotério Central ICB/UFPA**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 6 semanas**

N: **105**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: **LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA, INFLAMAÇÃO E COMPORTAMENTO (LAFICO) E LABORATÓRIO DE ENSAIOS IN VITRO, IMUNOLOGIA E MICROBIOLOGIA (LBEIM)**

Belé, 28 de outubro de 2017

Marta Chagas Monteiro

Profa. Dra. **Maria Vivina Barros Monteiro**
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Vanessa Joia de Mello

Profa. Dra. **Vanessa Joia de Mello**
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará