



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E INFLAMATÓRIAS INDUZIDAS
PELA DAPSONA NO SANGUE E NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE
CAMUNDONGOS: EFEITOS DO ÁCIDO ALFA-LIPÓICO**

BRUNO ALEXANDRE QUADROS GOMES

BELÉM-PA
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E INFLAMATÓRIAS INDUZIDAS
PELA DAPSONA NO SANGUE E NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE
CAMUNDONGOS: EFEITOS DO ÁCIDO ALFA-LIPÓICO**

BRUNO ALEXANDRE QUADROS GOMES

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (PPGNBC), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA), como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.
Área de concentração: Neurociências.
Orientadora: Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro.

BELÉM-PA
2018

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

- G633a Gomes, Bruno Alexandre Quadros.
Alterações oxidativas e inflamatórias induzidas pela dapsona no sangue e no Cortex Pré-frontal de camundongos: Efeitos do ácido alfa-lipóico / Bruno Alexandre Quadros Gomes. — 2018.
130 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^ª. Dra. Marta Chagas Monteiro
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
1. Dapsona; ácido lipóico; hanseníase; estresse oxidativo. I. Título.

CDD 610

BRUNO ALEXANDRE QUADROS GOMES

ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E INFLAMATÓRIAS INDUZIDAS PELA DAPSONA NO SANGUE E NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS: EFEITOS DO ÁCIDO ALFA-LIPÓICO

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (PNBC), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA), como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro- Orientadora
Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (PNBC-UFPA)

Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado- 1º avaliador
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFPA)

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira- 2º avaliador
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFPA)

Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior- 3º avaliador
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFPA)

Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia- Suplente
Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (PNBC-UFPA)

Julgado em: ____/____/____/

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio Gomes e Josefa Quadros, *in memoriam*, pelo pela inestimável contribuição para a minha educação, personalidade e apoio incondicional na minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus:

Pela minha Esposa, Ana Capistrano, e minha Filha, Antonella, que têm sido minha base sólida, pelo amor, apoio emocional e companheirismo, o que me deu forças para enfrentar todas as dificuldades surgidas no desenvolvimento deste trabalho;

Pela Professora Dra. Marta Chagas Monteiro por sua dedicação, paciência e grande sabedoria na orientação desta tese;

Pela Universidade Federal do Pará (UFPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências (PPGNBC-UFPA) pelo suporte técnico-científico fornecido para a longa jornada de minha formação como pesquisador;

Pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado, o que foi crucial para o desenvolvimento deste trabalho;

Pelos integrantes do Laboratório de Ensaio in vitro, Imunologia e Microbiologia (LABEIM) pelo apoio nas práticas laboratoriais, em especial ao grupo do Estresse oxidativo (Sávio, Pricila, Paulo, Carol, Everton e Joni);

Pelo Professor Dr. Rafael Lima e seus alunos do LABEF (Rafael e Marcio), pelo auxílio na coleta das amostras cerebrais;

Pelo Professor Dr. Pedro Romão, que realizou as dosagens de citocinas e BDNF;

Pelo Professor Dr. Romeu Burbano gentilmente permitiu as análises de citometria de fluxo;

Pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) que forneceu os camundongos para os experimentos;

Por todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"Antes que você possa alcançar o topo de uma árvore e entender os brotos e as flores, você terá de ir fundo nas raízes, porque o segredo está lá. E, quanto mais fundo vão as raízes, mais alto vai a árvore".

Friedrich Nietzsche.

RESUMO

A dapsona (DDS), um fármaco utilizado na poliquimioterapia da hanseníase, pode provocar muitas reações adversas e intoxicações, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e desequilíbrio no estado redox, levando a um aumento na formação de metemoglobina (MetHb), hemólise e liberação de heme e ferro livre, o qual pode interferir na homeostase redox em tecidos mais vulneráveis, como o córtex pré frontal (PFC), causando neurotoxicidade e até neuroinflamação. Nesse sentido, compostos antioxidantes com propriedades quelantes, como o ácido α -lipóico (ALA) podem ter papel fundamental no combate ou prevenção dessas alterações. Assim, este trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito da DDS sobre a formação de MetHb, estresse oxidativo periférico e alterações oxidativas e neuroinflamatórias no PFC, bem como os efeitos do ALA. Para isso, foi induzida a formação de MetHb em camundongos Swiss com DDS 40mg/kg ip durante 5 dias. Duas horas após a administração de DDS, foi administrado ALA em duas concentrações (12,5 e 25 mg/kg). Além do percentual de MetHb, foram avaliadas a capacidade antioxidante (TEAC), concentração de glutatona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e concentrações de ferro, no sangue e no PFC, bem como as concentrações de IL-1 β , IL-17 e IL-4 e, expressão de F4/80⁺, GFAP, e BDNF no PFC. Nossos resultados mostraram que DDS induz a formação de MetHb nos eritrócitos dos camundongos, no entanto, ALA foi capaz de prevenir ou reverter a oxidação da hemoglobina induzida pela DDS nas duas concentrações utilizadas. DDS reduziu a capacidade antioxidante (TEAC) no plasma e nos eritrócitos; diminuiu as concentrações de GSH, CAT e SOD nos eritrócitos; e aumentou de TBARS e ferro plasmático; no entanto, ALA nas duas concentrações aumentou ou reestabeleceu TEAC no plasma e nos eritrócitos aos níveis basais. Além de aumentar ou reestabelecer os níveis intraeritrocitários de GSH, SOD e CAT; e reduziu os níveis de TBARS e ferro, especialmente nos animais eutanasiados 4h após os tratamentos. O tratamento com DDS 40mg/kg também reduziu TEAC, GSH, CAT e SOD no PFC dos camundongos e aumentou TBARS e ferro, caracterizando estresse oxidativo, especialmente nos animais eutanasiados 24h após os tratamentos. O tratamento com ALA aumentou ou restabeleceu TEAC e GSH, aumentou SOD e CAT na concentração de 12,5mg/kg nos grupos com eutanásia em 4h, bem como, reduzir os níveis de TBARS e de diminuir ou prevenir a sobrecarga de ferro, especialmente nos grupos eutanasiados em 24h. DDS também promoveu ativação microglial e astrocitária no PFC, a partir da expressão de F4/80⁺ e GFAP, respectivamente, com produção de IL-1 β e IL-4, e redução de BDNF, no entanto, ALA 25mg/kg reduziu a expressão de GFAP e IL-1 β , além do aumento de BDNF, sugerindo que DDS também pode causar neuroinflamação e que ALA apresenta atividades anti-inflamatórias e antioxidantes benéficas contra a toxicidade induzida por DDS. Esses resultados sugerem que o ALA é promissor e tem um importante papel na prevenção e/ou formação de MetHb, no restabelecimento do equilíbrio redox e das concentrações de ferro, tanto no sangue como no PFC. Assim, ALA pode ser uma alternativa terapêutica viável na toxicidade induzida por DDS, com menor toxicidade e aumentando a adesão ao tratamento de pacientes com hanseníase.

PALAVRAS-CHAVE: dapsona, ácido α -lipóico, hanseníase, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Dapsone (DDS), a drug used in leprosy multidrug therapy, can cause many adverse reactions and intoxications, inducing the generation of reactive oxygen species (ROS) and imbalance in the redox state, increase methemoglobin (MetHb) formation, hemolysis and release of heme and iron free, which may interfere with redox homeostasis in more vulnerable regions, such as prefrontal cortex (PFC), causing neurotoxicity and even neuroinflammation. In this sense, antioxidant compounds with chelating properties such as α -lipoic acid (ALA) may play a key role in combating or preventing these alterations. Thus, this work aims to evaluate the effect of DDS on MetHb formation, peripheral oxidative stress, and oxidative changes and neuroinflammation in PFC, as well as, effects of ALA. For this, was induced MetHb formation in Swiss mice with DDS 40mg/kg ip for 5 days. Two hours after DDS administration, ALA was given at two concentrations (12.5 and 25 mg/kg). Besides MetHb percentage, total equivalent antioxidant capacity (TEAC), reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and iron concentrations in blood and PFC were evaluated, as well as, IL-1 β , IL-17, and IL-4 cytokine concentrations, and de F4/80⁺, GFAP, and BDNF expression in PFC. Our results show that DDS induces the MetHb formation in red blood cells of mice, however, ALA was able to prevent or reverse the oxidation of hemoglobin induced by DDS at two used concentrations. DDS reduced antioxidant capacity (TEAC) in plasma and red blood cells; decreased erythrocyte GSH, CAT, and SOD; and increased TBARS and plasma iron; however, ALA at two concentrations increased or reestablished TEAC in plasma and red blood cells at baseline levels. In addition to increasing or reestablishing GSH levels, SOD, and CAT in red blood cells, and decreased TBARS and iron levels, mainly in euthanized animals 4h after treatment. Curiously ALA 50mg/kg increased plasma iron concentrations. The treatment with DDS 40mg/kg also reduced TEAC, GSH, SOD e CAT in the PFC of the mice and increased TBARS and iron, characterizing oxidative stress, mainly in euthanized animals in 24h after treatment. Treatment with ALA increased or restored TEAC and GSH; and increased SOD and CAT in 12,5mg/kg concentration in euthanized animals 4h after treatment, as well as reducing TBARS levels and decreasing or preventing iron overload, mainly in euthanized animals 24h after treatment. DDS also promoting microglial and astrocyte activation in PFC, through F4/80⁺ e GFAP expression., with increased IL-1 β and IL-4 production, and BDNF reduction, on the other hand, ALA 25mg/kg reduced GFAP and IL-1 β expression, besides increased BDNF, suggesting that DDS also can cause neuroinflammation, and ALA presents antioxidant and anti-inflammatory properties against toxicity caused by DDS. These results suggest that ALA is promising and plays an important role in the prevention and/or formation of MetHb, reestablishment of redox balance and iron concentrations in both blood and PFC. Thus, ALA may be a usefull adjuvant therapy in DDS-induced toxicity, with lower toxicity and increasing adherence to treatment of leprosy patients.

KEY WORDS: dapsone, α -lipoic acid, leprosy, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processos de reconhecimento do <i>M. leprae</i> pela célula de Schwann e macrófagos e diferenciação da resposta imune.	22
Figura 2: Vias da defesa antioxidante durante o estresse oxidativo na hanseníase.	24
Figura 3: Hemólise e liberação da hemoglobina em pacientes com hanseníase.	25
Figura 4: Estrutura química da Dapsona, mostrando um grupo sulfonil (SO ₂) e dois grupos arilamina (AR-NH ₂).	27
Figura 5: Mecanismo antimicrobiano da DDS no interior de micro-organismos susceptíveis, como o <i>M. leprae</i> .	29
Figura 6: Mecanismos de bioativação e detoxificação de DDS.	31
Figura 7: Interconversão de glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px) e glutatona redutase (GR).	32
Figura 8: A hemoglobina consiste em um grupo prostético, heme, e o protético, representado pelas cadeias de globina α e β .	33
Figura 9: Mecanismo de formação espontânea da MetHb.	34
Figura 10: A via de <i>Embden-Meyerhofe</i> e via das pentoses-fosfato, responsáveis pela produção de NADH e NADPH, respectivamente.	35
Figura 11: Representação esquemática do ciclo de formação da metemoglobina nos eritrócitos a partir da indução da DDS-NOH (dapsona hidroxilamina).	37
Figura 12: Mecanismo de proteção do sistema antioxidante dos eritrócitos a partir da produção de espécies reativas de oxigênio e produção de metemoglobina.	39
Figura 13: Mecanismos de transporte e absorção do ferro no tecido cerebral (Ward <i>et al.</i> 2014).	43
Figura 14: Mecanismos da Reação de Fenton e Haber-Weiss que resulta na produção do radical hidroxila (\cdot OH) e morte neuronal.	44
Figura 15: Peroxidação lipídica causada pelo radical OH \cdot , formado na reação de Fenton.	45
Figura 16: Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e formação de ERO nos complexos I e III.	47

Figura 17: Prováveis vias de redução da metemoglobina, sendo que a principal via fisiológica é a do citocromo b5 redutase. No entanto, essa redução também pode ser feita pela via exógena com o uso de azul de metileno.	53
Figura 18: Estrutura química do ácido α -lipóico (ALA) e de sua forma reduzida, o ácido dihidrolipóico (ADHL).	55
Figura 19: Representação esquemática do delineamento experimental.	60
Figura 20: Representação esquemática da determinação do percentual de Metemoglobina.	62
Figura 21: Representação esquemática da determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC).	63
Figura 22: Representação esquemática da determinação da glutatona reduzida (GSH).	64
Figura 23: Procedimento para determinação da superóxido dismutase (SOD).	65
Figura 24: Procedimento para determinação da atividade da enzima catalase.	66
Figura 25: Representação esquemática da dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).	67
Figura 26: Procedimento para determinação do ferro sérico e no córtex pré-frontal.	68
Figura 27: Procedimento para determinação da expressão de células macrófágicas/microglial (F4/80 ⁺) e astrócitos (GFAP) por citometria de fluxo.	69
Figura 28: Procedimento para determinação da expressão de citocinas IL-1 β , IL-17 e IL-4, bem como de BDNF pelo método de ELISA.	70
Figura 29: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a formação de metemoglobina (MetHb) no sangue de camundongos e do pós-tratamento com ALA em diferentes concentrações (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos.	71
Figura 30: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a capacidade antioxidante total (TEAC) nas hemácias de camundongos e do pós-tratamento com ALA em diferentes concentrações (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos.	72
Figura 31: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) nas hemácias de camundongos e do pós-	73

tratamento com ALA em duas concentrações (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos.

Figura 32: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações de Superóxido Dismutase (SOD) nas hemácias de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas concentrações (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. **74**

Figura 33: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações de Catalase (CAT) nas hemácias de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas concentrações (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. **75**

Figura 34: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a capacidade antioxidante total (TEAC) no plasma de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas concentrações (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. **76**

Figura 35: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) na geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas concentrações (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. **77**

Figura 36: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações séricas de ferro (Fe) em camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas concentrações (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. **78**

Figura 37: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a capacidade antioxidante total (TEAC) no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas concentrações (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. **79**

Figura 38: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações de glutationa reduzida (GSH) no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA em diferentes concentrações (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. **80**

Figura 39: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações de Superóxido Dismutase (SOD) no PFC de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas concentrações (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. **81**

Figura 40: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações de Catalase (CAT) no PFC de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas concentrações (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), por 5 dias. **82**

Figura 41: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) na geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex pré-frontal (PFC) de **83**

camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas concentrações (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), por 5 dias consecutivos.

Figura 42: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações de ferro no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA em diferentes concentrações (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), po 5 dias. **84**

Figura 43: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a expressão de F4/80⁺ e GFAP no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA 25mg/kg, durante 5 dias consecutivos. A: Resultado da expressão F4/80⁺ e GFAP por citometria de fluxo; B: Gráficos do percentual da expressão dos marcadores F4/80⁺ e GFAP. **86**

Figura 44: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a concentração de citocinas IL-1 β e IL-4 e BDNF no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA 25mg/kg, durante 5 dias consecutivos. **87**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e antioxidantes. **30**

Tabela 2- Manifestações clínicas associadas aos níveis de MetHb. **36**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS^{•+} - radical 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato]

ALA - ácido α -lipóico

AM- Azul de metileno

BB - Borderline Borderline

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BHE - barreira hematencefálica

BL - Borderline Lepromatosa

BT - Borderline Tuberculóide

CAT - catalase

CTE - cadeia transportadora mitocondrial de elétrons

DDS – dapsona

DDS-NOH - dapsona hidroxilamina

DHLA - ácido dihidrolipóico

DMT-1 -transportador divalente de metal 1

DTNB - ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

ERN - espécies reativas de nitrogênio

ERO - espécies reativas de oxigênio

Ft - ferritina

G6PD - glicose 6-fosfato desidrogenase

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial

GPx - glutaciona peroxidase

GR - glutaciona redutase,

GSH - glutaciona reduzida

GSSG - glutaciona oxidada

GST - glutaciona S-transferase

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

4-HNE - 4-hidroxinonenal

IFN- γ - Interferon-gama

IL-1 β – interleucina 1 beta

IL-4 – interleucina 4

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

LL - Lepromatosa Lepromatosa
LO[•] - radical alcoxila
LOO[•] - radical peroxila
MADDS-NOH - Monoacetildapsona-hidroxilamina
MB - multibacilar
MDA - malondialdeído
MetHb - metemoglobina
MetHba - metemoglobinemia
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida do NAD⁺)
NADH-MR - NADH-metemoglobina redutase
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF-κB - Factor Nuclear Kappa B
nNOS - óxido nítrico sintase neuronal
NO - óxido nítrico
NOX - NADPH oxidase
NTBI - forma livre do ferro não ligado a transferrina
O₂^{•-} - superóxido
[•]OH - radical hidroxila
ONOO⁻ - peroxinitrito
PABA - ácido para-aminobenzóico
PB - paucibacilar
PBS- Solução salina fostato
PFC - córtex pré-frontal
PGL-1 - glicolípido fenólico de *M. leprae*
PQT – Poliquimioterapia
SNC - Sistema Nervoso Central
SOD - superoxide dismutase
TBARS - Substâncias Reativas ao ácido Tiobarbitúrico
TEAC - capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
Tf - transferrina
TfR1 - receptor de transferrina 1
TrX - sistema tioredoxina
TT – Tuberculóide Tuberculóide
WHO - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 FISIOPATOGENIA DA HANSENÍASE	20
2.2 POLIQUIMIOTERAPIA DA HANSENÍASE E DAPSONA.....	23
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E O USO DE DAPSONA	29
2.4 FORMAÇÃO DA METEMOGLOBINA E ALTERAÇÕES OXIDATIVAS	33
2.4.1 Alterações Oxidativas no Plasma e em Eritrócitos	37
2.5 ALTERAÇÕES OXIDATIVAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E A ASSOCIAÇÃO COM ACÚMULO DE FERRO.....	41
2.5.1 Alterações Oxidativas e Neuroinflamação no Córtex Pré-Frontal ...47	
2.6 TERAPIA PARA METEMOGLOBINEMIA E AGENTES ANTIOXIDANTES .52	
2.7 POTENCIAL ANTIOXIDANTE E FARMACOLÓGICO DO ÁCIDO LIPÓICO	54
3 OBJETIVOS	58
3.1 OBJETIVO GERAL	58
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
4 METOLOGIA	59
4.1 ANIMAIS E PROCEDÊNCIA.....	59
4.2 ADMINISTRAÇÃO DA DAPSONA E DO ÁCIDO LIPÓICO	59
4.2.1 Grupos e Tratamentos	59
4.3 COLETA DE AMOSTRAS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	61
4.3.1 Determinação do Percentual de Metemoglobina Erro! Indicador não definido.	
4.3.2 Determinação da Capacidade Antioxidante Total	63
4.3.3 Determinação da Atividade da Glutathiona Reduzida	63
4.3.4 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase	64
4.3.5 Determinação da Atividade da Catalase	64
4.3.6 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	66
4.3.7 Determinação das Concentrações de Ferro	67
4.3.8 Imunofenotipagem de células macrofágicas/microglial e astrócitos	68
4.3.9 Determinação da Expressão de IL-1β, IL-17, IL-4 e BDNF	68
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70

5 RESULTADOS	71
5.1 METEMOGLOBINA E PARÂMETROS OXIDATIVOS SANGUÍNEOS	71
5.1.1 Alterações na Defesa Antioxidante dos Eritrócitos	72
5.1.2 Avaliação de Parâmetros Bioquímicos Plasmáticos	74
5.2 ALTERAÇÕES OXIDATIVAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL	79
5.3 PERFIL CELULAR E CITOCINAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL.....	85
6 DISCUSSÃO	88
6.1 METEMOGLOBINA E ALTERAÇÕES OXIDATIVAS SANGUÍNEAS	88
6.2 ALTERAÇÕES OXIDATIVAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL	96
7 CONCLUSÕES	106
8 REFERÊNCIAS	107
9 ANEXOS	130

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma infecção crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, uma bactéria intracelular obrigatória, que infecta macrófagos e células de *Schwann* (Krishnan *et al.*, 2015; Scollard, *et al.* 2016). A hanseníase é um grande problema de saúde pública em países tropicais, como Brasil e Índia, por muitas décadas, se não tratada, podendo levar a deficiências físicas, psicológicas e sociais ao longo da vida (Moschella, 2004). As tendências globais mostram um aumento de 211.973 em 2015 para 214.783 novos casos em 2016. O Brasil registrou 26.395 em 2015, em 2016 foram 25.218 casos (WHO, 2017). O homem é conhecido como a única fonte de infecção e o contágio pode ocorrer através da pele e principalmente pelo trato respiratório, através do contato prolongado de indivíduos suscetíveis com pacientes bacilíferos não tratados, especialmente no ambiente intradomiciliar (BRASIL, 2005; Bhat, 2012).

A patogênese da hanseníase é influenciada por vários fatores, como o estresse oxidativo, resultante da elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ERO; VIJAYARAGHAVAN, 2009; SWATHI e TAGORE, 2015). No entanto, as ERO, além de destruir as bactérias, também podem causar lesões a macromoléculas do hospedeiro, levando a peroxidação lipídica, hemólise, agressão aos nervos periféricos, neuroinflamação e morte neuronal (Ohshima, 1999; Vasconcelos, 2007). Além disso, a poliquimioterapia (PQT) padronizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que é a principal estratégia para interromper a cadeia de transmissão do *M. leprae* (OMS, 2009), também pode gerar ERO e aumentar os danos oxidativo no paciente (Gandhi 2004; Kar, 2015; Swathi e Tagore, 2015).

Dentre os fármacos utilizados na PQT, a dapsona (DDS) é o maior responsável por intoxicações e reações adversas, como a formação de metemoglobina (MetHb) e hemólise (Rimiolli, 2001). Além disso, alguns estudos relatam que a DDS e seus metabólitos podem alterar a homeostase do ferro e levar a disfunção mitocondrial, assim como estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a neurotoxicidade e neuroinflamação (Piloni *et al.*, 2013; Urrutia, 2014). Atualmente, o antídoto mais eficaz para níveis elevados de MetHb é o azul de metileno (AM) que atua como um cofator no processo de redução da

MetHb (Mansouri e Lurie, 1993). Como o efeito do AM é relativamente breve e a meia-vida longa da DDS, torna-se necessário a aplicação de doses adicionais do AM, que pode agravar a metemoglobinemia (MetHba) e a hemólise devido ao seu efeito oxidante (Shihana *et al.*, 2010).

Desta forma, na tentativa de promover a redução ou prevenção dos efeitos tóxicos da DDS, alternativas terapêuticas vêm sendo investigadas como o uso de antioxidantes, como ácido ascórbico, a curcumina, o resveratrol (RSV), o ácido α -lipóico (ALA) e sua forma reduzida, o ácido dihidrolipóico (DHHLA), principalmente em pacientes em uso da PQT (Coleman, 2000; Coleman 2003; Leonard *et al.*, 2003; Boran *et al.*, 2008; El-Husseini e Azarov, 2010, Bergamaschi *et al.*, 2011; Albuquerque *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o ALA torna-se uma estratégia terapêutica interessante, visto que é um potente antioxidante que atua na diminuição da produção e liberação de ERO no organismo, com possível redução ou prevenção da formação da MetHb no sangue, e das alterações oxidativas e neurotoxicidade no SNC (Packer, 1995; Bilska *et al.* 2007), assim como apresenta propriedades quelantes (Zhang 2018). Desse modo, este trabalho visa avaliar se a DDS pode causar alterações oxidativas e inflamatórias no sangue e no córtex pré-frontal (PFC) em modelo animal, bem como, avaliar os prováveis efeitos benéficos do ALA em casos de MetHb e alterações oxidativas ocasionadas pela DDS.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FISIOPATOGENIA DA HANSENÍASE

A hanseníase é classificada, de acordo com Ridley e Jopling (1966), baseado em critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos, em: hanseníase tuberculóide (TT), que apresenta melhor resposta imune celular, inibindo a disseminação e o crescimento dos bacilos, e hanseníase Lepromatosa (LL), que apresenta resposta imunológica celular defeituosa, com elevada, porém inócua produção de anticorpos que permite a multiplicação de bacilos e a disseminação da doença. Entre esses dois pólos, existe uma forma Borderline da doença, que pode ser Borderline Tuberculóide (BT) Borderline Borderline (BB) ou Borderline Lepromatosa (BL), dependendo dos tipos de lesões, histopatologia e estado imunológico (Fig. 1) (BARRETO et al, 2017). Em termos operacionais, recomenda-se também que a classificação seja baseada no número de lesões cutâneas, inferior ou igual a cinco para paucibacilar (PB) e superior a cinco para a forma multibacilar (MB), tanto em adultos como em crianças (OMS, 1982).

Durante a infecção pelo *M. leprae*, principalmente pelo trato respiratório superior, macrófagos e células de Schwann são os principais alvos para a infecção no hospedeiro. Os macrófagos são as células mais abundantes que reconhecem as micobactérias (Bhat, 2012), sendo um dos principais mecanismos de defesa da resposta inata do hospedeiro contra a infecção microbiana. Assim, após a entrada da bactéria, ocorre inicialmente o seu reconhecimento por receptores da imunidade inata, principalmente os receptores toll-like (TLRs). Os TLRs são uma família de receptores altamente conservados que têm papel chave no reconhecimento e estímulo da resposta imune inata contra micobactérias (Akira e Takeda, 2004; Beutler, 2004; Iwasaki, 2004).

Além disso, outros receptores também são capazes de reconhecer o *M. leprae*, como NOD2 (Kang, 2011) e receptor de manose (Misch et al, 2010). Após o reconhecimento de *M. leprae* pelo TLRs de macrófagos, ocorre ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), que conduz a transcrição de várias citocinas e quimiocinas, principalmente interleucina-12 (IL-12; Hart, 2012). Essas citocinas e quimiocinas recrutam e ativam as células T no local da inflamação (Akira e Takeda,

2004). A IL-12 estimula as células T a produzirem Interferon-gama (IFN- γ) que também desempenha papel fundamental para potencializar a função antimicrobacteriana do macrófago. O IFN- γ induz a explosão respiratória em macrófagos com produção de ERO e NO, via NADPH oxidase durante a fosforilação oxidativa mitocondrial (Hart, 2012; McLeish, 2013), levando a destruição dos agentes patogênicos, mas também promovem danos em macromoléculas do hospedeiro (Jyothi, 2008).

Outra importante célula no processo de infecção pelo *M. leprae* é a célula de Schwann, relacionada a lesão no nervo, desmielinização e consequente incapacidade física do paciente (Bhat, 2012). A lesão do nervo é um marcador de infecção progressiva da hanseníase e envolve nervos mielinizados e não mielinizados (Misch *et al.*, 2010). A interação celular de *M. leprae*-Schwann envolve múltiplos ligantes bacterianos e receptores celulares (Rambukkana, 2010). Um alvo inicial para a interação de *M. leprae* com os nervos periféricos é Laminina- α 2, localizado na lâmina basal da unidade axonal de células de Schwann (Oliveira, 2003). Lamininas são grandes glicoproteínas que influenciam a proliferação e migração das células de Schwann (Rambukkana, 2000). Um glicolípido fenólico de *M. leprae* (PGL-1) parece mediar essa interação e determinar a predileção pelos nervos (Cho, 2001; Singh, 2015). Após a interação entre *M. leprae*-célula de Schwann, esta célula e macrófagos inflamatórios são ativados e produzem ERO e NO em altas concentrações para combater o *M. leprae*. Este processo leva a estimulação de NF- κ B com produção de citocinas inflamatórias e danos neurais, devido a apoptose das células de Schwann (Schurr, 2007).

Outro mecanismo de defesa na hanseníase é a resposta imune adaptativa, que é diretamente correlacionada com as formas clínicas PB ou MB. Na PB, predomina intensa resposta imune mediada por células, enquanto que nas formas MB, principalmente a forma lepromatosa, é frequente a resposta imune humoral (Alcaïs *et al.*, 2000; Britton, 2004). Após as células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas, apresentarem o antígeno ao linfócito T-helper 0 (LTh0), ocorre a diferenciação a células CD4 T helper 1 (Th1) ou CD4 T helper 2 (Th2; Bobosha, 2014). Este padrão Th1/Th2 determina o resultado da infecção e formas clínicas da doença (Frieden, 2003).

Assim, os pacientes PB desenvolvem uma resposta imune mediada por células Th1, enquanto que os MB desenvolvem uma resposta Th2 (Zhu, 2010).

Em pacientes PB, a resposta Th1 caracteriza-se por granulomas bem organizados que estão associados à proliferação limitada de micobactérias (Frieden, 2003; Hernandez, 2008), por isso, na ausência de granulomas, ocorre disseminação do *M. leprae* (Wang, 2013). Este perfil Th1 desencadeia uma imunidade mediada por células, induzindo uma intensa produção de citocinas, como IFN- γ (Scollard, 2015), IL-2, IL-7, IL-15, IL-18 e IL-12, que são críticas para a erradicação de patógenos intracelulares (Figura 1; Flynn, 2001, Aarão, 2014).

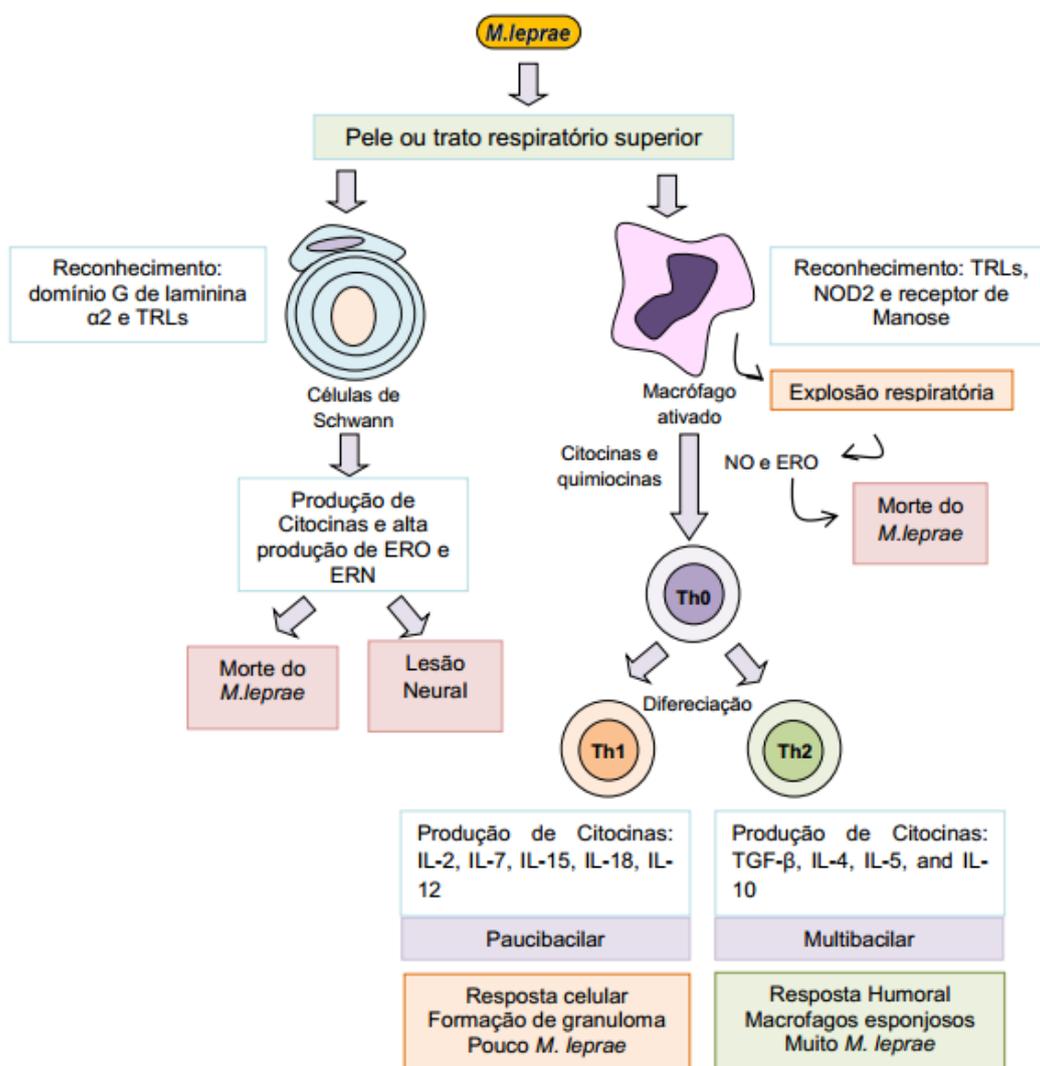


Figura 1: Processos de reconhecimento do *M. leprae* pela célula de Schwann e macrófagos e diferenciação da resposta imune.

Em relação aos pacientes MB, ocorre o desenvolvimento da resposta de perfil Th2 que é essencial para a produção de anticorpos e combate aos bacilos extracelulares, além de estar associada a processos alérgicos (Zhu, 2010). Além disso, nesta resposta há uma intensa produção de citocinas, como fator de crescimento transformante (TGF- β), IL-4, IL-5 e IL-10 (Alcaïs, 2000).

No entanto, vários tipos celulares e mediadores inflamatórios contribuem para desencadear as respostas imunes inatas e adaptativas, criando um microambiente inadequado para a diferenciação de células T nos padrões Th1/Th2. Os neutrófilos e os macrófagos são os principais tipos celulares, que produzem níveis elevados de ERO e ERN nos sítios inflamatórios, podendo favorecer a eliminação de *M. leprae* ou causando danos nos tecidos do hospedeiro (Grossi, 2008), estimulando o desenvolvimento da resposta Th2 (Niedbala, 1999).

Assim, os sistemas antioxidantes são necessários para equilibrar o processo oxidativo e a resposta imune (Valko, 2007). Deste modo, estudos relatam que sistemas antioxidantes, como glutathiona reduzida (GSH) de APCs poderiam influenciar o padrão Th1/Th2 (Dobashi, 2012). Peterson *et al.* (1998) relataram que a depleção de GSH resultou em baixa atividade de Th1 e alta atividade de Th2 (Peterson *et al.*, 1998). Corroborando com esse estudo, Fraternali *et al.* (2014) relataram que a depleção de GSH diminuiu a produção de IL-12 e induziu a polarização para padrões de resposta Th2 (Fraternali *et al.*, 2014). Desse modo, a capacidade antioxidante da GSH poderia direcionar o padrão de resposta Th1/Th2 durante o processo patológico (Lima, 2007).

2.2 POLIQUIMIOTERAPIA DA HANSENÍASE E DAPSONA

No final da década de 1940, a DDS era considerada a droga mais eficaz contra *M. leprae*. No entanto, era administrada por vários anos para curar o paciente com hanseníase, um fator que dificultava a adesão ao tratamento (Noordeen, 2016). Além disso, na década de 1960, surgiram evidências de resistência bacteriana à dapsona, dificultando o controle da doença apenas com este medicamento. Nesse mesmo período, outros dois antibióticos com atividade contra *M. leprae*: clofazimina, droga fracamente bactericida e rifampicina, um

potente bactericida. Em 1981, a OMS recomendou que pacientes com hanseníase fossem tratados com a PQT, constituída por DDS, rifampicina (RMP) e clofazimina (CFZ) (WHO, 1982; BRASIL, 2010; Smith *et al.*, 2017).

A PQT teve efeitos bastante expressivos sobre a epidemiologia da hanseníase. Assim, a duração da PQT para pacientes com hanseníase MB foi substancialmente encurtada de 24 meses em 1990 para 12 meses em 1998. Nas duas décadas seguintes, o número de pacientes que receberam tratamento diminuiu de 12 milhões em 1977 para cerca de 600.000 em 2000 (WHO, 2002; Schreuder, 2016).

No entanto, em um estudo recente, Benjak, et al (2018) obtiveram sequências de genoma do *M. leprae* a partir de DNA extraído diretamente de biópsias de pele de pacientes usando análise comparativa e filogenética de 154 genomas de 25 países, e forneceram importantes informações sobre a evolução e resistência antimicrobiana. Algumas das mutações anteriormente desconhecidas ocorrem em genes que aparentemente estão sujeitos à seleção positiva, e dois deles (ribD, fadD9) estão restritos a cepas resistentes a drogas.

A DDS (4,4'-diaminodifenil-sulfona) é um pó cristalino branco, inodoro, pouco solúvel em água e de fórmula molecular C₁₂H₁₂N₂O₂S (Figura 2) (Grunwald e Amichai, 1996; Goulart *et al.* 2002; Farhi *et al.*, 2005).

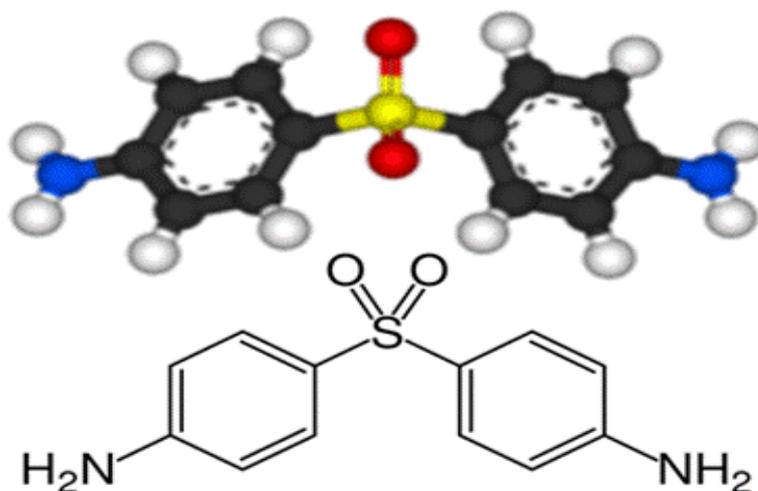


Figura 2: Estrutura química da Dapsona, mostrando um grupo sulfonil (SO₂) e dois grupos arilamina (AR-NH₂).

A DDS é uma sulfonamida que apresenta ação bacteriostática, sendo o fármaco de escolha para o tratamento das formas PB e MB da hanseníase (Sener *et al.* 2006). A presença do grupo sulfonil na estrutura química da DDS é essencial para sua atividade farmacológica (Ford, 2000; Paniker e Levine, 2001), e também pode ser o grupo responsável pelo aumento da MetHb (Schalcher, 2014). A ação bacteriostática da DDS dev-se ao antagonismo competitivo com o ácido para-aminobenzóico (PABA) pelo sítio ativo da enzima diidropteroato sintetase, levando a inibição da síntese de ácido fólico, um evento essencial para síntese de purinas e consequente formação de RNA e DNA, inibindo o crescimento de micro-organismos, como o *M. leprae* (figura 3; Coleman,1993; Farhi *et al.*, 2005; Annigeri *et al.*, 2007).

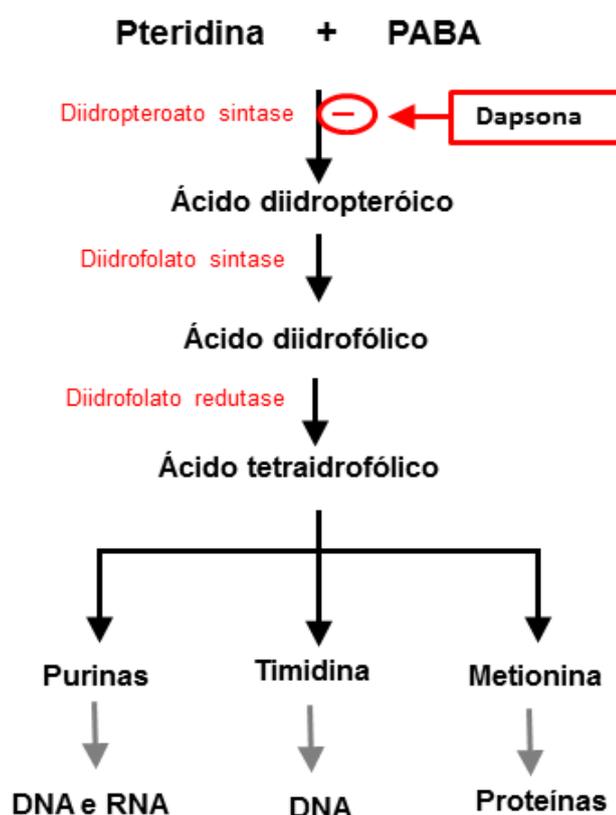


Figura 3: Mecanismo antimicrobiano da DDS no interior de micro-organismos susceptíveis, como o *M. leprae*.

Dentre os fármacos utilizados na PQT, a DDS é a principal responsável por reações adversas (RAM), como a MetHb e anemia hemolítica (Coleman e Tingle, 1992). Estas reações estão principalmente relacionadas aos metabólitos

hidroxilados da DDS, dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH) e Monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH) (Vyas *et al.* 2005; Schiff *et al.* 2006). Timothy *et al.* (1997), através de estudos em humanos, compararam o efeito pró-oxidante dos metabólitos DDS-NOH e o MADDS-NOH e constataram que ambos induziam a formação de MetHb nos pacientes, entretanto, comparativamente a DDS-NOH foi mais potente que MADDS-NOH.

A DDS-NOH é um metabólito sintetizado a partir da N-hidroxilação da DDS via sistema citocromo P450, principalmente pelas isoformas CYP2C9 e CYP2C19, e por outros sistemas enzimáticos oxidativos (Winter *et al.*, 2000; Schalcher *et al.*, 2014). A DDS-NOH apresenta potencial hematotóxico por realizar um ciclo de oxidação-redução com a oxihemoglobina e com moléculas de oxigênio (O₂), formando MetHb e ERO, respectivamente (Bradshaw *et al.*, 1997).

Em relação as suas propriedades farmacocinéticas, após a administração oral, a DDS dapsona é quase completamente absorvida pelo trato gastrointestinal com biodisponibilidade entre 80 a 85% e difunde-se por todos os tecidos, concentrando-se preferencialmente na pele, músculos, fígado e rins (Braghetto, 2007; Wozel e Blazum, 2014), permanecendo nesses órgãos até 3 semanas após a interrupção do tratamento. Cerca de 70% deste fármaco liga-se à proteínas plasmáticas, o que resulta em concentração sérica de 3,26 (máximo) e 1,95 mg/L após 24 h da ingestão de 100 mg/d da droga (Zuidema *et al.*, 1986; Wozel 2014). O pico plasmático é alcançado entre 2 a 8 h, após a ingestão de uma dose de 50 – 300 mg, para isso são necessários em torno de 7 a 10 dias após o início da terapia com a DDS para que o estado de equilíbrio seja alcançado (Wozel e Blazum, 2014).

Após a absorção, a dapsona sofre circulação entero-hepática, sendo metabolizada tanto pelo fígado quanto por leucócitos polimorfonucleares ativados ou células mononucleares. No fígado, o processo de biotransformação da DDS ocorre principalmente por a N-acetilação, realizada pela enzima N-acetiltransferase, resultando na formação de monoacetildapsona (MADDS) e, por N-hidroxilação através da via citocromo P450, pelas isoformas CYP2C9, CYP3A, CYP2E1 e CYP2C19 (Figura 4; Schalcher *et al.*, 2014). A N-hidroxilação é responsável pela produção de metabólitos DDS-NOH e MADDS-NOH, considerados responsáveis pelas alterações hematológicas (Braghetto, 2007).

A DDS é distribuída para todos os órgãos, atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e a placenta, sendo também detectável no leite materno. A DDS apresenta meia-vida de eliminação com uma variação interindividual de 14 a 83 horas e valores médios em torno de 30 horas, sendo que geralmente, 90% de uma dose única de 100 mg do fármaco é eliminada, em média em 9 dias. Já em tratamentos prolongados, esse fármaco pode ser encontrado nos fluidos biológicos até por um período de 35 dias após sua administração. Possivelmente, a explicação para o longo tempo de meia-vida desse fármaco, seja a circulação êntero-hepática e a extensa ligação às proteínas plasmáticas, variando de 70 a 90% a taxa de ligação da DDS (Wozel e Blazum, 2014).

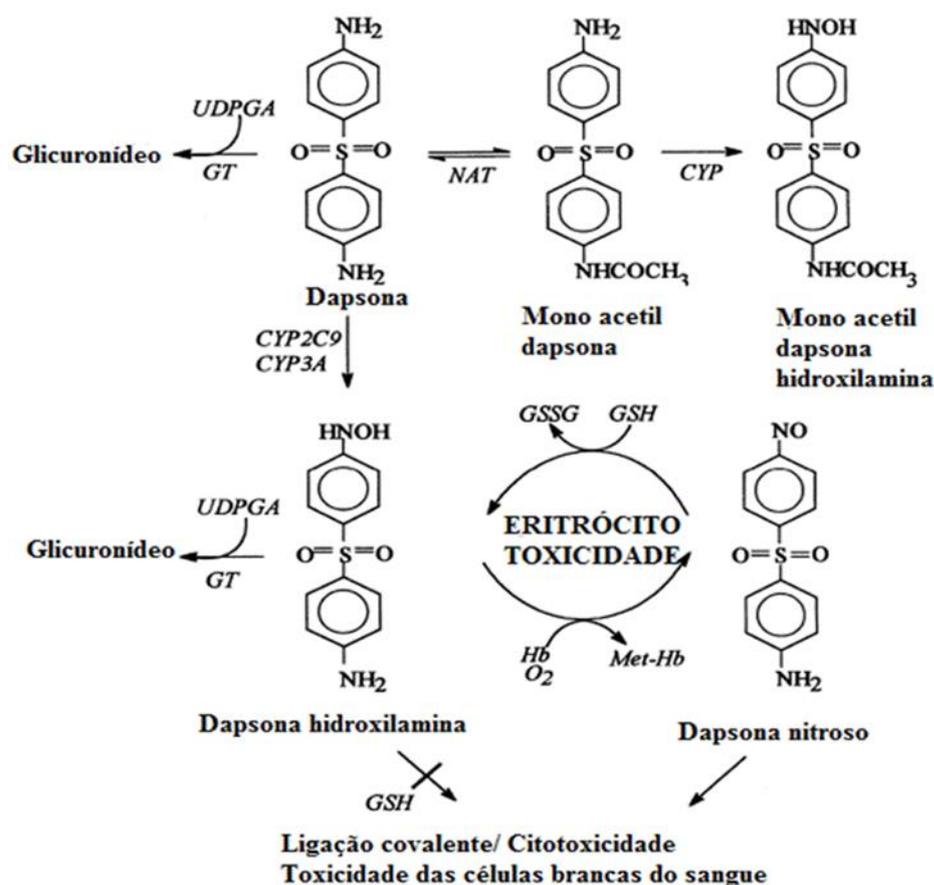


Figura 4: Mecanismos de bioativação e detoxificação de DDS. CYP: Citocromo P-450; Hb: hemoglobina; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; NAT: N-acetil-transferase; GT: glucuronil-transferase; UDPGA: ácido uridina difosfato glucurônico; MetHb: Metemoglobina; O₂:oxigênio. Fonte: Adaptado de Gill *et al.*1995.

A principal via de excreção da DDS é a urinária, com 20% excretada na urina na forma inalterada e 70% a 85% como metabólitos solúveis em água. Além disso, uma pequena quantidade pode ser excretada nas fezes ou por via biliar

(Ford, 2000; Wozel 2010). Após uma dose única deste fármaco, aproximadamente 50% é excretado durante as primeiras 24 horas. Na urina o principal metabólito encontrado é a monoacetildapsona (MADDS), conjugado com o ácido glicurônico (Braghetto, 2007).

As reações adversas relacionadas ao uso da DDS variam desde problemas digestivos, náuseas, vômitos e estomatite, a manifestações menos comuns, como: hepatites tóxicas, icterícia colestática, reações cutâneas por fotossensibilidade, psicoses, e uma síndrome que ficou conhecida por “Síndrome da Sulfona”, caracterizada por *rash* cutâneo, aumento de linfonodos, icterícia, hepatoesplenomegalia e linfocitose com linfócitos atípicos (Sánchez-Saldaña, 2008). Casos clínicos de anemia hemolítica e MetHba são frequentemente relatados na literatura, e podem ocorrer mesmo em doses terapêuticas de DDS (Coleman, 1995; Queiroz *et al.*, 1997; Salamat e Watson, 2003).

A anemia hemolítica e a MetHba, pelo uso da DDS, estão associadas a uma agressão oxidativa na membrana dos eritrócitos, que aumenta sua rigidez, favorecendo a recaptção esplênica e acelerando os processos hemolíticos (COLLEMAN, 1993). Além disso, a quebra de hidroperóxidos lipídicos pode levar à formação de aldeídos, incluindo o MDA, capaz de se ligar a fosfolípidos e proteínas, formando agregados de alto peso molecular, muitas vezes observados nas membranas dos eritrócitos, principalmente em indivíduos deficientes em glicose-6-fosfatodesidrogenase (G6PD; COLLEMAN, 1995).

Para reduzir as agressões oxidativas, o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida), que é uma molécula altamente redutora e extremamente importante para os eritrócitos, consegue manter a forma reduzida da GSH, uma vez que é o cofator da enzima glutationa-redutase que transforma glutationa oxidada (GSSG) em GSH (Mehta *et al.*, 2000). Por não possuírem mitocôndrias ou outras organelas, a única fonte de suprimento de NADPH do eritrócito é pela ação catalítica da G6PD através da via das pentoses-fosfato. Este processo favorece a defesa antioxidante dos eritrócitos pela ação da GSH que é capaz de detoxificar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como manter resíduos de cisteína da Hb no estado reduzido (Figura 5; Salvemini *et al.*, 1999).

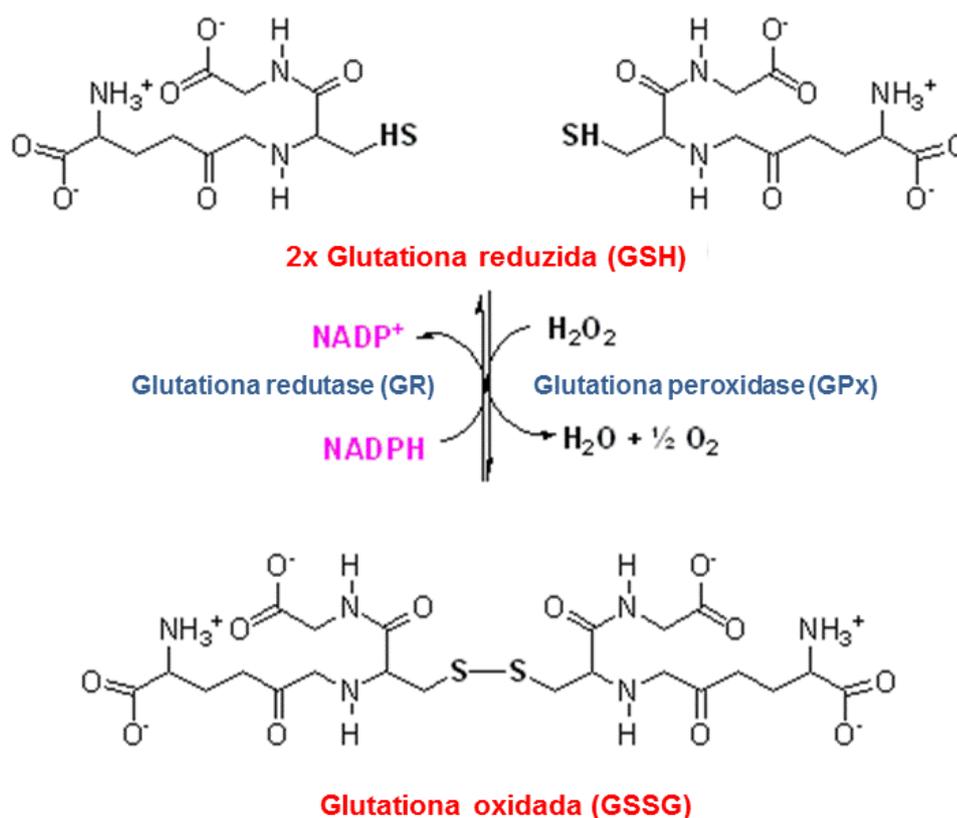


Figura 5: Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GR). Fonte: Rover Júnior *et al.* 2001.

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E O USO DE DAPSONA

Reações ocasionadas por ERO podem levar a danos em macromoléculas de células e tecidos, devido ao processo oxidativo. O estresse oxidativo é conceituado como um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção do controle redox e a danos moleculares (Sies, 2015; Kehrer e Klotz, 2015). A associação de estresse oxidativo à lesões teciduais resultam da perturbação no estado redox de uma célula pela elevada produção de ERO. Entretanto, ressalta-se que as reações redox são críticas para as funções celulares normais, incluindo a sinalização celular (Sies, 2014) e apoptose (Ray *et al.*, 2012; Kehrer e Klotz, 2015).

Os lipídeos de membrana são um dos principais alvos do dano oxidativo com geração de moléculas reativas secundárias (Jyothi, 2008). Com isso, a peroxidação lipídica induzida por agentes oxidantes gera dois importantes

biomarcadores do estresse oxidativo, o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE) a partir de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da bicamada lipídica da membrana (Poli, 2008; Swathi, 2015; Chacko, 2016). O MDA leva a mutações em células de mamíferos e bactérias e também é carcinogênico em ratos, enquanto o 4-HNE é fracamente mutagênico, no entanto é um dos principais produtos tóxicos da peroxidação lipídica (Bhat, 2015).

Para equilibrar esta liberação de espécies reativas e reduzir o dano oxidativo, o organismo possui sistemas de defesa antioxidante (Lushchak, 2014), que podem ser endógenos ou exógenos. Os sistemas endógenos podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, que são críticos para a manutenção do equilíbrio redox, tanto em condições fisiológicas, quanto em patológicas (Limón-Pacheco, 2009). Como exemplo de sistemas enzimáticos, incluem-se principalmente a superóxido dismutase (SOD), uma enzima que elimina os radicais superóxido (Abdel-Hafez *et al.*, 2009), a catalase (CAT), enzima que decompõe H_2O_2 (Valko 2007) e sistemas da glutathione, composto por glutathione reduzida (GSH) glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), glutathione S-transferase (GST), sistema tioredoxinas (TrX), entre outros, como mostrado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e antioxidantes.

Espécies Reativas de Oxigênio, de Nitrogênio e antioxidantes		Referência
ERO	Radicalares: Radical hidroxila ($\cdot OH$), radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical alcóxil (RO^{\cdot}), radical peridroxil (HO_2^{\cdot}). Não-radicalares: Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO) e peróxidos orgânicos (ROOH).	Prasad, 2008 Rahfiludin, 2016
ERN	Óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot -}$), ácido peroxinitroso ($ONOOH$), ânion nitroxil (NO^{\cdot}) e dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}).	Coleman, 1993 Udeh, 2001
ANTIOXIDANTES	Enzimáticos: radical superóxido (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST). Não-enzimáticos: Vitaminas C e E, Carotenóides, antioxidantes tíois (glutathione, tioredoxinas e ácido lipóico), Flavonóides e Melatonina.	Valko, 2007 Veggi, 2008 Blanco, 2017

A elevada produção de ERO e NO por células de Schwann e macrófagos, resultante da PQT e do processo infeccioso, pode causar desequilíbrio redox e agravar as lesões em pacientes com hanseníase (Schurr, 2009). Paralelamente, a PQT pode reduzir a atividade da GR, que converte glutatona oxidada (GSSG) em GSH, diminuindo a atividade de GPx. Os micronutrientes da dieta como β -caroteno, vitamina E, cobre, selênio, zinco e manganês também contribuem para o sistema de defesa antioxidante, visto que podem atuar como cofatores para enzimas antioxidantes, como a SOD e GPx, mas podem estar diminuídos na hanseníase (Figura 6; Limón-Pacheco 2009; Asalkar *et al.*, 2011; Trimbake *et al.*, 2013).

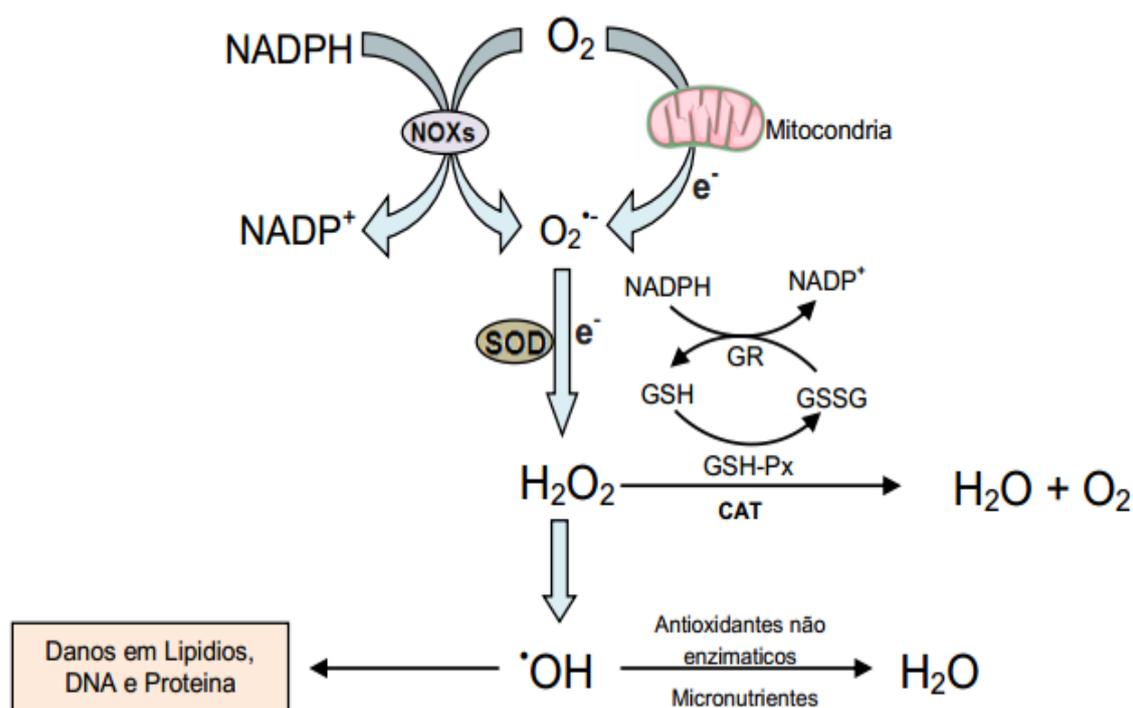


Figura 6: Vias da defesa antioxidante durante o estresse oxidativo na hanseníase. O radical superóxido intracelular ($O_2^{\bullet-}$) é inicialmente produzido pela oxidação da NADPH por enzimas NAPH oxidase (NOXs) ou pelo vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias. Superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). H_2O_2 pode ser convertido em H_2O por proteínas antioxidantes celulares, tais como glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). O H_2O_2 forma radicais hidroxila ($\bullet OH$) que causa danos irreversíveis à macromoléculas.

O estresse oxidativo também é causado por fármacos que constituem a PQT usada em pacientes com hanseníase (Ohshima, 1999) e seu metabólito, DDS-NOH, durante a PQT. A DDS-NOH é o principal mediador de efeitos deletérios, como anemia hemolítica grave e MetHb, que está associado ao comprometimento

na atividade enzimática da defesa antioxidante (Coleman 1993; Veggi 2008). Neste contexto, os eritrócitos são células vulneráveis ao estresse oxidativo, devido a sua alta concentração de oxigênio que leva a agressões principalmente na membrana celular e na hemoglobina (Hb; Vijayaraghavan, *et al.*, 2005). Além disso, a clivagem redutiva de H_2O_2 pode produzir $\cdot OH$ na presença de íons ferrosos através da reação de Fenton (Figura 7; Limón-Pacheco 2009).

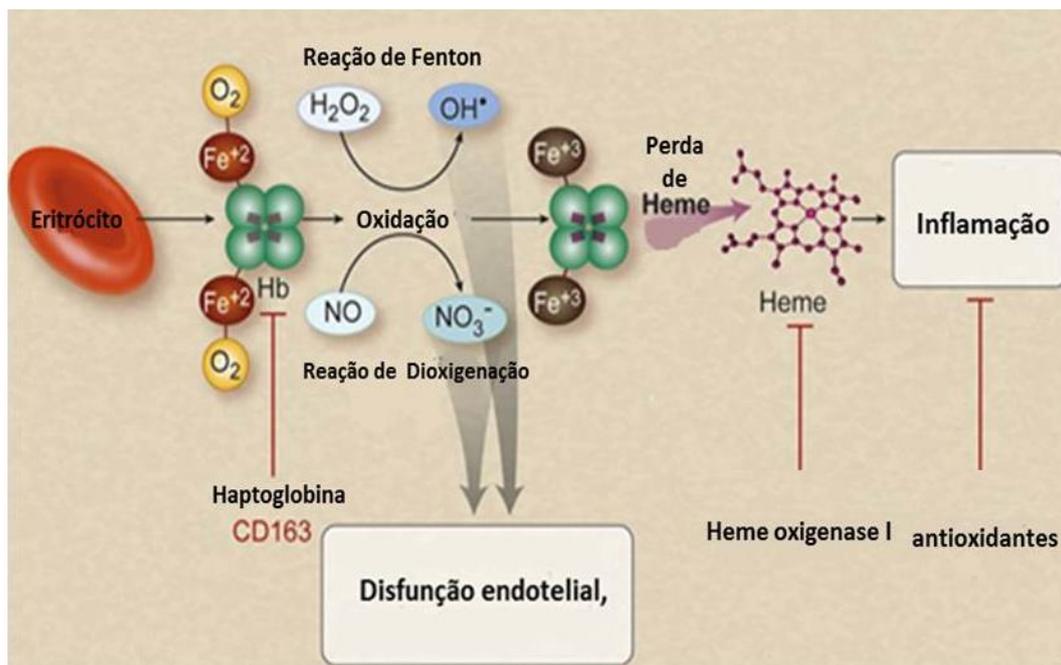


Figura 7: Hemólise e liberação da hemoglobina em pacientes com hanseníase. Durante a hemólise hemoglobina livre (Hb), que normalmente é sequestrada pela haptoglobina e CD163, pode reagir com o NO através da reação de dioxigenação e também reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para gerar radicais hidroxila através da reação de Fenton, levando a disfunção endotelial e hemólise em pacientes. O H_2O_2 pode reagir com Fe^{2+} liberado durante a hemólise de eritrócitos, levando à produção de radicais $\cdot OH$. O Fe^{2+} é convertido em íon férrico (Fe^{3+}) por oxidação. O $\cdot OH$ promove a peroxidação lipídica e a hemólise dos eritrócitos. Esta cascata de eventos é responsável pelo aumento dos níveis de MDA, liberado de diversos tipos celulares no hospedeiro.

O estresse oxidativo pode levar a oxidação da Hb, com formação de MetHb. Em situações normais, há uma proporção muito pequena de MetHb em relação a Hb total (<2%), principalmente pela ação da MetHb redutase em eritrócitos (Hare, *et al.* 2013). O aumento de MetHb no sangue causa uma síndrome clínica chamada MetHba (Udeh 2001; Percy, 2008). Com isso, a MetHb pode ser induzida por agentes químicos, como DDS, sulfonamidas, benzocaina, primaquina, levando a várias manifestações clínicas, como dispnéia, náuseas e taquicardia (Coleman 1993, Coleman, 1995). Além disso, o processo oxidativo também pode levar a

desnaturação da Hb e precipitação de polipeptídios insolúveis na forma de agregados, chamados de corpos de Heinz (Winterbourn, 1990).

Na hanseníase, a presença de corpos Heinz e MetHb pode indicar dano oxidativo pela PQT, especificamente, pelos metabólitos DDS-NOH e monoacetildapssona-hidroxilamina (MADDS-NOH; Coleman 1995; Albuquerque *et al.*, 2015). A oxidação da Hb pelo DDS-NOH leva a formação de MetHb e um composto derivado da DDS chamado nitrosobenzeno, que é reduzido pela enzima NADH-metemoglobina redutase e GSH a DDS novamente, continuando assim o processo de oxidação de Hb (Coleman 1993).

2.4 FORMAÇÃO DA METEMOGLOBINA E ALTERAÇÕES OXIDATIVAS

A Hb é a hemoproteína presente no interior dos eritrócitos que tem como principal função o transporte de O_2 para todo o organismo. Esta proteína é esférica, globular, formada por quatro subunidades, composto por dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, denominadas de cadeias do tipo alfa e beta (Galiza Neto e Pitombeira, 2002). O grupo prostético presente nas cadeias de globina é representado pelo grupo heme, anel porfirínico tetrapirrólico, cujo núcleo contém ferro sob a forma de Fe^{2+} que é responsável pela ligação com o O_2 (Figura 8). Cada molécula de Hb possui quatro grupos heme que são capazes de se combinar a quatro moléculas de O_2 (Galiza Neto e Pitombeira, 2002).

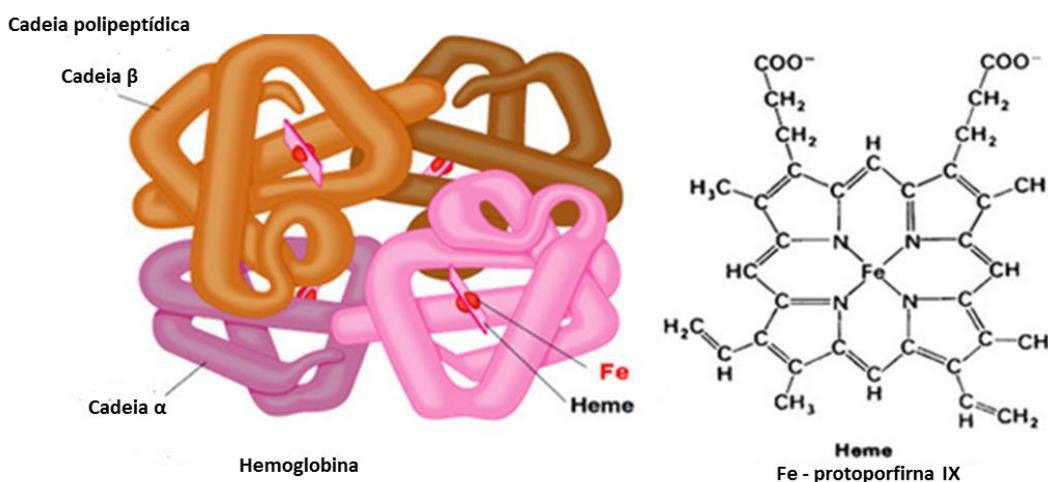


Figura 8: A hemoglobina consiste em um grupo prostético, heme, e o protéico, representado pelas cadeias de globina α e β .

Em condições normais, ocorre a conversão da Hb para a sua forma oxidada, a MetHb. Após a oxidação, o íon ferroso (Fe^{2+}) do grupo heme é oxidado para o íon férrico (Fe^{3+}) que não apresenta afinidade ao O_2 , levando a formação da MetHb (Figura 9). Esse processo é denominado como auto-oxidação da oxihemoglobina, na qual a forma oxidada (HbFe^{3+}) que é a MetHb não é capaz de transportar O_2 para o organismo (Galiza Neto e Pitombeira, 2002).

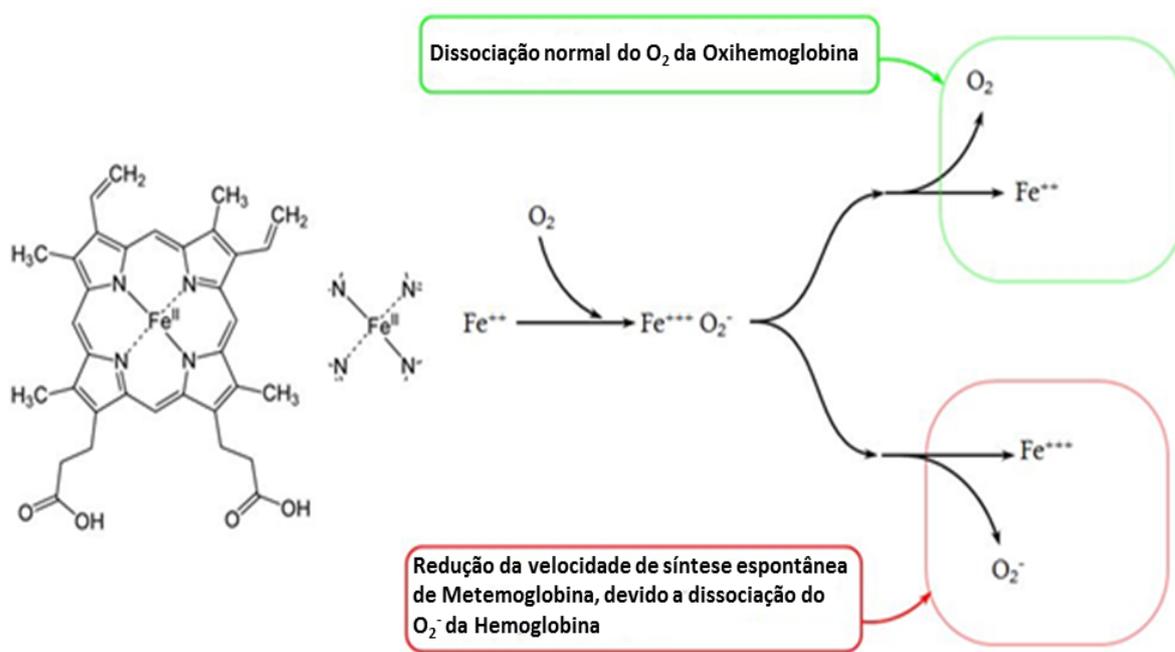


Figura 9: Mecanismo de formação espontânea da MetHb.

A formação da MetHb é um processo que pode ocorrer sem causar danos aos tecidos, desde que os sistemas redutores mantenham os níveis de MetHb abaixo de 2% no organismo (Chui *et al.*, 2005, Suyama *et al.*, 2005; Madke *et al.*, 2016). Nesse sentido, os principais reguladores dos níveis de MetHb são três sistemas enzimáticos que funcionam de forma sincrônica: (i) Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH)-metemoglobina redutase (NADH-MR), um sistema com duas enzimas, citocromo B5 e citocromo B5-redutase (CB5R), que é responsável pela redução endógena da MetHb, correspondendo a 99% da atividade redutora. (ii) MetHb redutase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeofosfato (NADPH-MR (~5% da conversão), e (iii) sistema antioxidante da GSH (~12–15% da conversão, Madke *et al.*, 2016). A GSH reduz a maioria das substâncias oxidantes antes que reajam com a Hb, entretanto, em condições normais essas reações são menos significantes, exceto quando a NADH-MR está comprometida (Haymond *et*

al., 2005). A NADH-MR transfere um elétron do NADH para a MetHb, transformando-a em Hb reduzida. A fonte de NADH necessária para a redução da MetHb provém da glicólise anaeróbia de *Ebdem-Meyerhof*, a partir da reação da oxidação da glicose que gera ATP e NADH, por outro lado o substrato NADPH é proveniente da via das pentoses a partir a ativação da G6PD (Figura 10; Haymond *et al.*, 2005).

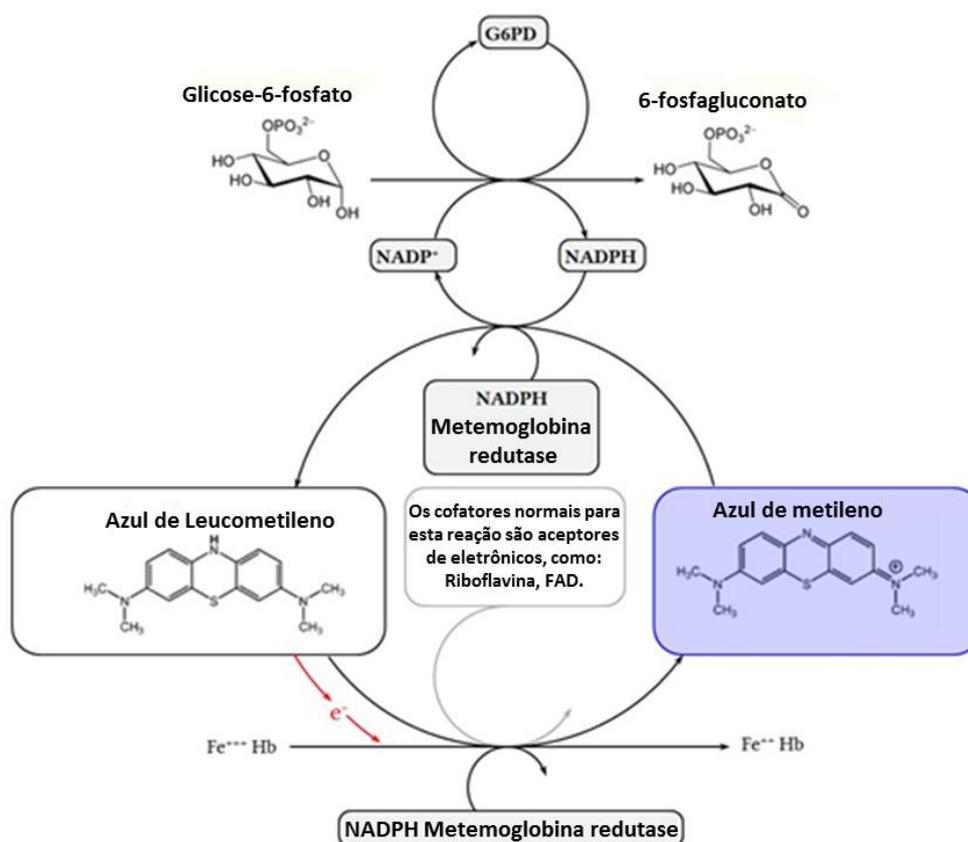


Figura 10: A via de *Embden-Meyerhof* e via das pentoses-fosfato, responsáveis pela produção de NADH e NADPH, respectivamente. Substratos importantes no processo de redução da Metemoglobina. Fonte: Percy e Lappin (2008).

Desta forma, a formação excessiva de MetHb resulta do desequilíbrio redox ocasionado pela oxidação excessiva da Hb ou pela diminuição da atividade de enzimas redutoras (Udeh *et al.* 2001; Da-Silva *et al.*, 2003; Haymond *et al.*, 2005; Prchal e Gregg, 2005). Além disso, a elevação nas concentrações de MetHb pode ocorrer devido alterações congênitas na síntese ou no metabolismo da Hb, assim como por fármacos oxidativos e azul de metileno que em altas doses levam ao desequilíbrio nas reações de oxi-redução (Rehman, 2001). A DDS induz a

formação de MetHb e hemólise, mesmo em doses terapêuticas (Goulart *et al.*, 2002; Halim e Ogbeide, 2002).

Os agentes oxidantes podem ocasionar significativa carência do suprimento de O₂ nos tecidos e provocar importantes manifestações clínicas que podem ser assintomáticas ou sintomáticas. Baixas concentrações de MetHb (2–10%) são bem toleradas e geralmente são assintomáticas em indivíduos aparentemente saudáveis. Contudo, MetHb de 10-30% os sinais clínicos são leves como hipóxia e cianose; com taxas de 30 a 50% os sintomas exibidos são mais graves, como dispinéia e ansiedade; de 50 a 70% pode ocorrer coma e convulsões; e níveis acima de 70% geralmente levam à morte (Tabela 2) (Coleman, 1995; Madke *et al.*, 2016).

Tabela 2- Manifestações clínicas associadas aos níveis de MetHb.

Manifestações clínicas da metemoglobinemia	
MetHb (%)	Sinais e sintomas
< 3	Nenhum
3-15	Pele acinzentada, hipóxia tecidual
15-30	Cianose, sangue marrom-chocolate
30-50	Dispinéia, Cefaléia, Fadiga, Fraqueza, Tonteira, ansiedade, síncope
50-70	Taquipnéia, acidose metabólica, arritmia cardíaca, convulsão, depressão do SNC, coma.
>70	Morte

Fonte: Madke *et al.*, 2016.

Conforme relatado, o principal efeito tóxico da DDS-NOH é a formação de MetHb, entretanto, este metabólito pode ser reduzido pela enzima NADH-MR e pela GSH reduzida, retornando novamente a DDS-NOH e ao estado de Hb (Figura 11), processo que se repete até que os níveis de GSH se esgotem (Coleman e Jacobus 1993).

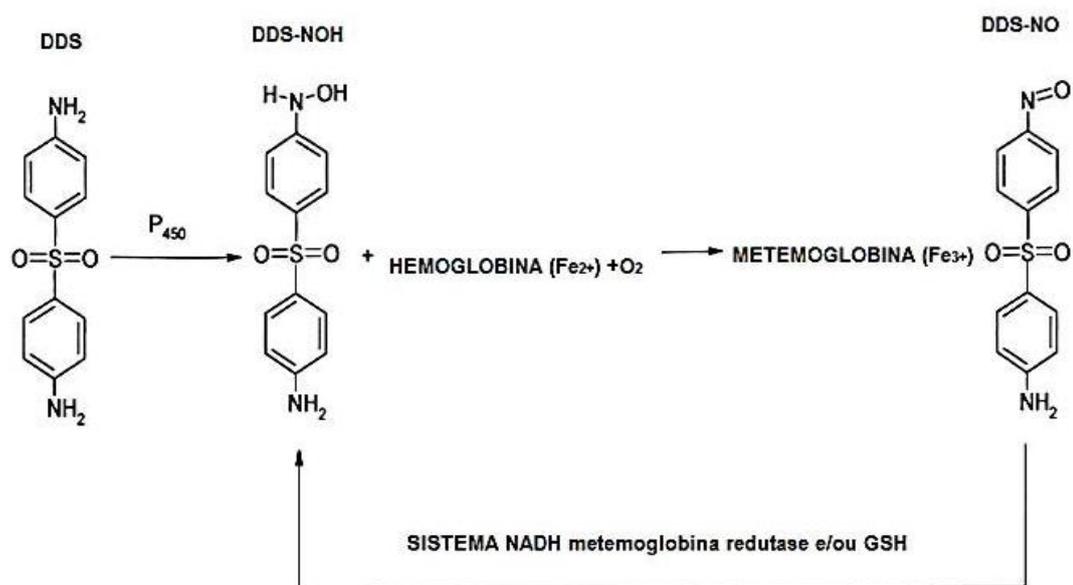


Figura 11: Representação esquemática do ciclo de formação da metemoglobina nos eritrócitos a partir da indução da DDS-NOH (dapsona hidroxilamina), demonstrando o possível ciclo redox que recupera o composto nitrosobenzeno até o precursor hidroxilamina. Fonte: Adaptado de Coleman e Jacobus (1993).

A MetHb possui propriedades pró-oxidantes que levam a mudanças estruturais e funcionais no endotélio vascular, ocasionando a inibição do crescimento celular, senescência, alterações morfológicas e apoptose celular, eventos que conduzem a trombose vascular e desnudação endotelial (Balla *et al.*, 2007). No plasma humano, em condições fisiológicas, as moléculas de Fe normalmente se encontram na forma de Fe³⁺ (~20 µM) ligada à Tf (Tf ~ 40 µM), portanto, não agride o organismo. Entretanto, em condições de sobrecarga de Fe, a Tf é saturada e o Fe³⁺ que não está ligado a Tf será reduzido a forma Fe²⁺ resultando no acúmulo de ferro livre não ligado a transferrina (NTBI), que pode se acumular no líquido cerebrospinal (LCE). O NTBI atua como catalisador das reações oxidativas e consequente síntese de radicais [•]O₂ e [•]OH, que podem potencialmente causar danos em vários tecidos (Ji e Kosman, 2015).

2.4.1 Alterações Oxidativas no Plasma e em Eritrócitos

O eritrócito dispõe de defesas antioxidantes especializadas para manter a Hb no seu estado funcional transportando grande quantidade de O₂ de forma segura para a sua integridade, por meio de um complexo sistema de detoxificação, que previne o acúmulo de ERO. Essas defesas antioxidantes protegem as células

das seguintes formas: impedindo a formação de ERO; reduzindo as ERO formadas pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas; reparando as lesões causadas pelas ERO e proporcionando uma adaptação do organismo em resposta a geração das ERO, com o aumento das enzimas antioxidantes (Machado *et al.*, 2009; Magalhães, 2009).

A manutenção dos mecanismos antioxidantes é de extrema importância nos eritrócitos que, ao contrário da maioria das células, não têm capacidade de sintetizar novos lipídios e proteínas para substituir os que foram oxidados. Desta forma, a lesão oxidativa é a principal responsável pelo processo normal de envelhecimento e destruição dos eritrócitos (MACHADO *et al.*, 2009), sendo que os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos são os responsáveis pela proteção do organismo (Zwieten *et al.*, 2014).

O sistema enzimático do eritrócito é dividido em: 1) A meta-Hb redutase NADH dependente, que converte aproximadamente 67% a Hb oxidada em deoxiHb, através do uso de dois carreadores de elétrons, o citocromo b5 e o NADH; 2) A Superóxido dismutase (SOD) Cu-Zn dependente converte $O_2^{\cdot-}$, formado na auto-oxidação da Hb, a H_2O_2 , o qual tem reatividade limitada; 3) A Catalase (CAT) é uma enzima citoplasmática que decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2 ; 4) Sistema da Glutathione, composto de Glutathione peroxidase (GSH-Px), uma enzima mitocondrial e citoplasmática que detoxifica o H_2O_2 e remove hidroperóxidos lipídicos formados na membrana, utilizando a GSH como cofator; e glutathione redutase (GR) dependente de NADPH, uma enzima citoplasmática que reduz a GSSG em GSH (Frei, 1999).

A defesa antioxidante não enzimática é composta por GSH, NADPH, NADH e por alguns antioxidantes provenientes da dieta, como: o α -tocoferol (vitamina E) que é um dos antioxidantes mais importantes da membrana, que funciona como um finalizador de reações em cadeia, interrompendo a propagação dos radicais livres (Figura 12; Frei, 1999; Tavazzi *et al.*, 2000).

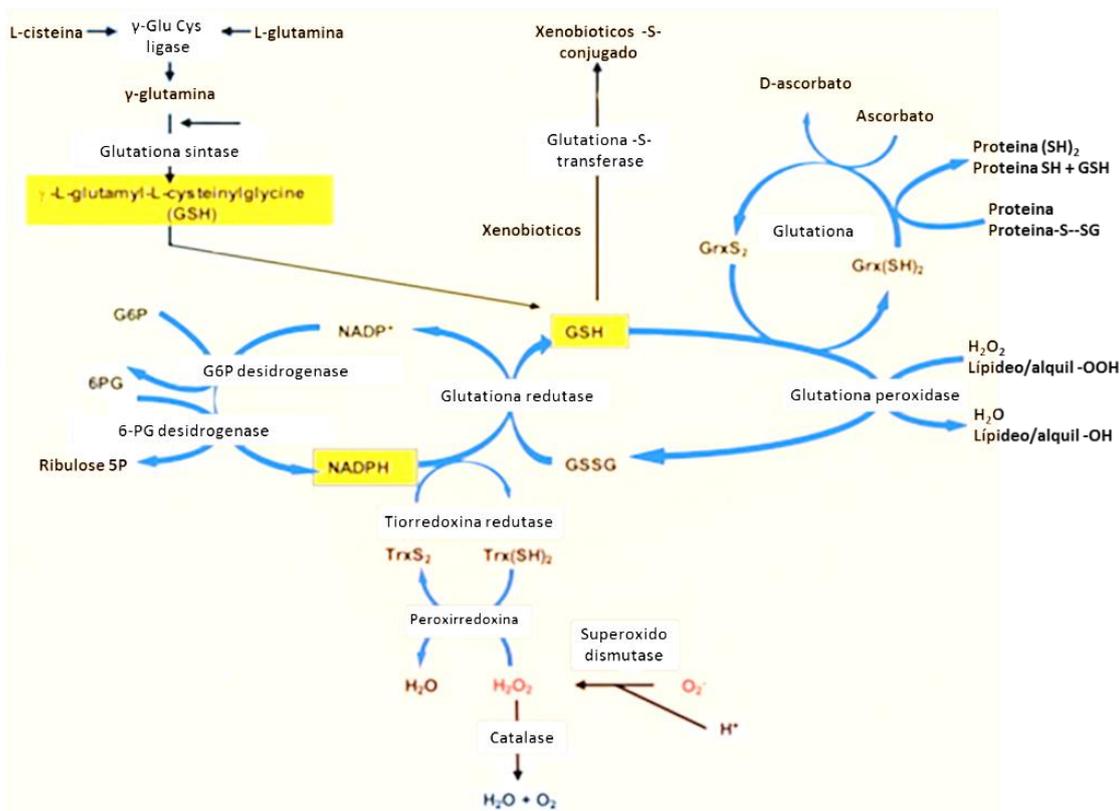


Figura 12: Mecanismo de proteção do sistema antioxidante dos eritrócitos a partir da produção de espécies reativas de oxigênio e produção de metemoglobina. Fonte: Van Zwieten *et al.*, (2014).

O principal antioxidante do eritrócito é a GSH, que é um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, glutamato e cisteína, sendo esse último aminoácido é portador do grupo sulfidríla (SH), que é importante para as reações de oxido-redução nas quais a molécula participa. A função da GSH é manter componentes celulares em estado reduzido, especialmente proteínas e íons Fe^{2+} de grupos heme. O mecanismo redox de remoção de H_2O_2 envolve a oxidação da GSH, gerando o dímero denominado GSSG. Entretanto, para que ocorra a regeneração da GSSG por redução é necessário que a GR utilize NADPH como fonte de elétrons (Lehninger *et al.*, 2014).

Coleman (1993) e Nascimento *et al.* (2008) relataram que a exposição à DDS eleva os níveis de MetHb e causa hemólise. Além disso, Grossman *et al.* (1995) demonstraram que a anemia hemolítica induzida pela DDS-NOH está relacionada com a inibição da G6PD em eritrócitos humanos *in vitro*. Nesse estudo, a exposição do DDS-NOH diminuiu o tempo de meia-vida dos eritrócitos provenientes de pacientes deficientes em G6PD, levando a hemólise duas vezes maior comparado aos eritrócitos provenientes de indivíduos normais. Desse modo,

estes autores sugeriram que as células deficientes em G6PD apresentam maior suscetibilidade ao dano oxidativo, visto que se tornam incapazes de reduzir NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada) para NADPH. A G6PD catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogliconolactona em uma reação que usa especificamente NADP⁺ como coenzima, que após redução se transformam em NADPH (Salvemini, 1999).

Além disso, Bordin *et al.* (2010) relataram que o DDS-NOH é um forte indutor de alterações progressivas nos eritrócitos, acelerando os processos de hemólise e liberação das moléculas de Fe no organismo, que em excesso se torna prejudicial ao equilíbrio redox. Deste modo, a DDS-NOH pode ocasionar efeitos hematotóxicos e neurotóxicos observados durante tratamento com a DDS. A liberação do ferro da hemoglobina é acompanhada pela formação de MetHb, peroxidação lipídica e hemólise, que pode se revertida pela GSH. No entanto, se houver diminuição das concentrações de GSH, eleva a liberação de ferro bem como a peroxidação lipídica e a hemólise (Ferrali, 1997; Comporti, 2001).

Paralelo a isso, o ciclo redox reversível entre os estados de oxidação do ferro, íons ferroso e férrico, é essencial para a regulação e função do ferro no organismo. No entanto, o excesso de ferro pode contribuir para a geração de ERO. Portanto, é importante equilibrar os níveis deste metal, a fim de controlar seus efeitos deletérios e as graves consequências decorrentes da sobrecarga deste metal, incluindo no SNC (Dlouhy e Outten, 2013). Além disso, a metemoglobina pode influenciar no transporte e acúmulo do ferro no tecido cerebral (MOHOROVIC *et al.*, 2014). Com isso, é importante investigar os efeitos da DDS sobre os níveis de MetHb e a regulação de ferro, assim como o desenvolvimento de neuroinflamação em tecidos importantes no processo cognitivo.

2.5 ALTERAÇÕES OXIDATIVAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E A ASSOCIAÇÃO COM ACÚMULO DE FERRO

Acredita-se que o tecido cerebral seja muito mais vulnerável a ação de ERO e ao estresse oxidativo, principalmente pelas suas características: (i) os neurônios são ricos em mitocôndrias e possuem um metabolismo aeróbico bastante elevado; (ii) os baixos níveis de algumas enzimas antioxidantes; (iii) ao alto teor de PUFA nas membranas cerebrais; e (iv) ao elevado conteúdo de Fe. Estes efeitos em associação tornam o cérebro um alvo preferencial para os danos relacionada ao estresse oxidativo (Halliwell, 2006; SOARES, 2013).

O cérebro tem uma das maiores taxas de atividade metabólica e, por essa razão, tem a segunda maior quantidade de Fe seguido do fígado. Com isso, alguns estudos associam o comprometimento da homeostase de Fe com consequente acúmulo desse elemento no sistema nervoso central (SNC), que podem levar a distúrbios neurodegenerativos, tais como Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington (Altamura e Muckenthaler, 2009).

O ferro é um importante oligoelemento do corpo humano e está envolvido em processos biológicos fundamentais no cérebro, incluindo transporte de oxigênio, síntese de DNA, RNA e proteínas, respiração mitocondrial, síntese de mielina e de neurotransmissores como a dopamina. Desta forma, a homeostase de ferro é necessária para manter a função cerebral fisiológica, enquanto a disfunção desta homeostase pode causar neurotoxicidade (Crichton, 2013; Meng *et al.*, 2017).

As concentrações de ferro nas células cerebrais precisam ser rigorosamente reguladas para evitar efeitos tóxicos do estresse oxidativo, que levam a morte neuronal e neuroglial. O excesso de ferro pode induzir estresse oxidativo, ocasionado pelo aumento de ERO, principalmente o radical $\cdot\text{OH}$ (Crichton, 2001). O acúmulo deste radical pode levar a peroxidação de PUFA de membrana e gerar aldeídos altamente reativos, como o 4-HNE, que modifica irreversivelmente as proteínas por carbonilação (Perluigi, 2012).

Nesse sentido, a barreira hematencefálica (BHE) é importante na manutenção da concentração de Fe nas células neuronais e neurogliais, visto que as células endoteliais vasculares ligadas por junções de oclusão funcionam como um obstáculo limitante da entrada deste metal do sistema circulatório e no SNC, e

consequentemente, sua sobrecarga (Moos *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 2014). Com isso, vias de transporte seletivas, como Tf, receptor de transferrina 1 (TfR1), ferritina (Ft), ferroportina (Fpn) e transportador divalente de metal 1 (DMT-1) visam garantir um nível precisamente equilibrado de Fe no SNC (Hentze *et al.*, 2004; Moos *et al.*, 2011).

Desse modo, o tecido encefálico não pode captar Fe diretamente do sistema circulatório. Com isso, a principal via de absorção é mediada por células endoteliais vasculares cerebrais (*brain vascular endothelial cells*-BVEC) presentes na BHE (Figura 14). Ao contrário das pequenas moléculas de gás, como O₂ e CO₂ que se difundem livremente através das membranas lipídicas para o cérebro, o influxo de Fe ocorre através dos TfR expressos em BVEC, receptores que possuem uma estrutura dimérica de alta afinidade pelo complexo Fe₂-Tf presente no plasma (Aisen, 2004).

Durante o transporte para o SNC, o ferro atravessa as células vasculares endoteliais da BHE, principalmente ligado a Tf, através do sistema Tf-TfR1. Portanto, o Tf-Fe₂ se liga ao TfR1 e acontece a endocitose do Fe que é temporariamente armazenado em endossomos (ABBOTT *et al.*, 2010; MILLS *et al.*, 2010). Posteriormente, dois mecanismos promovem a liberação de Fe das BVECs para o meio extracelular, os quais são iniciados pela ação de bomba de prótons que reduzem o pH no interior do endossoma, provocando alteração conformacional em ambas as unidades Fe₂-Tf e TfR1. Por outro lado, estes processos levam a liberação de Fe³⁺ que pode ser exportado diretamente para o meio extracelular por exocitose (HENTZE *et al.*, 2004). Durante a exocitose, ocorre também a saída de íons H⁺, assim o pH endossomal retorna a neutro, provocando a dissociação da apo-Tf (Tf sem Fe) do TfR. Em seguida, a molécula de Tf é reciclada, podendo ser reutilizada no transporte de Fe novamente (HARE *et al.*, 2013).

Outra via para o efluxo do íon Fe³⁺ ocorre quando este metal é liberado no endossoma e rapidamente reduzido a Fe²⁺ pelo antígeno epitelial transmembrana de próstata tipo 1-4 (STEAP 1-4), viabilizando sua saída para o citosol das BVECs via DMT-1 (De-DOMENICO *et al.*, 2008). Os íons Fe²⁺ presentes no citosol das BEVCs são disponibilizados ao meio extracelular via proteína transmembrana Fpn, sendo rapidamente convertido a Fe³⁺ pela enzima ferroxidase dependente de cobre (WU *et al.*, 2004; MILLS *et al.*, 2010).

Os neurônios expressam TfR1 e Fpn e adquirem a maior parte do ferro via sistema Tf-TfR1, e podem exportar ferro via Fpn (Boserup, 2011). Além disso, os astrocitários que envolvem a BHE formam conexões diretas com os neurônios e desempenham um papel fundamental na regulação da absorção de ferro cerebral (Dringen, 2007; Leitner, 2012).

Vários fatores podem afetar os mecanismos de absorção/transporte do Fe como as mutações genéticas e os agentes oxidantes que causam aumento de MetHb e assim o acúmulo deste metal no organismo (MELLS *et al.*, 2010). O potencial catalítico do Fe tem sido associado com a amplificação de danos no tecido encefálico pós-acidente vascular encefálico, uma vez que nesta patologia há grande quantidade de Fe livre que pode catalisar e produzir mais ERO e, conseqüentemente, ocasionar mais danos nesse tecido (Minhas *et al.*, 2014). Os mecanismos oxidativos estão associados com a ação catalítica do Fe na geração de ERO via reação de Fenton ou pela reação de Haber-Weiss (figura 14; Ferreira e Matsubara, 1997; Prousek, 2007). A toxicidade do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) decorrem da conversão, dependente de Fe, para o radical $\cdot OH$ que é extremamente reativo gerando danos graves às membranas, proteínas e DNA (Halliwell e Gutteridge, 1999).

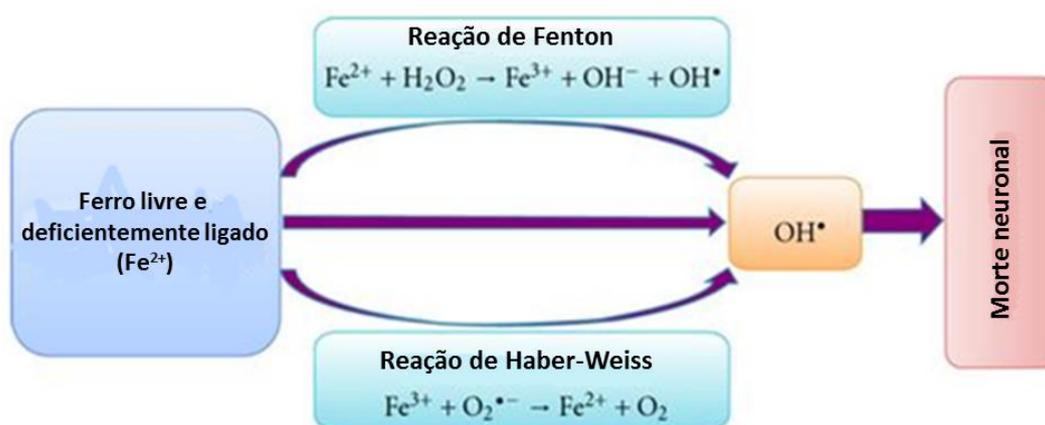


Figura 14: Mecanismos da Reação de Fenton e Haber-Weiss que resulta na produção do radical hidroxila ($\cdot OH$) e morte neuronal.

De maneira geral, todas as células e componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, entretanto, a membrana é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que promove alterações estruturais e na

permeabilidade das membranas celulares (Ferreira e Matsubara, 1997). Essas alterações levam a perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas, ativação de enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos, como o MDA e o 4-HNE, ocasionando a morte celular (Chiueh, 2001).

O tecido cerebral contém uma grande quantidade de PUFA, que são sensíveis ao estresse oxidativo e sofrem a peroxidação lipídica. Os mecanismos neurodegenerativos originados da toxicidade do ferro podem eventualmente induzir a apoptose, mediada pelo estresse oxidativo ou pela ferroptose que é uma morte celular oxidativa não apoptótica, dependente de ferro (Chiueh, 2001; Dixon *et al.*, 2012). A peroxidação lipídica cerebral também pode ser catalisada por íons Fe, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcoxila, LO[•] e peroxila, LOO[•]) que iniciam uma cadeia de reações que provocam a lesão da membrana celular. Estas reações incluem quatro fases: iniciação; propagação de radicais lipídicos peroxil; geração de produtos lipídicos reativos (MDA e 4-HNE); e terminação (figura 15; Chiueh, 2001).

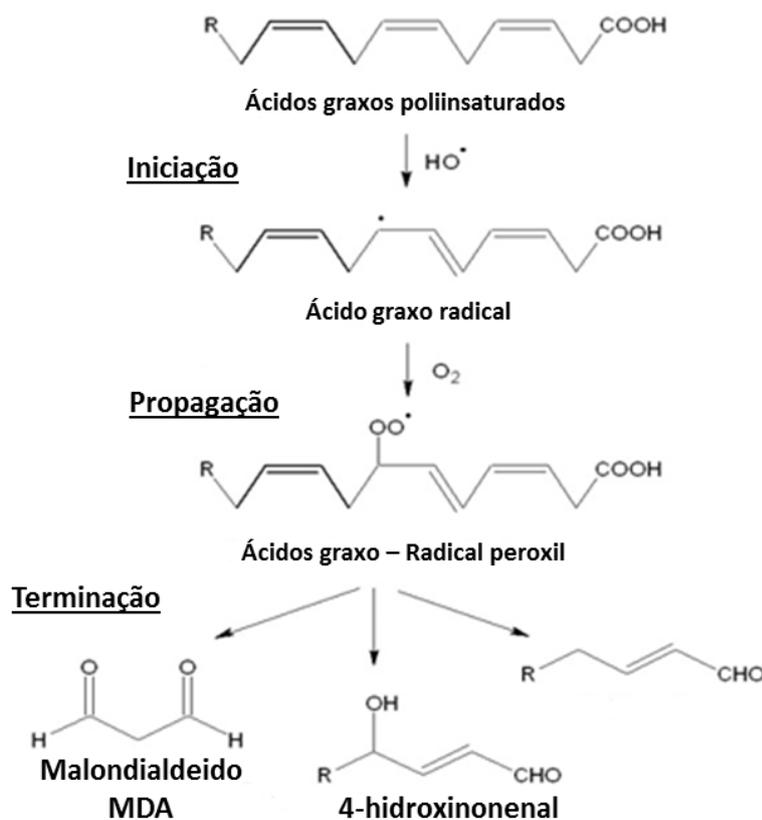


Figura 15: Peroxidação lipídica causada pelo radical OH[•] formado na reação de Fenton.

Dentre os ERO, o radical OH^\bullet é uma das principais espécies reativas iniciadora da lipoperoxidação, sendo que os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} também desempenham papel importante na iniciação deste processo (Ferreira e Matsubara, 1997). Deste modo, é necessário a realização de estudos que possam elucidar o papel da DDS no acúmulo de Fe, nos níveis de MetHb e seus possíveis danos no SNC, assim como avaliar o desequilíbrio do estado redox e propor terapias antioxidantes que apresentem mecanismos neuroprotetores para reestabelecer os níveis de MetHb e o equilíbrio redox do organismo, uma vez que o azul de metileno pode ser tóxico em altas doses.

Nesse sentido, a hemoglobina pode ser a principal fonte de sobrecarga de ferro cerebral durante a ruptura da BHE, promovendo a geração de ERO, peroxidação de PUFA, distrofia axonal e neurodegeneração (Chiueh, 2001). Estudos mostram que a sobrecarga de ferro intracraniana desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão de algumas doenças do SNC, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e hemorragia cerebral. Além disso, a lesão neuronal induzida pelo estresse oxidativo pode afetar a atividade da ATPase neuronal, inibir o influxo de cálcio, mediar a neuroinflamação e, em última instância, levar a uma lesão ou perda neuronal (Chen *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2017).

Paralelo a isso, o cérebro é particularmente dependente do fornecimento de energia mitocondrial para sua função normal, pois tem uma enorme demanda energética (Kovacic, 2005). As mitocôndrias estão envolvidas na regulação do metabolismo celular, regulação redox e apoptose (Widlund *et al.* 2017). Além disso, a mitocôndria é uma das principais fontes de ERO, durante o processo de consumo de oxigênio usado na produção de energia. Assim, a cadeia transportadora mitocondrial de elétrons (CTE) é uma das principais fontes de ATP para as células, no entanto, durante a transdução de energia, um pequeno número de elétrons "escapa", formando radicais $\text{}^{\bullet}\text{O}_2$ (Federico, 2012; Widlund *et al.* 2017). A estimulação excessiva de NADPH e da cadeia de transporte de elétrons leva à superprodução de ERO e estresse oxidativo, resultando em alterações em proteínas mitocondriais, lipídios e DNA mitocondrial, que por sua vez, leva ao dano às células nervosas (Bhat, 2015). A produção de radicais $\text{}^{\bullet}\text{O}_2$ mitocondrial ocorre principalmente em dois pontos na cadeia de transporte de elétrons, o complexo I

(NADH) e o complexo III (ubiquinona-citocromo-redutase; Figura 16; Selivanov, 2011).

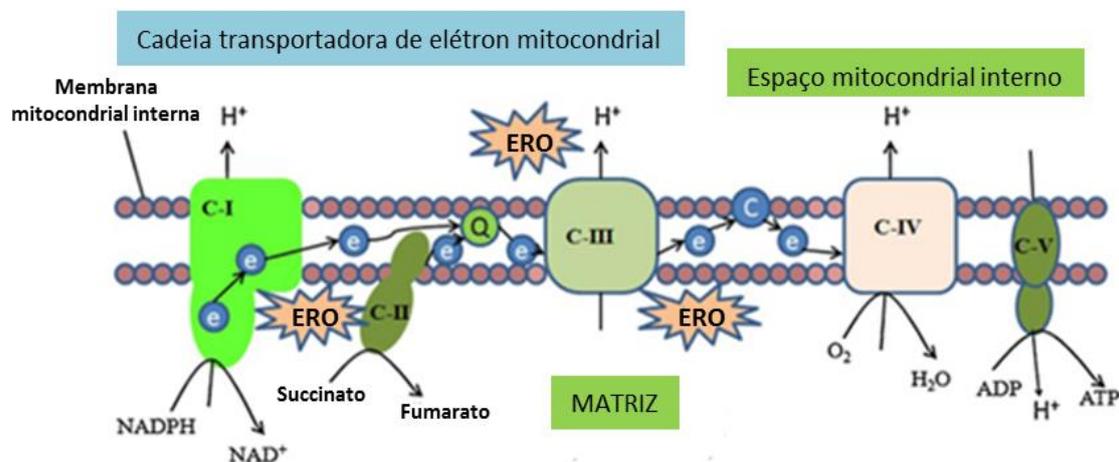


Figura 16: Cadeia transportadora mitocondrial de elétrons, formação de ERO nos complexos I e III e defesa antioxidante.

O estresse oxidativo promove a permeabilidade mitocondrial pela abertura temporária de um poro, o que posteriormente causa despolarização do potencial da membrana mitocondrial. Esses eventos podem induzir a morte de células neurais através da liberação de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas, incluindo o citocromo c (Al Shahrani *et al.*, 2017). A perda de função mitocondrial, ao nível da CTE, devido à susceptibilidade ao dano oxidativo e à sobrecarga de ferro, tem sido proposta como mecanismo provável para a morte neuronal (Urrutia, 2014). Em vista disso, várias estratégias terapêuticas têm sido propostas, envolvendo principalmente o uso de antioxidantes, na tentativa de prevenir as agressões oxidativa à CTE, restaurando a disfunção mitocondrial e prevenindo a morte neuronal (Stewart, 2003).

2.5.1 Alterações Oxidativas e Neuroinflamação no Córtex Pré-Frontal

O córtex pré-frontal (PFC) tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, por ser particularmente mais sensível ao estresse oxidativo do que outras áreas cerebrais, como o hipocampo (Radley *et al.*, 2006; Fowler *et al.*, 2014; Zlatkovic *et al.*, 2014) e por controlar funções importantes, incluindo emoção, memória, linguagem, inibição de distração e tomada de decisão (Liu, 2016; Luo, 2017; Smaers, 2017). As alterações oxidativas no PFC estão associadas a

neurodegeneração e fisiopatogenia de doenças neuropsiquiátricas, como ansiedade e depressão (Rawdin, 2013; Liang et al 2016). Em roedores, o PFC é composto pelo Cortex Prefrontal Medial (MPFC), que inclui áreas mediana pre-central, cíngulo anterior, prélimbica e infralimbica; e o Cortex Orbitofrontal (OFC), que é subdividido em áreas orbitárias medial, ventrolateral e lateral (Dalley, 2004; Price, 2007).

Alguns estudos de imagem funcional, lesão e estimulação cerebral associam o PFC à fisiopatologia de transtornos neuropsiquiátricos (Koenigs, 2009), incluindo distúrbios relacionados à neuroinflamação, como a depressão (VALLANCE, 2007; GARCIA-OSCO, 2015). Nesse sentido, o radical superóxido derivado da NADPH oxidase (NOX) foi identificado como um dos principais contribuintes para a lesão oxidativa cerebral em condições de hipoxia grave e inflamação. A NOX também tem sido implicada na neurodegeneração, como a doença de Alzheimer e Parkinson (INFANGER, 2006). A exposição prolongada a eventos frequentes de hipoxia / reoxigenação que imitam os padrões alterados de oxigenação da apnéia do sono induzem a NOX em regiões cerebrais selecionadas, sugerindo que a ativação desta enzima pode estar envolvida, parcialmente, no aumento da inflamação neuronal e do estresse oxidativo, observados em modelos animais de apnéia do sono (ZHAN, 2005).

Liang *et al.* (2016) investigaram a contribuição causal do estresse oxidativo derivado de NOX2 no PFC para alterações no desenvolvimento neurológico em um modelo de apnéia do sono neonatal e testaram o desenvolvimento da ansiedade psiquiátrica. Os autores sugeriram que o aumento do estresse oxidativo dependente de NOX2 no PFC pode ser uma característica central na patogênese das alterações neurológicas e psiquiátricas induzidas por hipoxia neonatal intermitente. Nos neurônios, sugere-se que a enzima NOX2 está envolvida na modulação da atividade neuronal. Do ponto de vista patológico, as enzimas NOX estão envolvidas no aumento do estresse oxidativo associado a vários distúrbios cerebrais, desde doenças psiquiátricas à neurodegenerativas, fato que já foi comprovado em modelos animais (SORCE, 2009).

Paralelo a isso, o glutamato, um importante neurotransmissor excitatório, aumenta no PFC de roedores durante situações de estresse, ativando os receptores NMDA e aumentando o influxo de cálcio, o qual estimula a enzima neuronal de óxido nítrico sintase (nNOS), resultando na produção de NO

(Garthwaite, 2008). O NO atua como um mensageiro intracelular no SNC, desempenhando um papel modulador em várias funções cerebrais, como a plasticidade sináptica e a neuroproteção, bem como em disfunções, como neurotoxicidade (PRAST e PHILIPPU, 2001).

Os mecanismos primários pelos quais o NO modula a transmissão sináptica são a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) e nitrosilação de proteínas (LISBOA *et al.*, 2011). Além disso, o NO também pode fazer complexos com metais de transição, como o ferro, e depois ser sequestrado por proteínas do grupo heme, como hemoglobina, sGC oxidase e citocromo c (TOLEDO Jr, 2012). A exposição de um organismo ao estresse resulta em aumento da produção de NO neuronal (ZLATKOVIC e FILIPOVIC, 2012). O NO pode desempenhar papel na plasticidade sináptica, neuromodulação e outras funções fisiológicas, no entanto, em condições fisiopatológicas, pode induzir dano oxidativo, sugerindo seu envolvimento na neurotoxicidade (DHIR e KULKARNI, 2011).

Do mesmo modo, durante décadas, o acúmulo e a reatividade do ferro no córtex cerebral foram relacionados à neurodegeneração e indução do estresse oxidativo cerebral em uma série de doenças neurodegenerativas (van Bergen *et al.*, 2016; BUIJS, 2017). Assim, a deposição anormal de ferro pode ocasionar morte celular associado ao acúmulo de ERO e danos patológicos (Dixon e Stockwell, 2014). Em algumas regiões cerebrais, os altos níveis de ferro podem predispor indivíduos a alto risco de declínio cognitivo e motor (Li *et al.*, 2015).

Além disso, a inflamação no SNC também pode ocasionar morte neuronal e está associado a vários distúrbios neurodegenerativos (Hirsch e Hunot, 2009) e em processos infecciosos (WESSLING-RESNICK, 2010). A neuroinflamação é caracterizada pela ativação microglial e uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias (URRUTIA, 2013). Esses processos inflamatórios desencadeiam uma série de eventos, incluindo aumento da produção de ERO e ERN, desequilíbrio homeostático do metabolismo do ferro e disfunção mitocondrial, (URRUTIA, 2014; ZHANG, 2015). Além disso, a microglia ativada possui altos níveis de NO sintase (NOS) e NOX, dois sistemas enzimáticos que medeiam o aumento do grau oxidativo induzido na inflamação, levando à disfunção cognitiva e neurodegeneração (URRUTIA, 2014; ZHANG, 2015).

Este é um evento chave no estresse oxidativo e pode agravar lesões neuronais na sobrecarga do ferro no SNC. Assim, muitas evidências apóiam a idéia

de que o ferro se acumula progressivamente no cérebro, levando ao estresse oxidativo, morte celular e neurotoxicidade. Como consequência deste microambiente, a microglia pode ser ativada para combater uma lesão (infecção ou trauma) e pode contribuir para a neuroinflamação (ONG, 2005; LI, 2016).

Células microgliais são consideradas macrófagos residentes do cérebro, tanto que são as únicas células mielóides presentes no parênquima do SNC. Elas usam sua morfologia “ramificada” para atuar como sentinelas imunes, estendendo processos especializados e patrulhando o ambiente local da presença de corpos estranhos (GRETER et al., 2015). A microglia tem múltiplas funções no SNC e contribue para (1) a eliminação de células apoptóticas, (2) suporte de neurogênese, migração e diferenciação de neurônios, (3) crescimento axonal e sinaptogênese, (4) geração e maturação de astrócitos e oligodendrócitos e (5) angiogênese (TAY, et al., 2017).

As micróglia ativadas podem ser tóxicas aos neurônios, englobando-os ou liberando várias moléculas e fatores neurotóxicos, incluindo ERO, glutamato, ligante Fas e TNF α . Quando a morte neuronal massiva é induzida, a microglia no córtex responde com um aumento agudo nos níveis de TNF α , IL1 β e CD68, consistente com um estado pró-inflamatório (Tay, et al, 2017). Um marcador importante de ativação microglial é o antígeno F4/80, uma glicoproteína madura da superfície celular do camundongo expressa em altos níveis em células de Kupffer, macrófagos esplênicos, microglia e células de Langerhans na pele (CASSADO, 2017).

IL-1 β é amplamente produzida por macrófagos e monócitos, embora também possa ser secretada por outros tipos de células, como células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, células B e T, células endoteliais e epiteliais e é comumente liberada pelas células quando estão morrendo (DE CASTRO, 2015). A IL-1 β medeia diversas respostas inflamatórias, como febre, vasodilatação e hipotensão, principalmente pela indução de cicloxigenase tipo 2 (COX-2), fosfolipase A2 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). IL-1 β também é capaz de aumentar a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, o que promove a infiltração de células inflamatórias e imunocompetentes da circulação para os tecidos (De CASTRO et al., 2015). IL-1 β está envolvida na síntese e secreção de IL-17 a partir de células T CD4+ ativadas (LACY, 2017).

Estudos *in vitro* mostram que a estimulação em curto prazo (pelo uso de TNF- α , IL-6 ou lipopolissacarídeo) por até 18h aumenta o acúmulo de ferro nos neurônios e na micróglia. Este acúmulo está associado a mudanças nos dois transportadores de ferro, DMT1 e Fpn; os neurônios do hipocampo estimulados apresentam aumentos substanciais no DMT1 e diminuição das concentrações de Fpn, ao passo que a microglia mostra aumento das concentrações de proteína DMT1, sem alterações na Fpn (URRUTIA, 2013).

A microglia e monócitos/macrófagos ativados são definidos como clássicos (pró-inflamatórios; tipo M1) ou alternativos (anti-inflamatórios ou protetores; tipo M2) em condições fisiopatológicas. Mais precisamente, a microglia tipo M1 secreta citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-23, e exacerba a inflamação e a lesão tecidual. Em contraste, a microglia tipo M2 secreta citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β , IL-4, IL-10, IL-13, e fatores de crescimento como VEGF e BDNF, suprime a inflamação e promove a recuperação dos tecidos. Crítica para a regulação da resposta imune, a resposta inicial tipo M1 é tipicamente seguida por uma ativação secundária tipo M2 que é importante para a cicatrização de feridas e supressão da inflamação (GRETER, et al., 2015). Essas alterações em micróglia ativada são implicadas tanto na iniciação quanto na progressão de doenças neurodegenerativas, pois, quando ativada, a microglia é capaz de adquirir fenótipos diversos e complexos, o que permite participar da resposta citotóxica, regulação imune e resolução de lesões (WARD, et al. 2014).

IL-4 é produzida por vários subtipos de células linfóides ativadas. As células TH2 são particularmente fontes importantes dessa citocina, pois são críticas para iniciar a imunidade humoral contra patógenos extracelulares. Em macrófagos, IL-4 inibe a secreção de quimiocinas pró-inflamatórias e citocinas, como TNF- α e IL-1 β , prejudicando a capacidade dessas células de produzir ERO e ERN, e bloqueia a expressão de moléculas de adesão celular induzidas por IFN γ , como ICAM e E-selectin. No entanto, a IL-4 também pode induzir macrófagos a sintetizar IL-12, fornecendo um feedback negativo para regular a resposta Th2 (MAK, 2006).

Paralelo a ativação microglial, os astrócitos também tem importante papel como marcador de agressão neurotóxica, principalmente pela expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), uma proteína de filamento intermediário presente em vários tipos de células neurais, principalmente astrócitos, formando parte do citoesqueleto. GFAP está aumentada em lesões cerebrais de roedores

(GLUSHAKOVA, et al., 2018). A indução dessa proteína é rápida, frequentemente maciça e pode resultar em mudanças na morfologia do astrócito. Tanto a lesão astrocítica primária, como as respostas gliais secundárias à lesão neuronal podem induzir aumento de GFAP, apoiando o uso dessa proteína como um marcador de lesão neurotóxica (PYLE, 2010).

As atividades atribuíveis à GFAP incluem a supressão da proliferação neuronal e extensão das neurites no cérebro adulto, formando uma barreira física para isolar tecidos danificados, regulando o fluxo sanguíneo após isquemia, contribuindo para a BHE, apoiando a mielinização e fornecendo resistência mecânica (BRENNER, 2014).

Outro fator importante no contexto das alterações neuronais, é o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), uma neurotrofina que está envolvida na plasticidade sináptica e na sobrevivência dos neurônios, na integridade estrutural dos neurônios e na neurogênese. Acredita-se que o BDNF esteja envolvido na patogênese de vários distúrbios neuropsiquiátricos, e vários estudos avaliam os níveis de BDNF em humanos como importante biomarcador, principalmente em relação à depressão e de transtornos de ansiedade (SULIMAN et al., 2013; MURÍNOVÁ et al., 2017). No entanto, os mecanismos que ligam o isolamento social crônico, a expressão do BDNF e as alterações comportamentais ainda são atualmente desconhecidos (MURÍNOVÁ et al., 2017).

2.6 TERAPIA PARA METEMOGLOBINEMIA E AGENTES ANTIOXIDANTES

A terapia padrão para os casos de MetHba adquirida e induzida por fármacos como a DDS é realizada com o Azul de Metileno (AM), um corante básico, através de injeção intravenosa, na dose de 1-2 mg/kg em solução 1%, com tempo de infusão de 5 minutos. No entanto, doses acumuladas superiores a 7 mg/kg podem causar sintomas como dispnéia, dor precordial, cianose persistente (principal efeito colateral), anemia hemolítica e MetHba (SILLS e ZINKHAM, 1994; ELLENHORN *et al.*, 1997; TOKER, 2015). A exposição aguda ao AM pode causar efeitos prejudiciais à saúde como aumento da frequência cardíaca, dor de cabeça intensa, náuseas, vômitos, diarreia e necrose do tecido humano (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006).

O AM é permeável através de biomembranas e atravessa facilmente a BHE e seletivamente marca o tecido cerebral. Alguns estudos mostraram que, após a administração, AM é seletivamente aprisionado no cérebro e suas concentrações são 10-20 vezes maiores no cérebro do que no sangue uma hora após a administração. O AM tem afinidade por oxidases teciduais, por isso se concentra na mitocôndria, no qual é capaz de manter a função mitocondrial, recebendo elétrons de moléculas da cadeia respiratória e transferindo-os para citocromo oxidase ou oxigênio, melhorando a respiração mitocondrial (MICLESCU e WIKLUND, 2010).

Os efeitos do AM são refletidos no aumento da atividade de produção de energia mitocondrial. Por este motivo, o AM constitui um potencializador metabólico que acelera a atividade da cadeia de transporte de elétrons (GONZALEZ-LIMA, 1998). Além disso, estudos farmacocinéticos em roedores revelaram que a administração intravascular de AM leva a um acúmulo rápido e extenso no SNC (Peter, 2000; Vutskits, 2008). O AM atua como co-fator para acelerar a redução da MetHb pela ação da enzima NADPH-MR (Mansouri e Lurie, 1993). Portanto, o AM é um doador efetivo de elétrons para NADPH-MR. Na presença desta enzima e de NADPH, o AM é rapidamente reduzido a branco de metileno (leucobase) que, por sua vez, reduz a não-enzimaticamente íon férrico para íon ferroso (Figura 17).

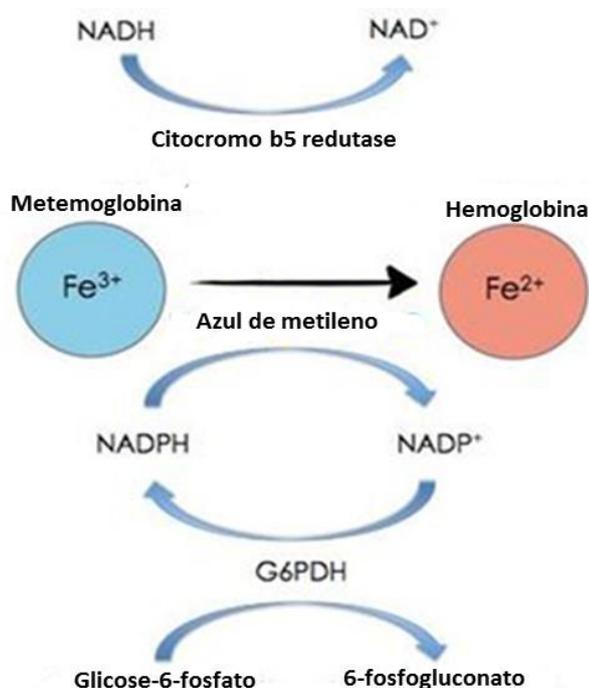


Figura 17: Prováveis vias de redução da metemoglobina, sendo que a principal via fisiológica é a do citocromo b5 redutase. No entanto, essa redução também pode ser feita pela via exógena com o uso de azul de metileno. Fonte: Walker et al, (2009).

O AM apresenta efeito rápido na redução da MetHb tanto *in vivo*, como também *in vitro* (GIBSON, 2002), entretanto a sua redução requer que a via da hexose monofosfato esteja intacta para a regeneração do NADPH. No entanto, em indivíduos com deficiência de G6PD, o AM não consegue ser convertido da sua forma oxidada para a forma reduzida, com isso ocorre o agravamento da metemoglobinemia nos pacientes (WARD e MCCARTY, 1998).

Portanto, a busca por compostos antioxidantes, que possam retardar ou prevenir este processo, é de extrema relevância para pacientes que fazem uso da DDS. Nesse sentido, vários antioxidantes são avaliados como possíveis alternativas terapêuticas para MetHb e outros danos ocasionados pelo estresse oxidativo, como o ácido ascórbico (BORAN *et al.*, 2008; EL-HUSSEINI e AZAROV, 2010), curcumina (BERGAMASCHI *et al.* 2011), o resveratrol (Albuquerque *et al.*, 2015), o cogumelo *Agaricus brasiliensis* (Barros *et al.*, 2008; Percário *et al.*, 2009), N-acetilcisteína (COLEMAN e TAYLOR, 2003), ácido α -lipóico (ALA; COLEMAN e WALKER, 2000; BILSKA e WLODEK, 2005), vitaminas C e E, licopeno, flavonóides como a quercetina e rutina, além de minerais como o selênio e o zinco (VALKO *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2007). Dentre eles, vale ressaltar a importância do ALA, como antioxidante e quelante, podendo atuar na varredura de ERO, homeostase do ferro, inflamação e disfunção mitocondrial.

2.7 POTENCIAL ANTIOXIDANTE E FARMACOLÓGICO DO ÁCIDO LIPÓICO

O ácido α -lipóico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico- ALA), também conhecido como ácido tióico, é um ácido graxo que contém um anel tiolano com uma ponte dissulfeto entre os carbonos 6 e 8 (Figura 18). O ALA é um composto naturalmente encontrado em todas as espécies vegetais e animais, em células procariontes e eucariontes (PACKER *et al.*, 2001), cuja síntese em animais ocorre pela ligação covalente de ALA ao grupo amino de lisinas residuais. Esta molécula atua como cofator de enzimas mitocondriais, catalisando a descarboxilação oxidativa do piruvato, α -cetoglutarato e cadeias ramificadas de α -cetoácidos formados durante a transaminação da leucina, isoleucina e valina (BILSKA e WLODEK, 2005; PACKER *et al.*, 2001).



Figura 18: Estrutura química do ácido α -lipóico (ALA) e de sua forma reduzida, o ácido dihidrolipóico (ADHL). Fonte: Bilaska; Wlodek, 2005.

O ALA é uma molécula anfipática e, portanto, apresenta características hidrossolúveis e lipossolúveis, influenciando o metabolismo celular na eliminação de substâncias tóxicas. Este composto auxilia na recuperação de lesões, na quelação de metais de transição e na inibição da ativação do NF κ -B, consequentemente inibindo a resposta inflamatória (MOINI *et al.*, 2002). Além disso, diversos estudos mostram que o ALA e ADHL são considerados potentes agentes antioxidantes, uma vez que podem capturar diversas ERO, incluindo radicais superóxido, radicais hidroxila, ácido hipocloroso, radicais peroxila e oxigênio singleto, além de poder reciclar a GSH, o α -tocoferol e o ácido ascórbico (WOLLIN e JONES, 2003). Além disso, estudos *in vitro* mostram que o ALA diminui a suscetibilidade plasmática à oxidação (Marangon *et al.*, 1999), protegendo eritrócitos humanos da hemólise induzida por radicais peroxil (CONSTANTINESCU *et al.*, 1994), e aumentando a síntese de GSH em eritrócitos humanos isolados (HAN *et al.*, 1997).

Após a administração, o ALA é reduzido por várias enzimas e liberado no ambiente extracelular como seu principal metabolito, o DHLA (Bilaska, 2005; Mignini, 2012). ALA é um composto de baixo peso molecular que penetra facilmente na BHE, sendo absorvido em células e tecidos, então é reduzido a ADHL, atuando como um potente antioxidante. O ALA é absorvido rapidamente em indivíduos saudáveis quando administrado uma dose de 200 mg, com uma biodisponibilidade limitada ($29,1 \pm 10,3\%$) devido ao metabolismo de primeira passagem (Teichert *et al.*, 2003 Venigala *et al.*, 2016).

Com relação à ação do ALA sobre efeitos tóxicos da dapsona, Coleman e Walker (2000) mostraram que este composto reduz a metemoglobinemia induzida pelo metabólito MADDS-NOH. O ALA também é um cofator essencial para a atividade de enzimas mitocondriais e tem sido estudado extensivamente no tratamento de doença de neurodegenerativas, como Alzheimer, prevenindo a evolução da doença *in vivo* e *in vitro* e melhorar o estado antioxidante cerebral (Moini *et al.*, 2002; Bilaska e Wlodek, 2005; Perez e Castaneda, 2006).

De acordo com Perez e Castaneda (2006) a capacidade antioxidante do ALA está relacionada à presença de um grupamento tiol, que é capaz de reagir diretamente com radicais oxidantes, portanto ele é considerado um excelente antioxidante com valor terapêutico em patologias relacionadas a produção acentuada de ERO, incluindo diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas. Em função de suas propriedades, espera-se que o ALA seja um antioxidante promissor no tratamento da MetHba e do estresse oxidativo cerebral ocasionado principalmente pelo desequilíbrio no metabolismo e transporte do ferro.

Nesse sentido, Georgakouli *et al.* (2013) propuseram que a suplementação com ALA (600mg/dia) leva a benefícios para pacientes com deficiência em G6PD, visto que esse antioxidante aumentou os níveis de GSH e CAT após a segunda semana de tratamento. Por outro lado, o ALA reduziu os níveis de proteínas carboniladas, indicando que a suplementação com ALA pode modular o estado redox no sangue de humanos com deficiência de G6PD, diminuindo os índices de estresse oxidativo.

Os principais mecanismos de ação do ALA e ADHL sugeridos são: aumento da produção de acetilcolina ativando acetilcolinesterase, aumento da absorção de glicose fornecendo assim mais acetil Co-A para produção de acetilcolina, quelação de metais de transição inibindo assim a formação de ERO e produtos de peroxidação lipídica, induzindo a produção de enzimas envolvidas na síntese de glutathione e outras enzimas antioxidantes protetoras (Packer *et al.*, 1995). Além disso, atua no reparo de moléculas danificadas pelo estresse oxidativo e ainda formam um par redox ADHL/ALA com potencial de redução mais negativo ($E_0' = -0,32$ V) que os pares glutathione reduzida/glutathione oxidada (GSH/GSSG) e cisteína/cistina (CSH/CSSC) ($E_0' = -0,24$ e $-0,22$ V, respectivamente) (Packer *et al.*, 1995). Devido a seu potencial redox, o ADHL/ALA é capaz de reduzir a GSSG a GSH e a CSSC a CSH. No caso da GSH em particular, o par redox ADHL/ALA

pode funcionar como um sistema de reciclagem alternativo a atividade da glutathiona redutase, sem gasto de NADPH (Packer *et al.*, 1995).

A ALA apresenta uma variedade de propriedades no SNC, como: aumento da produção de acetilcolina (ACh) por ativação de acetiltransferase de colina e aumenta a absorção de glicose, fornecendo mais acetil-CoA para a produção de ACh; quelação de metais de transição, como o ferro, inibindo a formação de ER; eliminação de produtos de peroxidação lipídica, como 4-HNE (Holmquist *et al.*, 2007); ativação da via Nrf2, aumentando os níveis de GSH no tecido cerebral (Steele *et al.*, 2013; Venigala *et al.*, 2016). Além disso, a dieta com ALA mostrou melhora na atividade metabólica e a função cognitiva, diminuindo o estresse oxidativo cerebral em ratos (Head *et al.*, 2012).

Além disso, o ALA pode atenuar o dano dos radicais livres e reduzir a atividade inflamatória e, portanto, pode ter um efeito positivo na ferroptose neuronal, já que a ferroptose também pode ser prevenida por antioxidantes lipofílicos e quelantes de ferro (Xie 2016, Zhang 2018). Portanto, é plausível que ALA possa exercer neuroproteção e ação anti-inflamatória direta ou indireta, pelas suas características antioxidantes e quelantes.

Assim, é de grande interesse e importância para a clínica, avaliar os efeitos da DDS sobre as alterações oxidativas e inflamatórias, periféricamente e no SNC, bem como os prováveis efeitos benéficos de ALA. Nesse sentido, nosso estudo pode contribuir para compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos no desequilíbrio redox, especialmente causados pelo ferro, no sangue e no SNC. Além disso, pode possibilitar o planejamento de ações eficazes no controle e tratamento da hanseníase, com o uso de um antioxidante de baixo custo e toxicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações oxidativas e inflamatórias causadas pela dapsona no sangue e no córtex pré-frontal de camundongos, e o possível papel protetor do ácido α -lipóico nesses processos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos do ALA na formação e/ou redução da MetHb e sobre parâmetros oxidativos plasmáticos ocasionados pelo tratamento com dapsona em camundongos;
- Avaliar os parâmetros antioxidantes (TEAC, GSH, SOD e CAT) e oxidativos (TBARS e Ferro) no sangue e no PFC causados pelo tratamento com a dapsona;
- Verificar os efeitos do ALA nas alterações oxidativas no PFC induzida pelo tratamento com dapsona em camundongos, correlacionando às concentrações de MetHb;
- Avaliar as respostas microglial e astrocitária, através da expressão de F4/80⁺ e GFAP em micróglia e astrócitos, respectivamente, no PFC induzidas pela dapsona em camundongos, bem como os efeitos de ALA;
- Determinar o efeito do ALA sobre a neuroinflamação induzida pela dapsona, correlacionando às concentrações de MetHb e alterações oxidativas periféricas e no córtex pré-frontal dos camundongos;
- Avaliar o papel do ferro na geração do estresse oxidativo plasmático e no córtex pré-frontal, correlacionando às concentrações de MetHb e alterações neuroinflamatórias;
- Avaliar a expressão das citocinas IL-1 β , IL-17 e IL-4, e BDNF no PFC, correlacionando às alterações oxidativas e expressão de F4/80⁺ e GFAP.

4 METOLOGIA

4.1 ANIMAIS E PROCEDÊNCIA

Para este estudo, foram utilizados 100 camundongos *Mus musculus*, adultos machos, da linhagem Swiss, com massa corpórea variando de 35 a 40g, com 8 semanas de vida, provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC-PA). Os camundongos foram alojados em gaiolas para cinco animais, sendo mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e em ciclo alternado de 12 horas de claro/escuro. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante o período dos experimentos. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPA sob o nº 2411100816, conforme certificado em anexo.

4.2 ADMINISTRAÇÃO DA DAPSONA E DO ÁCIDO LIPÓICO

A dapsona foi dissolvida em dimetilsulfóxido 2% (DMSO) e administrada via intraperitoneal (i.p) na concentração de 40mg/kg. Por outro lado, o ácido α -lipóico foi dissolvido em solução salina 0,9% e administrado por via oral (gavagem), nas concentrações de 12,5 e 25mg/kg.

4.2.1 Grupos e Tratamentos

Os camundongos foram tratados com com DDS (40mg/kg) por via intraperitoneal, enquanto ALA foi administrada por gavagem nas concentrações de 12,5 e 25 mg/kg. Os animais dos grupos controles foram administrados com AM 1mg/kg ou com os veículos (DMSO ou solução salina), seguindo a metodologia de Bergamaschi *et al.* (2011), com adaptações, como segue:

GRUPOS CONTROLES:

- **Grupos Sham (DMSO + Solução Salina) (N=20):** receberam 50µL em solução de DMSO 2% e, duas horas após, 50µL de solução salina 0,9% por gavagem, durante 5 dias consecutivos.
- **Grupos Dapsona + Azul de Metileno (N=20):** receberam 50µL em solução de DDS 40mg/kg em DMSO % e, duas horas após, 50µL de solução de azul de metileno (AM) 1mg/kg ip, durante 5 dias consecutivos.
- **Grupos Dapsona + Solução Salina: (N=20):** receberam 50µL em solução de DDS 40mg/kg em DMSO 2% e, duas horas após 50µL de solução salina a 0,9% por gavagem, durante 5 dias consecutivos.

TRATAMENTOS:

- **Grupos Dapsona + Ácido Lipóico 12,5 mg/kg (N=20):** receberam 50µL em solução de DDS 40mg/kg em DMSO e, duas horas após, 50µL de solução de ALA 12,5mg/kg em solução salina por gavagem, durante 5 dias consecutivos.
- **Grupos Dapsona + Ácido L ipóico 25 mg/kg (N=20):** receberam 50µL em solução de DDS 40mg/kg em DMSO e, duas horas após, 50µL de solução de ALA 25 mg/kg em solução salina por gavagem, durante 5 dias consecutivos.

Para cada um dos grupos acima (controle ou tratamento), 10 animais foram eutanasiados após 4h e 10 animais após 24h do final do tratamento.

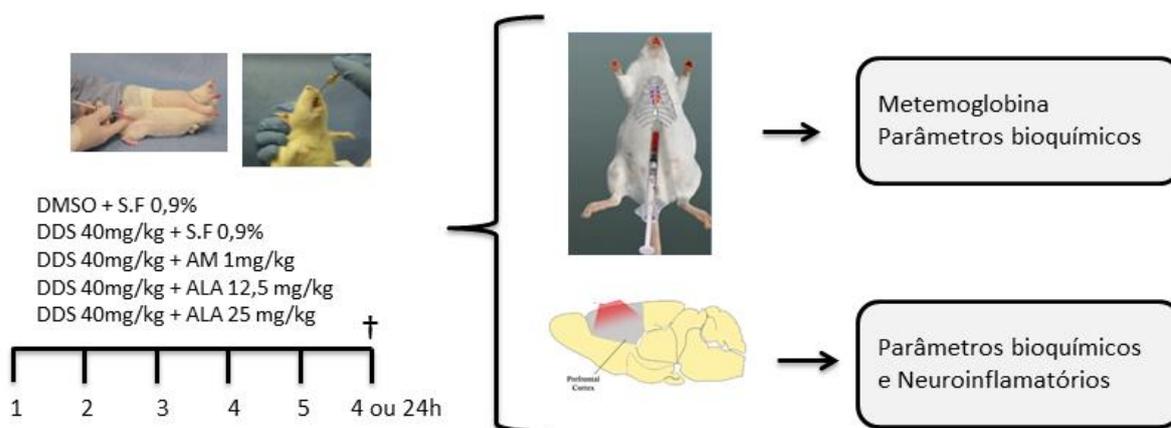


Figura 19 – Representação esquemática do delineamento experimental. DMSO: dimetilsulfóxido; DDS: dapsona; ALA: ácido α -lipóico; SF: solução fisiológica.

4.3 COLETA DE AMOSTRAS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Após 4h ou 24h do término do tratamento farmacológico com DDS e/ou ALA e dos grupos controles, os animais foram submetidos a eutanásia por exsanguinação, sendo inicialmente anestesiados com quetamina (1,5 µL/g de peso corporal) e xilazina (0,5 µL/g de peso corporal) e realizada a punção cardíaca para coleta de sangue total.

Em seguida, foi realizada uma craniotomia para a retirada do encéfalo e posterior separação do córtex pré-frontal. Cada órgão coletado foi pesado e colocado em tubos do tipo eppendorf com de PBS na proporção de 1:10 e sonicados. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C para posterior análise. A partir das amostras de sangue foram avaliadas os níveis de MetHb, marcadores da defesa antioxidante e do estresse oxidativo.

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

4.3.1 Determinação do Percentual de Metemoglobina

A técnica empregada foi criada por Evelyn e Malloy (1938) e posteriormente adaptada por Hegesh (1970), onde o percentual de MetHb é avaliado, observando-se a variação de absorbância causada pela adição do agente neutralizante cianeto de potássio (KCN) em um hemolisado tamponado com ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) e outro tubo sem este reagente. O tubo contendo hemolisado e $K_3Fe(CN)_6$ foi utilizado como padrão, empregado para converter todas as formas de Hb para MetHb. Valores de MetHb inferiores a 2% foram considerados normais.

Inicialmente, foram adicionados 500 µL da suspensão de hemácias a 50% em tubos de ensaio, seguido pela adição de 2.5 mL de água destilada e agitadas por inversão três vezes e mantidas em repouso por 3 min. Em seguida, foi adicionado ao tubo 1 mL de solução tampão-fosfato 0,5 mol/L e 3 gotas de t-Octylphenoxyethoxyethanol (Triton X-100) [adquirido da Sigma-Aldrich, Co. (St.

Louis, Mo)], e após isto, o tubo foi agitado no vórtex por 30 segundos. Deste tubo, foram transferidos 2.4 mL para cubeta (A1) e 0.2 mL para outra cubeta (A2), esta contendo 2,2 mL do reativo ferricianeto-fosfato. Seguiu-se a leitura das amostras em $\lambda = 632 \text{ nm}$ em espectrofotômetro, para obtenção das absorvâncias de A1 e A2. Após as leituras, foi adicionado 100 μL da solução neutralizada de cianeto de sódio a 10% nos tubos A1 e A2, sendo realizada nova leitura das absorvâncias para obtenção do A3 e A4 (Figura 20).

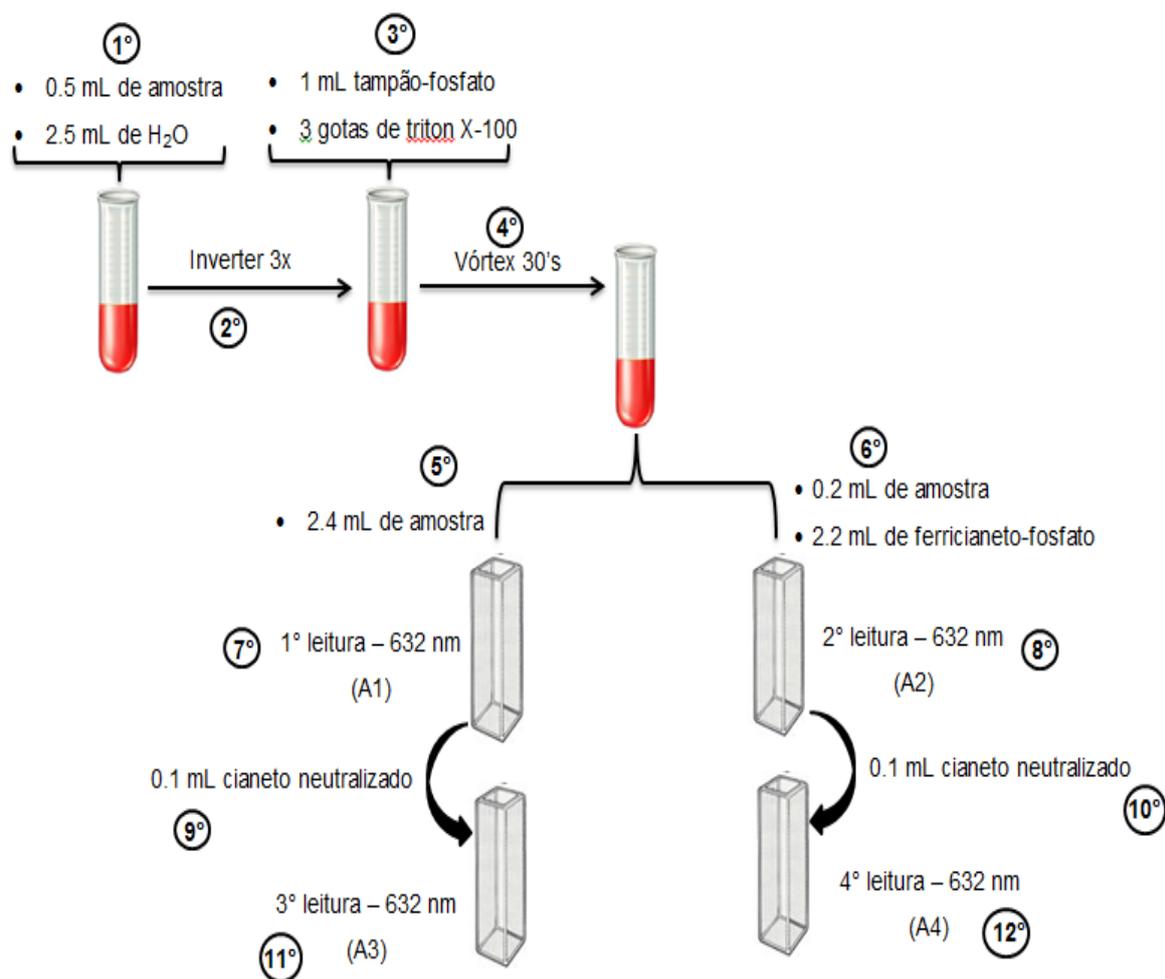


Figura 20: Representação esquemática da determinação do percentual de Metemoglobina.

Após a leitura das absorvâncias, o cálculo do % MetHb das amostras foi feito pela seguinte equação:

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

4.3.2 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 $ABTS^{+\cdot}$ (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 $\mu M/mL$.

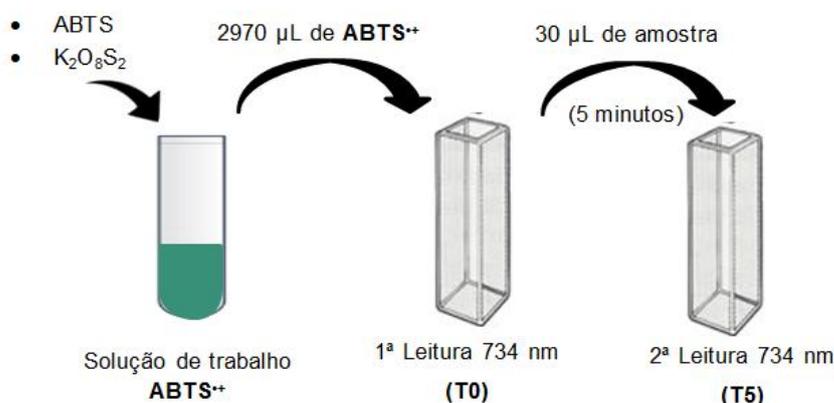


Figura 21: Representação esquemática da determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC).

4.3.3 Determinação da Atividade da Glutathiona Reduzida

A determinação das concentrações da 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 min. 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 absorbâncias (T3–T0) é proporcional à concentração de GSH, expressa em μ M/mL (Figura 22).

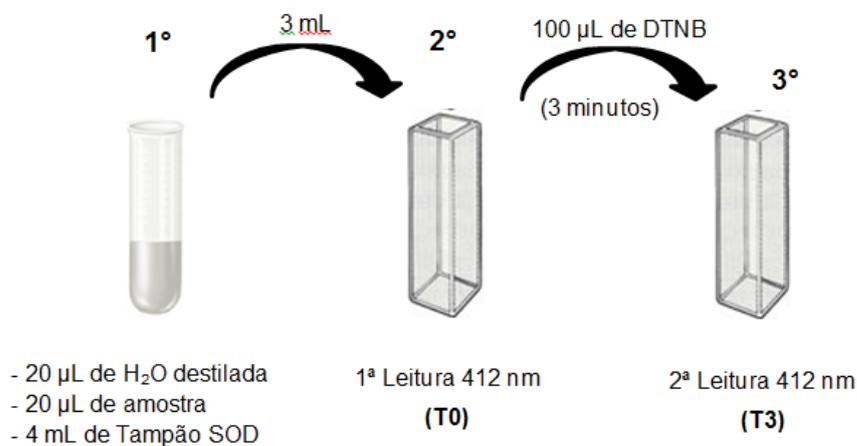


Figura 22: Representação esquemática da determinação da glutathiona reduzida (GSH).

4.3.4 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase

A determinação da atividade da SOD foi realizada segundo a técnica preconizada por McCord e Fridowich (1969) adaptada. Esta metodologia é de detecção indireta da atividade da SOD, pois a presença desta enzima na amostra,

promove a conversão do $\cdot\text{O}_2$ em H_2O_2 e O_2 , impedindo conseqüentemente a redução do citocromo C, que é detectada por espectrofotometria em comprimento de onda de 550nm. A atividade da enzima SOD foi expressa em nmol/ mL do hemolisado e dos órgãos dos animais tratados e os controles. Neste ensaio, uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que promove 50% de inibição da redução do citocromo C à 25°C em pH 7,8.

Após o preparo das amostras, uma alíquota de 50 μL foi adicionada a uma mistura de tampão, citocromo C 0,075mM, hipoxantina (Sigma-Aldrich) 1,5 mM e xantina oxidase (Sigma-Aldrich) 56 Mm. A solução resultante foi incubada a 37°C e ao abrigo da luz e, após 15 min, foi realizada uma única leitura na faixa de 550 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimatzu). Os valores de absorbância foram aplicados em curva padrão de citocromo C para determinação da concentração enzimática, expressa em Unidade SOD/mg proteína: uma unidade de SOD é a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a velocidade de redução do citocromo C em pH 7,8. A atividade de SOD foi expressa em nmol/ mL de sangue.

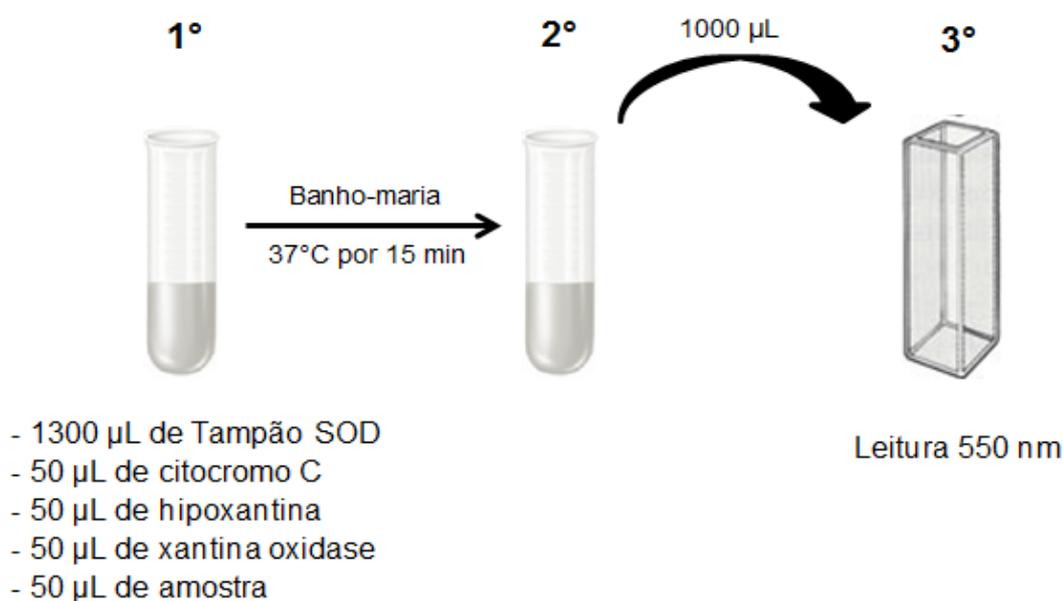


Figura 23: Procedimento para determinação da superóxido dismutase (SOD).

4.3.5 Determinação da Atividade da Catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada conforme o método descrito por Aebi (1984), que avalia a capacidade da catalase presente na amostra converter o H_2O_2 (Merck) em água e oxigênio. Assim, para verificar o decaimento do H_2O_2 , alíquotas das amostras diluídas foram adicionados a 900 μL de solução de reação (Tampão TRIS base, H_2O_2 30% e água ultrapura) em pH 8 (Bukowska e Kowalska, 2004). A diminuição da concentração de H_2O_2 foi verificada a $\lambda=240$ nm em espectrofotômetro a 25°C durante 60 seg. A atividade de catalase foi definida como a atividade necessária para degradar um 1 mol H_2O_2 em 60 seg, em pH 8 a 25°C, sendo expressa como U/mg proteína nos tecidos. Os dados de atividade enzimática obtida no ensaio da CAT foram normalizados pelas respectivas concentrações de protéicas totais, usando-se o Kit comercial Doles.

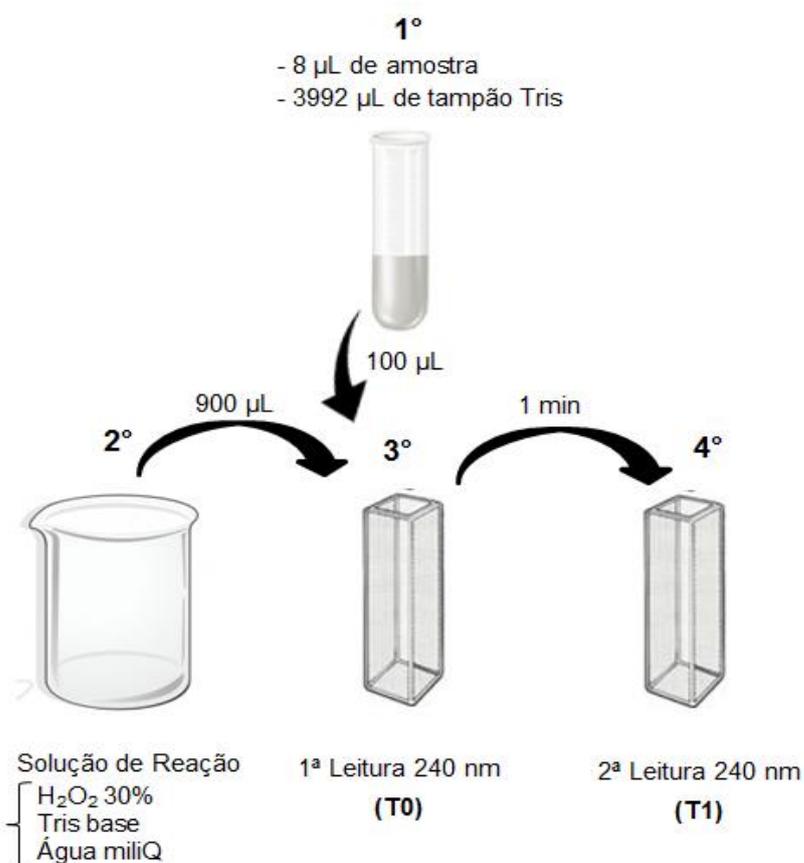


Figura 24: Procedimento para determinação da atividade da enzima catalase

4.3.6 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada pelo método de Khonn e 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 535 nm. 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). As concentrações elevadas de TBARS tem sido utilizadas como um indicador do estresse oxidativo.

O procedimento técnico consiste no preparo inicial do fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄ 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 TBA 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 expressos em µM/L.

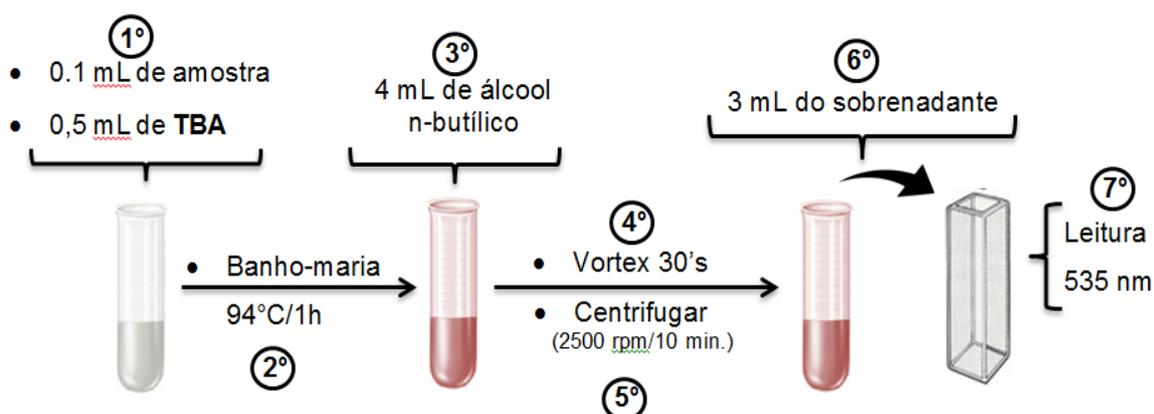


Figura 25: Representação esquemática da dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

4.3.7 Determinação das Concentrações de Ferro

As concentrações de ferro nas amostras foram determinadas pelo método colorimétrico de Goodwin modificado (Goodwin, et al, 1966). Para isso, foram utilizados 50µL de cada amostra e as leituras foram feitas em espectrofotômetro em 565nm. Os tubos utilizados na manipulação das amostras durante os procedimentos foram de plástico e descartáveis, para evitar a contaminação com traços de ferro. Na análise, 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. Os resultados foram expressos em µg/L.

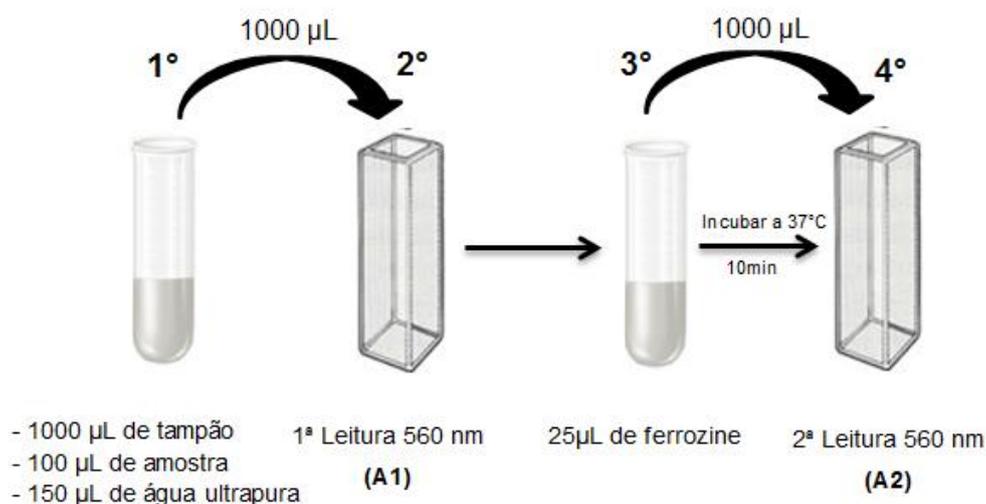


Figura 26: Procedimento para determinação do ferro sérico e no córtex pré-frontal.

4.3.8 Imunofenotipagem de células macrofágicas/microglial e astrócitos

A imunofenotipagem de células macrofágicas/microglial ($F4/80^+$) e astrócitos (GFAP) foi realizada por citometria de fluxo (Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer). Para a imunomarcagem foi utilizada a técnica de imunofluorescência direta, onde uma amostra de PFC de $1,5 \times 10^8$ cel/mL foi pré-incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, com cinco microlitros de um dos seguintes anticorpos monoclonais: anticorpo anti- $F4/80^+$ conjugado a PE (Sigma-Aldrich) e

anti-GFAP conjugado a FITC (Thermo Fisher Scientific). Amostras de animais basais (sem tratamento) e animais com dapsona ou dapsona+ALA foram avaliadas quanto a intensidade de expressão e percentagem de células positivas para F4/80⁺ ec GFAP, medida pela intensidade média de fluorescência. Para cada amostra de animais submetida à citometria de fluxo, foram analisados 10.000 eventos utilizando Attune NxT Software.

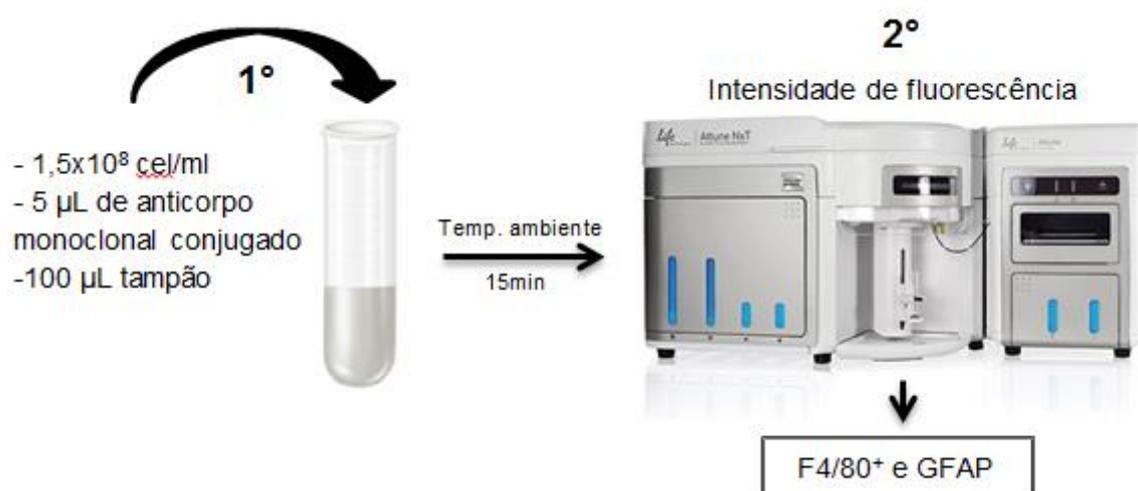


Figura 27: Procedimento para determinação da expressão de células macrofágicas/microglial (F4/80⁺) e astrocitos (GFAP) por citometria de fluxo.

4.3.9 Determinação da Expressão de IL-1 β , IL-17, IL-4 e BDNF

As dosagens das citocinas IL-1 β , IL-17 e IL-4, bem como de BDNF, foram realizadas no homogeneizado do PFC dos camundongos com *kits* comerciais (R&D Systems, Billings, MT, EUA) pela técnica de ELISA, com limite de detecção para cada citocina de 5 pg/mL.

O teste de ELISA (do inglês “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*”) baseia-se nas reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Resumidamente, placas de microtitulação de fundo chato foram revestidas durante 3 h com um anticorpo de captura a 10 µg/ml in a 0.1 M em tampão de carbonato a 0,1 M (pH 9,6, 50 µL/poço) a 37°C e 5% de CO₂. As placas foram lavadas duas vezes e incubadas por 1h com PBS/BSA 3% (37°C, 5% de CO₂). Após a lavagem, amostras contendo citocinas recém-descongeladas diluídas em PBS/BSA a 3% foram então adicionadas e incubadas *overnight* a 4 °C.

Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com estreptavidina acoplada a peroxidase, 1/5000 diluídas em PBS a 3% durante 1 h (37°C, 5% de CO₂) e lavado, e a atividade enzimática foi determinada com o substrato 1,2-fenileno-diamina com H₂O₂ (30%) em tampão de substrato, pH 5,4. A reação foi parada adicionando um volume igual de H₂SO₄ 1M aos poços. As placas foram lidas a dois comprimentos de onda de 490 e 405 nm em leitor de microplaca.

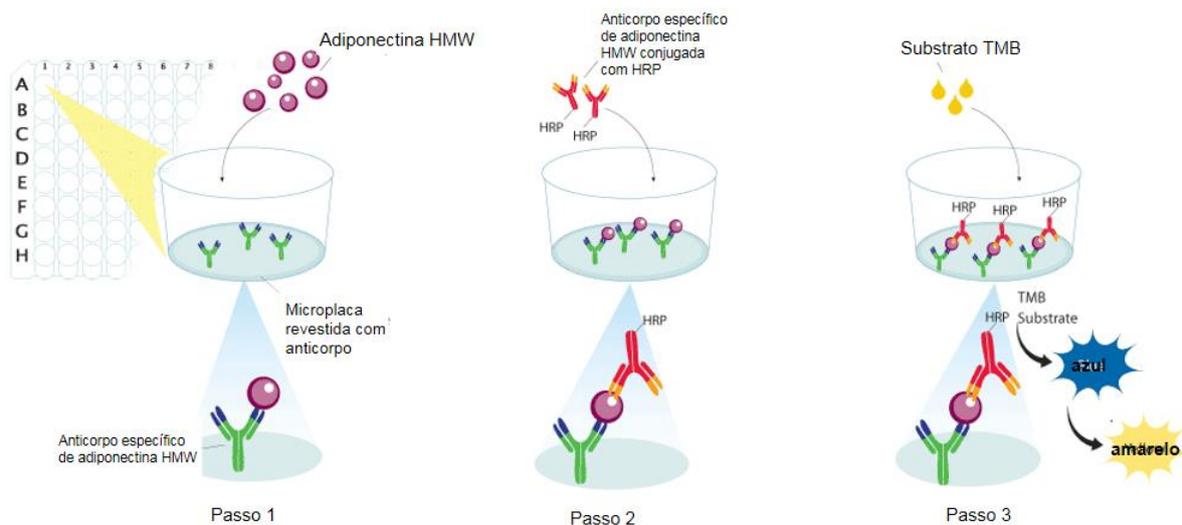


Figura 28: Procedimento para determinação da expressão de citocinas IL-1 β , IL-17 e IL-4, bem como de BDNF pelo método de ELISA. Adaptado de R&D Systems, Inc.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise estatística, onde cada parâmetro foi analisado inicialmente em relação aos possíveis pontos discrepantes (outliers), sendo utilizado o cálculo do intervalo interquartil. Para cada parâmetro analisado foi realizada Análise Variância (ANOVA) uma via, seguida do teste de Tukey para a comparação de pares de médias. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 METEMOGLOBINA E PARÂMETROS OXIDATIVOS SANGUÍNEOS

A Figura 29 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, nos tempos de 4h e 24h, aumentou significativamente ($p < 0,05$) o percentual de MetHb comparado aos controles (grupos sham). Em relação ao tratamento com o ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de prevenir ou reverter a oxidação da hemoglobina induzida pela DDS ($p < 0,05$) nos dois tempos avaliados. A inibição de MetHb pelo ALA foi similar ao efeito induzido pelo AM (1mg/kg), controle positivo, mostrando que o ALA tem eficácia similar ao AM.

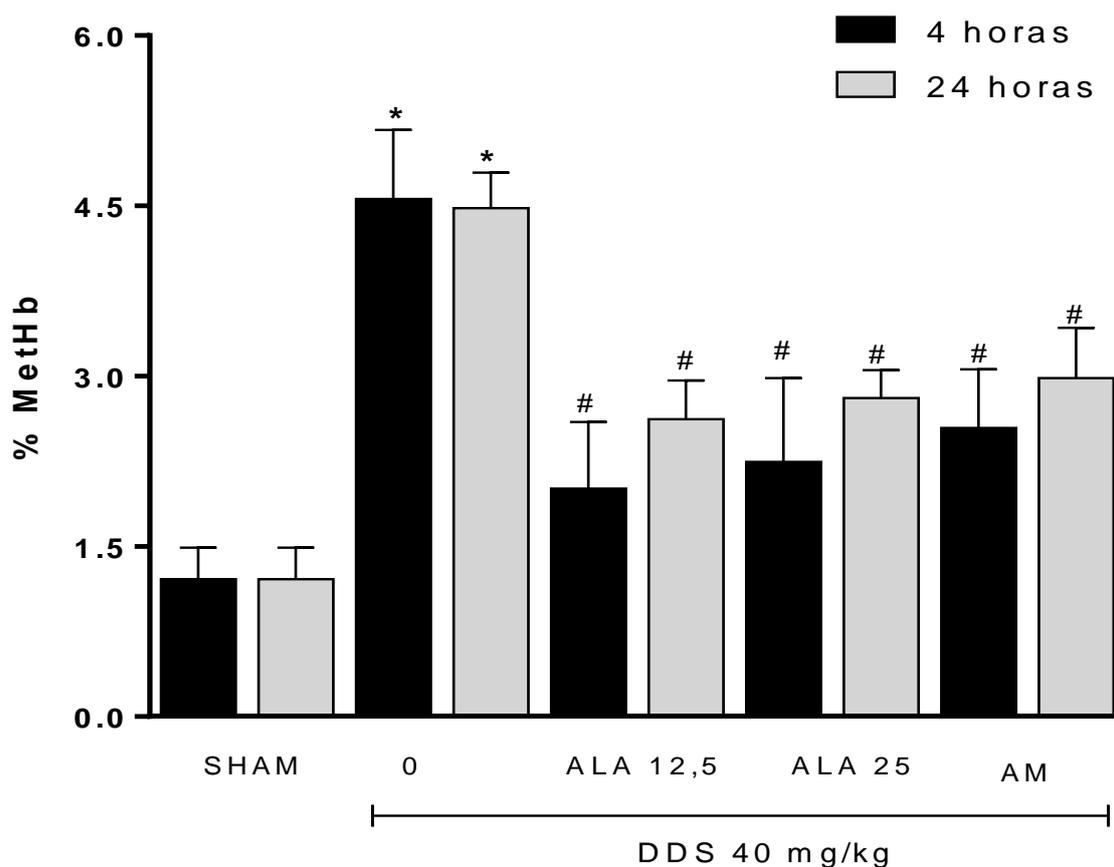


Figura 29: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a formação de metemoglobina (MetHb) no sangue de camundongos e do pós-tratamento com ALA em diferentes doses (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

5.1.1 Alterações na Defesa Antioxidante dos Eritrócitos

A Figura 30 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, nos tempos de 4 e 24h, diminuiu os níveis da capacidade antioxidante total (TEAC) intraeritrocitária comparado ao grupo sham. Em relação ao tratamento com o ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de restaurar os níveis de TEAC, principalmente em 24h, induzido pelo tratamento com DDS 40mg/kg ($p < 0,05$). O tratamento com ALA mostrou efeito semelhante ao AM (1mg/kg).

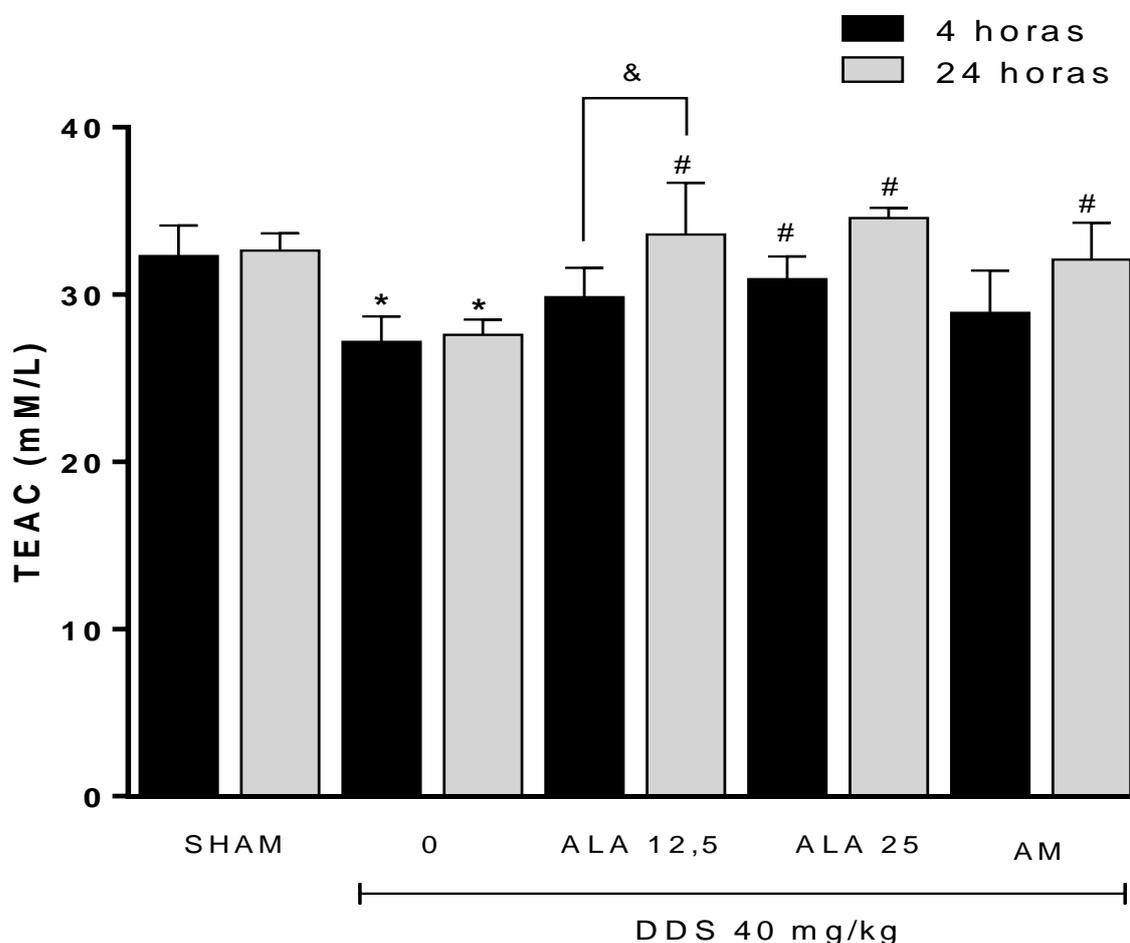


Figura 30: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a capacidade antioxidante total (TEAC) nas hemácias de camundongos e do pós-tratamento com ALA em diferentes doses (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante; & $p \leq 0,05$ comparado aos diferentes tempos avaliados. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A Figura 31 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu as concentrações de GSH nos eritrócitos no tempo de 24h comparado ao grupo sham ($p < 0,05$). Em relação ao tratamento com o ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de aumentar ou reestabelecer os níveis de GSH induzidos pelo tratamento com DDS ($p < 0,05$), nos tempos avaliados, principalmente em 4h após o tratamento. Os tratamentos nas duas doses de ALA apresentaram comportamento semelhante ao AM (1mg/kg).

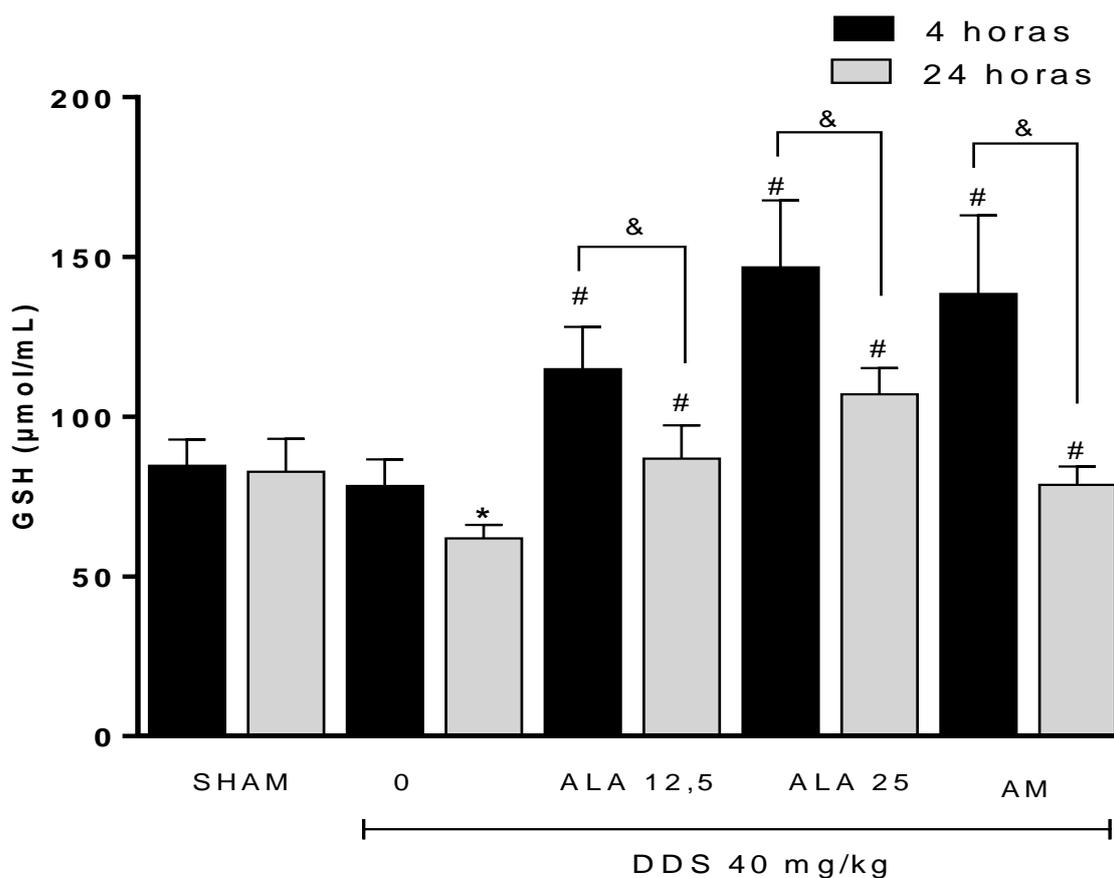


Figura 31: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) nas hemácias de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante; & $p \leq 0,05$ comparado aos diferentes tempos avaliados. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A Figura 32 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu a atividade de SOD intraeritrocitária em 24h em relação ao grupo sham ($p < 0,05$). Em relação ao tratamento com o ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de restaurar a atividade de SOD ($p < 0,05$), nos tempos avaliados. O grupo tratado com AM (1mg/kg) apresentou comportamento semelhante ao ALA em 24h.

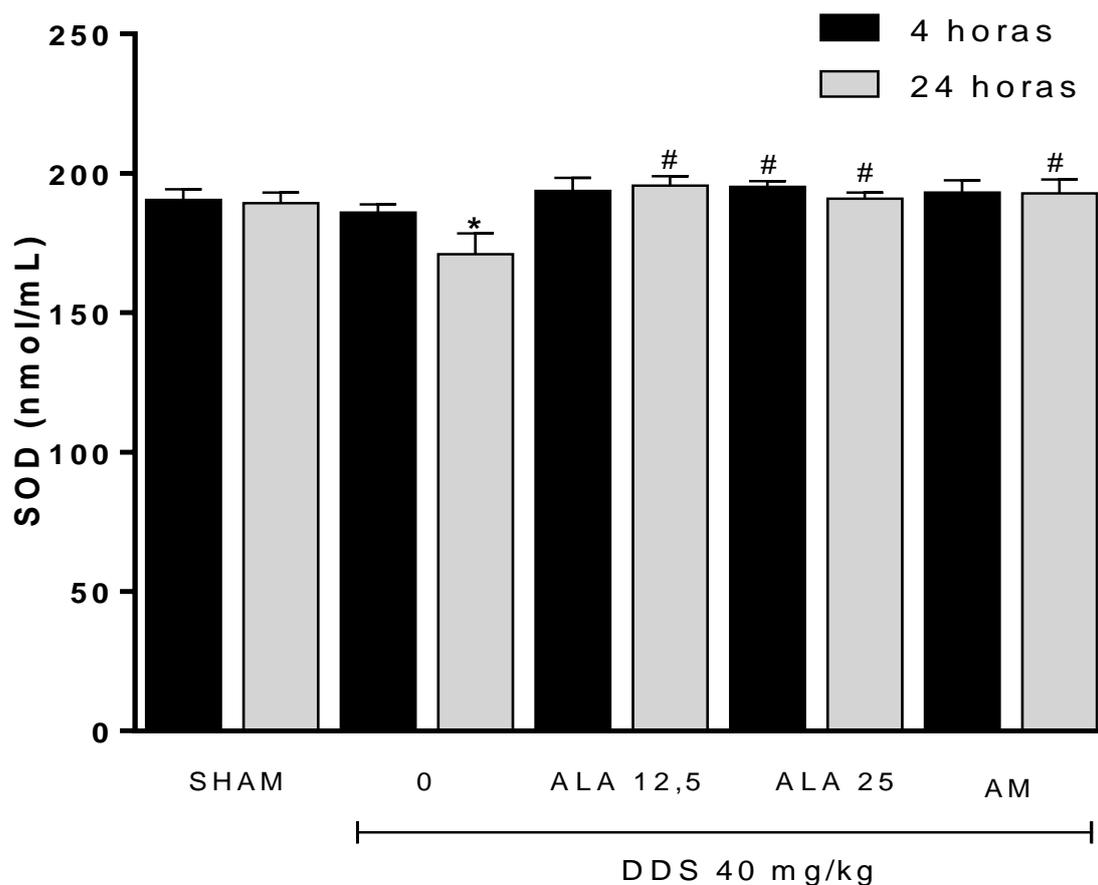


Figura 32: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a atividade de Superóxido Dismutase (SOD) das hemácias de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A Figura 33 mostra que o tratamento com DDS (40mg/kg), nos tempos 4 e 24h, diminuiu a atividade de Catalase (CAT) intraeritrocitária em relação ao grupo sham. Em relação ao tratamento com o ALA, principalmente a dose de 25 mg/kg foi capaz de reestabelecer a atividade de CAT induzido pelo tratamento com DDS 40mg/kg ($p < 0,05$), nos tempos avaliados. O tratamento com AM (1mg/kg) somente foi capaz de restaurar a atividade de CAT no tempo de 4h.

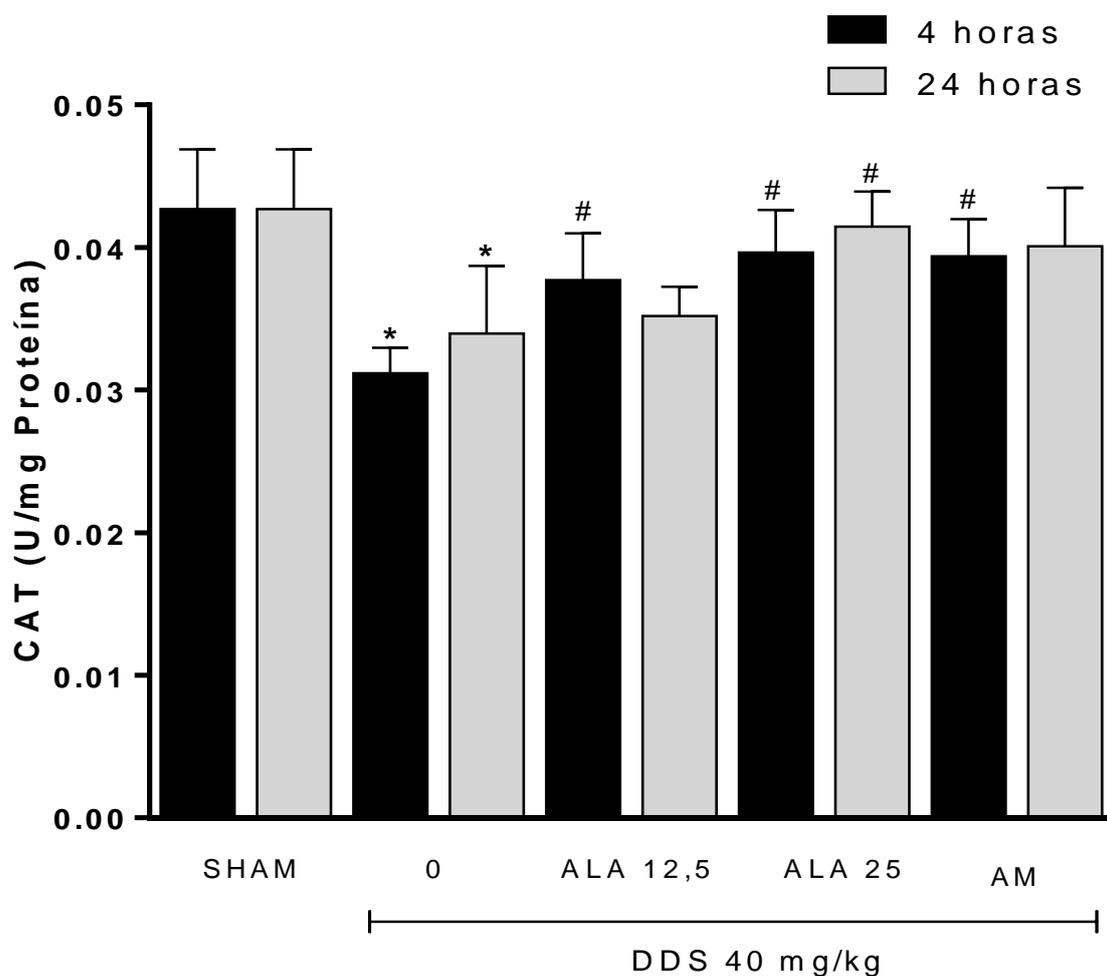


Figura 33: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a atividade de Catalase (CAT) nas hemácias de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

5.1.2 Avaliação de Parâmetros Bioquímicos Plasmáticos

A Figura 34 mostra que o tratamento com DDS (40mg/kg), nos tempos de 4 e 24h, diminuiu os níveis da capacidade antioxidante total (TEAC) no plasma comparado ao controle (Grupos sham; $p < 0,05$). Em relação ao tratamento com o ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de reestabelecer os níveis de TEAC induzidos pelo tratamento com DDS 40mg/kg ($p < 0,05$), nos tempos avaliados. O grupo tratado com AM (1mg/kg) apresentou comportamento semelhante ao ALA nas duas concentrações.

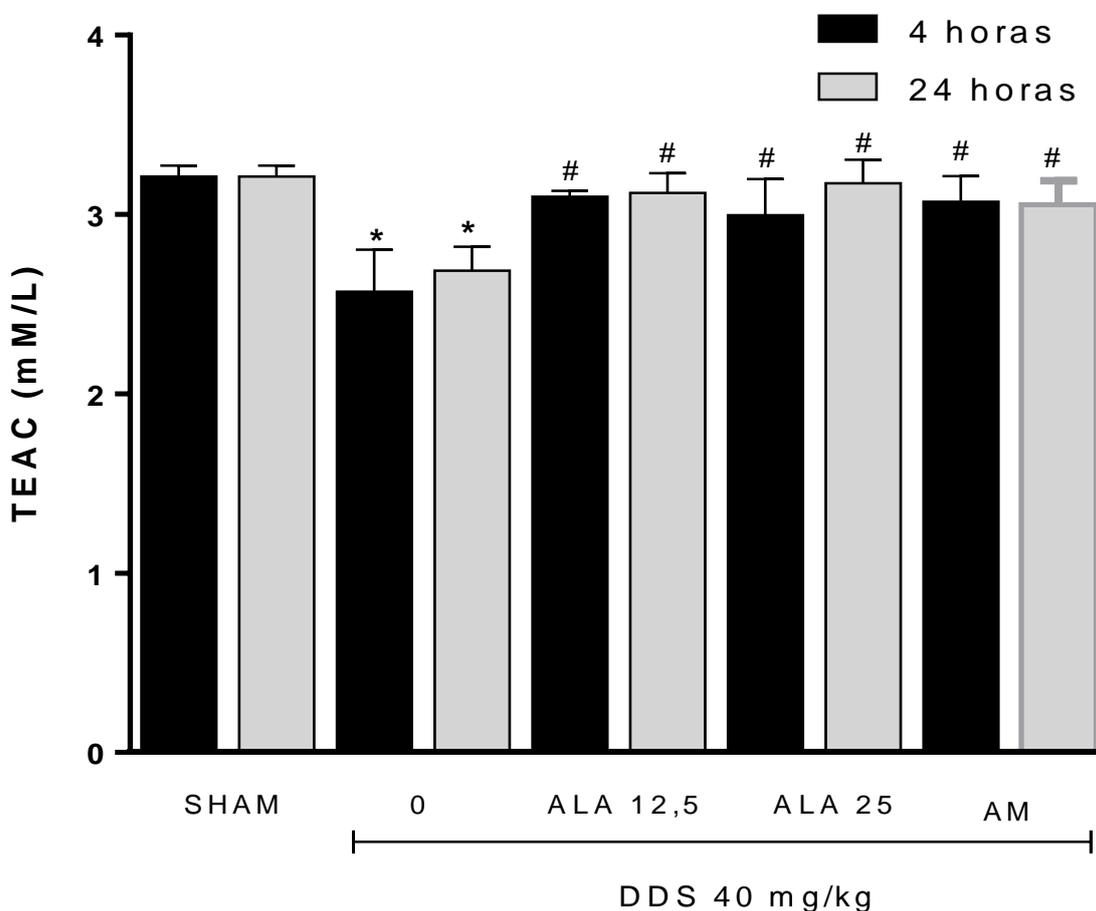


Figura 34: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a capacidade antioxidante total (TEAC) no plasma de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A Figura 35 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, nos tempos 4 e 24h, aumentou as concentrações de TBARS no plasma comparado ao controle (grupos sham; $p < 0,05$). Em relação ao tratamento com o ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de diminuir as concentrações de TBARS induzidas pelo tratamento com DDS 40mg/kg ($p < 0,05$), nos tempos avaliados, sendo que a dose de 25 mg/kg de ALA foi mais efetiva que a 12,5 mg/kg em 24h ($p < 0,05$). O grupo tratado com AM (1mg/kg) mostrou efeito antioxidante semelhante ao ALA 25 mg/kg nos tempos avaliados ($p < 0,05$).

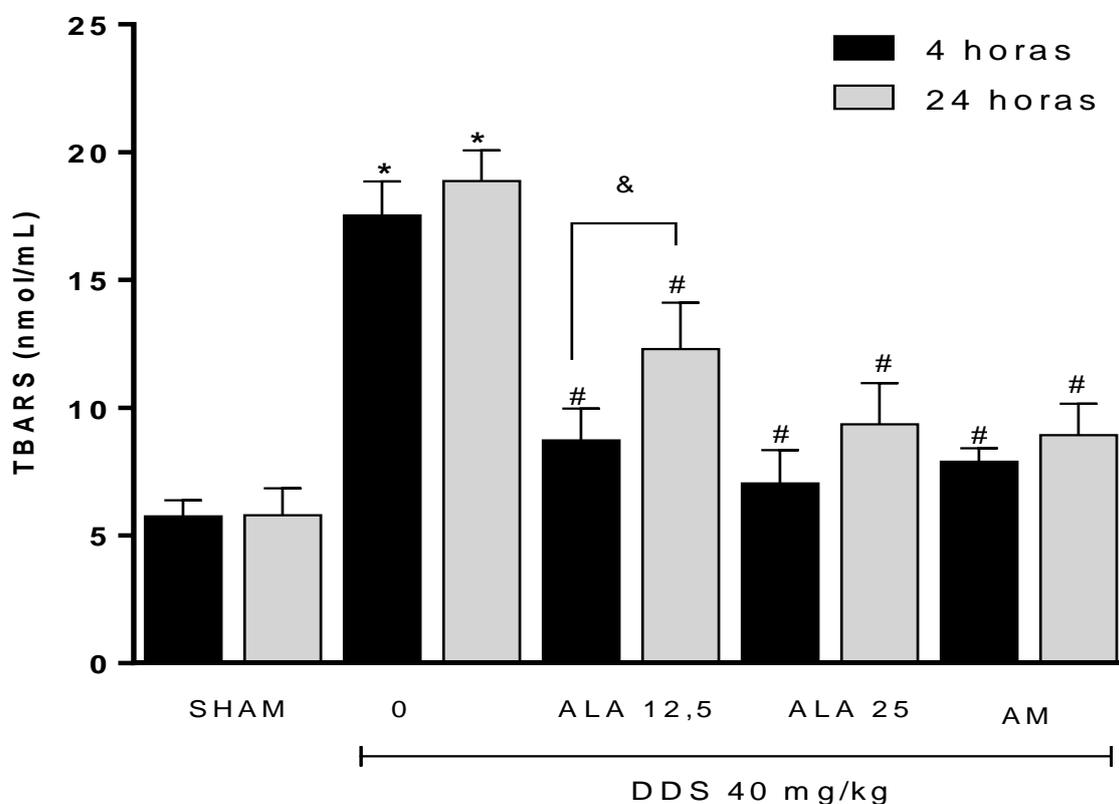


Figura 35: Efeito da Dapsona 40 mg/kg (ip) na geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante; & $p \leq 0,05$ comparado aos diferentes tempos avaliados. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A Figura 36 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, em 4 e 24h, aumentou as concentrações de ferro no plasma dos camundongos em relação ao grupo sham ($p < 0,05$). Nos grupos tratados com ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de diminuir ou prevenir a sobrecarga de ferro induzida pelo tratamento com DDS ($p < 0,05$).

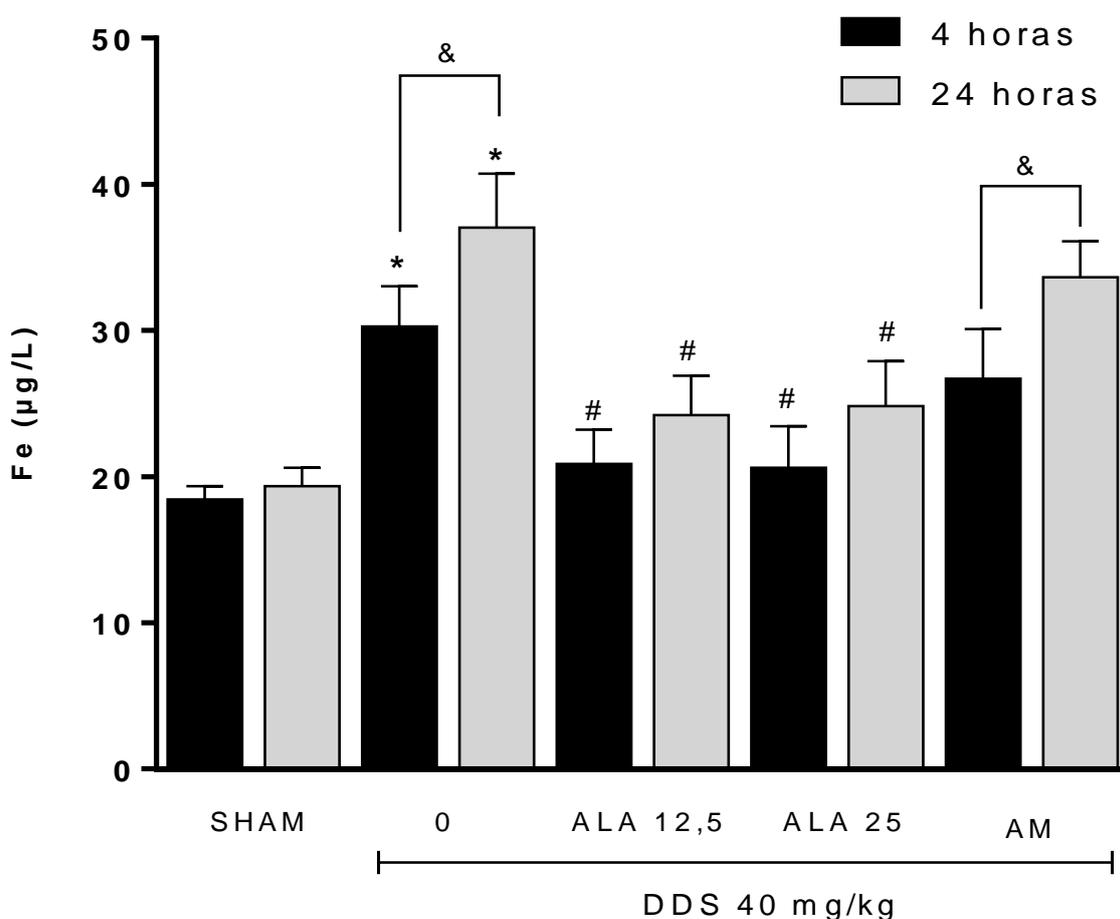


Figura 36: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações séricas de ferro (Fe) em camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante; & $p \leq 0,05$ comparado aos diferentes tempos avaliados. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

5.2 ALTERAÇÕES OXIDATIVAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

A Figura 37 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, em 4 e 24h, diminuiu a capacidade antioxidante total (TEAC) no PFC dos camundongos em relação ao controle (Grupos sham; $p < 0,05$). Em relação ao tratamento com o ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de reestabelecer os níveis de TEAC induzidos pelo tratamento com DDS 40mg/kg ($p < 0,05$), nos tempos avaliados. O grupo tratado com AM (1mg/kg) apresentou comportamento semelhante ao ALA nas duas doses.

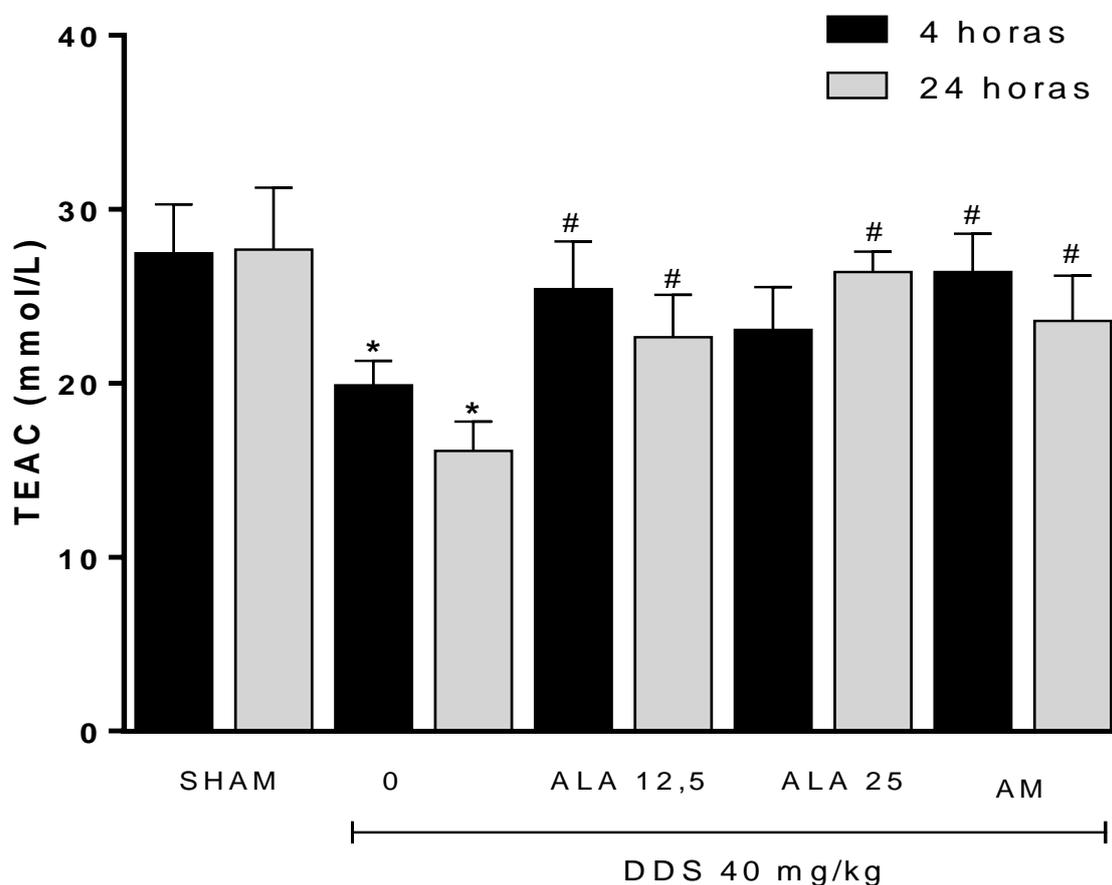


Figura 37: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a capacidade antioxidante total (TEAC) no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado a DDS sem tratamento antioxidante. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A Figura 38 mostra que o tratamento com DDS diminuiu as concentrações de GSH no PFC dos camundongos em relação ao grupo sham ($p < 0,05$) apenas para o tempo de 24h após o tratamento. Em relação ao tratamento com o ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25mg/kg) foram capazes de aumentar ou reestabelecer os níveis de GSH induzido pelo tratamento com DDS ($p < 0,05$). Além disso, em 4h, o tratamento com ALA induziu maiores níveis de GSH comparado ao tempo de 24 h. O tratamento com AM (1mg/kg) aumentou as concentrações de GSH em relação ao grupo DDS, no entanto, foi menos efetivo do que as doses de ALA no tempo de 4h ($p < 0,05$).

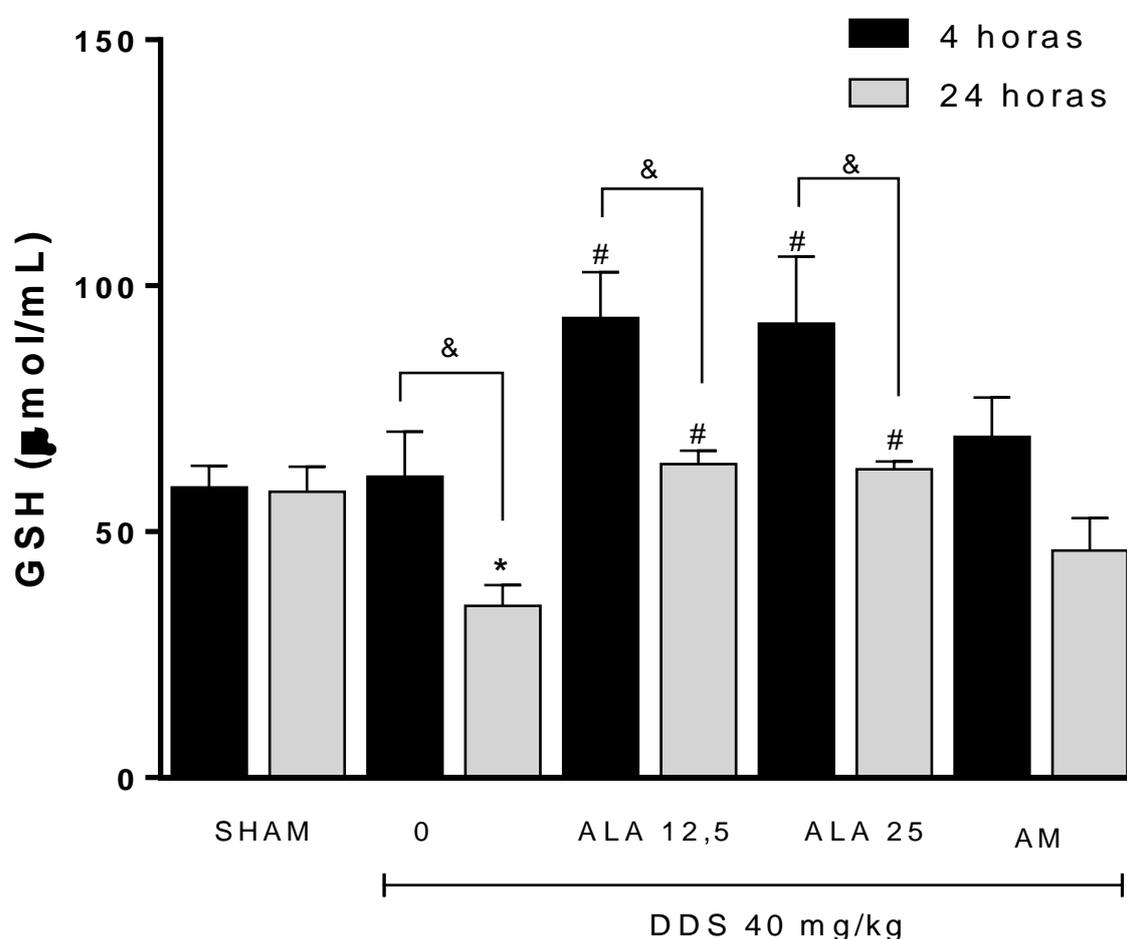


Figura 38: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA em diferentes doses (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado a DDS sem tratamento antioxidante; & $p \leq 0,05$ comparado aos diferentes tempos avaliados. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A Figura 39 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu a atividade de SOD no PFC no tempo de 24h em relação ao controle (grupo sham; $p < 0,05$). Em relação ao tratamento com o ALA, apenas a concentração de 12,5 mg/kg foi capaz de restaurar a atividade de SOD ($p < 0,05$) em 24h. O tratamento com AM (1mg/kg) não alterou a atividade de SOD comparado ao grupo DDS em 24 h.

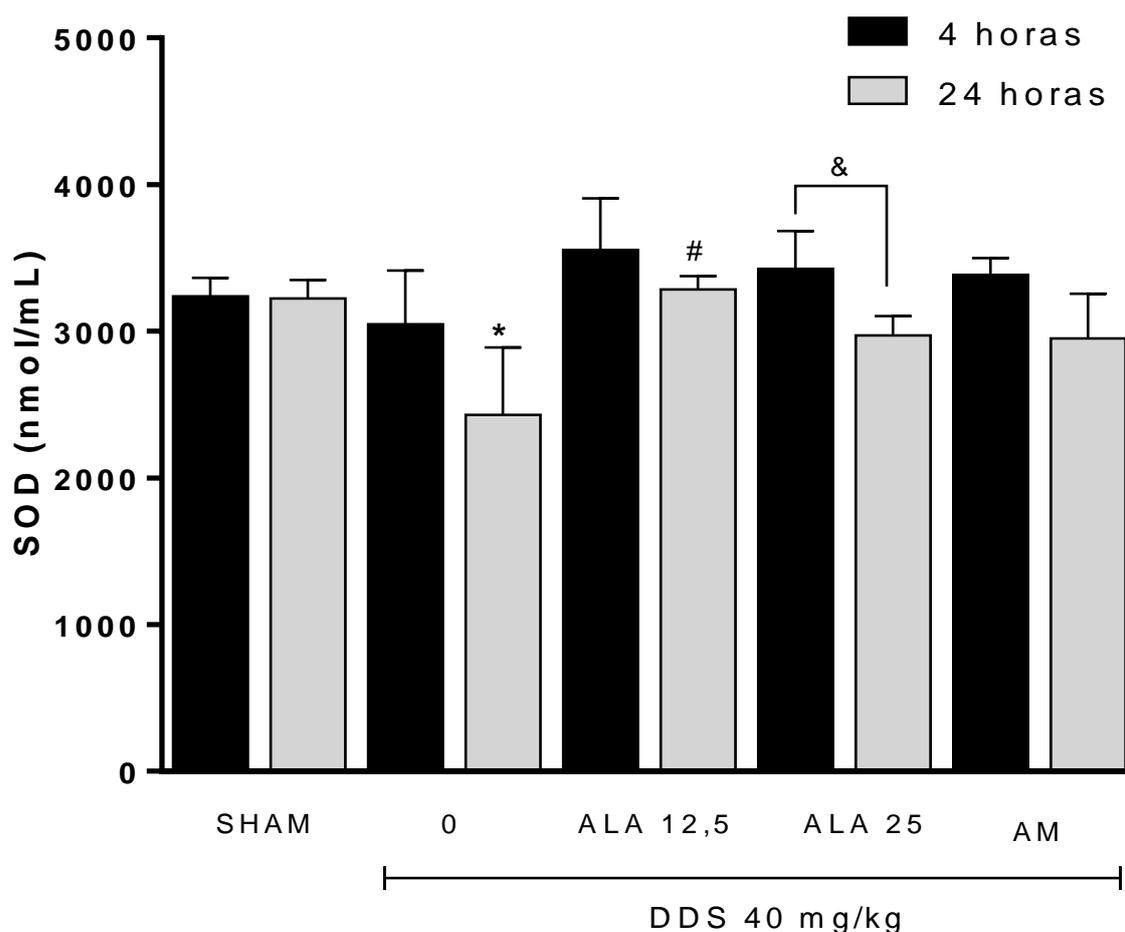


Figura 39: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a atividade de Superóxido Dismutase (SOD) no PFC de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), por 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante; & $p \leq 0,05$ comparado aos diferentes tempos avaliados. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A Figura 40 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, em 4 e 24h, diminuiu a atividade de CAT no PFC em relação ao controle (grupo sham). Em relação ao tratamento com o ALA, apenas a dose de 12,5 mg/kg, em 24h, foi capaz de reestabelecer a atividade de CAT ($p < 0,05$) em relação ao grupo DDS. O tratamento com AM (1mg/kg) não alterou a inibição na atividade de CAT induzida pelo DDS.

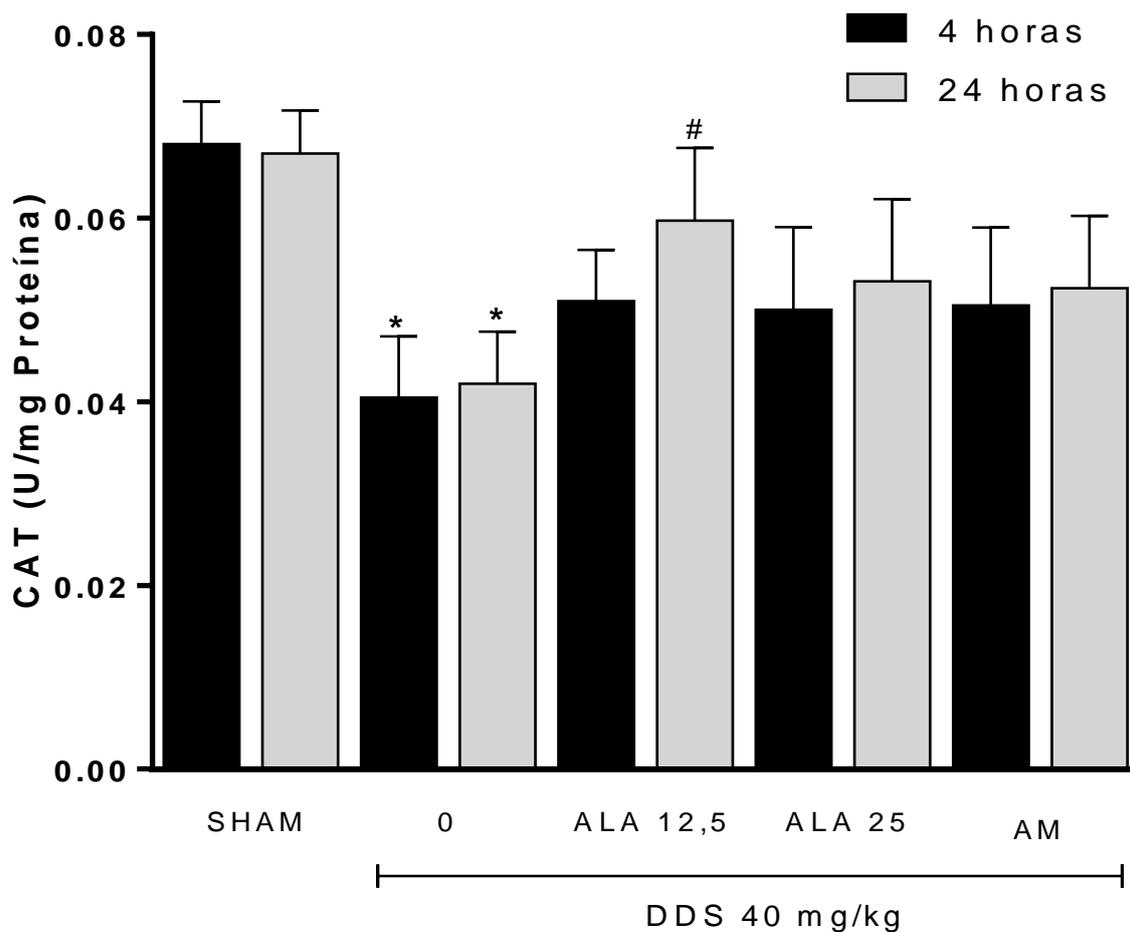


Figura 40: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a atividade de Catalase (CAT) no PFC de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A Figura 41 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, em 4 e 24h, aumentou as concentrações de TBARS no PFC dos camundongos em relação ao controle (grupo sham; $p < 0,05$). Em relação ao tratamento com o ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de diminuir (em 4h) ou reestabelecer (em 24h) as concentrações de TBARS induzidas pelo tratamento com DDS 40mg/kg ($p < 0,05$), nos tempos avaliados. O tratamento com AM (1mg/kg) apresentou comportamento semelhante ao ALA nos tempos avaliados ($p < 0,05$).

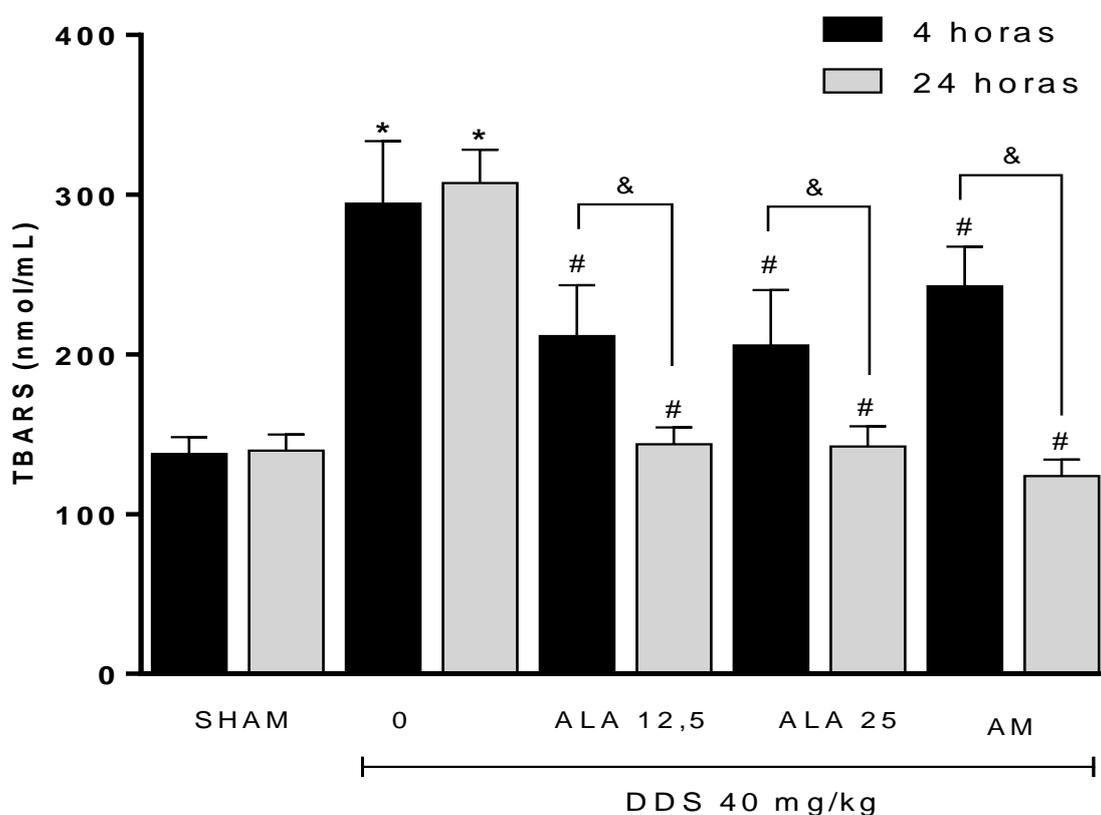


Figura 41: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) na geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA em diferentes doses (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante; & $p \leq 0,05$ comparado aos diferentes tempos avaliados. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A Figura 42 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, em 4 e 24h, aumentou as concentrações de ferro no PFC dos camundongos em relação ao grupo sham ($p < 0,05$), sendo que no tempo de 4h, as concentrações de ferro foram significativamente maiores em relação a 24h. Nos grupos tratados com ALA, as duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de diminuir ou prevenir a sobrecarga de ferro no PFC induzida pelo tratamento com DDS ($p < 0,05$), principalmente em 24h. O tratamento com AM (1mg/kg) de 24h mostrou efeito semelhante ao ALA, principalmente no tempo de 4h.

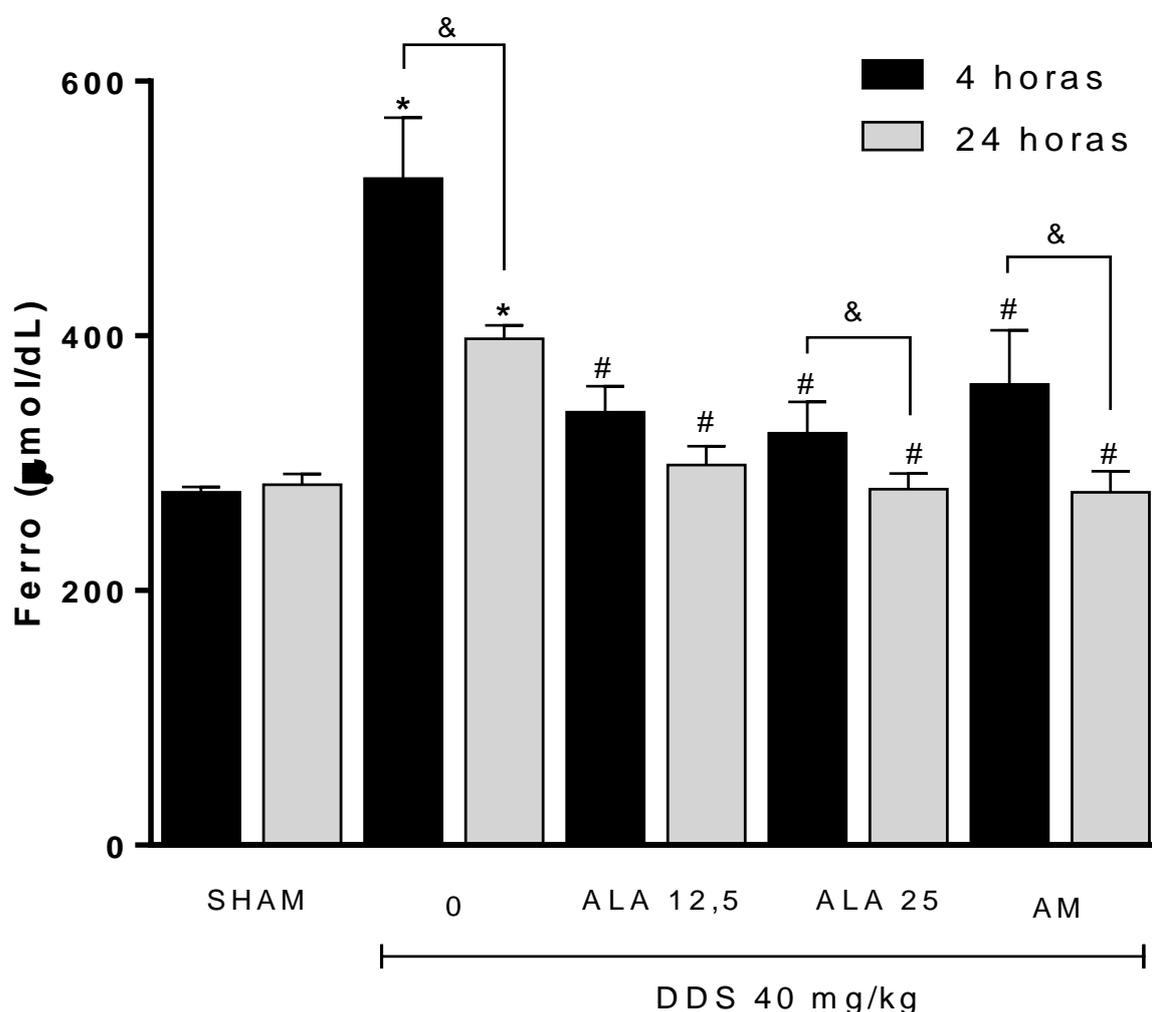


Figura 42: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre as concentrações de ferro no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA em diferentes doses (12,5 e 25mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante; & $p \leq 0,05$ comparado aos diferentes tempos avaliados. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

5.3 PERFIL CELULAR E CITOCINAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

Para a avaliação do perfil de ativação de macrófagos/micróglia e astrócitos no PFC foram usados marcadores fluorescentes de F4/80 e GFAP, respectivamente, e analisados por citometria de fluxo. A Figura 43 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, após 4h, elevou o percentual da população macrófágica/microglial que expressa baixos (“low”) níveis do marcador F4/80⁺ (população recém-migrada) no PFC em relação ao grupo sham ($p < 0,05$). No entanto, não alterou o percentual de macrófagos/microglia ativados ou diferenciados, população que expressa altos (“high”) níveis de F4/80⁺. Por outro lado, o pós-tratamento com ALA 25 mg/kg foi capaz de estimular a ativação ou diferenciação de macrófagos/micróglia, levando a um aumento no percentual da população F4/80^{high} e diminuição da população F4/80^{low}, mostrando que o ALA pode levar a ativação ou diferenciação de um perfil de macrófagos/micróglia no PFC.

Em relação aos astrócitos, o tratamento com DDS 40mg/kg aumentou o percentual de astrócitos com baixa (low) expressão de GFAP no PFC, e diminuiu o percentual de astrócitos com elevada (high) expressão de GFAP (astrócitos reativos) em relação ao grupo sham, mostrando que a DDS diminui a reatividade de astrócitos no PFC. Interessantemente, o pós-tratamento com ALA 25 mg/kg potencializou o efeito imunoregulador sobre astrócitos induzido pelo DDS, mostrando uma elevação no percentual da população de GFAP^{low} e diminuição da população de astrócitos reativos (GFAP^{high}) comparado ao grupo DDS.

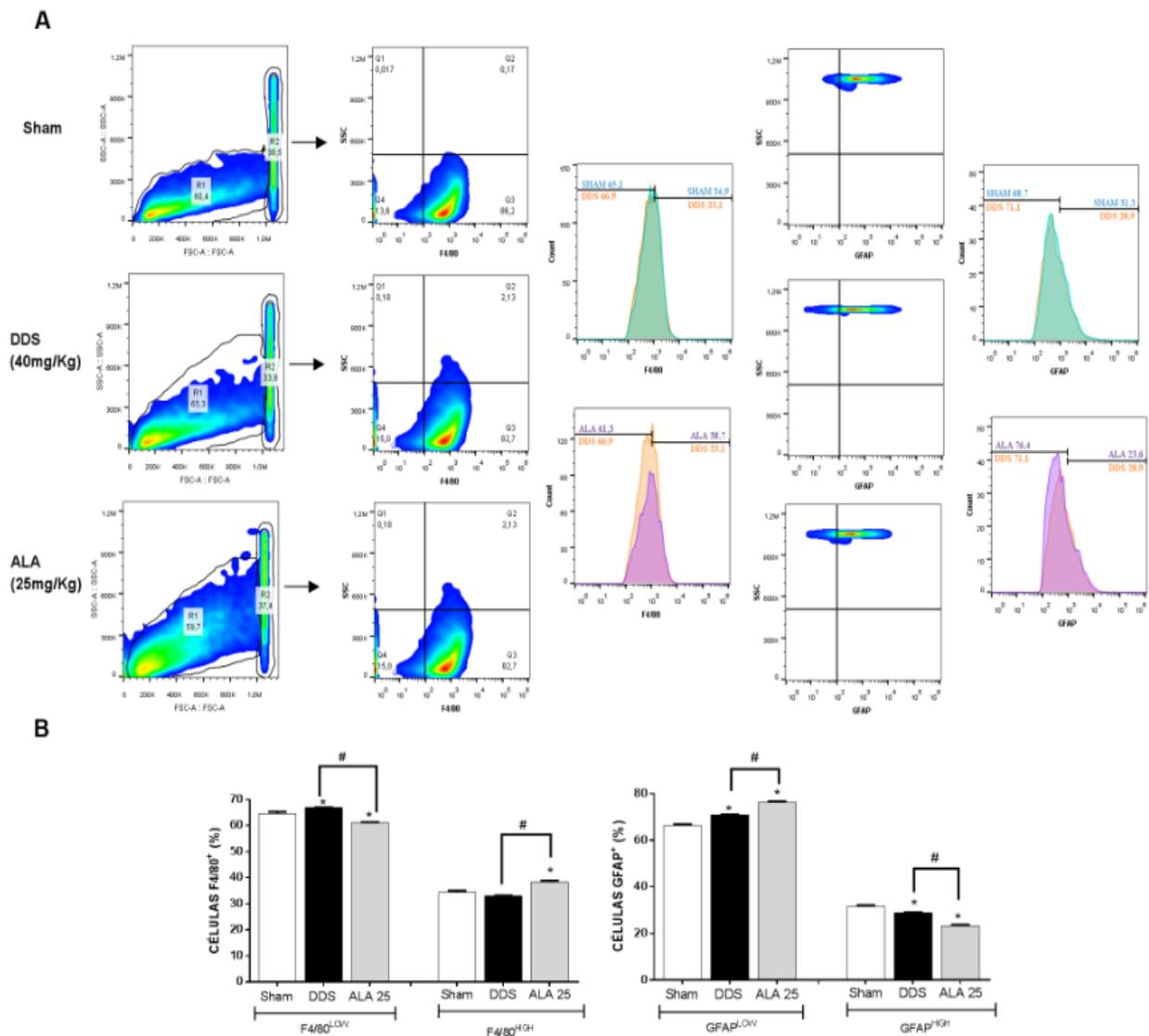


Figura 43: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre macrófagos/microglia (F4/80⁺) e astrócitos (GFAP⁺) no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA 25mg/kg, durante 5 dias consecutivos. A: População positiva para F4/80⁺ e GFAP⁺, análises por citometria de fluxo; B: Percentual de expressão de macrófagos/microglia (F4/80⁺) e astrócitos (GFAP⁺). * $p \leq 0,05$ comparado grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona.

Para avaliar a resposta inflamatória no PFC induzidos pelos tratamentos com DDS ou DDS+ALA, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-17) e anti-inflamatória (IL-4) e a produção de BDNF foram dosadas neste tecido. A Figura 44 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, em 4h, aumentou a expressão de IL-1 β , IL-17 e IL-4 no PFC em relação ao grupo sham ($p < 0,05$), no entanto, reduziu a produção de BDNF, mostrando que o DDS induz um processo inflamatório e confirmando o seu efeito oxidativo neste tecido, já mostrado pelos níveis elevados de MDA (Figura 39). No entanto, o pós-tratamento com ALA 25 mg/kg foi capaz de reduzir a produção de IL-1 β e aumentar os níveis de BDNF, mas não alterou os níveis de IL-17 e IL-4 no PFC após o tratamento com DDS ($p < 0,05$), mostrando ações anti-inflamatória e antioxidante neste tecido.

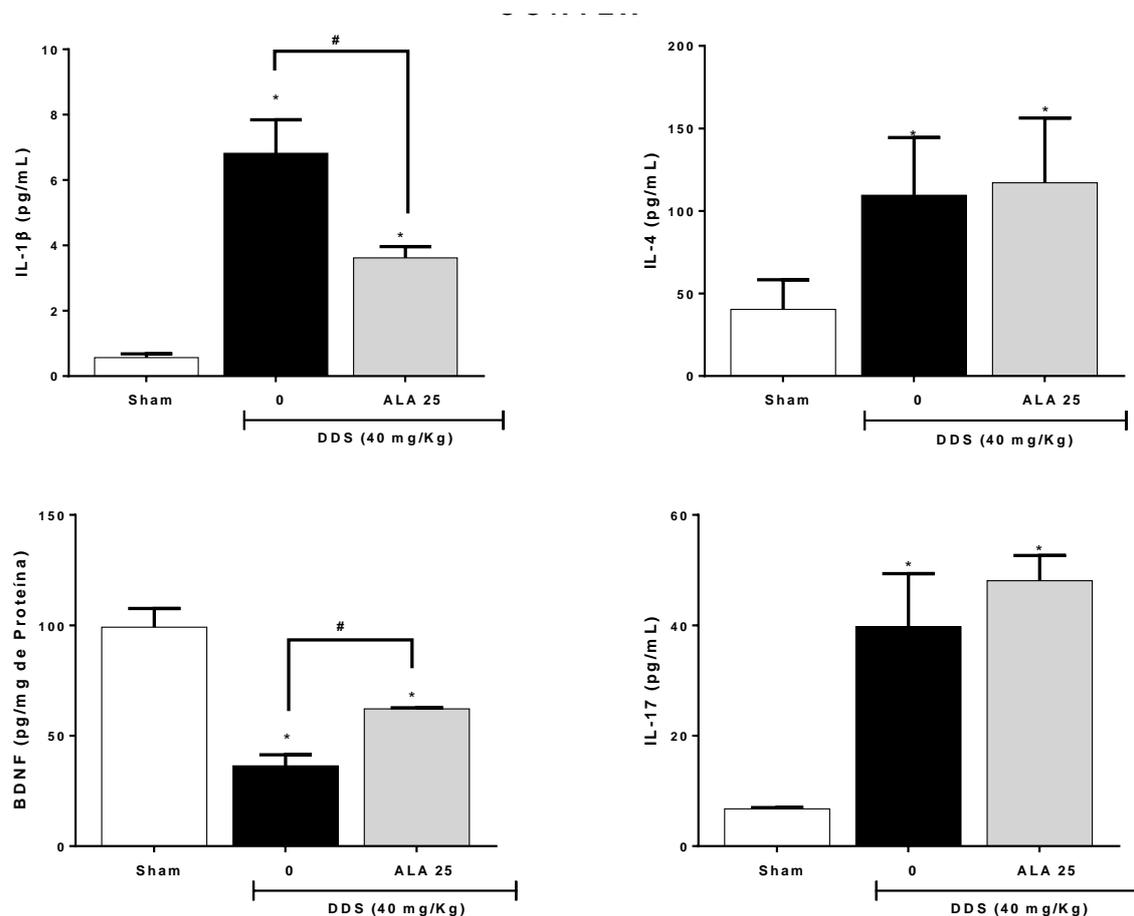


Figura 44: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre os níveis de citocinas IL-1 β , IL-17 e IL-4 e BDNF no córtex pré-frontal (PFC) de camundongos e do pós-tratamento com ALA 25mg/kg, durante 5 dias consecutivos. * $p \leq 0,05$ comparado grupo sham; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: ácido α -lipóico, DDS: dapsona.

6 DISCUSSÃO

6.1 METEMOGLOBINA E ALTERAÇÕES OXIDATIVAS SANGUÍNEAS

A anemia hemolítica mediada por DDS está relacionada às alterações da membrana dos eritrócitos que levam à remoção prematura de células, que pode ocorrer de forma extravascular, por remoção mediada pelo baço de eritrócitos danificados ou intravascularmente, pela fragilidade celular induzida por DDS. Os efeitos hematotóxicos relatados durante a terapia com DDS são secundariamente devido aos seus metabolitos, DDS-NOH e MADDS-NOH.

No nosso modelo experimental, a administração da Dapsona (40 mg/kg ip) foi capaz de induzir a formação de MetHb nas hemácias dos camundongos tratados, observada tanto nos grupos eutanasiados em 4h quanto em 24h após 5 dias de tratamento. Isso mostra que a DDS pode ter propriedades metemoglobinizantes, provavelmente por alterações no equilíbrio redox, promovendo estresse oxidativo, produção de ERO e complexas alterações periféricas envolvendo diversas ERO, ferro, alterações na defesa antioxidante, toxicidade e até inflamação. Coleman *et al.* (1996) que observaram que o metabolito DDS-NOH (32,6 μ M) foi capaz de induzir a formação de MetHb em altas concentrações (acima de 45%) e redução de GSH em eritrócitos sadios durante 1h de incubação.

Em um estudo clínico, realizado por nosso grupo de pesquisa, Schalcher *et al.* (2014) avaliou o estresse oxidativo em pacientes com hanseníase durante a PQT e encontraram níveis elevados de MetHb e presença de corpos de Heinz significativamente aumentados após a terceira dose supervisionada de PQT, mostrando que a PQT induz alterações hematológicas e não o agente etiológico. De acordo com Coleman, (1995), esses biomarcadores podem estar aumentados, mesmo em doses comumente usadas para tratar a hanseníase (DDS 100 mg/dia). Em um estudo semelhante, Dalpino *et al.* (1998) também verificaram que o nível de MetHb foi superior em pacientes com hanseníase do que pessoas saudáveis, provavelmente devido à ação oxidante da DDS, onde os pacientes apresentaram taxas de Hb diminuídas devido ao efeito hemolítico da DDS e altos níveis de MetHb. Rimiolli e Godoy (2001) também observaram os corpos de Heinz na maioria dos esfregaços sanguíneos de pacientes com hanseníase submetidos ao

tratamento PQT, devido a produção elevada de ERO nos eritrócitos, que podem levar à oxidação da Hb, culminando na formação de MetHb e corpos de Heinz.

Paralelamente, foram avaliados os efeitos do ALA sobre o percentual de MtHb, administrado em duas concentrações (12,5 e 25 mg/kg), 2 horas após a administração da DDS. Os resultados mostraram que todas as concentrações de ALA testadas (12,5 e 25mg/kg) foram capazes de prevenir ou reverter a formação da MetHb induzida por DDS, tanto em 4 quanto em 24h após o tratamento. Esses dados sugerem que o ALA tem elevada capacidade antioxidante e pode atuar sobre a MetHb, reduzindo-a à Hb ou criando um microambiente capaz de prevenir sua oxidação. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Coleman e Walker (2000) que mostraram que o ALA quando incubado com eritrócitos de humanos diabéticos e não diabéticos *in vitro*, provocou uma redução acentuada da MetHb induzida por MADDS-NOH. Nossos dados também mostraram que o AM 1mg/kg ip apresentou comportamento semelhante ao ALA, corroborando com Coleman e Taylor (2003) que demonstraram que o pré-tratamento e o tratamento com ADHL foram capazes de inibir a formação de MetHb induzida por DDS-NOH *in vitro*, atuando de forma semelhante ao AM, assim como mostraram que ALA pode ser reduzido a sua forma ADHL *in vitro*. Desta forma, os autores sugerem que o ALA pode ser incluído como suplemento na prevenção da toxicidade induzida pela DDS. Paralelamente, nosso grupo de pesquisa também analisou a ação antioxidante do ALA, mostrando que o pré-tratamento com ALA foi capaz de reduzir o percentual de MetHb e a produção de ERO intracelular, induzidos por DDS-NOH *in vitro* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015).

De acordo com Bradshaw *et al.* (1997), a DDS-NOH quando em contato com os eritrócitos realiza um ciclo de oxidação-redução com a oxihemoglobina e com moléculas de O₂, formando MetHb e ERO, provavelmente envolvidas nos processos que levam a anemia hemolítica. Estudos de Bordin *et al.* (2010) indicam que a DDS-NOH induz alterações progressivas nos eritrócitos, formando agregados da banda 3, uma proteína de membrana dos eritrócitos, induzindo a formação de MetHb.

Em um estudo *in vivo*, Ciccoli *et al.* (1999), observaram eventos tóxicos mediados pela DDS nos eritrócitos de camundongos, onde as células expostas a DDS-NOH apresentaram aumento significativo na formação de MetHb e depleção nos níveis de GSH. Do mesmo modo, Timothy *et al.* (1997) avaliaram estes efeitos

tóxicos induzidos pelos metabólitos hidroxilados da DDS em ratos e mostraram que a DDS-NOH tem alto poder de induzir a formação de MetHb, hemólise e indução da geração intracelular de ERO.

As substâncias pró-oxidantes também podem afetar o funcionamento dos eritrócitos e modificar o seu estado antioxidante. Em relação às características antioxidantes intraeritrocitárias, nossos dados mostraram que o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu a capacidade antioxidante total (TEAC) dos camundongos, tanto nos grupos eutanasiados em 4h quanto em 24h após o tratamento. Esses fatos sugerem que a DDS e seus metabólitos podem atravessar a membrana plasmática das hemácias e reduzir o status antioxidante dessas células, tendo como consequência a elevação de MetHb, hemólise, heme livre e liberação de ferro e estresse oxidativo. Portanto, a administração de DDS em ratos produz liberação contínua de ferro dos eritrócitos, afetando a homeostase plasmática, o estado redox e outros tecidos. Esses achados corroboram com Ferrali *et al.* (1997), que mostraram que o metabolito DDS-NOH induz a liberação de ferro em eritrócitos com consequente formação de MetHb, sugerindo a importância da liberação deste metal nos mecanismos que levam a danos nos eritrócitos e em tecidos.

Desse modo, é possível inferir que antioxidantes, como o ALA, podem ter efeitos benéficos no combate à liberação de ferro e as alterações oxidativas provocadas por DDS e seus metabólitos. De fato, nosso estudo mostrou que, o tratamento com o ALA em todas as concentrações testadas (12,5 e 25 mg/kg) foram capazes de aumentar ou restabelecer os níveis de antioxidantes totais (TEAC) e GSH, elevando aos níveis basais, especialmente na concentração de 25mg/kg em 24h após os tratamentos. Esses dados sugerem que o ALA pode atravessar a membrana do eritrócito e atuar também no seu citoplasma, aumentando a capacidade antioxidante *per se* e/ou induzindo a síntese de outros antioxidantes, como a GSH. Corroborando com nossos resultados, Lexis (2006) mostrou que a suplementação dietética com ALA (1,6 g / kg de dieta), associada ao α -tocoferol (1000 UI / kg de dieta) aumentou a defesa antioxidante dos eritrócitos, reduziu a nefrotoxicidade em ratos tratados com ciclosporina e aumentou a atividade de CAT. Paralelamente, os animais tratados com AM 1mg/kg apresentaram uma capacidade antioxidante semelhante ao ALA 25mg/kg, sugerindo que o AM aumenta a capacidade antioxidante nas hemácias, o que evidencia seu papel antioxidante a nível intraeritrocitário.

Nesse sentido, a GSH é chave na regulação do equilíbrio redox do organismo e também do eritrócito, atuando na remoção de ERO. Nosso estudo mostrou que o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu as concentrações de GSH nos eritrócitos dos camundongos, em 24h após os tratamentos, mostrando que a DDS pode consumir GSH, provavelmente durante a redução de MetHb induzida por DDS-NOH, o que altera o ciclo redox da glutatona, podendo gerar estresse oxidativo. No entanto, o tratamento com o ALA nas duas concentrações (12,5 e 25mg/kg) foi capaz de aumentar e/ou reestabelecer os níveis de GSH após tratamento com DDS ($p < 0,05$) nos dois tempos de eutanásia, especialmente no tempo de 4h, sugerindo em nossos achados que ALA pode agir como indutor da síntese intraeritrocitária de GSH e reduzir os efeitos tóxicos de DDS.

De acordo com Han *et al.* (2007) e Mignini *et al.* (2012) a capacidade antioxidante de ALA depende fundamentalmente da indução da regeneração de GSH em nível celular e que o aumento da GSH após a administração de ALA é provavelmente devido a uma resposta celular adaptativa induzida por uma melhor atividade da cisteína. Em estudos *in vitro* com eritrócitos humanos isolados, ALA diminuiu a susceptibilidade à oxidação (Marangon *et al.*, 1999), protegendo contra a hemólise de eritrócitos humanos induzidos por radicais peróxil (Constantinescu *et al.*, 1994) e aumentou da síntese de GSH (Han *et al.*, 1997). Recentemente, Albuquerque *et al.* (2015) mostraram que a DDS-NOH, é capaz de induzir um efeito metemoglobinizante (19 a 40 % de MetHb) de maneira dose-dependente em eritrócitos de indivíduos saudáveis *in vitro*. Além disso, a DDS-NOH induziu aumento da produção intracelular de ERO que foi revertido por antioxidantes, como o resveratrol e o ALA.

Curiosamente, o AM 1mg/kg apresentou comportamento semelhante ao ALA nas duas concentrações testadas, com melhor efeito em 4h após o tratamento. No entanto, esses dados devem ser cuidadosamente analisados em estudos posteriores, visto que é importante obter a concentração ideal de ALA ou de AM que leve ao aumento da capacidade antioxidante (como aumento de GSH), redução do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica, e menor toxicidade, mas que evite prováveis efeitos pró-oxidativos ocasionados por elevadas doses de ALA e AM, já descritos na literatura (Bonomi *et al.*, 1989; Toker, 2015).

A catalase é uma enzima que reage eficientemente com H_2O_2 para produzir água e oxigênio molecular, protegendo as células contra o H_2O_2 gerado em seu

interior. Outra enzima importante é a SOD, que catalisa rapidamente a dismutação do ânion $O_2^{\cdot -}$ e, portanto, atua como uma primeira linha de defesa. Na deficiência de SOD ou aumento da produção de superóxido, ele reage com o NO para produzir peroxinitrito (ONOO⁻), que é um potente agente nitrosante que pode causar danos diretos a proteínas, lipídios e DNA (SOARES, 2013).

Nosso estudo, mostrou que o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu a atividade de SOD intraeritrocitária, em 24h após o tratamento com o ALA, nas duas doses testadas (12,5 e 25 mg/kg), restabeleceu a atividade de SOD nos dois tempos avaliados. Esses resultados sugerem que a DDS reduz SOD, provavelmente por consumo e saturação do sistema antioxidante, no entanto, o ALA pode atuar induzindo a síntese desta enzima e restabelecendo o equilíbrio redox intraeritrocitário, fornecendo um mecanismo adicional para a remoção direta de ERO.

Em relação a enzima CAT, nosso estudo mostrou que o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu a atividade de CAT intraeritrocitária, em 4 e 24h após o tratamento com o ALA, principalmente a dose de 25 mg/kg, restabeleceu a atividade de CAT induzido pelo tratamento com DDS nos tempos avaliados, o que foi semelhante ao efeito do AM. Esses dados sugerem que a DDS e seus metabólitos consomem CAT, provavelmente por saturação do sistema antioxidante, no entanto, ALA pode induzir a síntese desta enzima e restabelecendo o sistema antioxidante intraeritrocitário.

Nossos resultados estão de acordo com Swathi e Tagore (2015), que avaliaram o estresse oxidativo em 70 pacientes com diferentes formas de hanseníase e sob tratamento com a PQT, a partir da estimativa dos níveis séricos de MDA e da atividade da SOD. Os dados mostraram um aumento significativo de MDA, MDA/SOD e diminuição da atividade de SOD, comparados a indivíduos controles. Além disso, os pacientes com hanseníase em uso de PQT apresentaram aumento na produção de ERO e peroxidação lipídica. Estudos de Prasad *et al.* (2008), também avaliaram as atividades de SOD e CAT dos eritrócitos e a peroxidação lipídica em 100 pacientes com hanseníase. A peroxidação induzida foi significativamente alta e as atividades enzimáticas de CAT e SOD estavam diminuídas nos pacientes com hanseníase.

Nosso modelo experimental mostrou que o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu a capacidade antioxidante total (TEAC) no plasma dos camundongos

tratados, mostrando que a DDS tem propriedades pró-oxidantes capazes de alterar o equilíbrio redox, causando estresse oxidativo plasmático. Por outro lado, o ALA nas concentrações testadas aumentou ou restabeleceu a capacidade antioxidante total, incluindo GSH e enzimas antioxidantes CAT e SOD, que estão em níveis reduzidos pelo tratamento com DDS. Estes dados, em conjunto, mostram que o ALA tem elevada capacidade antioxidante *in vivo* capaz de induzir ou restabelecer o estado antioxidante dos camundongos tratados com dapsona.

Em relação a avaliação da peroxidação lipídica, estimada pelo TBARS, observou-se um aumento da concentração dessas substâncias no plasma dos camundongos tratados com DDS 40mg/kg, indicando aumento de MDA induzido pela DDS. Portanto, a DDS ou seus metabólitos podem alterar o equilíbrio redox no plasma, em 4 em 24h após o tratamento, promovendo estresse oxidativo e produção de MDA. Esses dados estão de acordo com Veggi *et al.* (2008), que avaliaram os efeitos da administração de DDS e DDS-NOH (30 mg/kg, duas vezes ao dia, por 4 dias) em ratos machos e fêmeas no estresse oxidativo hepático através da avaliação do conteúdo hepático de GSH e GSSG, peroxidação lipídica e expressão/atividade das principais enzimas antioxidantes: GPX, SOD, CAT e GST. Os resultados revelaram um aumento na razão de GSSG/GSH e na peroxidação lipídica, em ratos machos, mas não em fêmeas tratados com DDS, uma vez que a N-hidroxilação de DDS ocorre principalmente em machos. A atividade de todas as enzimas antioxidantes foi significativamente prejudicada pelo tratamento DDS também em ratos machos. Em conjunto, essas evidências indicam que o DDS induz estresse oxidativo no fígado de ratos e que a N-hidroxilação do DDS, que leva à formação de DDS-NHOH, é o provável mediador desse processo, com prejuízo na atividade dos sistemas antioxidantes enzimáticos, levando ao agravamento do estresse oxidativo. Corroborando com esses estudos, Schalcher *et al.* (2013) mostraram que pacientes com hanseníase em uso de PQT apresentaram aumento de metemoglobina, MDA e diminuição da atividade de CAT.

Em relação aos efeitos do ALA sobre o estado redox plasmático, nossos dados mostraram que todas as doses de ALA reduziram os níveis de TBARS induzida pelo DDS, principalmente em 24h, mostrando que o ALA restabelece o equilíbrio redox, aumentando a capacidade antioxidante total e reduzindo o MDA. De acordo com Bhatti *et al.* (2005), a estimulação excessiva de NADPH e CTE, aumenta a produção de ERO, resultando em estresse oxidativo e disfunção

mitocondrial, causando danos às células neuronais. Assim, para combater essas agressões oxidativas, o ALA mostrou-se promissor na redução da geração de radical $\cdot\text{O}_2$ e a expressão NADPH oxidase em ratos.

O ferro é um metal chave no equilíbrio de oxi-redução, de modo que suas concentrações devem ser rigorosamente reguladas para evitar reações que levem a produção de ERO, como o radical $\cdot\text{OH}$ e, conseqüentemente danos celulares e teciduais. Desse modo, nosso estudo mostrou que o tratamento com DDS 40mg/kg aumentou as concentrações de ferro no plasma nos tempos avaliados, mostrando concentrações de ferro plasmático, sugerindo propriedades pró-oxidantes da dapsona. A formação da MetHb e liberação de heme e ferro livre no plasma, catalisa reações oxidativas que podem ser lesivas periféricamente e em tecidos mais vulneráveis. Estes dados corroboram com os achados de Ciccoli *et al.* (1999) que mostraram que a intoxicação aguda de ratos com DDS leva ao aumento significativo de MetHb e de Fe^{3+} , que em condições normais está ligado a transferrina (Tf). A Tf plasmática é capaz de transportar até 12 mg de Fe, entretanto em situações patológicas sua capacidade de transporte é ultrapassada ocasionando acúmulo de Fe na sua forma NTBI.

Nesse sentido, torna-se importante a busca por substâncias antioxidantes com propriedades quelantes, capazes de reestabelecer a homeostase do ferro. Assim, o ALA mostrou-se uma substância promissora, sendo alvo de muitas pesquisas para melhor compreensão desses mecanismos. Nossos dados mostraram que todas as doses de ALA (12,5 e 25 mg/kg) diminuíram ou preveniram a sobrecarga de ferro após tratamento com DDS, em 4 e 24h após o tratamento. Assim, é provável que o ALA também apresente propriedades quelantes de ferro, prevenindo as reações de Fenton e Haber-Weiss, diminuindo a geração de ERO, como o radical $\cdot\text{OH}$. Este evento é chave na disfunção mitocondrial, neurotoxicidade e até na neuroinflamação. Esses resultados estão de acordo com Goralska *et al.* (2003), que avaliaram os efeitos *in vivo* do tratamento com ALA no metabolismo do Fe em culturas de células epiteliais e observaram que ALA diminuiu a absorção de Fe da transferrina, aumenta a deposição de Fe na ferritina, assim como aumentou a concentração da ferritina. Assim, ALA pode reduzir o risco de dano oxidativo induzido pelo Ferro e, também pode ser útil no tratamento da sobrecarga deste metal.

Ali *et al.* (2015) mostraram que ratos tratados com 5 mg/kg de sulfato ferroso durante 50 dias, apresentaram uma sobrecarga de ferro no plasma e aumento nos níveis de MDA. No entanto, o pós-tratamento com ALA nesses animais, levou a redução de 47% nos níveis de ferro sérico, assim como diminuiu o nível de MDA no cérebro e plasma em 42% e 74%, respectivamente. O ALA também diminuiu o efeito das ERO induzidos pelo ferro, aumentando a integridade da membrana dos eritrócitos por diminuição da fragilidade osmótica, levando a diminuição da hemólise. Esses dados sugerem que ALA pode ser um antioxidante benéfico, diminuindo os danos causados pelo estresse oxidativo e sobrecarga de ferro.

ALA é convertida em DHLA após a absorção celular e esta forma (DHLA) também é capaz de retirar Fe da ferritina e reduzir Fe^{+3} para Fe^{+2} , aumentando a possibilidade de danos oxidativos (Bonomi *et al.*, 1989). Embora as propriedades quelantes (tanto de íons ferrosos quanto íons férricos) e antioxidantes de DHLA tenham sido bastante documentadas, há algumas evidências que mostram seu efeito pro-oxidante, especialmente na presença de ferro (Scott *et al.*, 1994). No entanto, este mecanismo necessita de investigações futuras para melhor compreensão.

Nesse cenário, Mohorovic *et al.* (2014) relataram também a importância da MetHb como transportador do Fe^{3+} , sendo que os mecanismos oxidativos deste íon podem induzir a apoptose das células endoteliais, levando a lesão dos pequenos vasos encefálicos. Esse mecanismo torna possível a passagem de MetHb e de Fe nesse tecido, possibilitando o acúmulo desses componentes no parênquima cerebral com posterior redistribuição para os astrócitos, micróglia e neurônios, fato que gera danos teciduais ocasionados pelo estresse oxidativo.

Desse modo, o complexo envolvimento do estresse oxidativo plasmático e em eritrócitos induzido por agente pró-oxidantes, como DDS e seus metabólitos, envolve principalmente ERO e ferro, elevando o percentual de MetHb e hemólise, alterando o equilíbrio homeostático no plasma e, conseqüentemente, em órgãos ou tecidos mais vulneráveis ao estresse oxidativo, como o cérebro. Por isso, substâncias com propriedades antioxidantes e quelantes tem tido atenção especial por muitos pesquisadores.

6.2 ALTERAÇÕES OXIDATIVAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

O PFC é uma área encefálica de grande interesse para muitos pesquisadores, pois é bastante sensível ao estresse oxidativo, principalmente em doenças neurodegenerativas. No caso de fármacos que induzem estresse oxidativo, como a DDS, o PFC pode sofrer agressões oxidativas que podem levar a neurotoxicidade e neuroinflamação. Nesse sentido buscamos avaliar os efeitos da DDS sobre o estado redox e inflamatório no PFC. No nosso modelo experimental, o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu a capacidade antioxidante total no PFC dos camundongos, tanto em 4h quanto em 24h após os tratamentos. Esses fatos sugerem que a DDS e seus metabólitos pode atravessar a barreira hematoencefálica e reduzir os antioxidantes induzíveis e mobilizáveis no PFC, promovendo estresse oxidativo. Por isso, o uso de antioxidantes pode prevenir ou reduzir essas alterações redox e os prováveis danos causados pela DDS no SNC.

Nossos resultados também demonstraram que o tratamento com as doses de ALA (12,5 e 25mg/kg) aumentou ou reestabeleceu os níveis de TEAC no PFC após tratamento com DDS, principalmente após 24h de tratamento. Desta forma, o ALA pode atuar no SNC, restabelecendo a capacidade antioxidante, especialmente do PFC, podendo ser uma alternativa viável para pacientes em uso crônico de DDS. De acordo com Fu *et al.* (2014), a neuroproteção de ALA contra danos isquêmicos em camundongos ocorre através da expressão de PGC-1 α dependente de SIRT1, uma importante proteína indutora de capacidade antioxidante e redutora da produção ERO. O AM (1mg/kg) que é atualmente utilizado nos casos de Methba mostrou propriedade semelhante ao ALA em relação ao TEAC no PFC de camundongos.

No SNC, a GSH é um antioxidante essencial para a manutenção da função mitocondrial, onde neutraliza ERO, incluindo H₂O₂ (Mari *et al.*, 2009). No PFC, a GSH atua no controle da geração de ERO para diminuir suas consequências danosas. No nosso estudo, o tratamento com DDS diminuiu as concentrações de GSH no PFC dos camundongos em 24h após o tratamento, o que sugere que o PFC sofre uma queda no status antioxidante, via consumo de GSH, dependente do tempo e da ação de DDS e seus metabólitos, resultando em estresse oxidativo. Nossos dados corroboram com Al Shahrani *et al.*, (2017), que verificaram que ERO pode causar disfunção mitocondrial e reduzir os níveis de GSH no tecido cerebral,

resultando em estresse oxidativo. Bilska *et al.* (2007) também observaram que o tratamento com ALA aumentou as concentrações de GSH, sem alterações em GSSG e diminuição das concentrações de NO, atenuando o estresse oxidativo induzido pela reserpina em ratos.

Os níveis de GSH também mostram-se diminuídos *in vivo* no córtex occipital em casos de depressão, conforme medido através de espectroscopia de ressonância magnética (Godlewska *et al.*, 2014). Com isso, as células podem regular as concentrações do radical $\cdot\text{O}_2$, bem como do peroxinitrito através da Cu, ZnSOD citosólica e MnSOD mitocondrial. Através da formação de S-nitrosoglutathione, o NO pode causar depleção de GSH e, portanto, desencadear mudanças no sistema redox e na sinalização celular, levando à lesão mitocondrial e à morte neuronal (Zhang *et al.*, 2009; Zlatkovic, 2013).

As células neuronais e astrocíticas parecem exibir uma resposta diferente quando a CTE mitocondrial está com a habilidade de gerar ATP comprometida, notadamente na disfunção mitocondrial. Além disso, o estado antioxidante, particularmente no metabolismo da GSH, parece ser diferente em astrócitos e células neuronais (Pope, 2008). Assim, parece que os neurônios tem uma proteção devido a disponibilidade de GSH dos astrócitos contra ERO e ERN. Este aumento no conteúdo de GSH resulta da transferência de precursores de GSH de astrócitos para neurônios. Uma interferência nesse processo resulta na falha das células neuronais em aumentar seu o nível de GSH, tornando a CTE suscetível a danos oxidativo (Gegg, 2005). De fato, muitos estudos relatam que o estresse promove mudanças nos níveis de ERO e GSH, bem como na atividade de enzimas antioxidantes em regiões cerebrais como o PFC e o hipocampo (Kumar *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2014).

Assim, torna-se necessário o estudo com ALA, pois ele pode atuar como antioxidante, quelante e na CTE mitocondrial. Nosso estudo mostrou que o ALA nas doses utilizadas (12,5 e 25mg/kg) foi capaz de aumentar ou reestabelecer os níveis de GSH após tratamento com DDS, principalmente em 4 h após o tratamento. Desta forma, é provável que ALA possa agir diretamente como indutor da síntese de GSH no PFC, mas também de forma indireta pela via da SIRT-1, para aumentar a capacidade antioxidante e reduzir os efeitos tóxicos da DDS e MetHb.

Curiosamente, o AM 1mg/kg não alterou as concentrações de GSH nos tempos avaliados, sugerindo que AM não altera os níveis de GSH, que pode ser

crucial para um eventual desequilíbrio oxidativo e, eventualmente, neurotoxicidade no PFC. No entanto, é importante investigar cuidadosamente esses achados, bem como, as concentrações ideais e o tempo de tratamento com AM para prevenir eventual toxicidade. Este fato reforça o importante papel do ALA como alternativa viável ao AM, especialmente em relação aos seus efeitos benéficos no SNC. Vutskits *et al.* (2008), mostraram que o AM pode ter efeitos neurotóxicos, quando administrado na injeção em bolus, causando morte neuronal, levando as questões sobre a segurança do uso deste medicamento em doses elevadas. De fato, a injeção intravenosa de AM em doses comparáveis a voluntários saudáveis induziu tonturas, dor de cabeça, tremores e confusão mental (Vutskits, 2008).

Nosso estudo mostrou que o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu a atividade de SOD e CAT no PFC, e o pós-tratamento com o ALA, na dose de 12,5 mg/kg em 24h, restabeleceu a atividade de SOD e CAT. Esses dados sugerem que a DDS e seus metabólitos consomem SOD e CAT de forma dependente de tempo, provavelmente por consumo e saturação do sistema antioxidante no PFC, no entanto, o ALA pode induzir a síntese destas enzimas e restabelecer o equilíbrio redox.

Em relação à avaliação da peroxidação lipídica no PFC, nosso estudo demonstrou um aumento da concentração de TBARS no PFC dos camundongos tratados com DDS, o que reflete em aumento de MDA induzido pela DDS ou seus metabólitos, em 4 e 24h após o tratamento, o que pode sugerir que o PFC é sensível ao estresse oxidativo. Portanto, a DDS pode alterar o equilíbrio redox, promovendo estresse oxidativo e indução de síntese e liberação de MDA no PFC, podendo levar a neurotoxicidade e neuroinflamação, o que pode explicar as alterações clínicas observadas em pacientes com elevadas taxas de MetHb. Esses efeitos podem ocorrer provavelmente de forma indireta, através do estresse oxidativo periférico, envolvendo a liberação de ferro e oxidação da MetHb.

Estudos clínicos sugerem que o estresse crônico pode causar mudanças funcionais e estruturais em certas regiões cerebrais, como o PFC (McEwen, 2015; Liu, 2016). Desta forma, o complexo mecanismo antioxidante e quelante de ALA pode ter papel relevante contra esse processo de agressão ao PFC. De fato, o tratamento com o ALA nas doses utilizadas (12,5 e 25mg/kg), foi capaz de reduzir ou restabelecer os níveis de TBARS após tratamento com DDS, em 4 e 24 horas, mostrando que o ALA pode atravessar a BHE e/ou agir de forma indireta via

sinalização celular e atuar no PFC, reduzindo as ERO e as agressões oxidativas causadas pela DDS. Esses dados corroboram com Giustina *et al.* (2017), que verificaram que ALA tem um importante efeito antioxidante na disfunção cerebral em ratos, especialmente no PFC e hipocampo, reduzindo a permeabilidade da BHE em 24h, diminuindo atividade de mieloperoxidase (MPO) e NO, peroxidação lipídica e proteica, aumentando a capacidade antioxidante e atividade de CAT, prevenindo a disfunção cognitiva.

Em se tratando das agressões oxidativas causadas por DDS ou seus metabólitos, interessantemente o AM apresentou comportamento semelhante ao ALA, também podendo agir no SNC, particularmente no PFC, reduzindo a peroxidação lipídica. No entanto, há necessidade de investigações adicionais criteriosas para compreender melhor o mecanismo de ação do AM, principalmente em relação às suas propriedades antioxidantes e segurança ao paciente. De acordo com Patel *et al.* (2006), o azul de metileno é uma opção viável no tratamento da encefalopatia induzida por ifosfamida, especialmente em pacientes com sintomas graves de neurotoxicidade. No entanto, Peter *et al.* (2000) relataram que o AM pode alcançar altas concentrações no SNC após administração intraduodenal ou intravenosa, que pode explicar uma eventual neurotoxicidade.

Alterações na atividade da enzima SOD e na síntese e liberação de MDA podem refletir o grau de peroxidação lipídica no SNC. Assim, estudos mostram que a sobrecarga de ferro aumenta os níveis de MDA e reduzem a SOD (Reddy, 2009). O aumento dos níveis de ferro acompanhado pelo estresse oxidativo cerebral estão associadas as doenças neurodegenerativas, com isso vários estudos mostram que o aumento anormal do ferro no tecido cerebral pode levar à geração exacerbada de ERO, induzindo neurotoxicidade e morte neuronal, como observado em doenças neurodegenerativas (Gaasch, 2009). Nesse sentido, as características do ferro e sua homeostase estão ligadas à resposta inflamatória e à infecção e, portanto, fornecem mecanismos importantes de sobrevivência na fisiologia humana. Muitas evidências clínicas demonstram que a suscetibilidade à doença e a resposta à infecção e inflamação agrava com a elevação de ferro (Wessling-Resnick, 2010).

Nesse contexto, íons metálicos redox-ativos, como o ferro, presente em altas concentrações no SNC, podem gerar estresse oxidativo. Por isso, um evento extremamente importante na ocorrência de estresse oxidativo é a elevação das concentrações de ferro no SNC, especialmente em regiões mais sensíveis como o

PFC. A sobrecarga de ferro pode agravar o estresse oxidativo cerebral, levando a uma cascata de eventos neurotóxicos e neuroinflamatórios, que podem explicar os sinais clínicos exibidos por pacientes em tratamento crônico com DDS e com elevados níveis de MetHb. Nesse sentido, nosso estudo observou que o tratamento com DDS aumentou o acúmulo de ferro no PFC, sugerindo que a DDS levou a alterações homeostáticas do ferro, catalisando a produção de ERO, levando a agressões oxidativas e neurotóxicas. Esta informação tem potencial relevância clínica, visto que possibilita entender os complexos mecanismos desencadeados pela sobrecarga de Fe no cérebro e associar aos parâmetros de estresse oxidativo. Com isso, a avaliação dos efeitos dependentes do Fe no cérebro deve ser feita com bastante cautela para compreender esses mecanismos complexos que ocorrem devido uma sobrecarga de Fe, bem como o seu papel no desequilíbrio metabólico e no desenvolvimento de distúrbios neurológicos.

Esses dados corroboram com Piloni *et al.* (2013), que administrou via intraperitoneal Fe-dextrana para estudar o estresse oxidativo desencadeado pela sobrecarga de Fe no cérebro de ratos e encontraram aumento significativo no conteúdo de Fe total e ferro intracelular livre no córtex (2,4 vezes), hipocampo (1,6 vezes) e estriatum (2,9 vezes), 6h após a administração de Fe. Além disso, houve aumento significativo na atividade de CAT após 8h de administração de Fe no córtex, no hipocampo e no estriatum (1,4 vezes, 86 e 47%, respectivamente), sugerindo ser este um evento crucial no estresse oxidativo cerebral.

De acordo com Kruszewski *et al.* (2003), quando as concentrações de ferro excedem a capacidade de sequestro de ferro celular por proteínas de armazenamento ou outras moléculas, a concentração de ferro intracelular livre pode aumentar, podendo ser prejudicial e causar danos oxidativos e morte celular. No entanto, o acúmulo de ferro em regiões específicas do cérebro ocorre em muitas doenças neurodegenerativas e, muitas vezes, está associada ao estresse oxidativo e ao dano celular (Kruszewski, 2003).

Nesse sentido, o ALA pode atuar contra essas alterações oxidativas e prevenir ou reverter os danos causados no PFC. De fato, nossos resultados demonstraram que o tratamento com ALA nas concentrações utilizadas (12,5 e 25mg/kg) foi capaz de diminuir ou reestabelecer as concentrações de ferro após tratamento com DDS, em 4 e 24h após o tratamento, prevenindo sua sobrecarga deste metal. Portanto, estes dados mostram que o ALA é um potente antioxidante

que pode sequestrar ou prevenir a formação de ERO e como quelante, reduzindo os efeitos deletérios da alta concentração de ferro e disfunção mitocondrial. Corroborando, Ou *et al.* (1995) mostraram que os efeitos neuroprotetores de ALA são devido a sua atividade quelante de metal, como o ferro. Paralelamente, a administração do ALA em ratos mostrou que este composto pode se acumular no plasma, fígado e cérebro, atravessando eficientemente a BHE e reduzindo a quantidade de radical $\cdot\text{OH}$, gerados pela reação de Fenton, e sequestrando radical $\cdot\text{O}_2$. Além disso, o ALA desempenha um papel fundamental no metabolismo mitocondrial e pode ser uma estratégia efetiva para melhorar a disfunção mitocondrial e cognitiva no dano oxidativo no sistema nervoso. Paralelamente, nossos resultados também mostraram que o AM apresentou comportamento semelhante ao ALA na redução das concentrações de ferro no PFC e, no entanto, o ALA mostrou ter efeitos antioxidantes mais pronunciados sobre a geração de ERO, sendo mais seguro e menos tóxico no sangue e no PFC.

Outros mecanismos do ALA têm sido propostos como os relatados por Chen *et al.* (2017) que mostraram os efeitos do ALA na expressão do receptor de transferrina TfR1, DMT1, Fpn1 e ferritina em células BV-2 microgliais. Seus dados mostraram que o ALA pode aumentar a expressão de TfR1, DMT1 e de ferritina ocasionando aumento de ferro fora da célula, promovendo a deposição de ferro na ferritina, aumento da absorção de ferro celular e, em seguida, redução do ferro livre tanto dentro como fora da célula.

Corroborando, Skjorringe *et al.* (2015), as propriedades antioxidantes do ALA associadas à sua capacidade de reduzir o ferro nas células e nos tecidos, são em parte devido ao seu efeito inibidor sobre a absorção de ferro da transferrina, promovendo o efeito sobre a deposição de ferro na ferritina. No entanto, não se conhece claramente como ALA inibe a absorção de ferro celular da transferrina e promove a deposição de ferro na ferritina. Os autores mostraram que é altamente provável que a ALA possa aumentar a expressão de TfR1 e/ou DMT1 para inibir a absorção de ferro e aumentar a expressão da ferritina para aumentar a deposição de ferro. Esses achados sugerem que ALA pode aumentar a expressão de proteínas que absorvem ferro, TfR1 e DMT1, bem como ferritina, quando o ferro está aumentado fora da célula. Os autores também mostraram que o aumento da expressão de TfR1, DMT1 e ferritina pode induzir a absorção de ferro celular e também a deposição de ferro na ferritina, levando a uma redução no ferro livre

tanto dentro como fora da célula, suprimindo posteriormente a formação de ERO mediada pelo ferro e estresse oxidativo.

De acordo com Xie *et al.* (2016), o ALA pode atenuar o dano causado por ERO e reduzir as atividades neuroinflamatórias e, portanto, pode ter um efeito positivo sobre a ferroptose neuronal, uma forma morte celular dependente de ferro e ERO. Desse modo, a ferroptose pode ser prevenida por antioxidantes lipofílicos e quelantes de ferro, como ALA (Suh *et al.*, 2005) ou deferoxamina (Dixon e Stockwell, 2014). Recentemente, Zhang (2018) também relatou que a suplementação com ALA em camundongos pode inibir potencialmente a apoptose neuronal dependente de caspase. Além disso, ALA bloqueou a sobrecarga de ferro induzida por Tau e ferroptoses, peroxidação lipídica e neuroinflamação.

Com isso, neste estudo também mostramos a neuroinflamação no PFC causada pelo DDS e seus metabólitos (DDS-NOH), que pode ser devido ao consumo de GSH e aumento na produção de ERO, levando ao estresse oxidativo. Além disso, DDS e DDS-NOH podem provocar oxidação da Hb e hemólise, com liberação de ferro na circulação sistêmica, ocasionando efeitos oxidativos em vários órgãos, incluindo o cérebro e áreas específicas como o PFC. Essa sobrecarga de ferro pode levar a produção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e INF- γ , que induzem a produção adicional de ERO e NO. Estas citocinas e as ERO podem levar a neurotoxicidade e morte neuronal, conforme relatado em casos de doenças neurodegenerativas e alterações clínicas relevantes provocadas por fármacos como a DDS.

Com o intuito de avaliar a atividade neuroinflamatória de DDS, bem como o papel de ALA nesse processo, quantificamos a expressão de marcadores neurogliais, como a expressão de F4/80⁺, relacionado a atividade macrófágica e microglial, e expressão de GFAP, marcador relacionado a atividade astrocitária no PFC dos camundongos. Nossos dados mostraram que o tratamento com DDS 40mg/kg não levou a ativação de macrófagos/micróglia e nem estimulou a reatividade de astrócitos no PFC dos camundongos, mas induziu um influxo recente de macrófagos/micróglia e astrócitos no PFC. Por outro lado, o pós-tratamento com ALA (25 mg/kg) estimulou a ativação de um perfil de macrófagos/micróglia, mas reduziu a reatividade de astrócitos. Esses resultados mostraram que a DDS, a princípio, induziu influxo macrófagos/micróglia e astrócitos no PFC, mas não levou a ativação destas células nos tempos avaliados. No

entanto, o ALA levou a ativação de macrófagos/microglia e reduziu a reatividade de astrócitos, mostrando uma ação imunoestimuladora sobre células macrofágicas no PFC, que é fundamental para a regulação na produção de ROS, estresse oxidativo e neurotoxicidade.

De acordo com Ward *et al.* (2014), o tratamento com ALA pode reduzir a ativação microglial, assim como modular o perfil macrofágico, inibindo o fenótipo de macrófagos M1 (inflamatório) e estimulando o perfil M2 (anti-inflamatório), que possivelmente reduz o dano neuronal. Além disso, Wang *et al.* (2018), investigaram o potencial de ALA em um modelo de oclusão da artéria cerebral média em ratos e um modelo de inflamação microglial induzida por LPS *in vitro*. Os resultados mostraram que ALA 20 mg/kg e 40 mg/kg diminuiu o tamanho do infarto, o edema cerebral e os déficits neurológicos. Além disso, ALA induziu a polarização da microglia ao fenótipo M2, modulou a expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 e atenuou a ativação de NF- κ B, sugerindo que ALA tem efeito benéfico no AVC experimental via modulação da polarização da microglia M1/M2, sendo o potencial mecanismo de ALA a inibição da ativação do NF- κ B.

Em relação aos astrócitos, Röhl *et al.*, (2007), afirmam que, dependendo do contexto de sua ativação, estas células podem estar envolvidas na sobrevivência e regeneração neuronal de um modo protetor ou impeditivo. As principais alterações reativas dos astrócitos *in vivo* são a regulação positiva de GFAP. Paralelo a isso, os autores também sugerem que o papel da microglia ativada em processos astrogliais após lesão cerebral deve ser considerado, já que a microglia em seu estado ativado pode suportar o início da astrogliose, mas pode retardar ou reduzir a formação de cicatriz glial subsequente. Pekny, *et al.*, (2007) demonstraram um efeito neuroprotetor de astrócitos reativos no neurotrauma em um estágio inicial; em um estágio posterior, visto que estas células facilitam a formação de cicatrizes gliais pós-traumáticas e inibem a regeneração do SNC.

Eskes *et al.* (2003) relatam que a microglia reage precocemente a uma agressão neurotóxica. No entanto, os fatores bioativos e as interações célula-célula que levam à ativação microglial e, finalmente, a um resultado neuroprotetor ou neurodegenerativo, ainda precisam ser elucidados. De fato, os autores estudaram as interações entre astrócitos e microglia em coculturas tratadas por 10 dias com Metilmercúrio (MeHgCl). Os resultados demonstraram que a microglia é

diretamente ativada pelo MeHgCl e que a interação entre a microglia ativada e os astrócitos pode aumentar a liberação de IL-6.

Além da ativação microglial e astrocitária, no contexto da neuroinflamação e atividade anti-inflamatória, avaliamos também a expressão das citocinas de IL-1 β , IL-17 e IL-4, bem como de BDNF no PFC. Nossos resultados mostraram que o tratamento com DDS 40mg/kg aumentou a produção de IL-1 β , IL-17 e IL-4 no PFC, e reduziu a expressão de BDNF em relação aos animais sem tratamento. Por outro lado, o tratamento com ALA (25 mg/kg) reduziu a expressão da citocina inflamatória IL-1 β e aumentou os níveis de BDNF no PFC, mas não alterou a produção da citocina anti-inflamatória IL-4 e nem da citocina inflamatória IL-17. Esses dados mostram claramente que a DDS induziu neuroinflamação no PFC, e levou ao estresse oxidativo nesse tecido, que pode ocasionar ansiedade e depressão por interferir negativamente nas vias de sinalização de BDNF. Nesse sentido, Li et al (2014) relataram o perfil inflamatório da microglia em camundongos com diferentes características de ansiedade e encontraram alto perfil de ansiedade em camundongos DBA/2J naíve e significativa polarização M1 microglial. Além disso, os camundongos expressaram níveis mais elevados de mRNA de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no hipotálamo antes e depois da estimulação com LPS. Assim, a ativação microglial pró-inflamatória reflete ansiedade em camundongos.

Khan et al. (2006) acreditam que o aumento de citocinas pró-inflamatórias pode aumentar a toxicidade de DDS e DDS-NOH em queratinócitos, nas reações cutâneas a drogas, através da redução no conteúdo de GSH. De fato, os pesquisadores avaliaram os efeitos do pre-tratamento com TNF- α nos níveis de GSH e ERO em queratinócitos epidérmicos humanos normais e descobriram uma diminuição significativa na GSH após 24h, enquanto que a formação de ERO foi aumentada na presença de DDS-NOH.

Portanto, é provável, que a DDS possa causar neuroinflamação e neurotoxicidade, assim como estresse oxidativo e alterações hematológicas. No entanto, esses mecanismos necessitam que estudos adicionais para melhor compreensão. No entanto, o tratamento com ALA mostrou ação anti-inflamatória e antioxidante, através da redução de IL-1 β , mas não de IL-4, assim como aumentou os níveis de BDNF, o que sugere uma diminuição da neurotoxicidade induzida por DDS. De acordo com Dinicolas et al. (2017), as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do ALA são exercidos através da modulação do NF- κ B, que modula

diferentes citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β e IL-6; e mostraram que a hipermetilação do DNA de IL-1 β e IL-6 com ALA 0,5 mM levou a diminuição da expressão dessas citocinas. Estes resultados reforçam achados prévios que indicam que a IL-1 β e a IL-6 sofrem modulação dependente da metilação do DNA em modelos neurais e abrem o caminho para o estudo dos mecanismos epigenéticos desencadeados pelo ALA.

Giustina et al (2017) observaram que o ALA reduziu a permeabilidade da BHE e os níveis de TNF- α no hipocampo em 24 h e os níveis de IL-1 β no hipocampo e no córtex pré-frontal no mesmo tempo. Além disso, o ALA protege a permeabilidade da BHE, diminui a neuroinflamação pela redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β e aumenta a atividade antioxidante nas estruturas cerebrais agudamente após a indução da sepse.

Recentemente, Li et al (2018), avaliaram os mecanismos de ALA em um modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e os resultados mostraram que ALA reduz os níveis de MDA, TNF- α e TGF- β , e aumenta SOD e células Treg (Células T regulatórias), o que mostra que, além da redução do estresse oxidativo, o ALA possuía efeitos antiinflamatórios e imunomoduladores na EAE.

Desse modo, o possível uso terapêutico de ALA depende basicamente das suas propriedades antioxidantes para remover ou prevenir a formação de ERO, e de suas propriedades quelantes, para remover as quantidades excessivas de ferro de regiões cerebrais específicas mais vulneráveis, como o PFC. Assim, o ALA deve essencialmente ser capaz de atravessar as membranas celulares, bem como a BHE, para combater as ERO geradas durante o estresse oxidativo, atingindo regiões com acúmulo de ferro, sem reduzir o ferro ligado à transferrina plasmática, e ser capaz de remover o ferro quelável do local de acúmulo ou transferi-lo para outras proteínas biológicas, tais como transferrina circulante. Enfim, acreditamos que o ALA é uma alternativa terapêutica útil e promissora para o tratamento de MetHba, hemólise, estresse oxidativo no sangue e no PFC para indivíduos em uso crônico de DDS, diminuindo sua toxicidade e facilitando a adesão ao tratamento de doenças como a hanseníase.

7 CONCLUSÕES

A partir deste modelo experimental, podemos concluir que:

- O tratamento com DDS induziu a formação de MethHb dos camundongos, no entanto, ALA em todas as concentrações testadas preveniu ou reverteu a oxidação da hemoglobina induzida pela DDS;

- O tratamento com DDS reduziu a capacidade antioxidante (TEAC), SOD e CAT no sangue e PFC, assim como também diminuiu as concentrações de GSH nesses tecidos. O tratamento com ALA em todas as concentrações aumentou ou restabeleceu os níveis de TEAC, GSH, SOD e CAT após o tratamento com DDS;

- O tratamento com AM inibiu a formação de MethHb e elevou os parâmetros antioxidantes (TEAC e GSH) no sangue de animais tratados com DDS; entretanto não alterou os níveis desses antioxidantes no PFC.

- O DDS aumentou as concentrações de TBARS e de ferro no plasma e PFC dos camundongos. O tratamento com o ALA e AM reduziram os níveis de TBARS e Fe induzidos pelo DDS no PFC; entretanto no sangue, somente as menores concentrações de ALA reduziram a sobrecarga de Ferro;

- O DDS também promoveu o influxo microglial e astrocitário no PFC, e induziu a produção de IL-1 β , IL-17 e IL-4, e reduziu BDNF no PFC. No entanto, o pós-tratamento com ALA estimulou a ativação macrofágica e inibiu a reatividade de astrocitos, assim como inibiu a produção de IL-1 β e aumentou BDNF no PFC.

8 REFERÊNCIAS

AARÃO T.L.; ESTEVES, N.R.; ESTEVES, N.; DE MIRANDA SOARES, L.P.; DA SILVA PINTO, D.; FUZII, H.T.; QUARESMA, J.A.S. Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. **Microb Pathog.**, v. 77, p. 66-72, 2014.

ABBOTT, N.J.; PATABENDIGE, A.A.; DOLMAN, D.E.; YUSOF, S.R.; BEGLEY, D.J. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiol disease.**, v. 37, n. 1, p. 13-25, 2010.

ABDEL-HAFEZ, H.Z.; MOHAMED, E.E.; ABD-ELGHANY, A.A. Tissue and blood superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in leprosy. **Eur Acad Dermatol Venereol.**, v. 24, n. 6, p. 704–708, 2009.

ADAMS, L.B.; FRANZBLAU, S.G.; VAVRIN, Z.; HIBBS, J.B.; KRAHENBUHL, J.L. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. **J Immunol.**, v. 147, n. 5, p. 1642–1646, 1991.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AISEN, P. Transferrin receptor 1. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 11, p. 2137-2143, 2004.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

AL SHAHRANI, M.; HEALES, S.; HARGREAVES, I.; ORFORD, M. Oxidative Stress: Mechanistic Insights into Inherited Mitochondrial Disorders and Parkinson's Disease. **J Clin Med.**, v. 6, n. 11, p. 100, 2017.

ALBUQUERQUE, R.V.; MALCHER, N.S.; AMADO, L.L.; COLEMAN, M.D.; SANTOS, D.C.; BORGES, R.S.; VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; MONTEIRO, M.C. In Vitro Protective Effect and Antioxidant Mechanism of Resveratrol Induced by Dapsone Hydroxylamine in Human Cells. **PLoS one**, v. 10, n. 8, p. e0134768, 2015.

ALCAÏS, A.; SANCHEZ, F.O.; THUC, N.V.; LAP, V.D.; OBERTI, J.; LAGRANGE, P.H.; SCHURR, E.; ABEL, L. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. **J Infect Dis.**, v. 181, n. 1, p. 302–308, 2000.

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. **J Radiat Res App Sci.**, v. 8, n. 1, p. 26-35, 2015.

ALTAMURA, S; MUCKENTHALER, M.U. Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, n. 4, p. 879-895, 2009.

ANNIGERI, S.R.; METGUD, S.C.; PATIL, J. R. Lepromatous leprosy of histoid type. **Indian J Med Microbiol.**, v. 25, p. 70–71, 2007.

ASALKAR, A.; GIRISH, S.; NAOLEY, R. Protein Oxidation and Antioxidant Vitamins in Leprosy. **Int J Pharm Sci Research.**, v. 2, n. 11, p. 2870-2873, 2011.

BALLA, J., VERCELLOTTI, G. M., JENEY, V., YACHIE, A., VARGA, Z., JACOB, H. S., BALLA, G. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. **Antioxidants & redox signaling**, v. 9, n. 12, p. 2119-2138, 2007.

BARRETO, J. G., FRADE, M. A. C., BERNARDES FILHO, F., DA SILVA, M. B., SPENCER, J. S., & SALGADO, C. G. **Leprosy in Children**. *Current infectious disease reports*, v. 19, n. 6, p. 23, 2017.

BARROS, L.; FALCÃO, S.; BAPTISTA, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I. Antioxidant activity of Agaricus sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chem.**, v. 111, n. 1, p. 61-66, 2008.

BENJAK, A., AVANZI, C., SINGH, P., LOISEAU, C., GIRMA, S., BUSSO, P., ... & SALGADO, C. G. **Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus Mycobacterium leprae**. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 352, 2018.

BERGAMASCHI, M.M.; STEINHORST, G.K.; VALÉRIO, D.A.; QUEIROZ, R. H. Curcumin could prevent methemoglobinemia induced by dapsone in rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 49, p. 1638-1641, 2011.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 257-263, 2004.

BHAT, A.H.; DAR, K.B.; ANEES, S.; MASOOD, A.; SOFI, M.A.; GANIE, S.A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomed Pharmacot.**, v. 74, p. 101–110, 2015.

BHAT, R.M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdiscip Perspect Infect Dis.**, v. 2012, Article ID 181089, 2012.

BHATTACHARYYA, K.G.; GUPTA, S.S. Pb (II) uptake by kaolinite and montmorillonite in aqueous medium: influence of acid activation of the clays. **Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.**, v. 277, n. 1, p. 191-200, 2006.

BHATTI, F.; MANKHEY, R.W.; ASICO, L.; QUINN, M.T.; WELCH, W.J.; MARIC, C. Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of α -lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney. **Kidney Int.**, v. 67, n. 4, p. 1371-1380, 2005.

BILSKA, A.; DUBIEL, M.; SOKOŁOWSKA-JEZ, M.; LORENC-KOCI, E.; WŁODEK, L. Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. **Neuroscience**, v. 146, n. 4, p. 1758-1771, 2007.

BILSKA, A.; WLODEK, L. Lipoic acid-the drug of the future. **Pharmacol Rep.**, v. 57, n. 5, p. 570-577, 2005.

BLANCO, S.; HERNÁNDEZ, R.; FRANCHELLI, G.; RAMOS-ÁLVAREZ, M.M.; PEINADO, M.Á. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. **Nitric Oxide**, v. 62, p. 32-43, 2017.

BOBOSHA, K.; WILSON, L.; VAN MEIJGAARDEN, K.E.; BEKELE, Y.; ZEWDIE, M.; VAN DER PLOEG-VAN, J.J.; HAGGE, D.A. T-Cell Regulation in Lepromatous Leprosy. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8, n. 4, p. e2773, 2014.

BONOMI, F.; CERIOLI, A.; PAGANI, S. Molecular aspects of the removal of ferritin-bound iron by dihydrolipoate. **Biochim Biophys Acta.**, v. 994, n. 2, p. 180-186, 1989.

BORAN, P.; TOKUC, G.; YEGIN, Z. Methemoglobinemia due to application of prilocaine during circumcision and the effect of ascorbic acid. **J Pediatr Urol.**, v. 4, p. 475–476, 2008.

BORDIN, L.; FIORE, C.; ZEN, F.; COLEMAN, M. D.; RAGAZZI, E.; CLARI, G. Dapsone hydroxylamine induces premature removal of human erythrocytes by membrane reorganization and antibody binding. **Br J Pharmacol.**, v. 161, n. 5, p. 1186–1199, 2010.

BOSERUP, M.W.; LICHOTA, J. HAILE, D. MOOS, T. Heterogeneous distribution of ferroportin-containing neurons in mouse brain. **Biometals**, v. 24, n. 2, p. 357-375, 2011.

BRADSHAW, T.P.; MCMILLAN, D.C.; CROUCH, R.K.; JOLLOW, D.J. Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsone hydroxylamine. **Free Radic Biol Med.**, v. 22, n. 7, p. 1183–1193, 1997.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Define ações de controle da hanseníase. Portaria Conjunta nº 125, de 26 de março de 2009. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2009/poc0125_26_03_2009.html>. Acesso em 10 de dezembro de 2017.

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

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

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

BRENNER M. Role of GFAP in CNS injuries. **Neuroscience letters**, v. 565, p. 7-13, 2014.

BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D.N. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, 2004.

BUIJS, M.; DOAN, N.T.; VAN ROODEN, S.; VERSLUIS, M.J.; VAN LEW, B.; MILLES, J, VAN DER GROND, J.; VAN BUCHEM, M.A. In vivo assessment of iron content of the cerebral cortex in healthy aging using 7-Tesla T2*-weighted phase imaging. **Neurobiol Aging.**, v. 53, p. 20-26, 2017.

BUKOWSKA, B.E.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicol Lett.**, v. 158, p. 73-84, 2004.

CASSADO A.A. F4/80 as a major macrophage marker: the case of the peritoneum and spleen. **Macrophages. Springer**, Cham, p. 161-179, 2017.

CHACKO, B.K.; WALL, S.B.; KRAMER, P.A.; RAVI, S.; MITCHELL, T.; JOHNSON, M.S.; DARLEY-USMAR, V.M. Pleiotropic effects of 4-hydroxynonenal on oxidative burst and phagocytosis in neutrophils. **Redox Biol.**, v. 9, p. 57-66, 2016.

CHEN, C.W.; CHEN, Q.B.; OUYANG, Q.; SUN, J.H.; LIU, F.T.; SONG, D.W.; YUAN, H.B. Transient early neurotrophin release and delayed inflammatory cytokine release by microglia in response to PAR-2 stimulation. **J Neuroinflammation.**, v. 9, n. 1, p. 142, 2012.

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. **Pharmacol Rep.**, v. 69, n. 1, p. 1-5, 2017.

CHEN, Z.; GAO, C.; HUA, Y.; KEEP, R.F.; MURASZKO, K.; XI, G. Role of iron in brain injury after intraventricular hemorrhage. **Stroke**, v. 42, n. 2, p. 465-470, 2011.

CHIUEH, C.C. Iron overload, oxidative stress, and axonal dystrophy in brain disorders. **Pediatr Neurol.**, v. 25, n. 2, p. 138-147, 2001.

CHO, S.N.; CELLONA, R.V.; VILLAHERMOSA, L.G.; FAJARDO, T.T.; BALAGON, M.V.; ABALOS, R.M.; TAN, E.V.; WALSH, G.P.; KIM, J.D.; BRENNAN, P.J. Detection of phenolic glycolipid I of Mycobacterium leprae in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clin Diagn Lab Immunol.**, v. 8, n. 1, p. 138-142, 2001.

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

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

COLEMAN, M.D. Dapsone toxicity: some current perspectives. **Gen Pharmacol.**, v. 26, n. 7, p. 1461-1467, 1995.

COLEMAN, M.D. Dapsone: Modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance. **Br J Dermatol.**, v. 129, n. 5, p. 507-513, 1993.

COLEMAN, M.D.; JACOBUS, D.P. Reduction of dapsone hydroxylamine to dapsona during methaemoglobin formation in human erythrocytes *in vitro*. **Biochem Pharmacol.**, v. 45, n. 5, p. 1027-1033, 1993.

COLEMAN, M.D.; OGG, M.S.; HOLMES, J.L.; GARDINER, J.M.; JACOBUS, D.P. Studies on the differential sensitivity between diabetic and non-diabetic human erythrocytes to monoacetyl dapsone hydroxylamine-mediated methaemoglobin formation *in vitro*. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 1, n. 2, p. 97-102, 1996.

COLEMAN, M.D.; TAYLOR, C.T. Effects of dihydrolipoic acid (DHLA), α -lipoic acid. N-acetyl cysteine and ascorbate on xenobiotic-mediated methaemoglobin formation in human erythrocytes *in vitro*. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 14, n. 3. p. 121-127, 2003.

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

COLEMAN, M.D.; WALKER, C.L. Effects of oxidized α -lipoic acid and α -tocopherol on xenobiotic-mediated methaemoglobin formation in diabetic and non-diabetic human erythrocytes *in vitro*. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 8, n. 2, p. 127-132, 2000.

COMPORTI, M.; SIGNORINI, C.; BUONOCORE, G.; CICCOLI, L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. **Free Rad Biol Med.**, v. 32, n. 7, p. 568-576, 2002.

CONSTANTINESCU, A.; TRITSCHLER, H.; PACKER, L. Alpha-lipoic acid protects against hemolysis of human erythrocytes induced by peroxy radicals. **Biochem Mol Biol Int.**, v. 33, n. 4, p. 669-679, 1994.

COOPER, H.A. Methemoglobinemia caused by benzocaine topical spray. **South Med J.**, v. 90, n. 9, p. 946-948, 1997.

CRICHTON, R.; WARD, R. **Metal-based neurodegeneration: from molecular mechanisms to therapeutic strategies**. John Wiley & Sons, 2013.

CRICHTON. R.R.; BOELAEERT, J.R. **Inorganic biochemistry of iron metabolism from molecular mechanisms to clinical consequences**. Chichester: John Wiley & Sons, 2001.

DALLEY, J.W.; CARDINAL, R.N.; ROBBINS, T.W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 28, n. 7, p. 771-784, 2004.

DALPINO, D.; DILTOR, L.A.M.; OPROMOLLA, V.A. Atividade da NADH-redutase de metemoglobina em hemolisado e membranas eritrocitárias de pacientes hansenians sob tratamento sulfônico. **Hansenol Int.**, v. 23, n. 1/21, p. 14-26, 1998.

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

DE CASTRO, C. P., JONES, S. A., & HARRIS, J. Autophagy Controls the Production and Secretion of IL-1 β : Underlying Mechanisms. In: **Autophagy**:

Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. 2015. p. 201-209.

DE DOMENICO, I.; MCVEY WARD, D.; KAPLAN, J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 1, p. 72-81, 2008.

ESKES, C., JUILLERAT-JEANNERET, L., LEUBA, G., HONEGGER, P., & MONNET-TSCHUDI, F. Involvement of microglia–neuron interactions in the tumor necrosis factor- α release, microglial activation, and neurodegeneration induced by trimethyltin. **Journal of neuroscience research**, v. 71, n. 4, p. 583-590, 2003.

DHIR, A.; KULKARNI, S.K.; Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**, v. 24, n. 3, p. 125–131, 2011.

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

DINICOLA, S., PROIETTI, S., CUCINA, A., BIZZARRI, M., & FUSO, A. Alpha-Lipoic Acid Downregulates IL-1 β and IL-6 by DNA Hypermethylation in SK-N-BE Neuroblastoma Cells. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 74, 2017.

DIXON, S.J.; LEMBERG, K.M.; LAMPRECHT, M.R.; SKOUTA, R.; ZAITSEV, E.M.; GLEASON, C.E.; MORRISON, B. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060-1072, 2012.

DIXON, S.J.; STOCKWELL, B.R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. **Nat Chem Biol.**, v. 10, n. 1, p. 9–17, 2014.

DLOUHY, A.C.; OUTTEN, C.E. The iron metallome in eukaryotic organisms. **Met Ions Life Sci.**, v. 12, p. 241–278, 2013.

DOBASHI, K.; KAMIDE, Y.; UTSUGI, M.; ONO, A.; ISHIZUKA, T.; HISADA, T.; MORI, M. Intracellular glutathione redox status in human dendritic cells regulates Th1/Th2 balance through IL-12 and IL-27 production, **Eur Respir J.**, v. 40, 2012.

DRINGEN, R.; BISHOP, G.M.; KOEPPE, M. DANG, T.N.; ROBINSON, S.R. The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain. **Neurochem Res.**, v. 32, n. 11, p. 1884-1890, 2007.

EL-HUSSEINI, A.; AZAROV, N. Is threshold for treatment of methemoglobinemia the same for all? A case report and literature review. **Am J Emerg Med.**, v. 28, n. 6, p. 748e5–748e10, 2010.

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

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys.**, v. 82, n. 1, p. 70-7, May 1959.

EVELYN, K.A.; MALLOY, H.T. Microdetermination of oxyhemoglobin methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. **J Biol Chem.**, v.126, n. 2, p. 655-662, 1938.

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

FEDERICO, A.; CARDAIOLI, E.; DA POZZO, P.; FORMICHI, P.; GALLUS, G.N.; RADI, E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. **J Neurol Sci.**, v. 322, n. 1, p. 254–262, 2012.

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CACIOTTI, B.; SUGHERINI, L.; CICCOLI, L.; GIACHETTI, D.; COMPORTI, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS letters**, v. 416, n. 2, p. 123-129, 1997.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos doenças relacionadas. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLYNN, J.L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immuno.**, v. 19, n. 1, p. 93-129, 2001.

FORD, P.G. Dapsone. **Curr Probl Dermatol.**, v. 12, n. 5, p. 242-245, 2000.

Fowler, A. K., Thompson, J., Chen, L., Dagda, M., Dertien, J., Dossou, K.S., Kruman, I. I. Differential sensitivity of prefrontal cortex and hippocampus to alcohol-induced toxicity. **PLoS one**, v. 9, n. 9, p. e106945, 2014.

FRATERNALE, A.; SCHIAVANO, G.F.; PAOLETTI, M.F.; PALMA, L.; MAGNANI, M.; BRANDI, G. Effect of the N-butanoyl glutathione (GSH) derivative and acyclovir on HSV-1 replication and Th1 cytokine expression in human macrophages. **Med Microbiol Immunol.**, v. 203, n. 4, p. 283-289, 2014.

FREI, B. Molecular and biological mechanism of antioxidant action. **FASEB J.**, v. 13, n. 9, p. 963-964, 1999.

FRIEDEN, T.R.; STERLING, T.R.; MUNSIFF, S.S.; WATT, C.J.; DYE, C. Tuberculosis. **Lancet**, v. 362, n. 9387, p. 887-899, 2003.

FU, B.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; ZHANG, C.; LI, Y.; ZHANG, Y.; WANG, X. Alpha-lipoic acid upregulates SIRT1-dependent PGC-1 α expression and protects mouse brain against focal ischemia. **Neuroscience**, v. 281, p. 251-257, 2014.

GAASCH, J.A.; LOCKMAN, P.R.; GELDENHUYS, W.J.; ALLEN, D.D.; VAN DER SCHYF, C.J. Brain iron toxicity: differential responses of astrocytes neurons and endothelial cells. **Neurochem Res.**, v. 32, n. 7, p. 1196-208, 2007.

GALIZA NETO, G.C.; PITOMBEIRA, M.S. Aspectos Moleculares da Anemia Falciforme. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2002.

GANDHI, G.; SINGH, B. DNA damage studies in untreated and treated leprosy patients. **Mutagenesis**, v. 19, n. 6, p. 483-488, 2004.

GARAD, A.S.; SURYAKAR, A.N.; SHINDE, C.B. Oxidative Stress and Role of Thiol in Leprosy. **Int J Pharm Biol Chem Sci.**, v. 3, n. 2, p. 22-26, 2014.

GARCIA-OSCOS, F.; PENA, D.; HOUSINI, M.; CHENG, D.; LOPEZ, D.; BORLAND, M.S. Vagal nerve stimulation blocks interleukin 6-dependent synaptic hyperexcitability induced by lipopolysaccharide-induced acute stress in the rodent prefrontal cortex. **Brain Behav Immun.**, v. 43, p. 149–158, 2015.

GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **Eur J Neurosci.**, v. 27, n. 1, p. 2783–2802, 2008.

GEGG, M.E.; CLARK, J.B.; HEALES, S.J.R. Co-culture of neurones with glutathione deficient astrocytes leads to increased neuronal susceptibility to nitric oxide and increased glutamate-cysteine ligase activity. **Brain research**, v. 1036, n. 1, p. 1-6, 2005.

GEORGAKOULI, K. DELI, C.K.; ZALAVRAS, A.; FATOUROS, I.G.; KOURETAS, D.; KOUTEDAKIS, Y.; JAMURTAS, A.Z. α -Lipoic acid supplementation up-regulates antioxidant capacity in adults with G6PD deficiency. **Food Chem Toxicol.**, v. 61, p. 69-73, 2013.

GIBSON, Q. Introduction: congenital methemoglobinemia revisited. **Blood**, v. 100, n. 10, p. 3445–3446, 2002.

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

GIUSTINA, A.D.; GOLDIM, M.P.; DANIELSKI, L.G.; FLORENTINO, D.; MATHIAS, K.; GARBOSSA, L.; LAURENTINO, A.O.M. Alpha-lipoic acid attenuates acute neuroinflammation and long-term cognitive impairment after polymicrobial sepsis. **Neurochem Int.**, v. 108, p. 436-447, 2017.

GLUSHAKOVA, O.Y. et al. The Use of Blood-Based Biomarkers to Improve the Design of Clinical Trials of Traumatic Brain Injury. **Handbook of Neuroemergency Clinical Trials (Second Edition)**. 2018. p. 139-166.

GODLEWSKA, B.R.; YIP, S.W.; NEAR, J.; GOODWIN, G.M.; COWEN, P.J. Cortical glutathione levels in young people with bipolar disorder: a pilot study using magnetic resonance spectroscopy. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 2, p. 327–332, 2014.

GONZALEZ-LIMA, F.; CADA, A. Quantitative histochemistry of cytochrome oxidase activity. In: *Cytochrome oxidase in neuronal metabolism and Alzheimer's disease*. **Springer US**, p. 55-90, 1998.

GOODWIN, JF.; MURPHY, B; GUILLEMETTE, M. Direct measurement of serum iron and binding capacity. **Clinical chemistry**, v. 12, n. 2, p. 47-57, 1966.

GORALSKA, M.; DACKOR, R.; HOLLEY, B.; MCGAHAN, M.C. Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epithelial cells. **Exp eye Res.**, v. 76, n. 2, p. 241-248, 2003.

GOULART, I.M.; ARBEX, G.L.; CARNEIRO, M.H.; RODRIGUES, M.S.; GADIA, R. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 35, n. 5, p. 453-460, 2002.

GRETER, M., LELIOS, I., & CROXFORD, A. L. Microglia versus myeloid cell nomenclature during brain inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 249, 2015.

GROSSI, M.A.D.F.; LEBOEUF, M.A.A.; ANDRADE, A.R.C.D.; BÜHRER-SÉKULA, S.; ANTUNES, C.M.D.F. Risk factors for ML Flow seropositivity in leprosy patients. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 41, n. 2, p. 39–44, 2008.

GROSSMAN, S.; BUDINSKY, R.; JOLLOW, D. Dapsone-induced hemolytic anemia: role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the hemolytic response of rat erythrocytes to N-hydroxydapsone. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 273, n. 2, p. 870-877, 1995.

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

HALIM, N. K.; OGBEIDE, E. Haematological alterations in leprosy patients treated with dapsone. **East African Med J.**, v.7, n.2, p.100-2, 2002.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. **J Neurochem.**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford: Oxford University Press**, v. 3, p. 105-245, 1999.

HAN, D.; HANDELMAN, G.; MARCOCCI, L.; SEN, C.K.; ROY, S.; KOBUCHI, H.; TRITSCHLER, H.J.; FLOHE, L.; PACKER, L. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. **BioFactors.**, v. 6, n. 3, p. 321-338, 1997.

HAN, D.; HANDELMAN, G.; MARCOCCI, L.; SEN, C.K.; ROY, S.; KOBUCHI, H.; PACKER, L. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. **Biofactors**, v. 6, n. 3, p. 321-338, 1997.

HARE, G.M.; TSUI, A.K.; CRAWFORD, J.H.; PATEL, R.P. Is methemoglobin na inert bystander, biomarker or a mediator of oxidative stress-The example of anemia?. **Red Biol.**, v. 1, n. 1, p. 65-69, 2013.

HART, B.E.; TAPPING, R.I. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* infection. **J Trop Med.**, v. 2012, Article ID 415057, 2012.

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

HE, W.; FROST, M.C. CellNO trap: Novel device for quantitative, real-time, direct measurement of nitric oxide from cultured RAW 267.4 macrophages," **Red Biol.**, v. 8, p. 383–397, 2016.

HEGESH, E.; GRUENER, R.N.; COHEN, S.; BOCHKOVSKY, R.; SHUVAL, H.I. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. **Clin Chim Acta.**, v. 30, n. 3, p. 679-682, 1970.

HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U.; ANDREWS, N.C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **cell**, v. 117, n. 3, p. 285-297, 2004.

HERNANDEZ, C.; CETNER, A.S.; JORDAN, J.E.; PUANGSUVAN, S.N.; ROBINSON, J.K. Tuberculosis in the age of biologic therapy. **J Am Acad Dermatol.**, v. 59, n. 3, p. 363-380, 2008.

INFANGER, D.W.; SHARMA, R.V.; DAVISSON, R.L. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. **Antioxid Redox Signal.**, v. 8, n. 9-10, p. 1583–1596, 2006.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol.**, v. 5, n. 10, p. 987-995, 2004.

JI, C.; KOSMAN, D. J. Molecular mechanisms of non-transferrin-bound and transferrin-bound iron uptake in primary hippocampal neurons. **Journal of neurochemistry**, v. 133, n. 5, p. 668-683, 2015.

JO, Y.H.; KWON, W.Y.; LEE, J.H.; KIM, K.; SHIN, S.D.; KANG, Y.J.; SUH, G.J. The effect of ethyl pyruvate on dapsone-induced methemoglobinemia in rats. **Clin Toxicol.**, v. 46, n. 9, p. 811–814, 2008.

JYOTHI, P.; RIYAZ, N.; NANDAKUMAR, G.; BINITHA, M.P. A study of oxidative stress in paucibacillary and multibacillary leprosy. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.**, v. 74, n. 1, p. 80, 2008.

KANG, T.J.; CHAE, G.T. The Role of Intracellular Receptor NODs for Cytokine Production by Macrophages Infected with Mycobacterium leprae. **Immune Netw.**, v. 11, n. 6, p. 424-427, 2011.

KAR, H.K.; GUPTA, R. Treatment of leprosy. **Clin Dermatol.**, v. 33, n. 1, p. 55-65, 2015.

KEHRER, JP.; KLOTZ, L-O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical reviews in toxicology**, v. 45, n. 9, p. 765-798, 2015.

KOENIGS, M.; GRAFMAN, J. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. **Behav Brain Res.**, v. 201, n. 2, p. 239–243, 2009.

KHAN, F. D., ROYCHOWDHURY, S., NEMES, R., VYAS, P. M., WOSTER, P. M., & SVENSSON, C. K. Effect of pro-inflammatory cytokines on the toxicity of the

arylhydroxylamine metabolites of sulphamethoxazole and dapsone in normal human keratinocytes. **Toxicology**, v. 218, n. 2-3, p. 90-99, 2006.

KHONN, H.I.; LIVERSEDGE, M. On a New Aerobic Metabolite Whose Production by Brain Is Inhibited by Apomorphine, Methine, Ergotamine, Epinephrine and Menadione. **J Pharm Exp Therap.**, v. 83, n. 3, p. 292–300, 1944.

KOVACIC, P.; POZOS, R.S.; SOMANATHAN, R.; SHANGARI, N.; O'BRIEN, P.J. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. **Curr Med Chem.**, v. 12, n. 22, p. 2601–2623, 2005.

KRISHNAN, S.P.; KAMALANATHAN, A.; JOHN, J.; GOPALAKRISHNAN, S. A reminiscent review on leprosy. **Rev Med Microbiol.**, v. 26, n. 1, p. 8-13, 2015.

KRUSZEWSKI, M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. **Mutat Res.**, v. 531, n. 1, p. 81-92, 2003.

LACY, Paige. Eosinophil Cytokines in Allergy. **Cytokine Effector Functions in Tissues**. 2017. p. 173-218.

LE-BARILLEC, K.; MAGALHAES, J.G.; CORCUFF, E.; THUIZAT, A.; SANSONETTI, P.J.; PHALIPON, A.; DI SANTO, J.P. Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*. **J Immunol.**, v. 175, n. 3, p. 1735-1740, 2005.

LEHNINGER, A.L. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. São Paulo, 2014.

LEITNER, D.F.; CONNOR, J.R. Functional roles of transferrin in the brain. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1820, n. 3, p. 393-402, 2012.

LEONARD, S.S.; XIA, C.; JIANG, B.H.; STINEFELT, B.; KLANDORF, H.; HARRIS, G.K.; SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochem Biophys Commun.**, v. 309, n. 4, p. 1017-1026, 2003.

LEXIS, L.A.; FASSETT, R.G.; COOMBES, J.S. α -Tocopherol and α -Lipoic Acid Enhance the Erythrocyte Antioxidant Defence in Cyclosporine A-Treated Rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 98, n. 1, p. 68-73, 2006.

Li, B., Tan, G. J., Lin, H. Q., Zhang, J. N., Guo, L., & Chen, L. P. Neuroprotective effects of α -lipoic acid on long-term experimental autoimmune encephalomyelitis. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 22, n. 19, p. 6517-6528, 2018.

LI, W., LANGKAMMER, C., CHOU, Y.H., PETROVIC, K., SCHMIDT, R., SONG, A.W., MADDEN, D.J., ROPELE, S., LIU, C. Association between increased magnetic susceptibility of deep gray matter nuclei and decreased motor function in healthy adults. **Neuroimage**, v. 105, p. 45–52, 2015.

LI, Y.; PAN, K.; CHEN, L.; NING, J.L.; LI, X.; YANG, T.; TAO, G. Deferoxamine regulates neuroinflammation and iron homeostasis in a mouse model of

postoperative cognitive dysfunction. **J Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 268, 2016.

LI, Z., MA, L., KULESSKAYA, N., VÕIKAR, V., & TIAN, L. Microglia are polarized to M1 type in high-anxiety inbred mice in response to lipopolysaccharide challenge. **Brain, behavior, and immunity**, v. 38, p. 237-248, 2014.

LIANG, D.; LI, G.; LIAO, X.; YU, D.; WU, J.; ZHANG, M. Developmental loss of arvalbumin-positive cells in the pré-frontal cortex and psychiatric anxiety after intermittent hypoxia exposures in neonatal rats might be mediated by NADPH oxidase-2. **Behav Brain Res.**, v. 296, p. 134–140, 2016.

LIMA, E.S.; ROLAND, I.D.A.; MAROJA, M.D.F.; MARCON, J.L. Vitamin A and lipid peroxidation in patients with different forms of leprosy. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**, v. 49, n. 4, p. 211-214, 2007.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.**, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.

LISBOA, S.F.; GUIMARAÃES, F.S.; RESSTEL, L.B. Anxiety-behavior modulated by ventral medial prefrontal cortex of rats submitted to the Vogel conflict test involves a local NMDA receptor and nitric oxide. **J Behav Brain Sci.**, v. 1, p. 181–187, 2011.

LIU, L.; ZHOU, X.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; YANG, L.; PU, J.; ZHU, D.; ZHOU, C.; XIE, P. The identification of metabolic disturbances in the prefrontal cortex of the chronic restraint stress rat model of depression. **Behav Brain Res.**, v. 305, p. 148–156, 2016.

LUO, F.; ZHENG, J.; SUN, X.; TANG, H. Inward rectifier K⁺ channel and T-type Ca²⁺ channel contribute to enhancement of GABAergic transmission induced by β 1-adrenoceptor in the prefrontal cortex. **Exp Neurol.**, v. 288, p. 51–61, 2017.

LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its Classification. **Chem-Biol Interact.**, v. 224, p. 164–175, 2014.

MACHADO, L.P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M.S.; SILVEIRA, V.F.; YONEZAWA, L.A.; Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos de interesse na Medicina Veterinária. **Rev Ciênc Agrovet.**, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MADKE, B.; KUMAR, P.; KABRA, P.; SINGH, A.L. How to Manage a Side Effect: Dapsone-induced Methemoglobinemia. **Indian J Drugs Dermatol.**, v. 2, n. 2, p. 117-120, 2016.

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

MANSOURI, A.; LURIE, A.A. Concise review: methemoglobinemia. **Am J Hematol.**, v. 42, n. 1, p. 7–12, 1993.

MARANGON, K.; DEVARAJ, S.; TIROSH, O.; PACKER, L.; JIALAL, I. Comparison of the effect of α -lipoic acid and α -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. **Free Rad Biol Med.**, v. 27, v. 9, p. 1114-1121, 1999.

MARI, M.; MORALES, A.; COLELL, A.; GARCIA-RUIZ, C.; FERNANDEZ-CHECA, J.C. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. **Antioxid Redox Signal.**, v. 11, n. 11, p. 2685–2700, 2009.

MAK T.W; MARY E. Saunders. Cytokines and Cytokine Receptors.**The Immune Response**, 2006.

MAYNE, S.T. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. **J nutr.**, v. 133, n. 3, p. 933S-940S, 2003.

MCCORD, J.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem.**, v.244, n.2, p.6049-6055, 1969.

MCEWEN, B.S.; BOWLES, N.P.; GRAY, J.D.; HILL, M.N.; HUNTER, R.G.; KARATSOREOS, I.N.; NASCA, C. Mechanisms of stress in the brain. **Nat Neurosci.**, v. 18, n. 10, p. 1353–1363, 2015.

McLEISH, K.R.; URIARTE, S.M.; TANDON, S.; CREED, T.M; LE, J.; WARD, R.A. Exocytosis of neutrophil granule subsets and activation of prolyl isomerase 1 are required for respiratory burst priming. **J Innate Immun.**, v. 5, n. 3, p. 277-289, 2013.

MEHTA, A.; MASON, P. J.; VULLIAMY, T. J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Baillieres Clin Haematol.**, v. 13, n. 1, p. 1521–38, 2000.

MÉNDEZ-ARMENTA, M., NAVA-RUÍZ, C., JUÁREZ-REBOLLAR, D., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, E., & YESCAS GÓMEZ, P. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

MENG, F. X.; HOU, J.M.; SUN, T.S. Effect of oxidative stress induced by intracranial iron overload on central pain after spinal cord injury. **J Orthop Surg Res.**, v. 12, n. 1, p. 24, 2017.

MICLESCU, A.; WIKLUND, L. Methylene blue, an old drug with new indications. **Jurnalul Roman de Anestezie Terapie Intensiva**, v. 17, n. 1, p. 35-41, 2010.

MIGNINI, F., NASUTI, C., GIOVENTU, G., NAPOLIONI, V., & DI MARTINO, P. Human bioavailability and pharmacokinetic profile of different formulations delivering alpha lipoic acid. **J Bioequiv Bioavailab.**, v. 1, p. 1-6, 2012.

MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring

the antioxidant status in premature neonates. **Clin Sci.**, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993.

MILLS, E.; DONG, X.P.; WANG, F.; XU, H. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. **Fut Med Chem.**, v. 2, n. 1, p. 51-64, 2010.

MINHAS, G; MODGIL, S; ANAND, A. Role of iron in ischemia-induced neurodegeneration: mechanisms and insights. **Metabolic brain disease**, v. 29, n. 3, p. 583-591, 2014.

MOHOROVIC, L., LAVEZZI, A. M., STIFTER, S., PERRY, G., MALATESTINIC, D., MICOVIC, V., ... & PETROVIC, O. A biomarker and a link to ferric iron accumulation in Alzheimer's disease. **Advances in Bioscience and BiotechnologVol**, v. 5, p. 12-18, 2014.

MOINI, H.; PACKER, L.; SARIS, N. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 182, n. 1, p. 84-90, 2002.

MOOS, T.; BERNTH, N.; COURTOIS, Y.; MORGAN, E.H. Developmental iron uptake and axonal transport in the retina of the rat. **Mol Cell Neurosci.**, v. 46, n. 3, p. 607-613, 2011.

MOSCHELLA, S.L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **J Am Acad Dermatol.**, v. 51, n. 3, p. 417-426, 2004.

MURÍNOVÁ, J., HLAVÁČOVÁ, N., CHMELOVÁ, M., & RIEČANSKÝ, I. The evidence for altered BDNF expression in the brain of rats reared or housed in social isolation: a systematic review. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 11, p. 101, 2017.

NASCIMENTO, T.S.D.; PEREIRA, R.O.L.; MELLO, H.L.D.D.; COSTA, J. Methemoglobinemia: from Diagnosis to Treatment. **Rev Bras Anesthesiol.**, v. 58, n. 6, p. 651-664, 2008.

NIEDEBALA, W.; WEI, X.Q.; PIEDRAFITA, D.; XU, D.; LIEW, F.Y. Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. **Eur J Immunol.**, v. 29, n. 8, p. 2498-2505, 1999.

NOORDEEN S. History of chemotherapy of leprosy. **Clin Dermatol**; **34**: 32–36, 2016.

OHSHIMA, H.; CELAN, I.; CHAZOTTE, L.; PIGNATELLI, B.; MOWER, H.F. Analysis of 3-nitrotyrosine in biological fluids and protein hydrolyzates by high-performance liquid chromatography using a postseparation, on-line reduction column and electrochemical detection: results with various nitrating agents. **Nitric Oxide**, v. 3, n. 2, p. 132-141, 1999.

OLIVEIRA, R.B.; OCHOA, M.T.; SIELING, P.A.; REA, T.H.; RAMBUKKANA, A.; SARNO, E.N. MODLIN, R.L. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infect Immun.**, v. 71, n. 3, p.1427-1433, 2003.

ONG, W.Y.; FAROOQUI, A.A. Iron, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. **J ALZHEIMERS DIS.**, v. 8, n. 2, p. 183-200, 2005.

OU, P.; TRITSCHLER, H.J.; WOLFF, S.P. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant?. **Biochem Pharmacol.**, v. 50, n. 1, p. 123-126, 1995.

PACKER, L.; KRAEMER, K.; RIMBACH, G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 888-895, 2001.

PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Rad Biol Med.**, v. 19, n. 2, p. 227-250, 1995.

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

PATEL, P.N. Methylene blue for management of Ifosfamide-induced encephalopathy. **Ann Pharmacother.**, v. 40, n. 2, p. 299-303, 2006.

PEKNY, Milos et al. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. **International review of neurobiology**, v. 82, p. 95-111, 2007.

PERCARIO, S.; NAUFAL, A.S.; GENNARI, M.S.; GENNARI, J.L. Antioxidant Activity of Edible Blushing Wood Mushroom, *Agaricus sylvaticus* Schaeff. (*Agaricomycetidae*) In Vitro. **Int J Med Mushr.**, v. 11, n. 2, p. 133-139, 2009.

PERCÁRIO, S.; VITAL, A.; JABLONKA, F. Dosagem do malondialdeido. **NewsLab.**, v. 2, n 6, p. 46-50, 1994.

PERCY, M.J.; LAPPIN, T.R. Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b5 reductase deficiency. **Brit J Haematol.**, v. 141, n. 3, p. 298-308, 2008.

PEREZ, O.G.; CASTANEDA, R.E.G. Therapeutic perspectives on the combination of alpha-lipoic acid and vitamin E. **Nutr Res.**, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2006.

PERLUIGI, M.; COCCIA, R.; BUTTERFIELD, D.A. 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. **Antioxid Redox Signal.**, v. 17, n. 11, p. 1590-1609, 2012.

PETER, C.; HONGWAN, D.; KÜPFER, A.; LAUTERBURG, B.H. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. **Eur J Clin Pharmacol.**, v. 56, n. 3, p. 247-250, 2000.

PETERSON, J.D.; HERZENBERG, L.A.; VASQUEZ, K.; WALTENBAUGH, C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 95, n. 6, p. 3071-3076, 1998.

PILONI, N.E.; FERMANDEZ, V.; VIDELA, L.A.; PUNTARULO, S. Acute iron overload and oxidative stress in brain. **Toxicol.**, v. 314, n. 1, p. 174-182, 2013.

POLI, G.; SCHAUR, R.J.; SIEMS, W.A.; LEONARDUZZI, G. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. **Med Res Rev.**, v. 28, n. 4, p. 569-631, 2008.

POPE, S.; LAND, J.M.; HEALES, S.J.R. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target?. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1777, n. 7, p. 794–799, 2008.

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

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiol.**, v. 64, n. 1, p. 51–68, 2001.

PRCHAL, J.T.; GREGG, X.T. Red cell enzymes. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.**, v. 2005, n. 1, p. 19-23, 2005.

PRICE, J.L. Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and other cortical regions. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1121, n.1, p. 54–71, 2007.

PROUSEK, J. Fenton chemistry in biology and medicine. **Pure Appl Chem.**, v. 79, n. 12, p. 2325-2338, 2007.

PYLE S.J., REUHL K.R. Metal effects on glial fibrillary acidic protein. **Comprehensive Toxicology**, 2010.

QUEIROZ, R.H.C.; MELCHIOR, E.J.; SOUZA, A.M.; GOUVEIA, E.; BARBOSA, J.C.; CARVALHO, D. Haematological and biochemical alterations in leprosy patients already treated with dapsone and MDT. **Pharm Acta Helv.**, v. 72, n. 4, p. 209-213, 1997.

RADLEY JJ, ARIAS CM, SAWCHENKO P.E. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. **J Neurosci** 26:12967–12976, 2006.

RAHFILUDIN, M.Z.; PRAMONO, A.; SETIANI, O. Effect of Vitamin A, Zinc and Vitamin E Supplementation on Immune Response in Seropositive Leprosy Subjects. **Pak J Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 40-44, 2016.

RAMBUKKANA, A. Molecular basis of the interaction of Mycobacterium leprae with peripheral nerve: implications for therapeutic strategies. **Lepr Rev.**, v. 71, p. S168-S169, 2000.

RAMBUKKANA, A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. **Prog Neurobiol.**, v. 91, n. 2, p. 102–107, 2010.

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S.H. Immune responses to intracellular bacteria. **Curr Opin Immunol.**, v. 13, n. 4, p. 417-428, 2001.

RAWDIN, B., MELLON S., DHABHAR F., EPEL E., PUTERMAN E., SU Y. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. **Brain, behavior, and immunity**, v. 31, p. 143-152, 2013.

RAY, P.D.; HUANG, B.W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal.**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012.

RE, R.; PELLEGRINI, R.; PROTEGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol Med.**, v. 26, n. 9, p.1231-1237, 1999.

REDDY, M.K.; LABHASETWAR, V. Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia-reperfusion injury. **FASEB J.**, v. 23, n. 5, p. 1384–9135, 2009.

REDDY, Y.N.; MURTHY, S.V.; KRISHNA, D.R.; PRABHAKAR, M.C. Oxidative stress and antioxidant status in leprosy patients. **Ind J leprosy.**, v. 75, n. 4, p. 307-316, 2003.

REHMAN, H.U. Evidence-Based Case Review: Methemoglobinemia. **West J Med.**, v. 175, n. 3, p. 193-196, 2001.

RICH, J.D.; MIROCHNICK, M. Dapsone penetrates cerebrospinal fluid during *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 24, n. 2, p. 77-79, 1996.

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

RÖHL, Claudia; LUCIUS, Ralph; SIEVERS, Jobst. The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. **Brain research**, v. 1129, p. 43-52, 2007.

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

SALAMAT, A.; 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.

SALVEMINI, F.; FRANZE, A.; LERVOLINO, A. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. **J Biol Chem.**, v. 274, n. 5, p. 2750–2757, 1999.

SÁNCHEZ-SALDAÑA, L. Medicamentos antiguos y vigentes en dermatología. **Dermatol Perú.**, v. 18, n. 3, p. 229-26, 2008.

SARNO EN, GRAU GE, VIEIRA LMM, NERY J.A. Serum levels of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 during leprosy reactional states. **Clinical and experimental immunology** 84: 103-108, 1991.

SCHALCHER, T.R.; BORGES, R.S.; COLEMAN, M.D.; JUNIOR, J.B.; SALGADO, C.G.; VIEIRA, J.L.F.; ROMÃO, P.R.T.; OLIVEIRA, F.R.; MONTEIRO, M.C. Clinical

Oxidative Stress during Leprosy Multidrug Therapy: Impact of Dapsone Oxidation. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e85712, 2014.

SCHALCHER, T.R.; VIEIRA, J.L.F.; SALGADO, C.G.; BORGES, R.D.S.; MONTEIRO, M.C. Antioxidant factors, nitric oxide levels, and cellular damage in leprosy patients. **Rev Soc Bras Med Tropic.**, v. 46, n. 5, p. 645-649, 2013.

SCHIFF, D.E.; ROBERTS, W.D.; SUE, Y.J. 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.

SCHREUDER PAM, NOTO S, RICHARDUS JH. Epidemiological trends of leprosy for the 21st century. **Clin Dermatol**; 34: 24–31, 2016.

SCHURR, E.; ALCAIS, A.; SINGH, M.; MEHRA, N.; ABEL, L. Mycobacterial infections: PARK2 and PACRG associations in leprosy. **HLA.**, v. 69, n. s1, p. 231-233, 2007.

SCOLLARD, D.M. Infection with Mycobacterium lepromatosis. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 95, n. 3, p. 500-501, 2016.

SCOLLARD, D.M.; TRUMAN, R.W.; EBENEZER, G.J. Mechanisms of nerve injury in leprosy. **Clin Dermatol.**, v. 33, n. 1, p. 46–54, 2015.

SCOTT, B.C.; ARUOMA, O.I.; EVANS, P.J.; O'NEIL, C.; VAN DER VLIET, A.; CROSS, C.E.; TRITSCHLER, H.; HALLIWELL, B. Lipoic acid and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. **Free Radic Res.**, v. 20, n. 2, p. 119–133, 1994.

SELIVANOV, V.A.; VOTYAKOVA, T.V.; PIVTORAIKO, V.N.; ZEAK, J.; SUKHOMLIN, T.; TRUCCO, M. Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain. **PLoS Comput Biol.**, v. 7, n. 3, p. e1001115, 2011.

SENER, O.; DOGANCI, L.; SAFALI, M.; BESIRBELLIOGLU, B.; BULUCU, F.; PAHSA, A. Severe Dapsone hypersensitivity syndrome. **J Investig Allergol Clin Immunol.**, v. 16, n. 4, p. 268-270, 2006.

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

SMITH, C. S., AERTS, A., SAUNDERSON, P., KAWUMA, J., KITA, E., & VIRMOND, M. Multidrug therapy for leprosy: a game changer on the path to elimination. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. e293-e297, 2017.

SILLS, M.R.; ZINKHAM, W.H. Methylene blue-induced Heinz body hemolytic anemia. **Arch Pediatr Adolesc Med.**, v. 148, n. 3, p. 306-310, 1994.

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

SIES, H. Role of metabolic H₂O₂ generation Redox signaling and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 13, p. 8735-8741, 2014.

SINGH, I.; YADAV, A.R.; MOHANTY, K.K.; KATOCH, K.; SHARMA, P.; MISHRA, B.; BISHT, D.; GUPTA, U.D.; SENGUPTA, U. Molecular mimicry between Mycobacterium leprae proteins (50S ribosomal protein L2 and Lysyl-tRNA synthetase) and myelin basic protein: a possible mechanism of nerve damage in leprosy. **Microbes Infect.**, v. 17, n. 4, p. 247–257, 2015.

SKJORRINGE, T.; BURKHART, A.; JOHNSEN, K.B.; MOOS, T. Divalent metal transporter 1 (DMT1) in the brain: implications for a role in iron transport at the blood-brain barrier, and neuronal and glial pathology. **Front Mol Neurosci.**, v. 8, p. 19, 2015.

SMAERS, J.B.; GÓMEZ-ROBLES, A.; PARKS, A.N.; SHERWOOD, C.C. Exceptional Evolutionary Expansion of Prefrontal Cortex in Great Apes and Humans. **Curr Biol.**, v. 27, p. 714–720.

SORCE, S.; KRAUSE, K.H. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. **Ant Red Sig.**, v. 11, n. 10, p. 2481-504, 2009.

STEWART, V.C.; HEALES, S.J.R. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. **Free Rad Biol Med.**, v. 34, n. 3, p. 287–303, 2003.

SUH, J.H.; MOREAU, R.; HEATH, S.H.; HAGEN, T.M. Dietary supplementation with (R)-alpha-lipoic acid reverses the age-related accumulation of iron and depletion of antioxidants in the rat cerebral cortex. **Red Rep.**, v. 10, n. 1, p. 52-60, 2005.

SULIMAN, S., HEMMINGS, S. M., & SEEDAT, S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 7, p. 55, 2013.

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

SWATHI, M; TAGORE, R. Study of oxidative stress in different forms of leprosy. **Ind J Dermatol.**, v. 60, n. 3, p. 321, 2015.

TAVAZZI, B.; DI PIERRO, D.; AMORINI, A.M.; FAZZINA, G.; TOTTOBENE, M.; GIARDINA, B.; LAZZARINO, G. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. **FEBS J.**, v. 267, n. 3, p. 684-689, 2000.

TAY, T. L., SAVAGE, J. C., HUI, C. W., BISHT, K., & TREMBLAY, M. È. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. **The Journal of physiology**, v. 595, n. 6, p. 1929-1945, 2017.

TIMOTHY, P.B.; MCMILLAN, D.C.; ROSALIE, K.C.; JOLLOWS, J. Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsone hydroxylamine. **Free Radic Biol Med.**, v. 22, n. 7, p. 1183-93, 1997.

TODORICH, B., PASQUINI, J. M., GARCIA, C. I., PAEZ, P. M., CONNOR, J.R. Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. **Glia**, v. 57, n. 5, p. 467-478, 2009.

TOKER, I.; YESILARAS, M.; TUR, F.C.; TOKTAS, R. Methemoglobinemia caused by dapsone overdose: Which treatment is best?. **Turk J Emerg Med.**, v. 15, n. 4, p. 182-184, 2015.

TOLEDO JR, J.C.; AUGUSTO, O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. **Chem Res Toxicol.**, v. 25, n. 5, p. 975–989, 2012.

TRIMBAKE, S.B.; SONTAKKE, A.N.; DHAT, V.V. Oxidative stress and antioxidant vitamins in leprosy. **Int J Research Med Sci.**, v. 1, n. 3, p. 226-229, 2013.

UDEH, C.; BITTIKOFER, J.; SUM-PING, S.J. Severe methemoglobinemia on reexposure to benzocaine. **J Clin Anest.**, v. 13, n. 2, p. 128-130, 2001.

URRUTIA, P.; AGUIRRE, P.; ESPARZA, A.; TAPIA, V.; MENA, N.P.; ARREDONDO, M.; NÚÑEZ, M.T. Inflammation alters the expression of DMT1, FPN1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. **J Neurochem.**, v. 126, n. 4, p. 541-549, 2013.

URRUTIA, P.J.; MENA, N.P.; NÚÑEZ, M.T. The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. **Front Pharmacol.**, v. 5, 2014.

VALLANCE, A. K. (2007). A systematic review comparing the functional neuroanatomy of patients with depression who respond to placebo to those who recover spontaneously: is there a biological basis for the placebo effect in depression?. **Journal of affective disorders**, 98(1-2), 177-185.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

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

VAN BERGEN, J.; HUA, J.; UNSCHULD, P.; LIM, I.; JONES, C.; MARGOLIS, R.; ROSS, C.; VAN ZIJL, P.C.M.; LI, X. Quantitative susceptibility mapping suggests altered brain iron in premanifest Huntington disease. **Am J Neuroradiol.**, v. 37, n. 5, p. 789–796, 2016.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, V.M.M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

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

Verma A, Karunanand B, Sawhney MPS, Bansal SK, Yadav BK, Shah AK. Study of serum interleukin-4 in north Indian leprosy patients. **International Journal of Medical and Health Research** Volume 4; Issue 9; September 2018.

VIJAYARAGHAVAN, R.; SURIBABU, C.S.; OOMMEN, P.K.; PANNEERSELVAM, C. Vitamin E reduces reactive oxygen species mediated damage to biomolecules in leprosy during multidrug therapy. **Curr Trends Biotechnol Pharm.**, v. 3, p. 428-439, 2009.

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, n. 10, p. 1121-1128, 2005.

VUTSKITS, L; BRINER, A.; KLAUSER, P.; GASCON, E.; DAYER, A.G.; KISS, J.Z.; MOREL, D.R. Adverse effects of methylene blue on the central nervous system. **Anesthesiology**, v. 108, n. 4, p. 684-692, 2008.

VYAS, P.; ROYCHOWDHURY, S.; WOSTER, P.; SVENSSON, C. Reactive oxygen species generation and its role in the differential cytotoxicity of the arylhydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone in normal human epidermal keratinocytes. **Bio Pharmacol.**, v. 70, n. 2, p. 275-286, 2005.

WALKER, J.G.; KADIA, T.; BROWN, L.; JUNEJA, H.S.; GROOT, J.F. Dapsone induced methemoglobinemia in a patient with glioblastoma. **J Neurooncol.**, v. 94, p. 149–152, 2009.

WANG, Q., LV, C., SUN, Y., HAN, X., WANG, S., MAO, Z., ... & ZHANG, B. The Role of Alpha-Lipoic Acid in the Pathomechanism of Acute Ischemic Stroke. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 42-53, 2018.

WANG, H.; MAEDA, Y.; FUKUTOMI, Y.; MAKINO, M. An in vitro model of Mycobacterium leprae induced granuloma formation. **BMC Infect Dis.**, v. 13, n. 1, p. 279, 2013.

WARD, K.E.; MCCARTY, M.W. Dapsone-induced methemoglobinemia. **Ann Pharmacother.**, v. 32, n. 5, p. 549-553, 1998.

WARD, R.J.; DEXTER, D.T.; CRICHTON, R.R. Neurodegenerative diseases and therapeutic strategies using iron chelators. **J Trace Elem Med Biol.**, v. 31, p. 267-273, 2014.

WARD, R.J.; ZUCCA, F.A.; DUYN, J.H.; CRICHTON, R.R.; ZECCA, L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. **Lancet Neurol.**, v. 13, n. 10, p. 1045-1060, 2014.

WESSLING-RESNICK, Marianne. Iron homeostasis and the inflammatory response. **Annual review of nutrition**, v. 30, p. 105-122, 2010.

WHO. World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes, **World Health Organization Technical Report Series**, vol. 675, pp. 1–33, 1982.

WHO. World Health Organization. **Weekly Epidemiological Record**, v 92, n 35, 501-520, 2017.

WHO. World Health Organization. **Weekly epidemiological record**, v.84, n. 33, p. 333–340, 2009.

WHO. World Health Organization. **Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion**, Vol 91, No 35, pp 405–420, 2016.

WHO. World Health Organization. Study Group. Chemotherapy of leprosy for control programmes, 1982.

WHO. World Health Organization. Global leprosy situation. **Wkly Epidemiol Rec**; 77: 1–8, 2002.

WIDLUND, A.L.; BARAL, K.; DALGAARD, L.T.; VANG, O. Functional Mitochondria Are Important for the Effect of Resveratrol. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 847, 2017.

WINTER, H.R.; WANG, Y.; UNADKAT, J.D. CYP2C8/9 mediate dapsones N-hydroxylation at clinical concentrations of dapsones. **Drug Metab Dispos.**, v. 28, n. 8, p. 865-868, 2000.

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

WOLLIN, S.D.; JONES, P.J.H. Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. **J Nutr.**, v. 133, n. 11, p. 3327-3330, 2003.

WOZEL, G.; BLASUM, C. Dapsone in dermatology and beyond. **Arch Dermatol Res.**, v. 306, n. 2, p. 103-124, 2014.

WOZEL, V.E. Innovative use of dapsones. **Dermatol Clin.**, v. 28, n. 3, p. 599-610, 2010.

WU, L.J.C.; LEENDERS, A.M.; COOPERMAN, S.; MEYRON-HOLTZ, E.; SMITH, S.; LAND, W.; ROUAULT, T.A. Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood–brain barrier. **Brain research.**, v. 1001, n. 1, p. 108-117, 2004.

XIE, Y.; HOU, W.; SONG, X.; YU, Y.; HUANG, J.; SUN, X.; TANG, D. Ferroptosis: process and function. **Cell Death Diff.**, v. 23, n. 3, p. 369-379, 2016.

ZHAN, G.; SERRANO, F.; FENIK, P.; HSU, R.; KONG, L.; PRATICO, D.; et al., NADPH oxidase mediates hypersomnolence and brain oxidative injury in a murine model of sleep apnea. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 172, n. 5, p. 921–929, 2005.

ZHANG, D.; WEN, X.; WANG, X.; SHI, M.; ZHAO, Y. Antidepressant effect of Shudihuang on mice exposed to unpredictable chronic mild stress. **J Ethnopharmacol.**, v. 123, n. 1, p. 55–60, 2009.

ZHANG, X.Y.; CAO, J.B.; ZHANG, L.M.; LI, Y.F.; MI, W.D. Deferoxamine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment in mice. **J Neuroinflammation.**, v. 12, n. 1, p. 20, 2015.

ZHANG, Y.H.; WANG, D.W.; XU, S.F.; ZHANG, S.; FAN, Y.G.; YANG, Y.Y.; GUO, C. α -Lipoic acid improves abnormal behavior by mitigation of oxidative stress,

inflammation, ferroptosis, and tauopathy in P301S Tau transgenic mice. **Red Biol.**, v. 14, p. 535-548, 2018.

ZLATKOVIC, J.; FILIPOVIC, D. Chronic social isolation induces NF- κ B activation and upregulation of iNOS protein expression in rat prefrontal cortex. **Neurochem Int.**, v. 63, n. 3, p. 172–179, 2013.

ZLATKOVIĆ, J., TODOROVIĆ, N., BOŠKOVIĆ, M., PAJOVIĆ, S. B., DEMAJO, M., & FILIPOVIĆ, D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 393, n. 1-2, p. 43-57, 2014.

ZLATKOVIC, J.; FILIPOVIC, D. Bax and Bcl-2 mediate proapoptotic signaling following chronic isolation stress in rat brain. **Neuroscience.**, v. 223, p. 238–245, 2012.

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

9 ANEXOS

Anexo 1: Certificado da comissão de ética no uso de animais.



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

M^a Viviana B. Monteiro

Profa. Dra. Maria Viviana 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