



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

**EFEITO PROTETOR DE ANTIOXIDANTES NA
METEMOGLOBINA E NO DANO EM DNA INDUZIDOS PELA
DAPSONA-HIDROXILAMINA *in vitro***

Antonio Rafael Quadros Gomes

BELÉM-PA
2016



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

**EFEITO PROTETOR DE ANTIOXIDANTES NA
METEMOGLOBINA E NO DANO EM DNA INDUZIDOS PELA
DAPSONA-HIDROXILAMINA *in vitro***

Aluno: Antonio Rafael Quadros Gomes

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

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

BELÉM-PA
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Gomes, Antonio Rafael Quadros, 1987-

Efeito protetor de antioxidantes na metemoglobina e no dano em dna induzidos pela dapsona-hidroxilamina in vitro / Antonio Rafael Quadros Gomes. - 2016.

Orientadora: Marta Chagas Monteiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

1. Antioxidantes. 2. Metemoglobina. 3. Estresse oxidativo. 4. Dapsona. 5. Hidroxilamina. I. Título.

CDD 22. ed. 616.071

ANTONIO RAFAEL QUADROS GOMES

**EFEITO PROTETOR DE ANTIOXIDANTES NA
METEMOGLOBINA E NO DANO EM DNA INDUZIDOS PELA
DAPSONA-HIDROXILAMINA *in vitro***

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

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

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

Prof. Dr^a. Fernanda de Freitas Anibal, UFSCar

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira, PPGCF/UFPA

DEDICATÓRIA

In memoriam: Ao meu pai Antonio Gomes e à minha mãe Josefa Quadros

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai eterno por todas as bênçãos a mim concedidas e pela possibilidade de concretizar este sonho;

Em memória aos meus pais Antonio Gomes e Josefa Quadros, e a toda minha Família pela inestimável contribuição para a minha educação, personalidade e apoio incondicional na minha trajetória acadêmica;

À minha noiva Nathália Carvalho por ser minha companheira e amiga que sempre acredita em meu potencial e me dá forças em todos os momentos de minha vida. A você minha linda que com sua presença e carisma embeleza os meus dias;

A professora Dra. Marta Chagas Monteiro, por abrir as portas de seu laboratório e acreditar em meu potencial. Por ser fundamental e única na realização desta pesquisa, através de críticas e incentivos ao projeto e ao aluno, tornou-se para mim um exemplo de profissional e amiga a quem admirar;

Aos integrantes do LABEIM no apoio das práticas laboratoriais e pelas amizades construídas durante este trabalho, em especial a Carla Mendonça, Glauber Vilhena, Carol Azulay, Bruno Quadros, Everton Varela, João Paulo, Rafaelli Gomes e Kely Navegantes;

A Prof^a. Dr^a. Lilian Lund Amado do Laboratório de Toxicologia da UFPA, que gentilmente nos forneceu a técnica de detecção de EROS e permitiu as leituras em seu aparelho. Assim como sua aluna de doutorado Dani Ribeiro pela paciência, apoio e amizade durante os ensaios;

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

RESUMO

GOMES, A.R.Q. **Efeito protetor de antioxidantes na metemoglobina e no dano em DNA induzidos pela dapsona-hidroxilamina *in vitro***. 117 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

A dapsona (DDS) é um dos fármacos utilizados na poliquimioterapia da hanseníase, associado com a rifampicina e clofazimina. Destes fármacos, a DDS é a principal responsável por reações adversas, como a metemoglobinemia e anemia hemolítica. Estas reações estão relacionadas ao metabólito da DDS, a dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH). Na tentativa de promover a redução de efeitos hematotóxicos, são estudadas alternativas terapêuticas com os antioxidantes. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito protetor da N-acetilcisteína (NAC), *A. brasiliensis* e Glutaciona-etil-éster (GSH-EE) na metemoglobina (MetHb) e no dano em DNA induzidos pela DDS-NOH *in vitro*, correlacionando aos parâmetros do estresse oxidativo. Para isto, as suspenções de eritrócitos humanos a 50% foram pré e pós-tratadas com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE em diferentes concentrações, sendo os grupos expostos a DDS-NOH para induzir a formação de MetHb. Além disso, avaliou-se também a atividade das enzimas SOD e CAT, bem como os níveis de GSH, TEAC e MDA. Em leucócitos avaliou-se a indução de EROs no meio intracelular utilizando o DCFH-DA e o dano em DNA através do ensaio cometa. Os resultados mostraram que o metabólito DDS-NOH foi capaz de induzir MetHb *in vitro*, sendo este efeito dose-dependente. Em relação ao pré-tratamento, todos os antioxidantes preveniram a formação de MetHb induzida pela DDS-NOH, assim como no pós-tratamento. Em relação a SOD, apenas o pré-tratamento com NAC e *A. brasiliensis* reduziram a atividade de SOD. Já no pós-tratamento, houve aumento quando tratados com os antioxidantes. O pré-tratamento com NAC e GSH-EE aumentou a atividade de CAT, por outro lado o *A. brasiliensis* reduziu, assim como no pós-tratamento com os antioxidantes. Quanto aos níveis de GSH, o pré-tratamento com NAC e *A. brasiliensis* aumentaram GSH, por outro lado, não alteraram no pós-tratamento. Em relação ao TEAC, não houve alteração. Com relação aos danos oxidativos no pré-tratamento, o *A. brasiliensis* e a GSH-EE reduziram o MDA. Já no pós-tratamento, houve aumento no grupo *A. brasiliensis* e redução no grupo GSH-EE. Apenas a NAC mostrou ser eficiente na remoção de EROs do meio intracelular induzido por DDS-NOH em leucócitos. Enquanto que em eritrócitos, a NAC e o *A. brasiliensis* foram capazes de reduzir tal efeito. No estudo do ensaio cometa, a DDS-NOH foi capaz de induzir danos no DNA em leucócitos do sangue periférico, entretanto estes danos foram reduzidos quando tratadas com NAC e *A. brasiliensis*. Pode-se concluir com estes dados que os compostos antioxidantes avaliados apresentam potenciais terapêuticos na prevenção da MetHb e no dano em DNA induzido por DDS-NOH *in vitro*, sendo a NAC mais eficaz contra estes efeitos.

Palavras-Chave: Dapsona-Hidroxilamina; Metemoglobina; Estresse oxidativo; N-acetilcisteína; *Agaricus brasiliensis*; Glutaciona-etil-éster.

ABSTRACT

GOMES, A.R.Q. **Antioxidant protective effect in methemoglobin and DNA damage induced by dapsone-hydroxylamine *in vitro***. 117 f. Masters Dissertation, Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2016.

Dapsone (DDS) is one of the drugs used in polychemotherapy of leprosy associated with rifampicin and clofazimine. Of these drugs, DDS is primarily responsible for adverse reactions, such as methemoglobinemia and hemolytic anemia. These reactions are related to the DDS metabolite, dapsone hydroxylamine (DDS-NOH). In an attempt to promote the reduction of toxic effects are studied alternative therapies with antioxidants. This work aimed to evaluate the protective effect of N-acetylcysteine (NAC), *A. brasiliensis* and Glutathione ethyl ester (GSH-EE) in methemoglobin (MetHb) and DNA damage induced by DDS-NOH *in vitro*, correlating to oxidative stress parameters. For this, suspensions of human erythrocytes to 50% were pre- and post-treated with NAC, *A. brasiliensis* and GSH-EE in different concentrations, being exposed groups DDS-NOH to induce the formation MetHb. It also assessed whether the activity of enzymes-SOD and CAT and GSH levels, TEAC and MDA. In leukocytes evaluated the induction of ROS intracellularly using DCFH-DA and the damage to DNA by comet assay. The results showed that the DDS-NOH metabolite was capable of inducing MetHb *in vitro*, this dose-dependent effect. Regarding the pre-treatment, all the antioxidants prevented MetHb formation induced by DDS-NOH, as well as post-treatment. For SOD, only the pre-treatment with NAC and *A. brasiliensis* reduced SOD activity. In the post-treatment, there was increased when treated with antioxidants. Pre-treatment with NAC and GSH-EE increased CAT activity, moreover *A. brasiliensis* reduced, as after treatment with antioxidants. As for GSH levels, pre-treatment with NAC and GSH increased *A. brasiliensis*, on the other hand, did not alter after treatment. Regarding TEAC did not change. With respect to oxidative damage in the pre-treatment *A. brasiliensis* and GSH-EE reduced MDA. In the post-treatment, there was an increase in group *A. brasiliensis* and reduced GSH-EE group. Only the NAC was shown to be effective in removing the intracellular ROS induced by DDS-NOH in leukocytes. While in erythrocytes, a NAC and *A. brasiliensis* were able to reduce this effect. In the study of the comet assay, the DDS-NOH was able to induce DNA damage in peripheral blood leukocytes, however this damage was reduced when treated with NAC and *A. brasiliensis*. It can be concluded from our data that the evaluated antioxidants have therapeutic potential in the prevention of MetHb and DNA damage induced by DDS-NOH *in vitro*, more effective NAC against these effects.

KeyWords: Dapsone-Hydroxylamine; Methemoglobin; Oxidative stress; N-acetylcysteine; *Agaricus brasiliensis*; Glutathione-ethyl-ester.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fórmula estrutural da Dapsona, esse fármaco possui grupo sulfonil (SO ₂) e grupo arilamina (AR-NH ₂). Fonte: Monteiro et al, 2012	18
Figura 2:	Mecanismo de ação da Dapsona no interior de microrganismos. Fonte: Adaptado de FARHI et al, 2005.	19
Figura 3:	Proposta de mecanismos de bioativação e detoxificação de dapsona.	20
Figura 4:	Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR). Fonte: Rover Júnior et al, 2001.	23
Figura 5:	A Hb consiste em um grupo prostético, heme, e o protéico, representado pelas cadeias de globina α e β . Fonte: Mader (1997).	25
Figura 6:	Representações da estrutura tetrapirrólica do grupo prostético heme, ligando-se aos quatro anéis pirrólicos e a moléculas de oxigênio. Fonte: Peñuela (2005)	26
Figura 7:	Transferência de cargas entre Fe ²⁺ e moléculas de O ₂ observados no processo de ligação oxidação de grupo heme. Fonte: Shikama (1998).	26
Figura 8:	A via de <i>Embden-Meyerhof</i> e das pentoses-fosfato, responsáveis pela produção de NADH e NADPH, respectivamente. Fonte: Percy e Lappin (2008).	27
Figura 9:	Estrutura da membrana eritrocitária. Fonte: (PARK, 2010).	28
Figura 10:	Suprimentos de energia no eritrócito. Fonte: Red Cell Biology (2011)	30
Figura 11:	Mecanismo de proteção do sistema antioxidante dos eritrócitos a partir da produção de espécies reativas de oxigênio e produção de metemoglobina. Fonte: HARRIS (1991)	32
Figura 12:	As prováveis vias de redução da metemoglobina, sendo que a principal via fisiológica é a do citocromo b5 redutase. Fonte: Walker et al, (2009).	37
Figura 13:	Corpo de frutificação de <i>Agaricus brasiliensis</i> . Fonte: Soares et al, (2009).	39
Figura 14:	Localização da β -glucana na parede celular de cogumelos. Fonte: Adaptada de PARK et al, (2003).	41
Figura 15:	Representação estrutural da N-acetilcisteína. Fonte: Mello (2006).	43
Figura 16:	Interação medicamentosa entre NAC e DDS. Fonte: Moraes et al, 2008.	45
Figura 17:	Lavagem e suspensão de eritrócitos.	47
Figura 18:	Incubação de eritrócitos com DDS-NOH.	48
Figura 19:	Pré-tratamento de eritrócitos com antioxidantes.	49
Figura 20:	Pós-tratamento de eritrócitos com antioxidantes.	50
Figura 21:	Curva temporal de pré-tratamento de eritrócitos com antioxidantes.	51
Figura 22:	Curva temporal de pós-tratamento de eritrócitos com antioxidantes.	52
Figura 23:	Esquema da técnica de metemoglobina, descrita por Evelyn e Malloy (1938). Fonte: Hegesh et al. (1970).	53
Figura 24:	Níveis de classificação de células preparadas em ensaio cometa. Fonte: COLLINS et al, 1995	59

Figura 25:	Percentual de MetHb em suspensão de eritrócitos normais expostos ao DDS-NOH, nas concentrações 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µg/mL, <i>in vitro</i> .	60
Figura 26:	Percentual de MetHb induzida por DDS-NOH (2,5 µg/mL) em suspensão de eritrócitos normais que foram pré e pós-tratados com NAC (0,1; 0,4; 0,9; 1,6; 4,8; 9,7; 16; 48; 163 µg/mL) por 60 min a 37°C <i>in vitro</i> .	61
Figura 27:	Percentual de MetHb induzida por DDS-NOH (2,5 µg/mL) em suspensão de eritrócitos normais que foram pré e pós-tratados com <i>A. brasiliensis</i> (2,2; 6,7; 22,5 µg/ml) por 60 min a 37°C <i>in vitro</i> .	62
Figura 28:	Percentual de MetHb induzida por DDS-NOH (2,5 µg/mL) em suspensão de eritrócitos normais que foram pré e pós-tratados com GSH-EE (0,1; 0,3; 0,8; 1,6; 3,3 mg/ml) por 60 min a 37°C <i>in vitro</i> .	63
Figura 29:	Percentual de MetHb induzida por DDS-NOH (2,5 µg/mL) em suspensão de eritrócitos normais que foram pré-tratados com NAC (1,6 µg/mL), <i>A. brasiliensis</i> (6,7 µg/ml) e GSH-EE (0,8 mg/ml) por diferentes tempos (60 30, 60, 90 e 120 min).	64
Figura 30:	Percentual de MetHb induzida por DDS-NOH (2,5 µg/mL) em suspensão de eritrócitos normais que foram pós-tratados com NAC (1,6 µg/mL), <i>A. brasiliensis</i> (6,7 µg/ml) e GSH-EE (0,8 mg/ml) por diferentes tempos (60 30, 60, 90 e 120 min).	66
Figura 31:	Comparação das médias do % MetHb obtidas em suspensão de eritrócitos normais pré e pós-tratamentos com AM (15ng/mL), NAC (1,6 µg/mL) e <i>A. brasiliensis</i> (6,7 µg/ml) <i>in vitro</i> .	67
Figura 32:	O efeito do DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre a atividade da SOD em suspensão de eritrócitos pré e pós-tratados com NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE.	69
Figura 33:	O efeito do DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre a atividade da CAT em suspensão de eritrócitos pré e pós-tratados com NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE.	71
Figura 34:	O efeito do DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre a GSH em suspensão de eritrócitos pré e pós-tratados com NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE.	73
Figura 35:	Efeito do DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre o TEAC em suspensão de eritrócitos pré e pós-tratados com NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE.	75
Figura 36:	Efeito do DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre o MDA em suspensão de eritrócitos pré e pós-tratados com NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE.	77
Figura 37:	O efeito do DDS-NOH (2,5 µg/ml) e do potencial antioxidante da NAC e <i>A. brasiliensis</i> na produção de EROs em suspensão de eritrócitos (Hematócrito a 5%).	79
Figura 38:	O efeito do DDS-NOH (2,5 µg/ml) e do potencial antioxidante da NAC e <i>A. brasiliensis</i> na produção de EROs em leucócitos.	81
Figura 39:	Efeito do dano em DNA exposto ao DDS-NOH (2,5 µg/mL) e do potencial antioxidante da NAC em linfócitos do sangue periférico <i>in vitro</i> , através do ensaio cometa. O grupo controle positivo foi T-BHP (200µM).	82
Figura 40:	Efeito do dano em DNA exposto ao DDS-NOH (2,5 µg/mL) e do potencial antioxidante do <i>A. brasiliensis</i> em linfócitos do sangue periférico <i>in vitro</i> , através do ensaio cometa.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS⁺- 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
ADHL- ácido diidrolipóico
ALA- Ácido α -lipóico
AM- Azul de metileno
Ar-N=O - arilnitrosos
ATP- trifosfato de adenosina
CAT- enzima catalase
CFZ- Clofazimina
CO₂- Gás carbônico
CYP2C9- Citocromo P450 2C9
Ca²⁺- íon de cálcio
°C- graus Celsius
DCF- diclorofluoresceína
DCFH- 2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DDS- Dapsona
DDS-NO- Dapsona nitrosobenzeno
DDS-NOH- Dapsona-hidroxilamina
DPPH-1,1-difenil-2-picrilidrazila
DTNB- ácido 5,5'- ditio-bis (2-nitrobenzóico)
2,3-DPG- 2,3 Difosfoglicerato
Fe²⁺- íons ferroso
Fe³⁺- íons férrico
GPx- glutationa peroxidase
GR- Glutationa redutase
GSH- Glutationa reduzida
GSH-EE- Glutationa reduzida etil-ester
GSSG- Glutationa oxidada
G6P- 6-fosfogluconolactona
G6PD-glicose 6-fosfato desidrogenase
h-hora
Hb- hemoglobina
HClO- ácido hipocloroso
NHOH- grupo funcional hidroxilamina
H₂O- água
H₂O₂- Peróxido de hidrogênio
K⁺- íon potássio
MADDS-OH- Monoacetil dapsona-hidroxilamina
MB-Multibacilar
MDA: Malondialdeído
(=CH-) - meteno

MetHb- metemoglobina
mg- miligrama
mM- milimolar
NAC- N-acetilcisteína
NaCl- cloreto de sódio
NADH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida do NAD⁺)
NADP- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Forma reduzida NADP)
ng/mL- nanograma por mililitro
NO- óxido nítrico
nm- nanômetro
Na⁺- íon de sódio
•OH- radical hidroxila
O₂- Oxigênio molecular
O₂^{•-} - ânion radical superóxido
PABA- ácido Para-aminobenzóico
PB- Paucibacilar
PBS- Tampão fosfato salina
pH- potencial hidrogeniônico
PQT- Poliquimioterapia
R- estado conformacional da hemoglobina com elevada afinidade pelo oxigênio
RAM- Reação adversa ao medicamento
RMP- Rifampicina
ROS- Espécies reativas de oxigênio
rpm- rotações por minuto
RSV- Resveratrol
SOD- enzima superóxido dismutase
SH- grupo sulfidril
T- estado conformacional da hemoglobina com baixa afinidade pelo oxigênio
TCLE- termo de consentimento livre esclarecido
TNB- ácido nitrobenzóico
TEAC- capacidade antioxidante em equivalência ao trolox
U/mg- unidade por miligrama
UI/mL- Unidades internacionais por mililitro
μM- micromol
μL- microlitro
μg/mL- micrograma por mililitro
σ- sigma
Π- pi
λ- comprimento de onda
%MetHb- percentual de metemoglobina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Dapsona e Dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH)	18
3.2 Eritrócitos humanos	23
3.2.1 MEMBRANA ERITROCITÁRIA	23
3.2.2 HEMOGLOBINA (HB) E METEMOGLOBINA (METHB)	25
3.2.3 METABOLISMO ERITROCITÁRIO	29
3.2.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE DO ERITRÓCITO	31
3.2.5 IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS <i>IN VITRO</i> COM ERITRÓCITOS	33
3.3 Dano oxidativo ao DNA de leucócitos	33
3.4 Terapêutica usual para tratamento de MetHb	35
3.4.1 AZUL DE METILENO	35
3.5 Terapia alternativa com antioxidantes para tratamento de MetHb	37
3.5.1 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO <i>Agaricus brasiliensis</i>	38
3.5.2 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA N-ACETILCISTEÍNA	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Amostra biológica	46
4.2 Coleta de amostras sanguíneas	46
4.3 Lavagem e suspensão de eritrocitos	46
4.4. Fornecimento e Preparação do <i>Agaricus brasiliensis</i>	47
4.5 Tratamento dos eritrócitos	47
4.5.1 INCUBAÇÃO DE ERITRÓCITOS COM DDS-NOH	47
4.5.2 CURVA DOSE RESPOSTA COM ANTIOXIDANTES	48
4.5.3 CURVA TEMPORAL COM ANTIOXIDANTES	50
4.5.4 PRÉ E PÓS-TRATAMENTO COM AZUL DE METILENO E DDS-NOH	52
4.6 Determinação do percentual de metemoglobina	52
4.7 Determinação da atividade da superóxido dismutase	54
4.8 Determinação da atividade da catalase	54
4.9 Determinação dos níveis de glutatona reduzida	55

4.10 Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TEAC).....	55
4.11 Dosagem de Malondialdeído (MDA).....	56
4.12 Avaliação da produção de espécies reativas (EROs) em leucócitos e eritrócitos por ensaio com DCFH	56
4.13- Avaliação do dano em DNA de leucócitos expostos a DDS-NOH e do potencial antioxidante da NAC e <i>A. brasiliensis</i>	57
4.13.1- AMOSTRA SANGUÍNEA.....	57
4.13.2- INCUBAÇÃO DA AMOSTRA SANGUÍNEA EM MEIO DE CULTURA	57
4.13.3- TRATAMENTO E NOVA INCUBAÇÃO DA AMOSTRA	57
4.13.4- DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO COMETA.....	58
4.14- Análise estatística	59
5 RESULTADOS	60
5.1 Curva dose-resposta do DDS-NOH em eritrócitos <i>in vitro</i>	60
5.2 Efeito do Pré e Pós-tratamento da NAC na formação de MetHb induzida pelo DDS-NOH em eritrócitos <i>in vitro</i>	61
5.3 Efeito do Pré e Pós-tratamento do <i>A. brasiliensis</i> na formação de MetHb induzida pelo DDS-NOH em eritrócitos <i>in vitro</i>	62
5.4 Efeito do Pré e Pós-tratamento da GSH-EE na formação de MetHb induzida pelo DDS-NOH em eritrócitos <i>in vitro</i>	63
5.5 Avaliação temporal do pré-tratamento de NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos <i>in vitro</i>	64
5.6 Avaliação temporal do pós-tratamento da NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos <i>in vitro</i>	65
5.7 Comparações entre os efeitos do pré e pós-tratamento anti-metemoglobinizante do AM, NAC e <i>A. brasiliensis</i> em eritrócitos <i>in vitro</i>	67
5.8 Efeito do pré e pós-tratamento com NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE na atividade da SOD em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) <i>in vitro</i>	68
5.9 Efeito do pré e pós-tratamento com NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE na atividade da CAT em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) <i>in vitro</i>	70
5.10 Efeito do pré e pós-tratamento com NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE nos níveis de GSH em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) <i>in vitro</i>	72
5.11 Efeito do pré e pós-tratamento com NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE na avaliação de TEAC em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) <i>in vitro</i>	74
5.12 Efeito do pré e pós-tratados com NAC, <i>A. brasiliensis</i> e GSH-EE nos níveis de MDA em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) <i>in vitro</i>	76
5.13 Efeito do pré-tratamento com NAC e <i>A. brasiliensis</i> na detecção de EROs intracelulares em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) <i>in vitro</i>	78

5.14 Detecção de EROs intracelulares em leucócitos pré-tratados com NAC e <i>A. brasiliensis</i> incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) <i>in vitro</i>	80
5.15 Avaliação do dano em DNA exposto ao DDS-NOH e do potencial antioxidante da NAC <i>in vitro</i> , através do ensaio cometa	82
5.16 Avaliação do dano em DNA exposto ao DDS-NOH e do potencial antioxidante do <i>A. brasiliensis in vitro</i> , através do ensaio cometa	83
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

A dapsona (4,4'-diaminodifenil-sulfona) ou DDS é um dos fármacos utilizados na poliquimioterapia (PQT) da hanseníase, associado com a Rifampicina (RMP) e Clofazimina (CFZ) (BRASIL, 2010). Dentre estes fármacos, a DDS é a principal responsável por reações adversas (RAM), como a metemoglobinemia e anemia hemolítica (COLEMAN e TINGLE, 1992). Estas RAM's estão diretamente relacionadas a presença do grupo funcional hidroxilamina (NHOH) na molécula do metabólito da DDS, a dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH) (VYAS et al. 2005).

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 metemoglobina (MetHb) e espécies reativas de oxigênio (EROs), respectivamente (BRADSHAW et al. 1997). Além disso, a capacidade da DDS-NOH de formar MetHb é dose-dependente (REILLY et al. 1998; REILLY et al. 1999).

Na tentativa de promover a redução de efeitos hematotóxicos, alternativas terapêuticas com característica antioxidante vem sendo estudada com o intuito de proteger, principalmente pacientes com hanseníase em uso da PQT, tais como ácido ascórbico, a curcumina, o resveratrol (RSV), o ácido α -lipóico (ALA) e sua forma reduzida, o ácido dihidrolipóico (DHLA) (COLEMAN et al. 2000; 2003; MELLO, 2005; LIMA et al. 2007; BORAN et al. 2008; EL-HUSSEINI e AZAROV, 2010, ALBUQUERQUE et al. 2015). Desta forma, é de grande interesse investigar outros compostos com elevada atividade antioxidante, tais como N-acetilcisteína (NAC), substância exógena indutora de síntese do antioxidante glutationa (DEKHUIJZEN, 2004) e o cogumelo *Agaricus brasiliensis*, identificado com ação antioxidante e imunomoduladora (DALLA SANTA et al. 2010). Nesse sentido, o uso destas substâncias antioxidantes poderia prevenir ou reverter a MetHb induzida por DDS-NOH, restabelecendo o equilíbrio redox e melhorando a adesão dos pacientes com hanseníase durante a PQT.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos antioxidantes, N-acetilcisteína, *Agaricus brasiliensis* e Glutathiona-etil-éster na metemoglobina e no dano em DNA induzidos pela DDS-NOH *in vitro*, correlacionando aos parâmetros do estresse oxidativo.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da NAC, do extrato micelar do *A. brasiliensis* e da Glutathiona-etil-éster na metemoglobina induzida pelo metabólito DDS-NOH em eritrócitos *in vitro*;
- Avaliar o efeito da NAC e do extrato micelar do *A. brasiliensis* no dano em DNA induzido pelo metabólito DDS-NOH em leucócitos *in vitro*;
- Estimar a geração de espécies reativas de oxigênio em eritrócitos e leucócitos expostos ao metabólito DDS-NOH na presença ou não dos antioxidantes, medida pela oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH);
- Mensurar os níveis de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT nos eritrócitos expostos DDS-NOH na presença ou não de NAC, *A. brasiliensis* e Glutathiona-etil-éster *in vitro*;
- Determinar a capacidade antioxidante total pelo método de TEAC, e os níveis de MDA (Malondialdeído) nos eritrócitos expostos ao DDS-NOH na presença ou não de NAC, *A. brasiliensis* e Glutathiona-etil-éster *in vitro*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Dapsona e Dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH)

A 4,4'-diaminodifenil-sulfona ou DDS é um pó cristalino branco, inodoro, pouco solúvel em água, fotossensível e de fórmula molecular $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ (Figura 1) (GRUNWALD e AMICHAÏ, 1996; GOULART et al. 2002). A DDS é utilizada no tratamento de Hanseníase, devido sua ação bacteriostática para o *Mycobacterium leprae* (DHOPLE, 1999). Além disso, possui ação anti-inflamatória e antiprotozoário (FORD, 2000; PANIKER e LEVINE, 2001), sendo utilizada em doenças como dermatite herpetiforme, psoríase pustulosa (THUONG-NGUYEN et al. 1993) e infecções causadas por *Pneumocystis carinii*, *T.gondii* e *Plasmodium falciparum* (AMUKOYE et al.1997; EL -SADR et al. 1998; ZHU e STILLER, 2001).

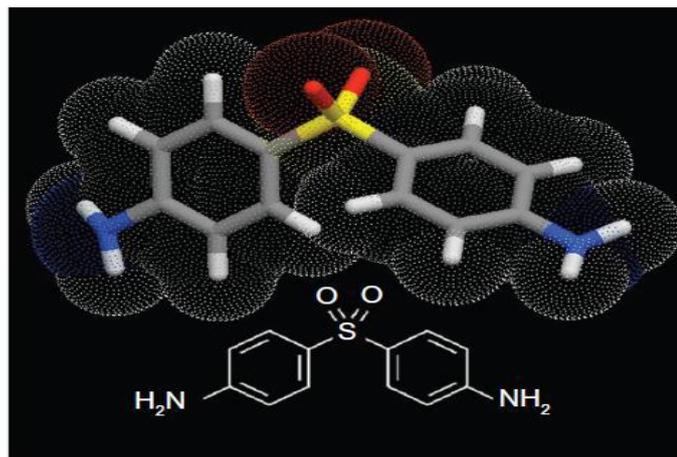


Figura 1: Fórmula estrutural da Dapsona, esse fármaco possui grupo sulfonil (SO_2) e grupo arilamina ($AR-NH_2$). Fonte: Monteiro et al. 2012

O mecanismo de ação do DDS contra bactérias e protozoários é devido a sua interação com o sítio ativo da enzima dihidropteroato sintetase (Figura 2), que acarreta a inibição da síntese de ácido fólico, um evento essencial para síntese de purinas e consequente formação de RNA e DNA por estes micro-organismos (WOLVERTON, 1992; COLEMAN e JACOBUS, 1993; FARHI et al. 2005).

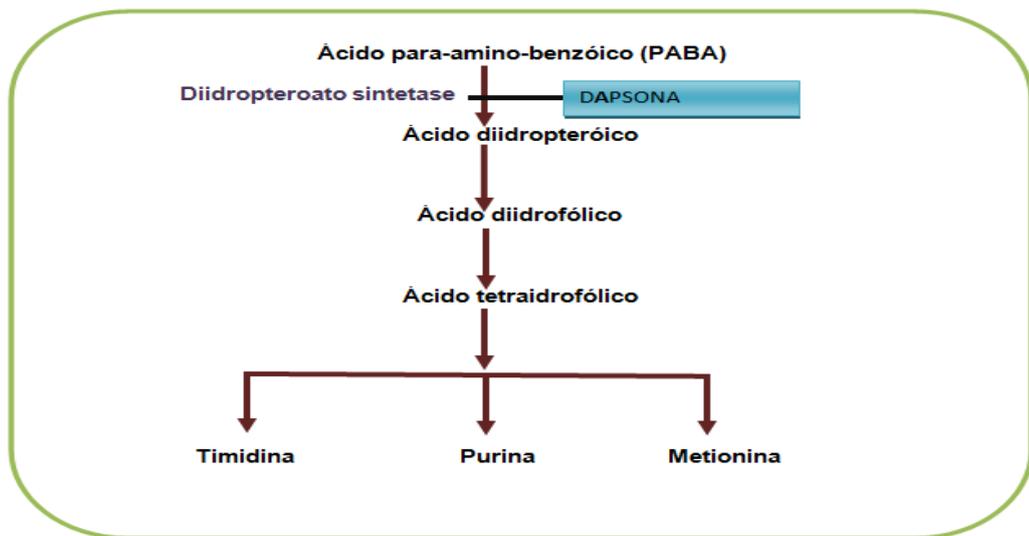


Figura 2- Mecanismo de ação da Dapsona no interior de microrganismos. Fonte: Adaptado de Farhi et al. 2005.

A DDS tem absorção quase completa pelo trato gastrointestinal entre 80 a 85% e difunde-se por todos os tecidos, concentrando-se preferencialmente na pele, músculos, fígado e rins (REIS NETO et al. 2006; BRAGHETTO, 2007; WOZEL e BLAZUM, 2014), permanecendo nesses órgãos até 3 semanas após a interrupção do tratamento. Cerca de 70% deste fármaco se liga às proteínas plasmáticas, com concentração plasmática variando entre 0,4 a 1,2 mg/L, após 24 h da ingestão de 100 mg da droga (ZUIDEMA et al. 1986; MELLO, 2005). 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).

O processo de biotransformação da DDS ocorre no fígado, tendo como principal via a N-acetilação realizada pela enzima N-acetil-transferase e N-hidroxilação através da via citocromo P450, pelas isoformas CYP2C9, CYP3A, CYP2E1 e CYP2C19 (Figura 3) (GILL et al. 1995; SCHALCHER et al. 2014). A N-hidroxilação é responsável pela produção de metabólitos hidroxilados, como a DDS-NOH e Monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH), considerados responsáveis pelas alterações hematológicas, como hemólise e MetHb, causados pelo uso deste fármaco (VAGE et al. 1994; SCHIFF et al. 2006; BRAGUETTO, 2007).

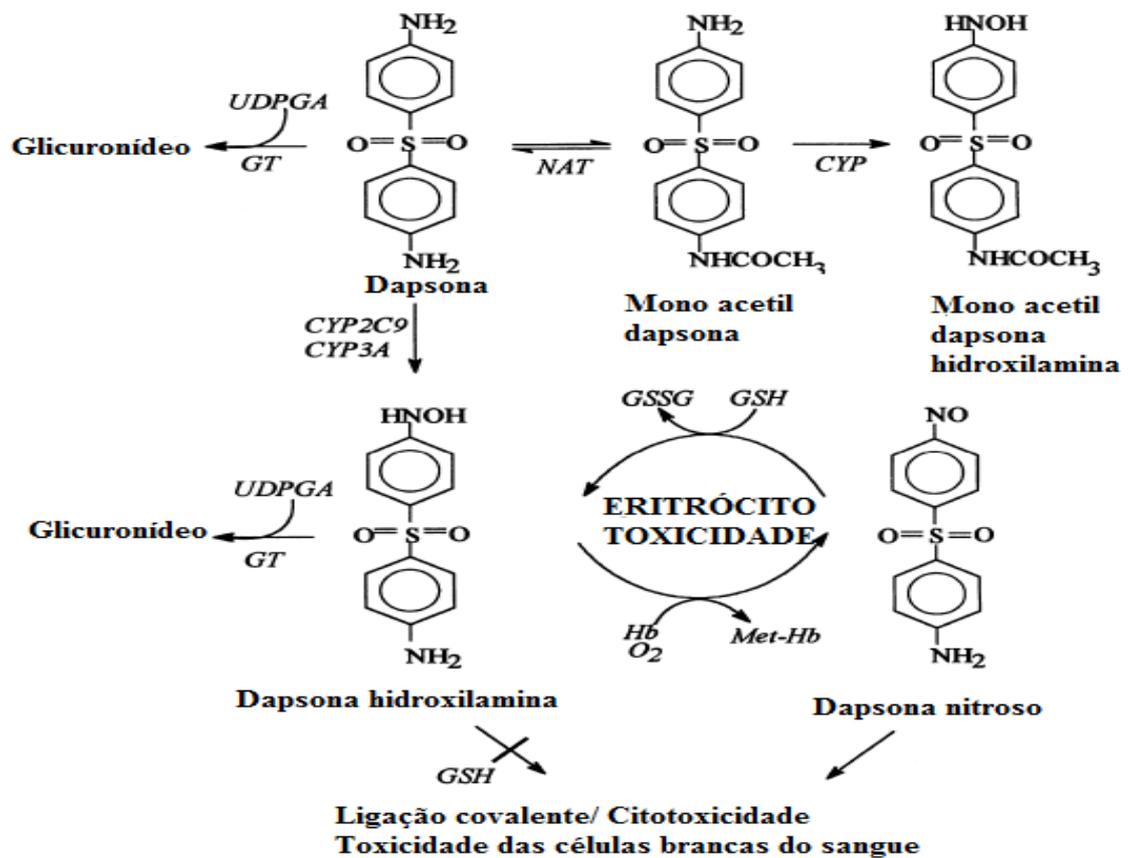


Figura 3- Proposta de mecanismos de bioativação e detoxificação de dapsona. CYP:Citocromo P-450; Hb:hemoglobina; GSH: glutationa reduzida; GSSG: glutationa oxidadas; NAT: N-acetil-transferase; GT: glucuronil-transferase; UDPGA: ácido uridina difosfato glucurônico; Met-Hb: Metemoglobina; O₂ :oxigênio. Fonte: Adaptado de GILL et al.1995.

Conforme demonstrado por 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 EROs, respectivamente. Além disso, acredita-se que as EROs estejam envolvidas nos processos que levam a anemia hemolítica. Estudos de Bordin et al. (2010) indicam que a DDS-NOH induz alterações progressivas nos eritrócitos, iniciando pelo domínio citosólico das proteínas de membrana dos eritrócitos, a banda 3, que leva a formação de MetHb e o comprometimento da atividade da proteína tirosina quinase e das fosfatases, com formação de agregados da banda 3 na membrana eritrocitária.

Estudo em animais realizado por Ciccoli et al. (1999), verificou eventos tóxicos mediados pela DDS em eritrócitos de camundongos, nos quais as células tratadas com DDS-NOH apresentaram aumento significativo na formação de MetHb,

bem como depleção dos níveis de GSH se comparado ao controle. Tal fato sugere que a presença deste metabólito hidroxilado foi essencial para ocorrência de efeitos hematotóxicos.

Estudos realizados em humanos relacionaram o efeito da DDS-NOH aos distúrbios hematológicos e produção de EROs, como os relatados por Timothy et al. (1997) que avaliaram estes efeitos induzidos pelos metabólitos hidroxilados da DDS e do sulfametoxazol. Nesse estudo, os autores mostraram que tanto a DDS-NOH como a sulfametoxazol hidroxilamina induziram a formação de MetHb, sendo que a DDS-NOH mostrou maior efeito metahemoglobinizante quando comparado ao sulfametoxazol. Além disso, os metabólitos, DDS-NOH e MADDS-NOH foram capazes de elevar a concentração intracelular de EROS, relacionadas com os efeitos tóxicos da DDS.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa mostrou elevados níveis de MetHb e de corpos de Heinz em pacientes em uso da terceira dose supervisionada da PQT (SCHALCHER et al. 2014). Assim como, Pessoa (2014) também demonstrou que o percentual de MetHb aumenta gradativamente nos pacientes hansenianos, conforme os meses de tratamento com PQT. Estes dados evidenciam que os metabólitos da DDS são os principais responsáveis pelos efeitos hematotoxicos durante o tratamento.

Recentemente, outro estudo de nosso grupo comprovou que a DDS-NOH, é o metabólito que induziu efeito metahemoglobinizante (19 a 40 % de MetHb) de maneira dose-dependente em eritrócitos de indivíduos saudáveis *in vitro* (Albuquerque et al. 2015). Além disso, a DDS-NOH induziu aumento da produção intracelular de EROS que foi revertido por antioxidantes, como o resveratrol. Fato este que também foi observado no estudo de Malcher (2012).

Com isso, a toxicidade da DDS pode ser categorizada tanto como dose dependente ou de reação idiossincrática. Os efeitos dose dependentes incluem as reações hematológicas, como metemoglobinemia e hemólise. A administração de DDS na dose de 100 mg/dia em pacientes saudáveis pode resultar em significativa metemoglobinemia, que na realidade não é causada exatamente pela DDS, mas pelos seus metabólitos hidroxilaminas formados na biotransformação da DDS (HALIM e OGBEIDE, 2002).

A anemia hemolítica e a metemoglobinemia, pelo uso da DDS, estão associadas a uma desnaturação oxidativa na membrana dos eritrócitos, que

aumenta sua rigidez, favorecendo a recaptação esplênica e acelerando os processos de hemólise celular (COLLEMAN, 1993). Relatou-se ainda, que a quebra de hidroperóxidos lipídicos pode levar à formação de aldeídos, incluindo malonildialdeído (MDA), que é capaz de se ligar aos aminofosfolípidos e proteínas, formando agregados de alto peso molecular (COLLEMAN, 1995). Estes agregados, muitas vezes são observados nas membranas dos eritrócitos, principalmente em indivíduos deficientes em glicose-6-fosfatodesidrogenase (G6PD) (COLLEMAN, 1995).

Em estudo realizado por Grossman et al. (1995), a anemia hemolítica induzida pela DDS-NOH foi correlacionada com a inibição da G6PD em eritrócitos humanos *in vitro*. Sendo que a DDS-NOH foi capaz de diminuir o tempo de meia-vida dos eritrócitos deficientes em G6PD induzindo um processo anêmico duas vezes maior quando comparado aos eritrócitos normais expostos a esse metabólito. Desse modo, as células deficientes em G6PD apresentam maior suscetibilidade ao dano oxidativo, uma vez que se tornam incapazes de reduzir NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada) para NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida). A G6PD catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogliconolactona em uma reação que usa especificamente NADP⁺ como coenzima, que após a redução transforma-se em NADPH (SALVEMINI et al. 1999).

O NADPH é uma molécula altamente redutora e extremamente importante para os eritrócitos pelo fato de manter a forma reduzida da GSH, uma vez que é o cofator para atividade da glutathiona-redutase que transforma glutathiona 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 capacidade de defesa antioxidante dos eritrócitos pela ação da GSH que é capaz de detoxificar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), bem como manter resíduos de cisteína da Hb e de outras proteínas de glóbulos vermelhos no estado reduzido (Figura 4) (URSINI et al. 1997; SALVEMINI et al. 1999).

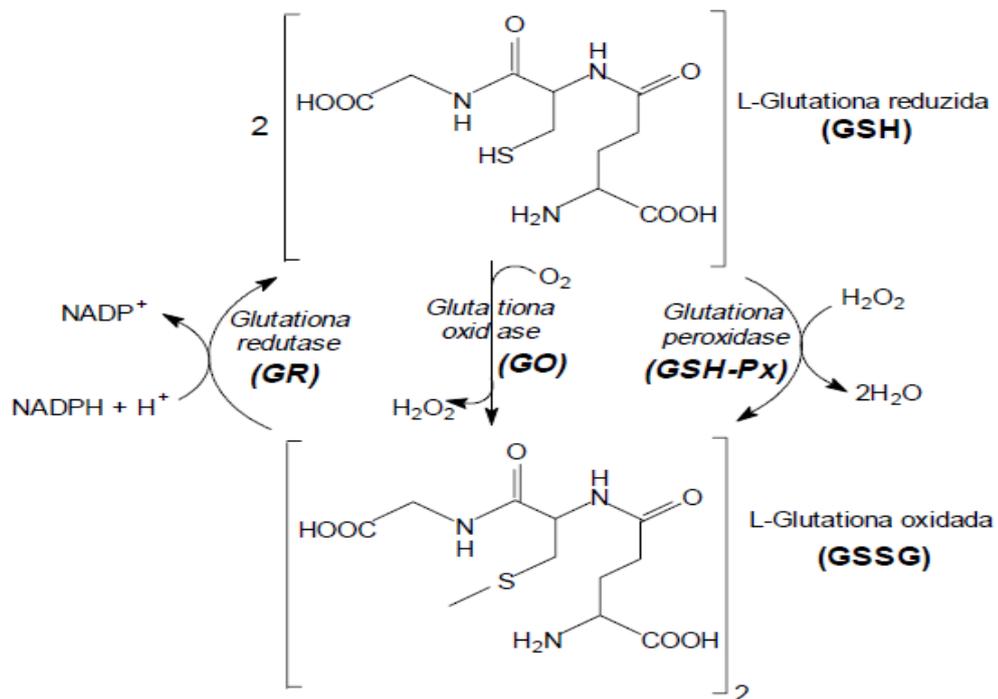


Figura 4- Interconversão de glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR). Fonte: Rover Júnior et al. 2001.

3.2 Eritrócitos humanos

3.2.1 MEMBRANA ERITROCITÁRIA

O eritrócito é uma das células mais especializadas do organismo humano, sendo responsável pelo transporte de oxigênio aos tecidos. Para o melhor desempenho desta importante função, a forma madura dos eritrócitos é anucleada, o que lhe traz inúmeras vantagens, como a sua passagem por capilares menores do que o seu diâmetro, no baço e na microcirculação em geral. A membrana eritrocitária é constituída de uma bicamada lipídica com 42% de lipídios, 52% de proteínas e 7% de carboidratos. Entre os lipídios, o colesterol e os fosfolipídios estão organizados em bicamada, em quantidades quase equimolares (HARRIS,1991). Os tipos predominantes de fosfolipídios são a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilserina, na face interna da membrana; a fosfatidilcolina e a esfingomiélnina, mais abundantes

na face externa da membrana (LEHNINGER et al.1995). A distribuição dos lipídios está relacionada com a curvatura da membrana (LODISH, 2004).

A estrutura lipídica da membrana é mantida por um sistema de transporte ativo através dos fosfolipídeos da membrana. A lipase transporta ativamente os aminofosfolipídeos de fora para dentro, enquanto que a scramblase, quando ativada, move qualquer fosfolipídeo em todas as direções (STUART e NAGEL, 2004). Em geral, substâncias de baixa polaridade atravessam livremente a membrana do eritrócito, enquanto moléculas polares dependem de transporte através de sítios especializados.

Quanto as proteínas, a membrana eritrocitária é composta por proteínas estruturalmente classificadas em integrais ou transmembrana e periféricas ou extra-membrana. Essas proteínas compõem o citoesqueleto, organela responsável pela forma bicôncava normal ou anormal das eritrócitos, e representa 60% da massa protéica da membrana (MURRAY et al. 2006).

As proteínas integrais penetram ou atravessam a bicamada lipídica e interagem com a porção hidrofóbica das moléculas lipídicas. Entre estas proteínas, destacam-se as de transporte, como a banda 3, denominada proteína transportadora de íons e as glicoforinas A, B, C e D, que possuem receptores de membrana e antígenos. Estas moléculas participam do reconhecimento célula-célula na extremidade externa e auxiliam na estabilização do citoesqueleto através de ligações com a proteína 4.1 na face interna da membrana (MURADOR, 2007). O domínio citoplasmático da banda 3 se apresenta como um grande centro organizacional que interage com muitas outras proteínas periféricas ou ligantes (Figura 5), como a anquirina, considerada a maior ponte para o citoesqueleto. Assim como, a espectrina-actina, proteína 4.1, proteína 4.2, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfofrutoquinase, desoxihemoglobina, tirosinaquinase e hemicromos, que regulam a interação do citoesqueleto com enzimas glicolíticas (MURADOR e DEFFUNE, 2007).

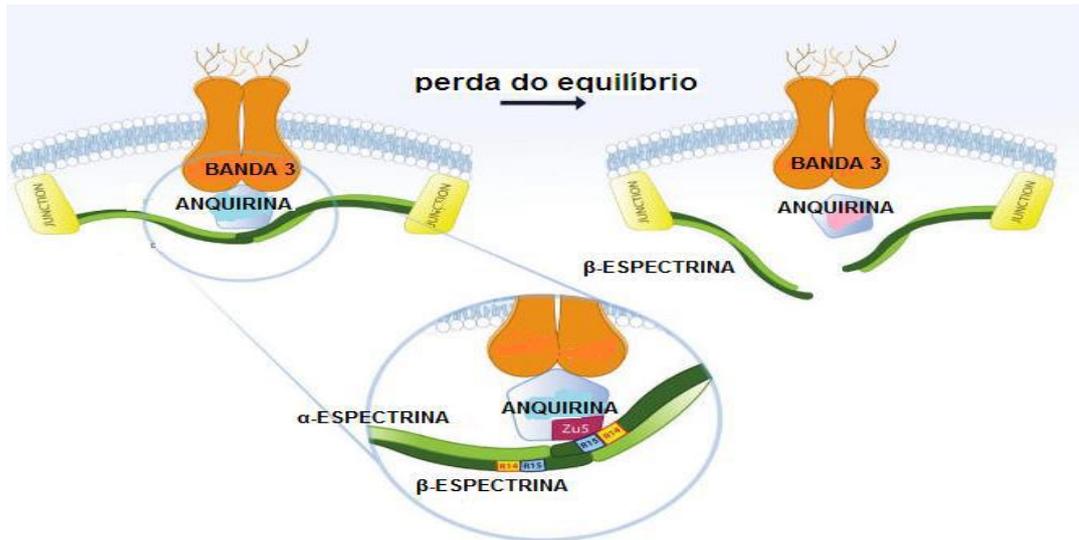


Figura 5: Estrutura da membrana eritrocitária. Disposição das proteínas integrais banda 3 e anquirina com a fração β da espectrina. Fonte: (PARK, 2010).

Dentre as proteínas citoplasmáticas, a Hb é a proteína transportadora de oxigênio, que constitui 95% do total protéico citosólico do eritrócito (MURRAY et al. 2006). Além da Hb, o citosol do eritrócito maduro apresenta enzimas importantes na produção de energia a partir da glicólise. Com isso, para manter a Hb em condições funcionais, a energia necessária para o processo provém do ATP, e de coenzimas como NADH e NADPH, que mantêm seu estado funcional e volume celular por 80 a 120 dias, frente a exposições repetidas a lesões mecânicas e/ou metabólicas (MACHADO et al. 2009).

3.2.2 HEMOGLOBINA (HB) E METEMOGLOBINA (METHB)

A Hb é a proteína presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos e apresenta como principal função o transporte de O_2 por todo o organismo (Figura 6). A sua estrutura é de uma proteína esférica, globular, formada por quatro subunidades, compostas de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, sendo um par denominado de cadeias do tipo alfa (alfa- α ou zeta- ζ) e o outro de cadeias do tipo não-alfa (beta- β , delta- σ , gama- γ ou epsilon- ϵ). Cada cadeia polipeptídica é composta por uma sequência de aminoácidos, tendo as cadeias alfa 141 aminoácidos (aa) e as cadeias não-alfa, 146 aa. As combinações entre as diversas cadeias de proteínas dão origem às diferentes Hbs presentes nos eritrócitos desde o

período embrionário até a fase adulta, produzidas no decorrer das distintas etapas do desenvolvimento humano (GALIZA NETO e PITOMBEIRA, 2002).

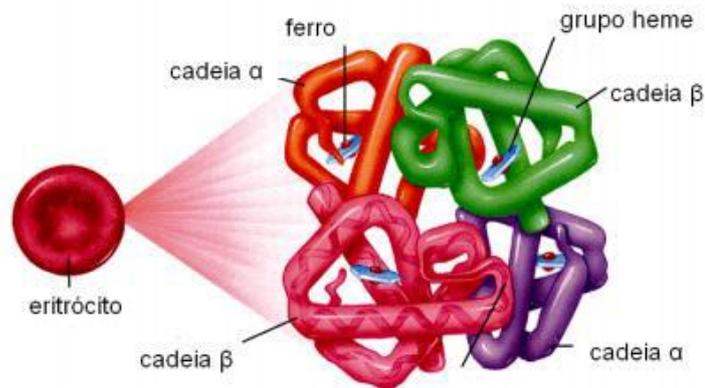


Figura 6: A Hb consiste em um grupo prostético, heme, e o protéico, representado pelas cadeias de globina α e β . Fonte: Mader (1997).

O grupo prostético presente nas cadeias de globina é representado pelo heme, anel porfirínico tetrapirrólico, cujo núcleo contém ferro sob a forma de Fe^{2+} . Este metal se liga covalentemente aos quatro anéis pirrólicos unidos em anel planar por quatro pontes de meteno ($=\text{CH}-$), sendo que o átomo de Fe^{2+} é responsável pela ligação com o O_2 (Figura 7). Como cada molécula de Hb possui quatro grupos heme, a mesma é capaz de se combinar a quatro moléculas de O_2 (GALIZA NETO e PITOMBEIRA, 2002).

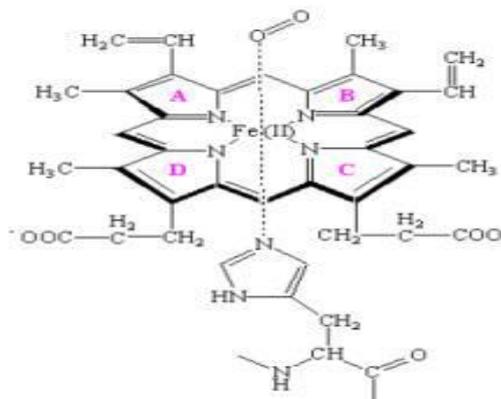


Figura 7: Representações da estrutura tetrapirrólica do grupo prostético heme, ligando-se aos quatro anéis pirrólicos e a moléculas de oxigênio. Fonte: Peñuela (2005)

No adulto, as Hbs constituem arranjos tetraméricos de cadeias alfa com beta ($\alpha_2\beta_2 = \text{Hb A1}$), alfa com delta ($\alpha_2\delta_2 = \text{Hb A2}$) e alfa com gama ($\alpha_2\gamma_2 = \text{Hb F}$). Ao nascimento, ainda predomina a hemoglobina Fetal (Hb F), que diminui gradativamente até aproximadamente a vigésima oitava semana de vida, quando as concentrações das Hbs chegam às proporções do adulto, de 96 a 98% para Hb A1; de 2,0 a 3,7% para Hb A2 e de até 1% para Hb F (STAMATOYANNOPOULOS, 1992). Devido a sua estrutura tetramérica, a Hb pode interagir com outras moléculas, possibilitando interações fundamentais para o seu funcionamento, tais como, o processo de oxigenação que ocorre a partir da avidéz das duas cadeias β pelo O_2 que se movimentam juntas para facilitar a combinação entre eles.

Contudo, para que ocorra a liberação deste gás nos tecidos é necessária a atuação do 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG) que proporciona a redução da afinidade da Hb pelo O_2 proporcionando a liberação deste para os tecidos (LORENZI, 2011). Além disso, a molécula de O_2 se liga mais rapidamente se outras moléculas de O_2 já estiverem ligadas, o que é denominado “ligação cooperativa”. Este fenômeno permite que a Hb maximize tanto a quantidade de O_2 transportada sob a PO_2 dos pulmões quanto a quantidade de O_2 liberada sob PO_2 típica dos tecidos periféricos (MURRAY et al. 2006).

De acordo com Shikama (1998), a conversão da Hb a sua forma oxigenada está associada a um arranjo eletrônico, uma vez que ocorre transferência de carga (doação π) do Fe^{2+} para O_2 , e uma coordenação (doação σ) do O_2 para o Fe^{2+} , ocasionando assim uma forte ligação covalente entre o ferro e o O_2 (Figura 8). Logo, após esta oxidação o íon Fe^{2+} do grupo heme não pode mais combinar-se com O_2 , pois esta molécula não apresenta nenhuma afinidade pelo Fe^{3+} , sendo assim observada a formação da MetHb.

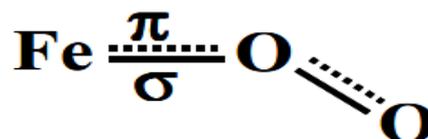


Figura 8: Transferência de cargas entre Fe^{2+} e moléculas de O_2 observados no processo de ligação oxidação de grupo heme. Fonte: Shikama (1998).

A metemoglobinemia é uma síndrome clínica causada pelo aumento da concentração de MetHb no sangue (UDEH et al. 2001), que pode ocorrer devido alterações congênitas na síntese ou no metabolismo da Hb ou em situações agudas de desequilíbrio nas reações de redução e oxidação. Esta síndrome pode ser induzida pela exposição a agentes químicos diversos, tais como DDS, sulfonamidas, anestésicos locais e o azul de metileno em altas doses. Estes agentes podem ocasionar significativa carência do suprimento de O₂ nos tecidos provocando importantes manifestações clínicas, como: dispnéia, náuseas e taquicardia quando os níveis são de até 30% de MetHb. No entanto, podem levar a letargia e perda de consciência em níveis de aproximadamente 50% de MetHb; arritmias cardíacas, falência circulatória e depressão neurológica com valores entre 50 a 70% de MetHb, e níveis acima de 70% geralmente levam à morte (COLEMAN, 1995).

A redução da MetHb ocorre por dois principais mecanismos; pela via do sistema NADPH-dependente e NADH-dependente (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida), representadas pela NADPH-metemoglobina redutase e NADH-citocromo b5 redutase (chamada também como NADH-metemoglobina redutase), respectivamente. A NADPH-metemoglobina redutase é capaz de reduzir a MetHb formada sob condições normais, já sob condições de elevada oxidação da Hb a responsável pela redução e NADH-citocromo b5 redutase (WRIGHT et al. 1999). A fonte de NADH necessária para a redução da MetHb provém da glicólise anaeróbica 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 9).

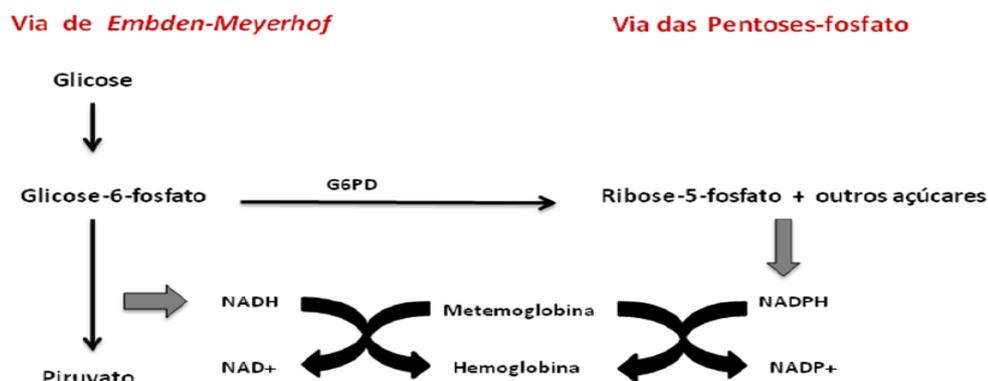


Figura 9: A via de *Embden-Meyerhof* e das pentoses-fosfato, responsáveis pela produção de NADH e NADPH, respectivamente. Substratos importantes no processo de redução da Metemoglobina. Fonte: Percy e Lappin (2008).

3.2.3 METABOLISMO ERITROCITÁRIO

O eritrócito humano maduro não possui estrutura mitocondrial ou nuclear para o metabolismo de aminoácidos e lipídios, toda a sua energia resulta do catabolismo da glicose. Esta energia é necessária para manter o ferro no seu estado bivalente, altos níveis de potássio, baixos níveis de cálcio e sódio no interior da célula, os grupamentos sulfidrilas das enzimas eritrocitárias, Hb e membrana na forma reduzida e a forma bicôncava da célula (BEUTLER, 2006). A entrada de glicose nos eritrócitos ocorre por difusão facilitada, através de uma proteína transportadora de glicose ou glicose permease, não insulino-dependente (MURRAY et al. 2006).

A geração de energia a partir de um substrato, como a glicose, é realizada por um grande número de enzimas e por três vias metabólicas essenciais para a função do eritrócito, entre elas: a via glicolítica Embden-Meyerhof que é a principal via de síntese de ATP no eritrócito, a via da hexose monofosfato (também chamada Shunt das pentoses) e a via da metahemoglobina redutase (Figura 10) (CIESLA, 2007).

Na via Embden-Meyerhof ou glicolítica, são gerados três produtos importantes: NADH, um co-fator para a redução da metehemoglobina; ATP, como fonte de energia; e 2,3-DPG, um regulador da função da Hb (TELEN e KAUFMAN, 1999). A via glicolítica cataboliza a glicose anaerobicamente a piruvato ou lactato. Cerca de quatro moles de ADP podem ser fosforilados a ATP durante o metabolismo de cada mol de glicose, através de reações controladas por uma série de enzimas, principalmente pela hexoquinase e a fosfofrutoquinase (BEUTLER, 2006). Neste processo, a energia gerada é suficiente para manter a forma e a flexibilidade da membrana, preservando os lipídios e mantendo o gradiente interno dos íons pelo funcionamento das bombas de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (LORENZI et al. 2003).

A via metabólica da hexose monofosfato, também chamada Shunt das pentoses, combina o metabolismo oxidativo da G6P com a redução dos nucleotídeos da piridina e da glutathiona, promovendo proteção aos eritrócitos contra os oxidantes do meio ambiente. Nesta via, três moléculas de G6P produzem três moléculas de CO_2 e três açúcares de cinco carbonos (MURRAY et al. 2006), sendo o NADPH reduzido o produto mais importante formado nesta via, devido esse produto ser utilizado pelo eritrócito como cofator da glutathiona redutase que efetua a redução da molécula de GSSG para GSH (GREER et al. 2003). A demanda aumentada de NADPH é o principal estímulo para a utilização de G6P pela via, uma

prova disso é que em eritrócitos humanos maduros, 11% da glicose eritrocitária é consumida por essa via (HILLMAN, 2001).

Por último a via da metahemoglobina redutase que mantém o ferro da molécula de Hb no seu estado reduzido, de modo que o O₂ possa ser liberado nos tecidos, durante a troca gasosa. Esta enzima é dependente de NADH, sendo que na ausência deste, a MetHb acumula-se nos eritrócitos (CIESLA, 2007). A molécula de 2,3 – DPG, importante modulador da afinidade do O₂ à molécula de Hb, é sintetizada a partir de intermediários glicolíticos do ciclo de Luebering-Rapoport (GREER et al. 2003).

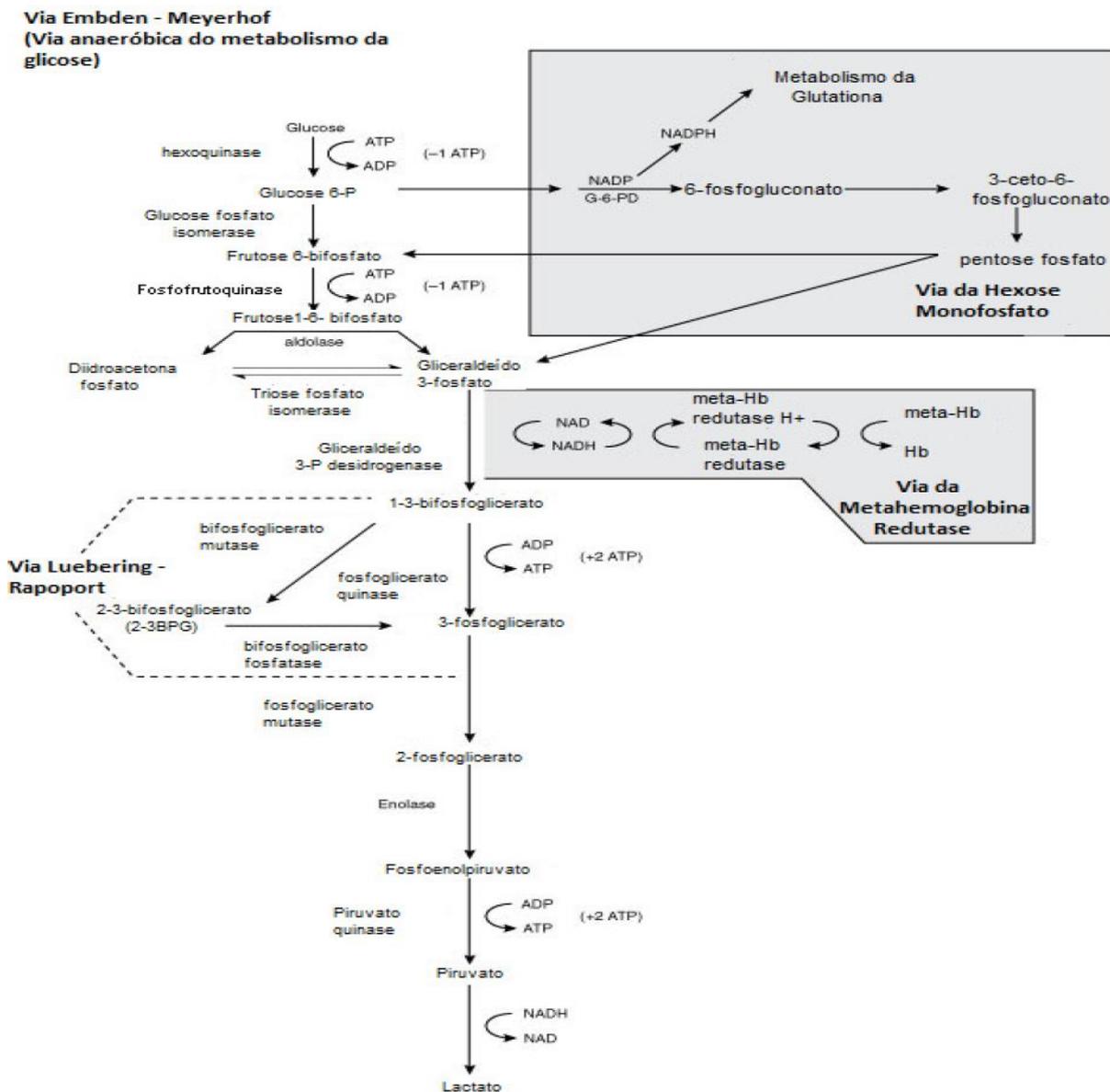


Figura 10: Suprimentos de energia no eritrócito. Fonte: Red Cell Biology (2011)

3.2.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE DO ERITRÓCITO

O eritrócito dispõe de defesas antioxidantes especializadas para manter a Hb no seu estado funcional transportando grande quantidade de O_2 de forma segura para a sua integridade, por meio de um complexo sistema de detoxificação, que previne o acúmulo de radicais livres. Essas defesas antioxidantes protegem as células de quatro formas possíveis como: impedindo a formação de radicais livres; interceptando os radicais livres formados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas; reparando as lesões causadas pelos radicais e proporcionando uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais, 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. O efeito cumulativo da lesão oxidativa é responsável pelo processo normal de envelhecimento e destruição dos eritrócitos (MACHADO et al. 2009). Sendo assim, para combater a agressão oxidativa no eritrócito, o organismo se defende com defesas antioxidantes, as quais são classificadas em defesa antioxidante enzimática e não enzimática.

O sistema enzimático do eritrócito é dividido em: 1) A meta-Hb redutase NADH dependente 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 apresenta quatro subunidades, cada uma contendo um grupamento Fe^{3+} , ligado ao seu sítio ativo, esta enzima decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2 e realiza a oxidação de doadores de H^+ , como metanol, ácido fórmico e formóis, com o consumo de peróxidos (atividade peroxídica); 4) A Glutathione peroxidase (GSH-Px) é uma enzima mitocondrial e citoplasmática que detoxifica o H_2O_2 e remove hidroperóxidos lipídicos formados na membrana, utilizando a GSH como cofator; 5) A glutathione redutase (GR) NADPH dependente é uma enzima citoplasmática que reduz a GSSG em GSH (Figura 11) (HARRIS, 1991).

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 residentes na membrana, que funciona

como um finalizador de reações em cadeia, interrompendo a propagação dos radicais livres. Assim como, o β -caroteno (pró-vitamina A) e o ácido ascórbico (vitamina C) que apesar de se encontrarem em níveis baixos dentro do eritrócito (0,043 moles/l) são um dos antioxidantes extracelulares mais importantes ao trabalhar sinergicamente com o tocoferol (HARRIS, 1991; FREI, 1999; TAVAZZI et al. 2000).

O principal tampão redox do eritrócito é a GSH, um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, glutamato e cisteína, sendo esse último aminoácido portador do grupo sulfidríla (SH), grupo empregado nas reações de óxido-redução nas quais a molécula participa. A função da GSH é manter componentes diversos da célula 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. 2002).

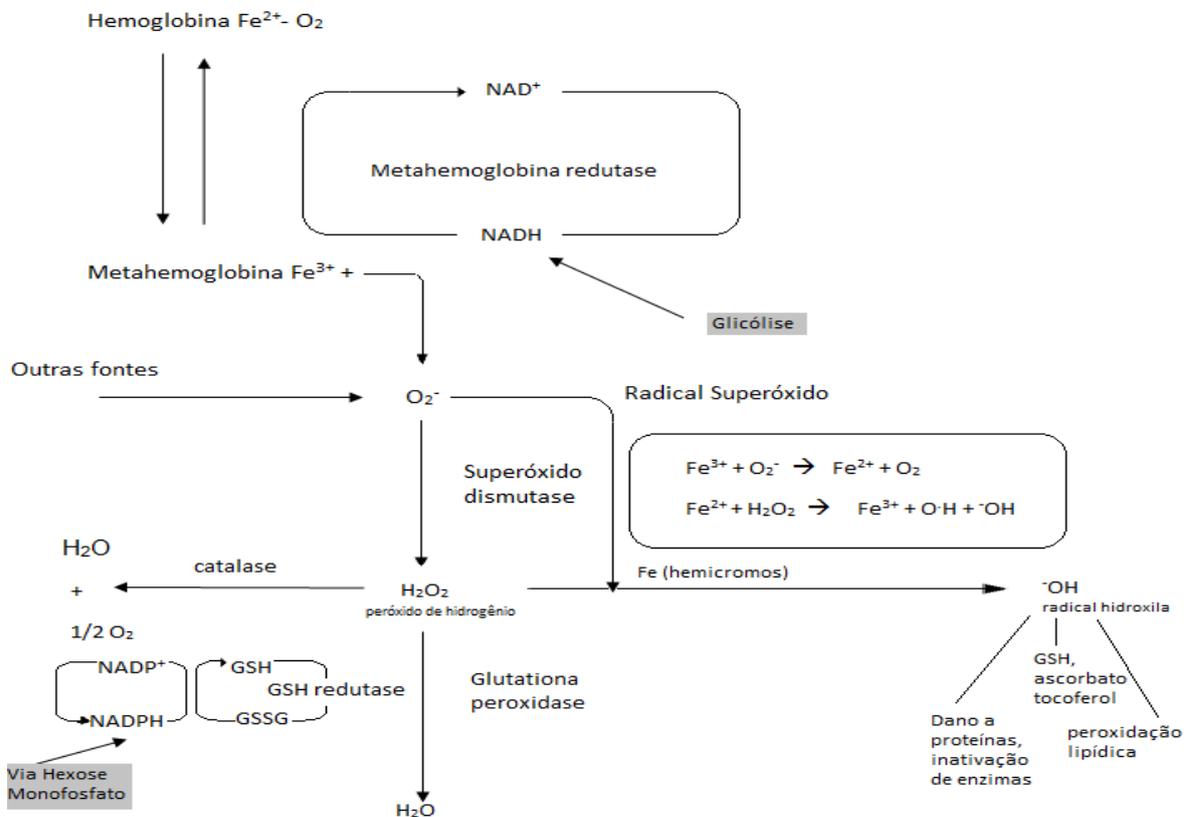


Figura 11: Mecanismo de proteção do sistema antioxidante dos eritrócitos a partir da produção de espécies reativas de oxigênio e produção de metemoglobina. Fonte: HARRIS (1991)

3.2.5 IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS *IN VITRO* COM ERITRÓCITOS

A utilização dos eritrócitos em modelos *in vitro* de estudos do metabolismo oxidativo, sustenta-se na abundância destas células, relativamente simples, sem núcleo ou organelas, de fácil obtenção e por serem alvos constantes de lesões metabólicas por circularem todo o organismo (MACHADO, 2009). Isto resulta em um modelo excelente para o estudo da toxicidade sobre biomembranas e da defesa antioxidante (CASADEVALL, 2009).

Diversos estudos têm utilizado eritrócitos em modelos *in vitro*, como o de Albuquerque et al. (2015), que utilizou eritrócitos humanos como modelo experimental *in vitro* para avaliar a ação antioxidante sobre a formação de MetHb induzido em eritrócitos por DDS-NOH em diferentes concentrações deste metabólito. Estes autores demonstraram que esse modelo experimental constitui uma ótima estratégia para avaliar o efeito toxicológico e respostas adaptativas celulares de fármacos sobre o estresse oxidativo, bem como comprovar os seus efeitos reguladores sobre mecanismos oxidativos que levam a citotoxicidade, dano no DNA, peroxidação lipídica entre outros.

Do mesmo modo, Furman (2011) e Henneberg (2013) também demonstraram que o modelo experimental com eritrócitos humanos é comumente utilizado para investigar o potencial antioxidante de diferentes compostos. Mediante ao fato, que os eritrócitos ao transportar o O₂ estão constantemente expostos aos danos oxidativos e ao processo de oxido-redução que ocorre na Hb, fazendo que os eritrócitos sejam altamente susceptíveis ao ataque de EROs. Com isso, a suspensão de eritrócitos é um sistema eficaz para a investigação do efeito protetor de substâncias antioxidantes, visto que radicais livres e compostos oxidantes podem levar a alterações em lipídios, proteínas e DNA eritrocitário (SHIVA et al. 2007).

3.3 Dano oxidativo ao DNA de leucócitos

A sequência integral do genoma é essencial para a manutenção do fenótipo de todo ser vivo. No entanto, o genoma está constantemente exposto a instabilidades do DNA, devido às reações químicas que ocorrem espontaneamente mediadas por substâncias oxidantes e erros no processo de replicação. O principal mecanismo de dano no DNA é a oxidação das bases nitrogenadas, que ao serem

oxidadas são reconhecidas e removidas da sequência da fita simples de DNA por endonucleases, formando-se sítios apurínico ou apirimidínico na fita, em caso de purina (Adenosina e Guanina) ou pirimidina (Citosina e Timina), respectivamente (HEGDE et al. 2012). Esta mutação é eficientemente corrigida pela ativação do sistema de reparo por excisão de base, uma vez que uma endonuclease-AP reconhece as bases oxidadas e as remove da sequência. Em seguida, a DNA-polimerase substitui este sítio por uma nova base, utilizando a fita-irmã como molde e finalmente, a DNA-ligase efetua a ligação dessa nova base a este sítio (HEGDE et al. 2012).

Uma das principais causas de dano no DNA é a produção desequilibrada de EROs provenientes tanto do meio intracelular como de fatores externos, tais como a exposição a metabólitos arilhidroxilamina, que são formados pela reação de N-hidroxilação (KIM e GUENGERICH, 2005). Estes metabólitos estão envolvidos no desenvolvimento do câncer a partir da formação de adutos com a molécula do DNA (BELAND e KADLUBAR, 1990). Além disso, os danos ao DNA podem também ser induzidos pela *M. leprae* e PQT em pacientes hansenianos, os quais produzem EROS que reagem com o DNA celular causando quebras em suas cadeias.

Desse modo, nos últimos anos, diversos autores têm discutido o envolvimento da PQT e da hanseníase como causadores de dano no DNA (D'SOUZA e DAS 1994; ALY e DONYA, 2002; KALAISELVI et al. 2002; GANDHI e SINGH, 2004). O dano no DNA pode ser mensurado pelo ensaio cometa, que é uma técnica simples e sensível que avalia o dano no DNA ao nível da célula individual (SINGH et al. 1988; TICE et al. 1992; COLLINS et al. 1997). Este ensaio foi desenvolvido por Singh et al, (1988) e tem encontrado diversas aplicações em monitoramento da população, avaliação da genotoxicidade e na modulação das condições dos doentes (MALUF e ERDTMANN, 2001; SARDAS et al. 2001).

Estudo realizado por Kalaiselvi et al. (2002) mostrou que a PQT levou a danos genéticos em linfócitos de sangue periférico de pacientes com hanseníase submetidos a PQT, por meio da avaliação das aberrações cromossômicas (AC), micronúcleos e ensaio do cometa. Por outro lado, D'Souza et al. (1991) e D'Souza e Das (1994) mostraram que a DDS em combinação com a RMP e CFZ, não foram capazes de induzir AC em linfócitos de pacientes com hanseníase submetidos a PQT. Além disso, os pacientes tratados com a PQT apresentaram níveis reduzidos de AC quando comparado aos pacientes sem a terapia. Desta forma, até o

momento, os possíveis mecanismos e os compostos responsáveis pelo dano genético em pacientes com hanseníase estão pouco elucidados. No entanto, sabe-se que em algumas infecções bacterianas como a tuberculose, brucelose e tifo, há aumento de pelo menos 2 vezes no nível de AC nos linfócitos destes pacientes (MASJEDI et al. 2000). Entretanto, pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar, o nível de AC aumenta de 2,6 a 4,2 vezes, respectivamente, em comparação aos indivíduos saudáveis (D'SOUZA e DAS, 1994).

Gandhi e Singh (2004) avaliaram os danos no DNA em linfócitos do sangue periférico de pacientes com hanseníase tratados e não tratados com PQT, e mostraram que o maior dano em DNA foi observado em pacientes tratados em relação aos sem tratamento. Além disso, as maiores categorias de dano pelo ensaio do cometa em pacientes em PQT sugerem que tanto o *M. leprae* como o PQT são responsáveis pelas quebras de DNA. Por outro lado, em pacientes com hanseníase sem tratamento, o dano em DNA mediado pelo bacilo (*M. leprae*) foi bem menor quando comparado aos pacientes em tratamento. Corroborando, Malcher (2012), mostrou que o metabólito DDS-NOH levou a formação de dano em DNA em modelo *in vitro*, visto que das células analisadas, 83% apresentaram dano em DNA em diferentes classes (16% na classe 1, 10 na classe 2, 26 na classe 3 e 31 na classe 4).

3.4 Terapêutica usual para tratamento de MetHb

3.4.1 AZUL DE METILENO

O Azul de Metileno (AM) é um corante básico redox que impregna componentes ácidos das células com tonalidade azul-violeta, largamente empregado na rotina laboratorial, sendo também utilizado no tingimento de algodão, lãs e papel. Devido à sua forte adsorção em suportes sólidos, muitas vezes, o AM serve como um composto modelo para a remoção de corantes e de contaminantes orgânicos a partir de soluções aquosas (LI et al. 2012). Ainda que o AM não seja tóxico como os metais pesados, a exposição aguda 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 utilizado nos pacientes com metahemoglobinemia adquirida e induzida por fármacos como a DDS, através de injeção intravenosa, na dose de 1-2 mg/kg em solução de 1-2 g/dl, em tempo de infusão de 5 minutos. Doses acumuladas superiores a 7 mg/kg podem desencadear sintomas como dispnéia, dor precordial, cianose persistente e anemia hemolítica (SILLS e ZINKHAM, 1994; ELLENHORN et al. 1997).

A MetHb é reduzida pelo AM, devido esta substância ser um doador de elétrons efetivo para a metahemoglobina redutase dependente de NADPH. Na presença desta enzima e de NADPH, o AM é rapidamente reduzido a branco de metileno que, por sua vez, reduz a MetHb não-enzimaticamente, reduzindo o íon férrico para íon ferroso (Figura 12). O AM apresenta efeito rápido na redução da MetHb tanto *in vivo*, como também *in vitro* (GIBSON, 2002), mas para isso a sua redução requer a via da hexose monofosfato intacta para a regeneração do NADPH. Nesse sentido, pacientes com deficiência de G6PD a utilização do AM é ineficaz e ainda pode induzir hemólise (WARD e McCARTHY, 1998).

Nosso grupo de pesquisa, também, comprovou o efeito anti-metemoglobinizante do AM em modelos *in vitro* induzidos pela DDS-NOH (Malcher 2012; Albuquerque et al. 2015). Estes autores também mostraram que o pré e pós-tratamento com AM foi capaz de prevenir e reverter a formação de MetHb induzida por diferentes concentrações da DDS-NOH, de maneira mais eficiente os compostos antioxidantes, resveratrol (RSV) e ácido α -lipóico (ALA).

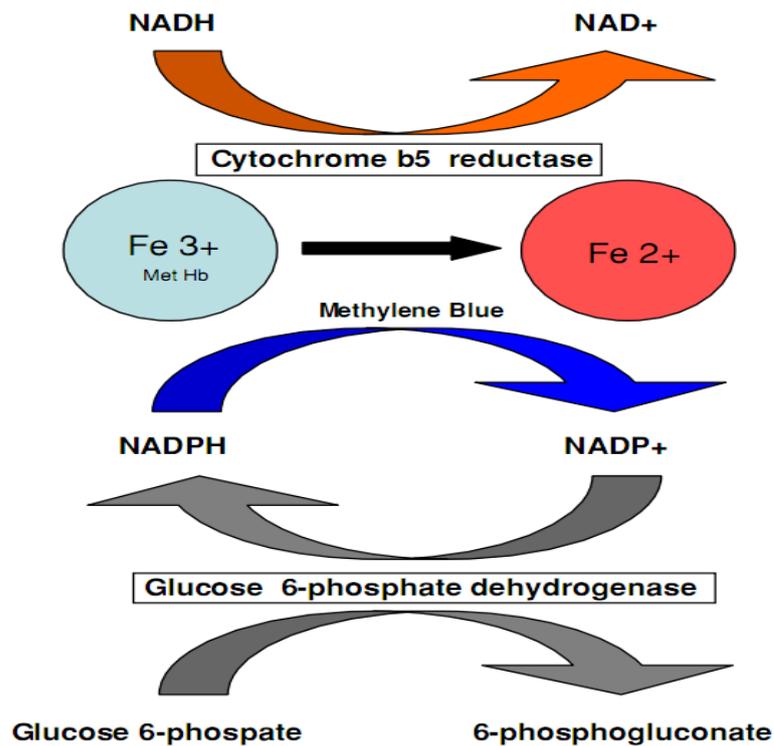


Figura 12: As prováveis vias de redução da metemoglobina, sendo que a principal via fisiológica é a do citocromo b5 reductase. No entanto, essa redução também pode ser feita pela via exógena com o uso de azul de metileno. Fonte: Walker et al, (2009).

3.5 Terapia alternativa com antioxidantes para tratamento de MetHb

Nos últimos anos, têm-se estudado muitos compostos antioxidantes, tais como, ALA, RSV, NAC, Vitaminas C e E, licopeno, flavonóides como a quercetina e rutina, além de minerais como o selênio e o zinco (COLEMAN et al. 2000; 2003; MELLO, 2005; BARREIROS et al. 2006; VALKO et al. 2006; LIMA et al. 2007) como terapia alternativa em casos de MetHb e danos em eritrócitos, como observados em pacientes com hanseníase em uso da PQT. Como relatado anteriormente, nosso grupo de pesquisa também desenvolve trabalhos com estes antioxidantes na prevenção da MetHb induzida por DDS-NOH e de outros danos oxidativos.

Segundo Coleman e Walker (2000), o ALA levou a redução acentuada da MetHb induzida pelo metabólito MADDS-NOH e, eritrócitos de pacientes diabéticos e não diabéticos *in vitro*. Além disso, Coleman e Taylor (2003) constataram que o pré-tratamento e o tratamento com ADHL (forma reduzida do ALA) foi o capaz de inibir a formação de MetHb induzida por DDS-NOH *in vitro*, atuando de forma semelhante ao AM. Com isso, estes autores sugerem que o ALA poderia ser incluído como

suplemento na prevenção da toxicidade induzida pela DDS, já que o ALA pode ser reduzido a sua forma ADHL tanto *in vitro* como *in vivo* (COLEMAN et al. 2000).

Nesse sentido, Georgakouli et al. (2013) proporam que a suplementação com ALA (600mg/dia) levou a benefícios para pacientes com deficiência em G6PD, visto que esse antioxidante aumentou os níveis de GSH e catalase (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 em G6PD, diminuindo os índices de estresse oxidativo.

Paralelamente, nosso grupo também analisou a ação antioxidante do ALA e do RSV, mostrando que o pré-tratamento com RSV e ALA foi capaz de atenuar o percentual de MetHb induzido por DDS-NOH. Além disso, a DDS-NOH induziu grande quantidade de EROs em meio intracelular, que foi reduzido pelo tratamento de RSV e ALA (ALBUQUERQUE et al. 2015).

De modo semelhante, outro trabalho de nosso grupo, também mostrou os efeitos benéficos dos antioxidantes ALA e RSV na prevenção dos danos oxidativos em amostras de pacientes hansenianos em uso de PQT. Neste estudo, conclui-se que o tratamento com PQT levou a um aumento gradativo nos níveis de MetHb nos pacientes hansenianos de acordo com os meses de tratamento com PQT. Entretanto, o tratamento com os antioxidantes ALA e RSV *in vitro* nas doses de 100 e 500 μ M não inibiu os percentuais de MetHb induzida pela PQT. Além disso, os antioxidantes, ALA e RSV, nas doses de 100 μ M aumentaram a atividade enzimática de SOD em pacientes em tratamento com PQT (PESSÔA, 2014).

3.5.1 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO *Agaricus brasiliensis*

O cogumelo *A. brasiliensis* (Figura 13) é originário da cidade de Piedade interior do Estado de São Paulo (Brasil), conhecido desde 1960. Amostras desse fungo foram enviadas ao Japão, em 1965, para estudo no Institute Iwaide, o qual encaminhou essa mesma amostra para o Dr. Heinemann, cientista belga, que em 1967 identificou e o denominou de *Agaricus blazei* Murill. Anos mais tarde, Wasser et al. (2002) em um estudo morfológico comparativo, demonstraram que *Agaricus blazei* Murril se trata da mesma espécie denominada pelos autores de *A.*

brasiliensis. Assim, à luz deste conhecimento, o nome *A. brasiliensis* substituiria as denominações anteriores usadas para esta importante espécie de cogumelo.



Figura 13 - Corpo de frutificação de *Agaricus brasiliensis*. Fonte: Soares et al. (2009).

O *Agaricus blazei* Murril (Agaricaceae), uma espécie nativa do Brasil, popularmente conhecida como “cogumelo do sol” (ou “Himematsutake” no Japão) que é foco de vários estudos devido as suas propriedades farmacológicas (BARBISAN et al. 2002; FIRENZUOLI et al. 2008). Este fungo é amplamente cultivado no Japão para uso medicinal, tanto que é hoje considerado uma das mais importantes espécies comestíveis com propriedades medicinais.

Tradicionalmente, este cogumelo tem sido utilizado no tratamento de muitas doenças, tais como bacterianas e parasitárias (MIZUNO et al. 1995; WASSER e WEIS, 1999), estresse físico e emocional, estimulante do sistema imune, bem como para a melhoria da qualidade de vida de diabéticos, redução do colesterol, prevenção de osteoporose e úlcera péptica, dermatites, hepatite, doenças cardíacas, além do tratamento de problemas digestivos, circulatórios, combate ao câncer (MIZUNO et al. 1995; KASAI et al. 2004; FIRENZUOLI et al. 2008; YUMINAMOCHI, 2007) e tratamento da AIDS (HUANG e MAU, 2006).

O *A. brasiliensis* possui moléculas com atividades antimutagênica, antiviral, antialérgica, antitumoral, imunomoduladora e antioxidante, e ainda outras

substâncias bioativas como os terpenos, lipídios e fenóis que foram identificados e caracterizados evidenciando as suas propriedades medicinais. Segundo Dalla Santa et al. (2009), a potente atividade biológica atribuída ao *A. brasiliensis* se deve aos seus compostos bioativos, principalmente os polissacarídeos como as β -D-glucanas. Outros compostos, como, lectinas, esteróis e ergosterol, também são investigados e em conjunto com os polissacarídeos, exercem ação fisiológica sobre várias vias metabólicas no organismo (DALLA SANTA et al. 2010).

Dentre os cogumelos medicinais pesquisados, o *A. brasiliensis* é um dos que possuem a maior concentração de polissacarídeos (β -glucana), a maioria com potente atividade antitumoral e que podem ser isoladas do corpo frutífero, do micélio e do meio de cultivo filtrado (DALLA SANTA et al. 2009; DALLA SANTA et al. 2010). Segundo Park et al. (2003), estes polissacarídeos se localizam na camada intermediária da parede celular (Figura 14a), adjacente à membrana plasmática, com função relacionada à rigidez e à forma. A β -glucana de *A. brasiliensis* é formada por um esqueleto de (1 \rightarrow 3)- β -D-glicose ao qual estão ligadas unidades do tipo (1 \rightarrow 6)- β -D-glicose de tamanhos variados e que ocorrem em diferentes intervalos ao longo do esqueleto central (Figura 14 b). Estas moléculas interagem e modificam a resposta imunológica (biorregulação) do hospedeiro, controlam a homeostase, regula o biorritmo e previne várias doenças (WASSER e WEIS, 1999; ROSS et al. 1999; DIJKGRAAF et al. 2002; JONG, 2002; CAMELINI et al. 2005).

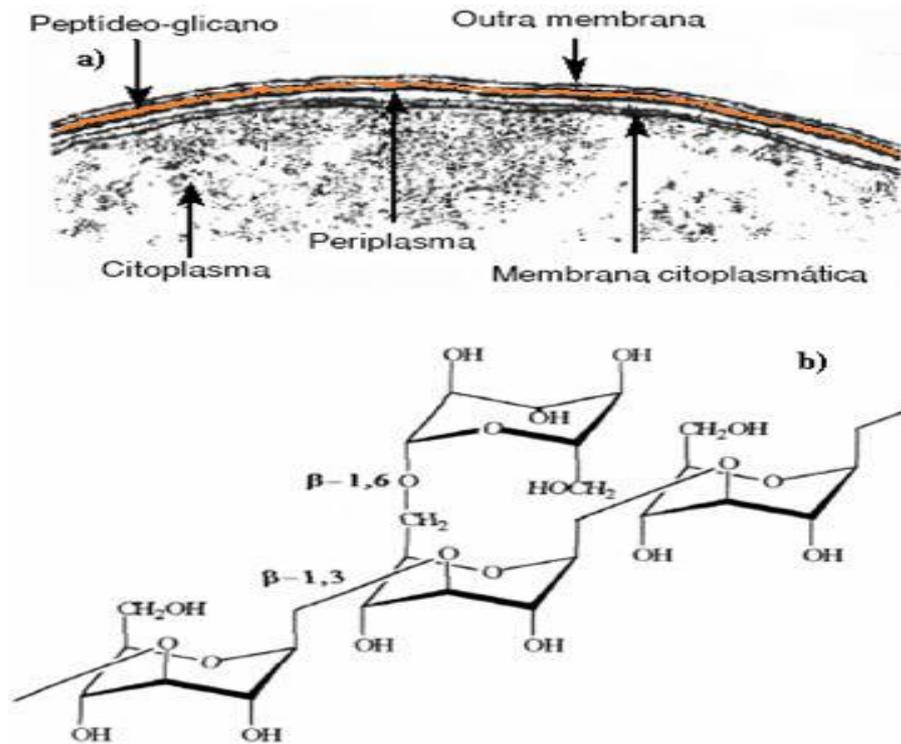


Figura 14 - Localização da β -glucana na parede celular de cogumelos (a); estrutura da (1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana de cogumelos (b). Fonte: Adaptada de PARK et al. (2003).

Nesse sentido, Nagata et al. (2001) ao avaliarem a expressão de NO e IL-1 β em macrófagos peritoneais de ratos tratados com β -glucanas extraídas de *A. brasiliensis*, perceberam que o *A. brasiliensis* induziu a produção de NO e de IL-1 β apenas em altas concentrações, sugerindo que a ativação de macrófagos e células B pode ser desencadeada pelo *A. brasiliensis*. Em estudo semelhante, Sorimachi et al. (2001) demonstraram que componentes fracionados de *A. brasiliensis* induzem a secreção de NO e citocinas TNF- α , IL-8 em macrófagos *in vitro*, sugerindo que o *A. brasiliensis* contém componentes que ativam macrófagos.

Além da atividade imunomoduladora, vários estudos demonstram suas propriedades antioxidantes que podem reduzir danos ao organismo. Esta ação antioxidante muitas vezes é atribuída aos compostos fenólicos, essenciais em seu crescimento. Dessa forma, estes compostos são potentes substâncias ativas e terapeuticamente úteis gerando benefícios à saúde, diminuindo os riscos de doenças crônicas (SOOB RATTEE et al. 2005).

Segundo Barros et al. (2008) que estudaram a atividade antioxidante de cinco espécies de *Agaricus* através de técnicas químicas, bioquímicas e eletroquímicas, e

mostraram que todas as espécies apresentam atividade antioxidante, sendo que o *A. brasiliensis* foi a espécie com maior atividade. Posteriormente, Percário et al. (2009) mostraram o potencial antioxidante *in vitro* de diferentes apresentações de *Agaricus* pelos métodos 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio (ABTS+) e 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH). Estes autores verificaram que todas as amostras testadas apresentaram alta capacidade antioxidante e inibição da produção de EROS.

Soares et al. (2009) testaram corpos de frutificação de *A. brasiliensis* em diferentes estágios de maturidade, frente a sistemas oxidativos, como o método de inibição da peroxidação lipídica com ácido linoleico e caroteno, bem como avaliação antioxidante frente a redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH), habilidade de quelação de íon ferroso. Estes autores mostraram um índice EC50 de 3,0 mg.mL⁻¹ no ensaio com DPPH, e poder sequestrante de 90% para o extrato de Ab na concentração de 6,0 mg.mL⁻¹. Nesse sentido, Ker et al. (2005) também verificaram que o micélio também possui atividade antioxidante, testado frente ao DPPH e quelação de íons ferroso, obtendo uma faixa de 72,0% a 85,0 % de capacidade sequestrante em extrato de *A. brasiliensis* com concentração de 5,0 mg.mL⁻¹.

Por causa deste efeito antioxidante do *A. brasiliensis*, nosso grupo de estudo tem mostrado que este cogumelo tem efeito preventivo na MetHb *in vitro* e em modelo murino de sepse. Mediante suas atividades imunomoduladoras e antioxidantes, o *A. brasiliensis* pode ser uma possível terapêutica para restabelecer o equilíbrio redox em doenças ou terapêuticas que induzem elevado nível de estresse, como mostrado por nosso grupo em pacientes com hanseníase em uso de PQT.

3.5.2 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA N-ACETILCISTEÍNA

A NAC é um composto tiólico, cuja fórmula é C₅H₉NO₃S (Figura 15). É uma substância usada principalmente como agente mucolítico e antídoto em casos de intoxicação pelo paracetamol (acetaminofeno), reduzindo o grau de lesão hepática e sendo bastante efetiva quando administrada previamente dentro de 8 a 10 horas após a intoxicação. A proteção hepática mediada por NAC ocorre pela manutenção ou restauração dos níveis de GSH ou que NAC deve atuar como um substrato

alternativo por conjugação com as EROs para detoxificá-las (DODDS et al. 2008; TUMUR, 2010).

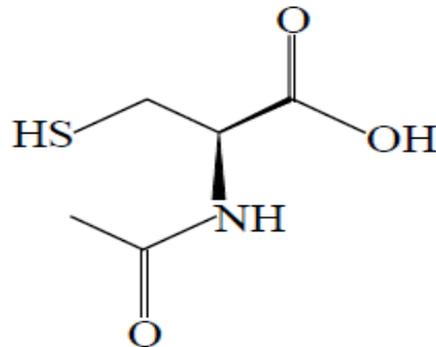


Figura 15: Representação estrutural da N-acetilcisteína. Fonte: Mello (2006).

Em relação às propriedades farmacocinéticas, a NAC é rapidamente absorvida após a administração via oral, tanto em humanos quanto em animais. A máxima concentração plasmática é atingida em 2 a 3 horas após a administração e a meia-vida plasmática é de 5 a 6 horas em adultos e 11 horas em neonatos. No entanto, sofre extensivo metabolismo hepático, resultando em baixa biodisponibilidade (DEKHUIJZEN, 2004).

NAC é uma molécula doadora de grupo sulfidríla com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (MAJANO et al. 2004). Assim, NAC exibe propriedades antioxidantes diretas e indiretas. O grupo tiol livre da NAC é capaz de interagir com os grupos eletrofílicos de EROs do metabolismo respiratório e da resposta imune, levando a formação de substâncias menos reativas, como a ponte dissulfeto da NAC.

Além disso, NAC exerce um efeito antioxidante indireto relacionado ao seu papel como precursor da GSH. Em situações de estresse oxidativo, os níveis de GSH podem decair drasticamente. No entanto, a administração de NAC demonstrou reestabelecer a ressíntese de GSH via desacetilação intracelular da NAC fornecendo cisteína, o principal aminoácido da molécula de GSH. Dados de estudos *in vivo* e *in vitro* também mostram que NAC protege o pulmão de agentes tóxicos pelo aumento dos mecanismos de defesa pulmonar através de suas propriedades antioxidantes diretas e indiretas, como precursor da síntese da GSH (DEKHUIJZEN, 2004).

Tem sido demonstrado que a NAC apresenta um efeito atenuante e até preventivo em relação aos radicais livres como, o ácido hipocloroso, o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e o H_2O_2 , devido ao grupo sulfidrílico presente em sua estrutura química (SHAIK, 2006). Assim, a NAC pode ser parcialmente comparada à atividade de enzimas antioxidantes endógenas como a SOD, CAT e GSH-Px, apesar dessas últimas apresentarem maior capacidade de desintoxicação se comparadas a sua ação direta.

Com efeitos preventivos, a NAC tem-se mostrado bastante eficiente como protetor em doença renal crônica (IVANOVSKI, 2005), câncer, insuficiência pulmonar, e outras doenças sistêmicas (NOLIN, 2007). Pode também melhorar a função endotelial e atenuar a doença inflamatória vascular (aterosclerose), antagonizando os efeitos da geração de substâncias reativas intracelulares (TUMUR, 2010). A NAC também apresenta efeitos positivos sobre complicações cardiovasculares, pois as concentrações de homocisteína e lipoproteínas séricas também diminuem na presença desse antioxidante. Além disso, foi demonstrado que este composto é capaz de aumentar a capacidade de reparo no DNA e também promove a indução de apoptose seletiva de células em transformação. Estudos também indicam que NAC reduz disfunção endotelial, inflamação e fibrose em pacientes renais crônicos, com evidente de melhora clínica (MASSY, 2009).

No que concerne a intervenção com antioxidantes na reversão de MetHb, alguns estudos *in vitro* mostram que a NAC reduz a MetHb comparado ao grupo controle (WRIGHT et al. 1996). Anos mais tarde, Wright et al. (1998) demonstraram novamente que a NAC reduz significativamente a MetHb, só que agora em modelo *in vitro* de deficiência de G6PD.

Além disso, Coleman et al. (2003) avaliaram os efeitos do DHLA, ALA, NAC e ascorbato na formação de MetHb mediada por xenobióticos em eritrócitos humanos *in vitro*. Os resultados demonstraram que nem o ácido lipóico, DHLA, NAC e ascorbato tiveram quaisquer efeitos significativos sobre a MetHb formada por nitrito, entretanto, a NAC reduziu a formação de MetHb.

Por outro lado, Moraes et al. (2008) avaliaram o potencial efeito da NAC em prevenir a hemotoxicidade induzida pela DDS em ratos. Os dados mostraram que a NAC ao invés de prevenir a MetHb, potencializou o efeito metemoglobinizante da DDS, devido ao aumento de sua concentração plasmática e conseqüente aumento da formação da N-hidroxilamina. Isto se deve a capacidade desta droga em

regenerar a N-hidroxilamina enquanto promove a regeneração da GSH, pois a N-hidroxilamina promove a oxidação da oxiemoglobina, e este ciclo só termina quando a GSH eritrocitária estiver quase depletada. Com isto, enquanto houver doação de grupos sulfidrílicos oriundos da NAC, a formação de MetHb continua a ocorrer nos eritrócitos (Figura 16) (MORAES et al. 2008).

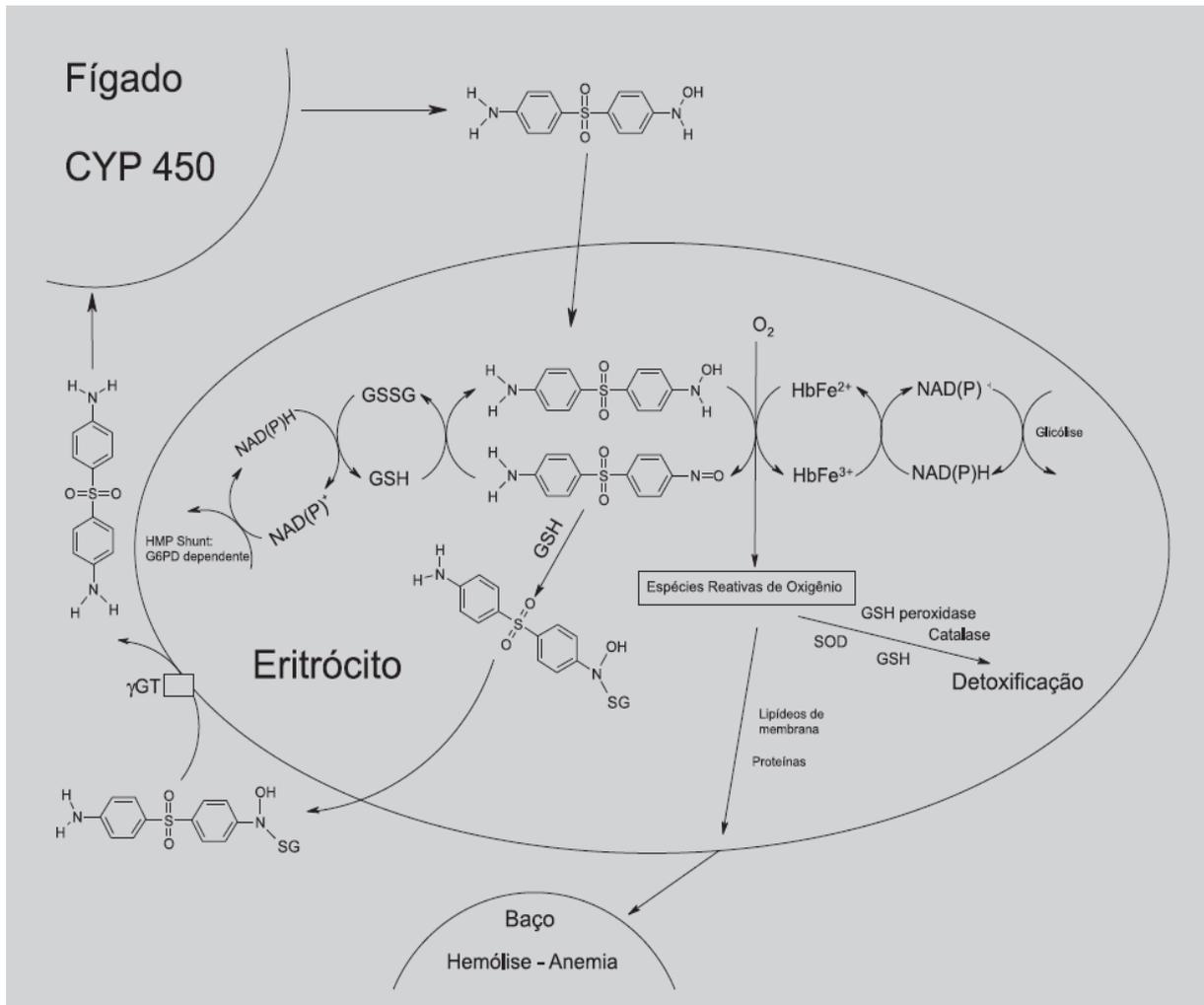


Figura 16: Interação medicamentosa entre NAC e DDS. Fonte: Moraes et al. (2008).

Devido ao potencial antioxidante e pró-oxidante da NAC, é de suma importância analisar o efeito da NAC e outros antioxidantes, em processos hematológicos, como anemias induzidas por fármacos como observado em pacientes em uso de DDS. Assim, este estudo poderá contribuir como possíveis alternativas de tratamento para atenuar ou prevenir os efeitos hematotóxicos ocasionados por fármacos, como a DDS, os quais comprometem a adesão do paciente ao tratamento, e põe em questão a relação risco e benefício deste fármaco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra biológica

Os eritrócitos foram obtidos a partir de amostras de sangue venoso de voluntários sadios, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPa), sob parecer nº 1.173.696 e CAAE 42778714.5.0000.0018 (ANEXO B).

4.2 Coleta de amostras sanguíneas

As amostras de sangue (10 mL de sangue venoso) foram obtidas de doze voluntários adultos saudáveis do sexo masculino e feminino com idade entre 18 a 30 anos e de diferentes tipos sanguíneos, após assinarem o TCLE aprovado pelo CEP-ICS/UFPa. Utilizou-se os seguintes critérios de exclusão: indivíduos tabagistas, etilistas, com comorbidades (infecção, diabetes e hipertensão) e que estivessem em tratamento medicamentoso ou em uso de qualquer suplemento antioxidante. O sangue dos doze voluntários foi armazenado individualmente em tubos de ensaio contendo o anticoagulante EDTA 5% (New prov) (Ácido etilendiaminotetracético), usou-se uma gota para cada/mL de sangue e imediatamente foi realizada a lavagem e suspensão dos eritrócitos para a realização dos ensaios.

4.3 Lavagem e suspensão de eritrocitos

Inicialmente, as amostras coletadas de cada voluntário foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min, sendo posteriormente retirada e cultivada a camada de leucócitos (buffy-coat) para os ensaios de detecção de EROs e cometa. Em seguida, três sucessivas lavagens foram realizadas na suspensão de eritrócitos com NaCl 0,9% até a obtenção de uma suspensão límpida e um pellet de glóbulos vermelhos para cada amostra de voluntário coletada. Após a lavagem, o pellet de glóbulos vermelhos foi isolado e diluído em NaCl 0,9% para resultar em uma suspensão com

hematócrito de aproximadamente 50% e volume final aproximado de 10 mL para cada amostra (Figura 17).

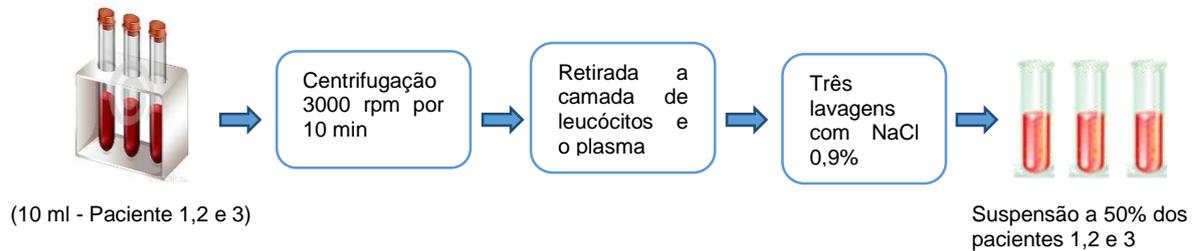


Figura 17: Lavagem e suspensão de eritrócitos.

4.4. Fornecimento e Preparação do *Agaricus brasiliensis*

O cogumelo *Agaricus brasiliensis*, seco e pulverizado foi fornecido gentilmente pela professora Herta Stuz Dalla Santa da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Paraná, Brasil.

Para a obtenção do decocto de *A. brasiliensis*, 2 g do cogumelo seco e pulverizado foram fervidos com 20 ml de água destilada estéril. Após a extração, o decocto foi filtrado e submetido a liofilização para eliminação da água, apresentando um rendimento de 22%. Posteriormente foi preparada uma solução mãe de 1 mg/mL em água destilada estéril. Para a realização dos testes foram utilizadas as concentrações de 2,2; 6,7; 22,5 µg/ml a partir da solução mãe.

4.5 Tratamento dos eritrócitos

4.5.1 INCUBAÇÃO DE ERITRÓCITOS COM DDS-NOH

A suspensão de eritrócitos com hematócrito de aproximadamente 50% obtido conforme o item 4.3, foi distribuído em alíquotas de 2mL em tubos de ensaio de vidro. Em seguida, os eritrócitos foram incubados com 400 µL de diferentes concentrações da DDS-NOH (Santa Cruz Biotechnology) (2,5; 5,0; 7,5; 10 µg/mL) diluído em metanol (Merck), este experimento foi adaptado de Mcmillan et al. (1995)

e Albuquerque et al. (2015). O período de incubação foi de 60min a 37°C e posteriormente, 500µL foram retirados para a dosagem de MetHb e construída uma curva dose versus resposta. O grupo controle negativo foi formado pelos eritrócitos incubados com metanol. O teste foi feito em triplicata em cada concentração e em cada amostra de paciente (Figura 18).

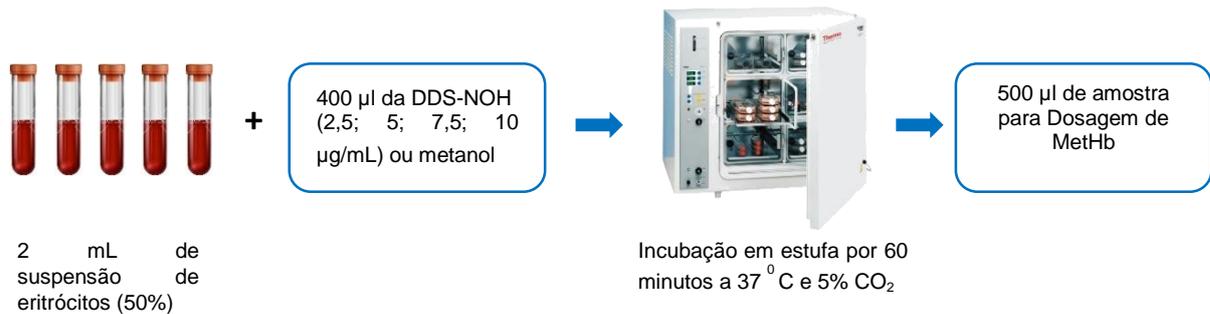


Figura 18: Incubação de eritrócitos com DDS-NOH.

4.5.2 CURVA DOSE RESPOSTA COM ANTIOXIDANTES

4.5.2.1 Pré-tratamento com antioxidantes

A ação dos antioxidantes foi testada a partir de um pré-tratamento com alíquotas de 2 mL de concentrações da NAC (Sigma-Aldrich) (0,1; 0,4; 0,9; 1,6; 4,8; 9,7; 16; 48; 163 µg/mL) diluídos em tampão fosfato (PBS), do *A. brasiliensis* (2,2; 6,7; 22,5 µg/ml) e GSH-EE (Sigma-Aldrich) (0,1; 0,3; 0,8; 1,6; 3,3 mg/ml) diluída em dimetil-sulfoxido (DMSO) a uma solução mãe a 10%. O período de incubação da suspensão de eritrócitos pré-tratados com estes antioxidantes foi de 60 minutos a 37 °C. A seguir, foram adicionados 400 µL da DDS-NOH (2,5 µg/mL) e novamente foi realizada a incubação por 60 min a 37°C. Os grupos controles negativos foram formados pelos eritrócitos incubados somente com metanol, NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE. Por fim, foram retirados 500µL das suspensões de eritrócitos para determinação de MetHb (Figura 19).

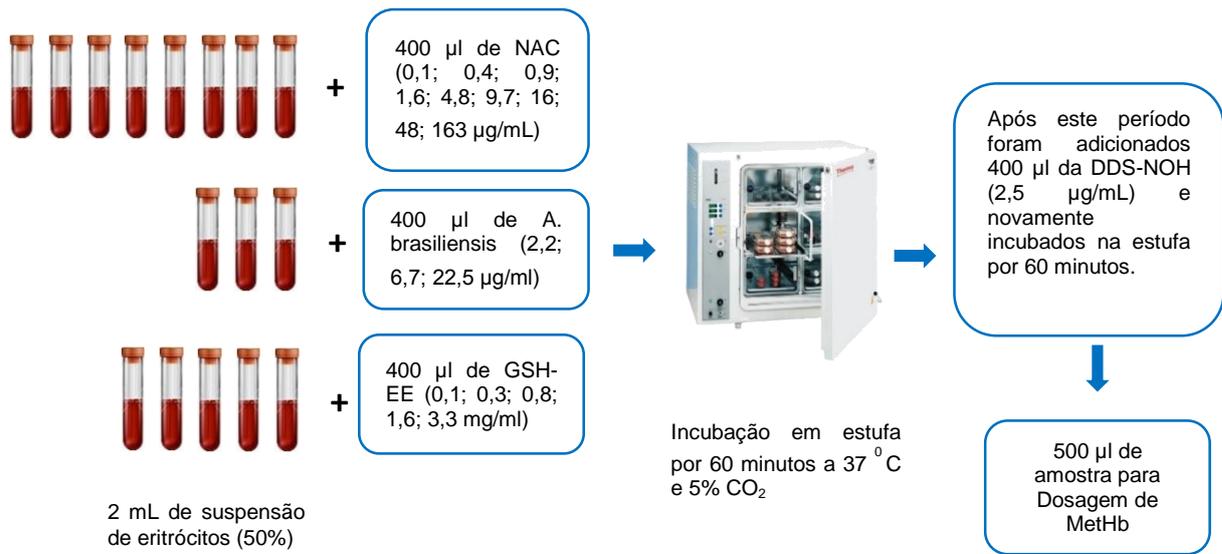


Figura 19: Pré-tratamento de eritrócitos com antioxidantes.

4.5.2.2 Pós-tratamento com antioxidantes

A suspensão de eritrócitos com hematócrito de aproximadamente 50% que foi obtida conforme o item 4.3, foi distribuída em alíquotas de 2 mL em tubos de ensaio de vidro. Em seguida, os eritrócitos foram incubados com 400 µL da DDS-NOH (2,5 µg/mL) por um período de 60min a 37°C. Após este tempo, a suspensão foi pós-tratada com os antioxidantes, NAC a diferentes concentrações, do *A. brasiliensis* (2,2; 6,7; 22,5 µg/ml) e GSH-EE (0,1; 0,3; 0,8; 1,6; 3,3 mg/ml) diluída em DMSO a uma solução mãe a 10%. 10% por um período de 60 min a 37 °C. Os grupos controles negativos foram formados pelos eritrócitos incubados somente com metanol, NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE. Por fim, foram retirados 500 µL das suspensões de eritrócitos para determinação de MetHb (Figura 20).

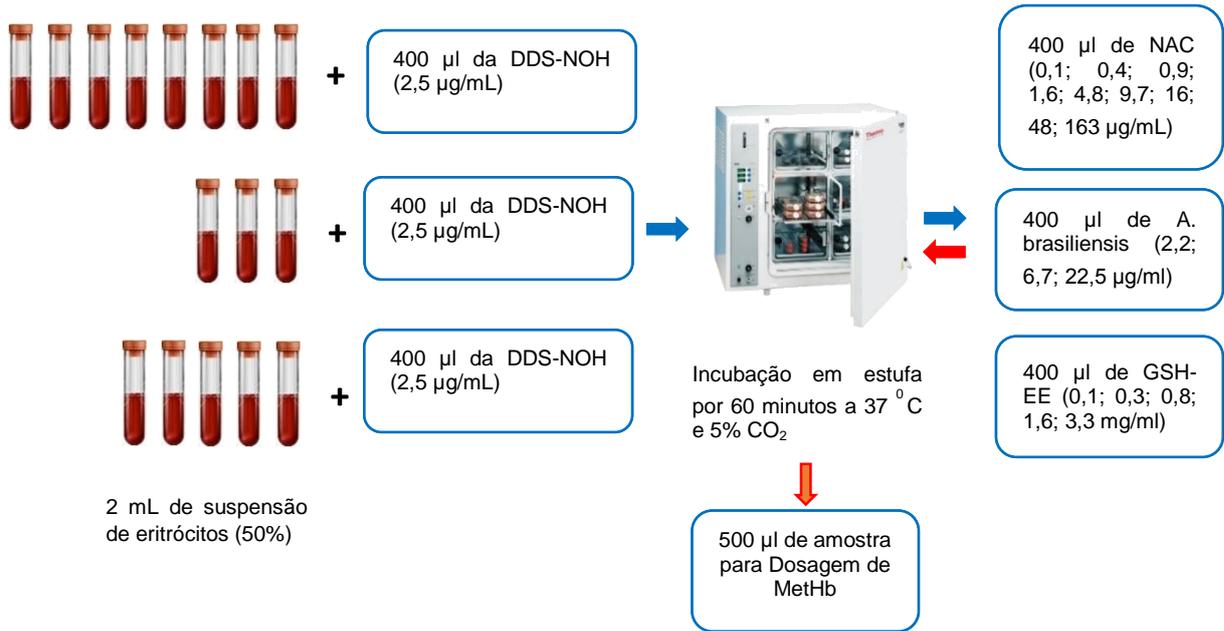


Figura 20: Pós-tratamento de eritrócitos com antioxidantes.

4.5.3 CURVA TEMPORAL COM ANTIOXIDANTES

4.5.3.1 Pré-tratamento com antioxidantes

A ação dos antioxidantes foi testada a partir de uma curva temporal de pré-tratamento com alíquotas de 2 mL de suspensão de eritrócitos obtido conforme o item 4.3, na presença da concentração de NAC (1,6 µg/ml), *A. brasiliensis* (6,7 µg/ml) e GSH-EE (0,8 mg/ml) mais eficaz em inibir MetHb. O período de incubação da suspensão de eritrócitos pré-tratados com estes antioxidantes foi de 30, 60, 90 e 120 minutos a 37 °C. A seguir, foram adicionados 400 µL da DDS-NOH (2,5; µg/mL) as suspensões de eritrócitos tratadas com os antioxidantes aos diferentes tempos e novamente foi realizada a incubação por 60 min a 37°C. Os grupos controles negativos foram formados pelos eritrócitos incubados somente com metanol, NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE. Por fim, foram retirados 500 µL das suspensões de eritrócitos para determinação de MetHb (Figura 21).

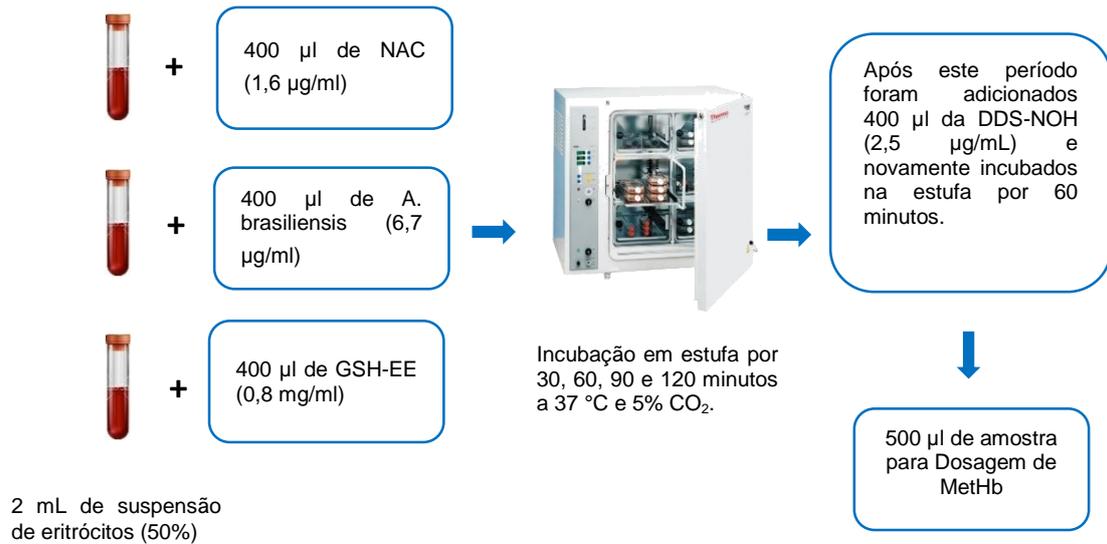


Figura 21: Curva temporal de pré-tratamento de eritrócitos com antioxidantes

4.5.3.2 Pós-tratamento com antioxidantes

Já na curva temporal de pós-tratamento, as alíquotas de 2 mL de suspensão de eritrócitos obtido conforme o item 4.3, foi primeiramente incubada com 400 µL da DDS-NOH (2,5 µg/mL) por um período de 60 min a 37°C e em seguida, foram pós-tratada com NAC (1,6 µg/ml), *A. brasiliensis* (6,7 µg/ml) e GSH-EE (0,8 mg/ml) por um período de tempo de 30, 60, 90 120 minutos a 37 °C. Os grupos controles negativos foram formados pelos eritrócitos incubados somente com metanol, NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE. Por fim, foram retirados 500 µL das suspensões de eritrócitos para determinação de MetHb (Figura 22).

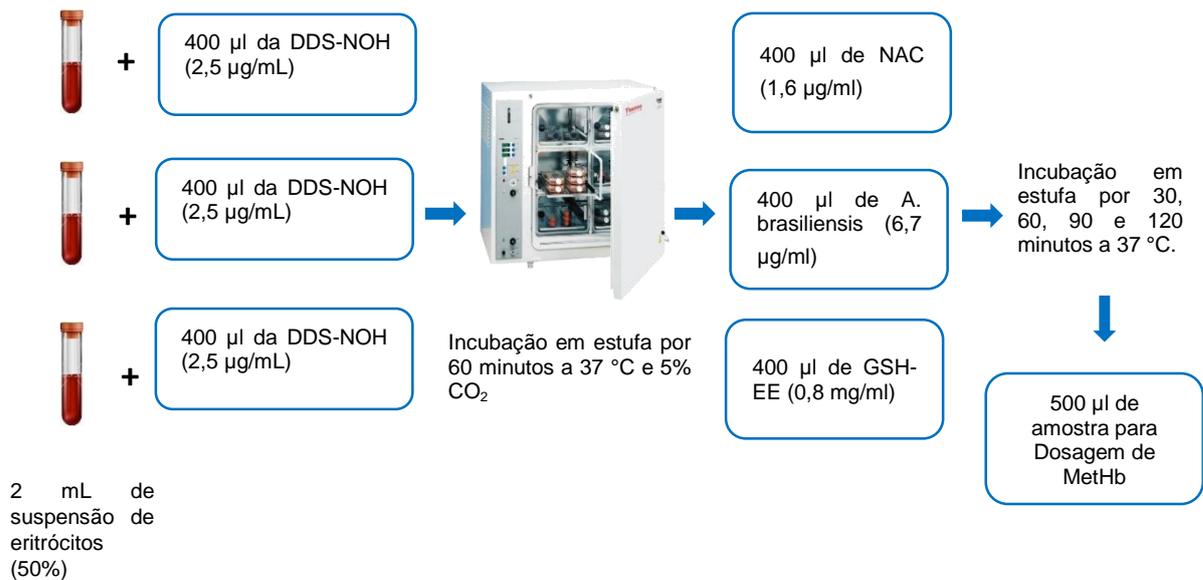


Figura 22: Curva temporal de pós-tratamento de eritrócitos com antioxidantes.

4.5.4 PRÉ E PÓS-TRATAMENTO COM AZUL DE METILENO E DDS-NOH

O AM (Synth) (15ng/mL) foi utilizado no estudo como o controle positivo na prevenção e reversão da MetHb pela DDS-NOH em eritrócitos *in vitro*, uma vez que clinicamente este agente redutor é considerado o único tratamento para a MetHb induzida por DDS. O teste foi feito em triplicata. O pré e pós-tratamento foi feito de acordo como descrito respectivamente no item 4.5.2 (REILLY et al. 1999; ALBURQUEQUE et al. 2015).

4.6 Determinação do percentual de metemoglobina

A determinação de metemoglobina por espectrofotometria descrita por Evelyn e Malloy (1938) foi feita a partir da retirada de 500µL das suspensões de eritrócitos, posteriormente essas células foram hemolisadas pela adição de 2500µL de água destilada e 100 µL de triton X-100 (Sigma- Aldrich).

Em tubos de ensaio, as suspensões foram agitadas por inversão três vezes e mantidas em repouso por 3 min. Adicionou-se 1 mL de tampão fosfato 0,5 M e 3 gotas do reagente Triton X-100, levou-se ao agitador vórtex por 30 s. A seguir,

retirou-se para tubo identificado como A1 uma alíquota de 2,4 mL e para outro tubo identificado como A2, uma alíquota de 0,2 mL, sendo acrescentado a esse último 2,2 mL de solução de ferrocianeto de potássio 5% (Synth). Procedeu-se a leitura das amostras em $\lambda=632$ nm em espectrofotômetro, para obtenção de valores de A1 e A2. Acrescentou-se 100 μ L da solução neutralizada de cianeto de sódio 10% (Synth) nos tubos A1 e A2, agitou-se em vórtex por 30 s e novamente procedeu-se a leitura $\lambda=632$ nm em espectrofotômetro, para obtenção de valores de A3 e A4 (Figura 23).

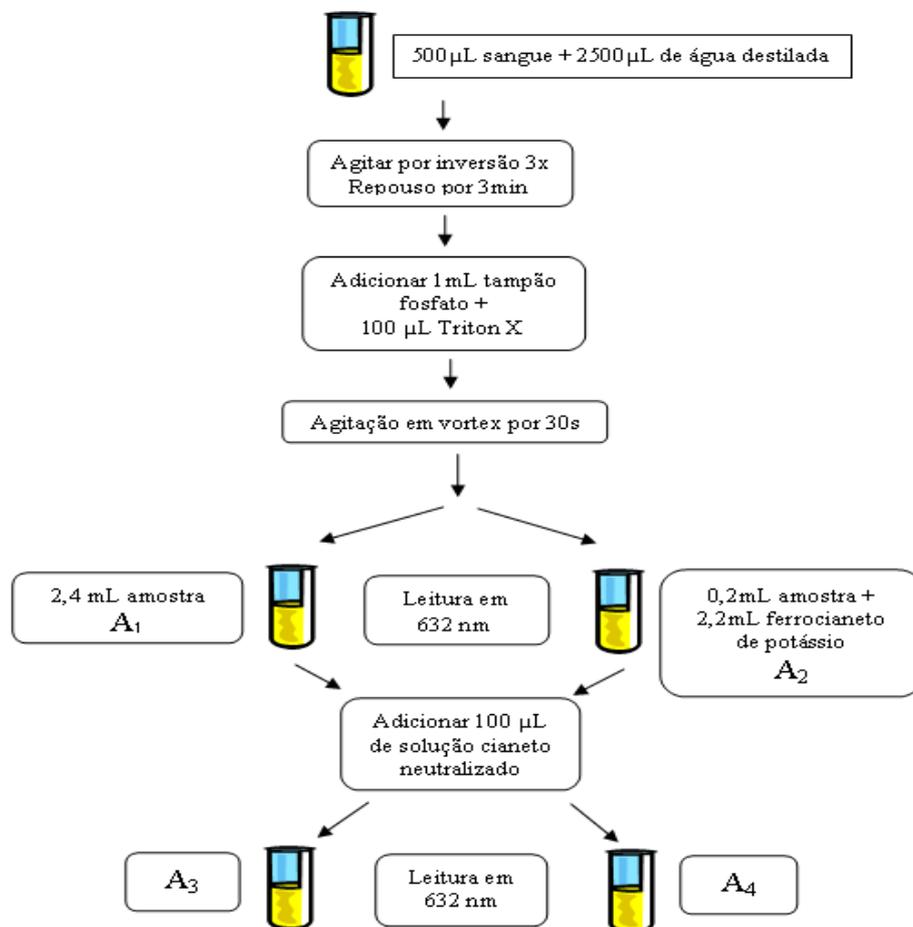


Figura 23: Esquema da técnica de metemoglobina, descrita por Evelyn e Malloy (1938). Fonte: Hegesh et al. (1970).

Após a leitura das absorbâncias, calculou-se o percentual de %MetHb pela seguinte equação.

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

Onde:

12: fator de correção

$A_1 - A_2$: porcentagem de metemoglobina na amostra

$A_3 - A_4$: 100% de metemoglobina

4.7 Determinação da atividade da superóxido dismutase

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

Após os processos descritos no item 5.2.3, foi obtido um hemolisado a partir de 50 µL dos grupos estudados. Uma alíquota deste 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 à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e, após 15 min, foi realizada uma única leitura na faixa de 550 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimatzu).

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

4.8 Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada conforme, o método descrito por Aebi (1984), as suspensões de eritrócitos foram hemolisadas em água gelada (1:3) para em seguida serem diluídas em tampão TRIS base (Tampão Tris 1 M/EDTA 5mM pH8,0). No entanto, para verificar o decaimento do H₂O₂ (Merck), alíquotas das amostras diluídas foram adicionados a 900µL de solução de reação (Tampão TRIS

base, H₂O₂ 30% e água ultrapura) pH 8, sendo que cada amostra continha seis réplicas (BUKOWSKA e KOWALSKA, 2004). A diminuição da concentração de H₂O₂ foi verificada a $\lambda=240$ nm a 25°C durante 60 segundos. A atividade de catalase foi definida como a atividade necessária para degradar um 1 mol H₂O₂ em 60 seg, em pH 8 a 25°C, sendo expressa como U/mg Hb nos eritrócitos (BUKOWSKA e KOWALSKA, 2004). O coeficiente de extinção molar H₂O₂ utilizado para o cálculo foi de 39,4 cm²/mol.

4.9 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida

A determinação dos níveis intracelulares da forma reduzida da GSH baseia-se na capacidade da GSH em reduzir o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich) para ácido nitrobenzóico (TNB), o qual foi quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm (VASCONCELOS et al. 2007). Para as determinações das concentrações de GSH foi utilizada a metodologia adaptada de Ellman, 1959, que retira da papa de hemácias resultante uma alíquota de 20 μ L em tubo de ensaio e adiciona a este tubo 20 μ L de água destilada e 3 mL de tampão PBS/EDTA para que seja realizada a 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) para que seja determinada a concentração de GSH expressa em μ g/ml.

4.10 Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TEAC)

Foi determinada de acordo com a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico; Sigma-Aldrich 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 (Sigma-Aldrich A1888) com persulfato de potássio (K₂S₂O₈; Sigma-Aldrich 60490), produzindo diretamente o radical cátion ABTS^{•+}, cromóforo de coloração verde/azul. A adição de antioxidantes a este radical cátion 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 absorvância lida a 734nm durante cinco minutos (Fento, São Paulo, Brasil; 800 XI). Assim, foi determinada a atividade antioxidante total da amostra, sendo calculada a sua relação com a reatividade do Trolox como padrão, através da realização de curva padrão sob as mesmas condições.

4.11 Dosagem de Malondialdeído (MDA)

Este método avalia a peroxidação lipídica e foi utilizado como um indicador do estresse oxidativo. Esta técnica baseia-se na reação do malondialdeído (MDA) e outras substâncias com o ácido tiobarbitúrico (TBA; Sigma-Aldrich T5500), em pH baixo e temperatura elevada, formando o complexo MDA-TBA de cor rósea, com absorvância em 535 nm.

O procedimento técnico foi realizado de acordo com fundamentos propostos por Khonn & Livesedge (1944), adaptados por Percário et al. (1994), método que consiste no preparo inicial do fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4 75 mM, Synth, 35210) em água acidificada (pH 2,5). Esta solução é utilizada na preparação do TBA (10 nM). Adiciona-se 500 μl de amostra à 1000 μl da solução de ácido tiobarbitúrico 10 nM. Em seguida leva-se ao banho-maria (95°C x 60 min); após a incubação deixa-se esfriar a temperatura ambiente; adiciona-se 4,0 ml de álcool 1-butílico, homogeneiza-se bem em vórtex e posteriormente submete-se a centrifugação a 175 x g (15 min); coleta-se 3,0 ml do sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535 nm. Utilizou-se como padrão o 1,1,3,3, tetrahidroxipropano (Sigma-Aldrich, T9889) para a realização da curva padrão.

4.12 Avaliação da produção de espécies reativas (EROs) em leucócitos e eritrócitos por ensaio com DCFH

A produção de EROs foi avaliada através da utilização do DCFH-DA, que é considerada uma excelente ferramenta para verificar a liberação de EROs em células, tais como radical hidroxila, peroxila, radical alcoxila, peroxinitrito, bem como H_2O_2 (WANG e JOSEPH, 1999). As suspensões de eritrócitos a 5% e a obtenção de leucócitos foram pré-tratadas com a concentração mais eficazes de NAC e *A. brasiliensis* em inibir MetHb *in vitro*. Mediante isto, os eritrócitos e os leucócitos pré-

tratados foram incubados com DDS-NOH (2,5 µg/mL) por 30 min a 37°C, em seguida foi adicionado o DCFH-DA (10mM) e imediatamente feito uma leitura (tempo zero) e logo a cada 5 minutos até 30 minutos (sempre deixando a placa no fluorímetro a 37° C), utilizando o programa EROs. Como controle positivo foi usado TBHP e como controle negativo metanol (LISOVSKAYA et al. 2009).

O método consiste na capacidade do DCFH-DA atravessar a membrana celular e ser hidrolisado por esterases celulares, onde sofre um processo de oxidação, culminando no surgimento da forma fluorescente, diclorofluoresceína (DCF). A fluorescência foi medida nos eritrócitos pela técnica de fluorímetro, com excitação de $\lambda=488\text{nm}$ (laser azul) e com um filtro de emissão de $\lambda=530\text{ nm}$ (RICHARD et al, 2002; GRASSO et al, 2003).

4.13- Avaliação do dano em DNA de leucócitos expostos a DDS-NOH e do potencial antioxidante da NAC e *A. brasiliensis*

4.13.1- AMOSTRA SANGUÍNEA

A amostra sanguínea foi obtida semelhante a forma descrita no item 4.2.

4.13.2- INCUBAÇÃO DA AMOSTRA SANGUÍNEA EM MEIO DE CULTURA

Em tubos contendo 4,5ml de RPMI suplementado com antibióticos e fitohemaglutinina, adicionaram-se doze gotas do plasma obtido da amostra sanguínea referida no ítem anterior. Os tubos fechados foram ressuspendidos por inversão e os leucócitos levados as placas para os tratamentos.

4.13.3- TRATAMENTO E NOVA INCUBAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de cada tubo receberam os seguintes tratamentos: os grupos controles foram tratados com RPMI, metanol, NAC e *A. brasiliensis*. O grupo controle positivo foi adicionado 50 µL de TBHP (200 µM). Os outros grupos foram tratados com os antioxidantes e incubados com a DDS-NOH (2,5 µg/mL), e grupo incubado apenas com a DDS-NOH (2,5 µg/mL). O tratamento de todos os grupos foi de três horas na estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.13.4- DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO COMETA

O experimento foi realizado dispondo de oito amostras diferentes para a preparação da segunda camada do ensaio cometa: controle positivo (amostra exposta a substância genotóxica-TBHP), controles negativos (amostra exposta ao RPMI, metanol, NAC e *A. brasiliensis*), amostra exposta a DDS-NOH (2,5 µg/mL) e a concentração mais eficaz de NAC/ *A. brasiliensis* em prevenir MetHb.

Cada amostra, embebida em gel de agarose de baixo ponto de fusão, foi depositada sobre a superfície de uma lâmina, previamente coberta com agarose comum ou “standard”. Após solidificação da segunda camada, as lâminas foram mergulhadas em solução final de lise durante 24 horas a 4°C. As células imersas nessa solução foram lisadas, tendo separadas seu conteúdo citoplasmático e a membrana nuclear.

Após esse processo, as lâminas foram imersas em tampão de eletroforese a 4°C durante 20 minutos. Este processo visa o desnovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento das estruturas secundária e terciária presentes no núcleo dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras. A corrida de eletroforese foi realizada por 20 minutos, potência de 22,57V (0,74V/cm-1), corrente de 300 mA e temperatura de 4°C.

Passado tal processo, as lâminas foram lavadas com água destilada e, posteriormente, deixadas imersas durante cinco minutos, ainda em água destilada. Para fixá-las, utilizou-se Etanol absoluto, deixando-as imersas nesta solução por três minutos. As lâminas foram armazenadas em condições adequadas até o momento de análise.

A análise envolve a contagem aleatória de 100 células, não justapostas, por lâmina/tratamento. Para a leitura, as lâminas foram coradas com brometo de etídio. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência, filtro de 516 a 560 nm e aumento de 400x. A classificação visual dos nucleóides foi baseada na migração dos fragmentos de DNA, corados com brometo de etídio.

Os critérios de classificação dos nucleóides, segundo Collins et al. (1995), foram feitos com base no tamanho da cauda, diâmetro do núcleo e intensidade de coloração e são divididos em cinco categorias (Figura 24).

- Classe 0 (sem cauda aparente e núcleo grande): nenhum dano.
- Classe 1 (cauda pequena e nucleóide grande): pouco dano.
- Classe 2 (nucleóide e cauda de tamanhos médios): dano médio.
- Classe 3 (nucleóide de tamanhos médios e cauda de tamanhos grandes): dano grande.
- Classe 4 (núcleo pouco aparente, cauda longa e difusa): núcleo apoptótico.

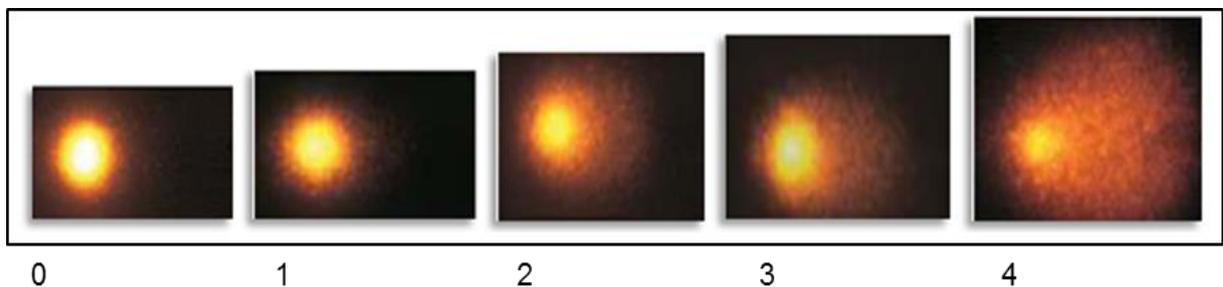


Figura 24: Níveis de classificação de células preparadas em ensaio cometa. Fonte: COLLINS et al. 1995

Por fim, foi calculado o escore visual, multiplicando o número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe correspondente. O valor pode variar de 0 (ausência de danos) a 400 (todas as células com o máximo de dano). O método escolhido para a avaliação do ensaio cometa foi o visual, que segundo Kobayashi et al. (1995), é mais rápido e apresenta sensibilidade igual ou superior a análise de imagem computadorizada.

4.14- Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism 5.1 (2007), para análise de variância uma via, seguida do teste de Tukey nos pares de médias da curva dose resposta DDS-NOH e para os demais experimentos. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e considerados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Curva dose-resposta da DDS-NOH em eritrócitos *in vitro*

A fim de verificar *in vitro*, o efeito de diferentes concentrações da DDS-NOH (2,5; 5,0; 7,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) na formação de %MetHb em eritrócitos de voluntários sadios, incubou-se essas células por 60 min a 37°C, conforme descrito no item 4.5.1.

A figura 25 mostra que a DDS-NOH em todas as concentrações testadas foi capaz de induzir significativamente o aumento do %MetHb ($*p \leq 0,05$), em relação as células expostas ao metanol. Além disso, observou-se que o efeito metemoglobinizante da DDS-NOH foi dose dependente ($\#p \leq 0,05$).

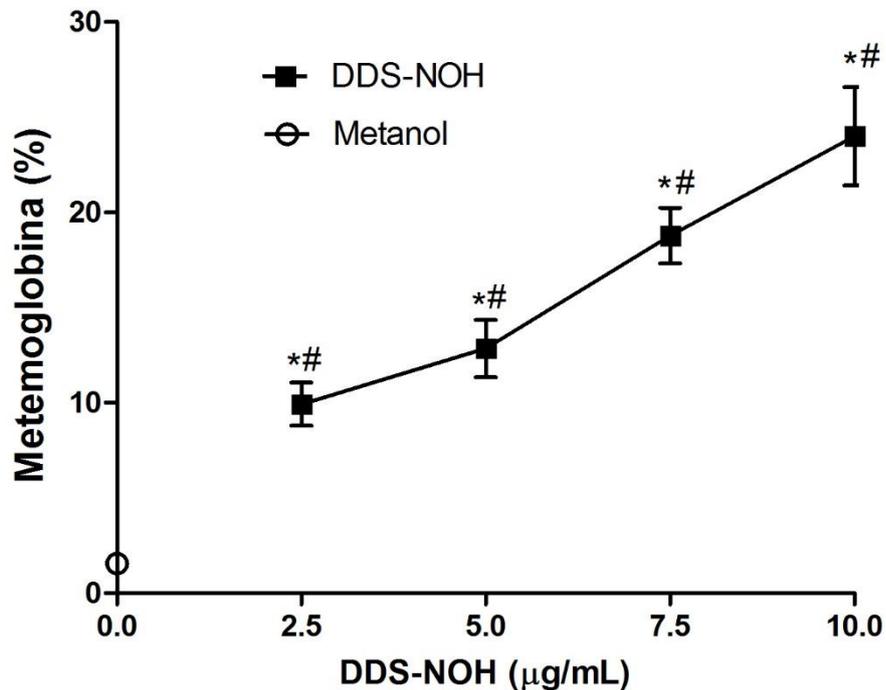


Figura 25: Percentual de MetHb em suspensão de eritrócitos normais expostos a DDS-NOH, nas concentrações 2,5; 5,0; 7,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, *in vitro*. No grupo controle, os eritrócitos foram expostos ao metanol (solvente). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. $*p \leq 0,05$ comparado ao grupo com metanol. $\# p \leq 0,05$ entre as concentrações do grupo exposto a DDS-NOH.

5.2 Efeito do Pré e Pós-tratamento da NAC na formação de MetHb induzida pela DDS-NOH em eritrócitos *in vitro*

A figura 26a mostra que o pré-tratamento com NAC em todas as concentrações foram capazes de inibir significativamente o %MetHb ($\#p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g/mL}$). Sendo que, a concentração de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ foi a mais eficaz entre as concentrações de NAC ($p \leq 0,001$). Por esse motivo, a concentração de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ de NAC foi a escolhida para os próximos experimentos da curva temporal.

Em relação ao pós-tratamento com NAC, na figura 26b é possível observar que somente as concentrações 1,6 e 4,8 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de reverter o %MetHb ($\#p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, as concentrações de 16, 48 e 163 $\mu\text{g/mL}$ potencializaram o %MetHb ($\#p \leq 0,05$), mostrando que nessas concentrações a NAC assume um potencial pró-oxidante capaz de induzir MetHb *in vitro*.

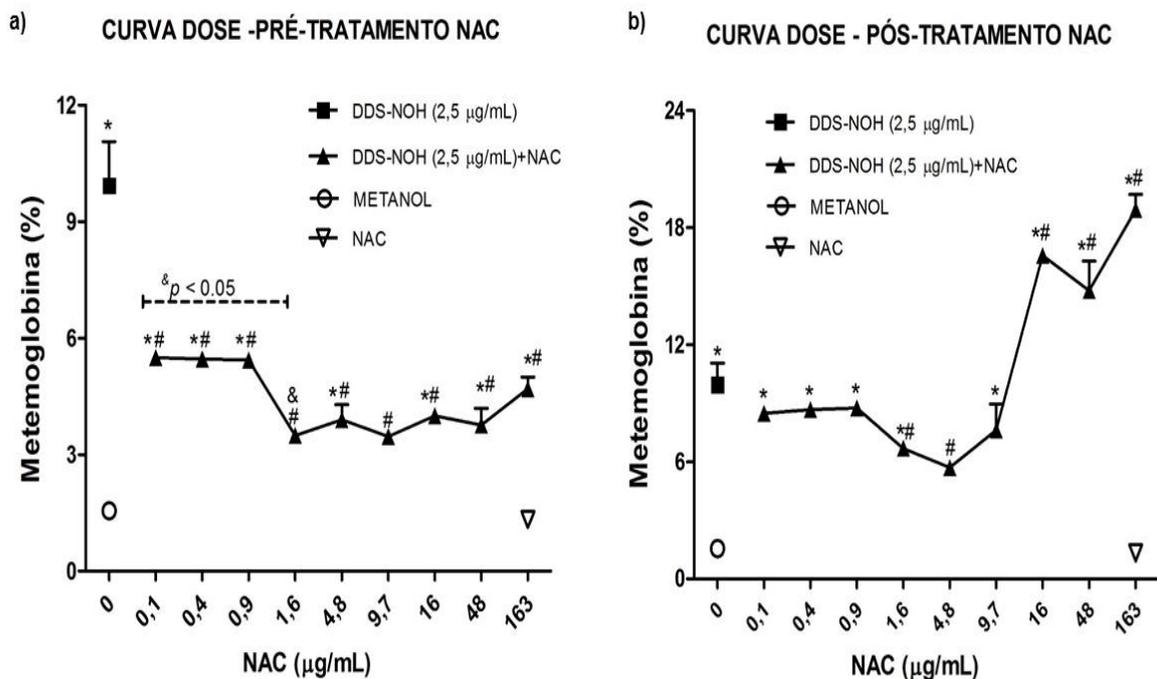


Figura 26: Percentual de MetHb induzida por DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g/mL}$) em suspensão de eritrócitos normais que foram pré e pós-tratados com NAC (0,1; 0,4; 0,9; 1,6; 4,8; 9,7; 16; 48; 163 $\mu\text{g/mL}$) por 60 min a 37°C *in vitro*. Como grupos controles, utilizaram-se células incubadas somente com NAC e metanol. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo com metanol; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto ao DDS-NOH; & $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g/mL}$) + NAC.

5.3 Efeito do Pré e Pós-tratamento do *A. brasiliensis* na formação de MetHb induzida pela DDS-NOH em eritrócitos *in vitro*

A figura 27a mostra que no pré-tratamento com a *A. brasiliensis*, todas as concentrações (2,2; 6,7; 22,5 µg/ml) foram capazes de inibir significativamente o %MetHb ($\#p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo DDS-NOH (2,5 µg/mL), sendo que este efeito não foi dose-dependente.

Entretanto, no pós-tratamento com *A. brasiliensis*, na figura 27b, observa-se que somente a concentração de 6,7 µg/mL foi capaz de reverter significativamente o %MetHb ($\#p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo DDS-NOH (2,5 µg/mL). Com isso, esta concentração foi escolhida para os ensaios da curva temporal.

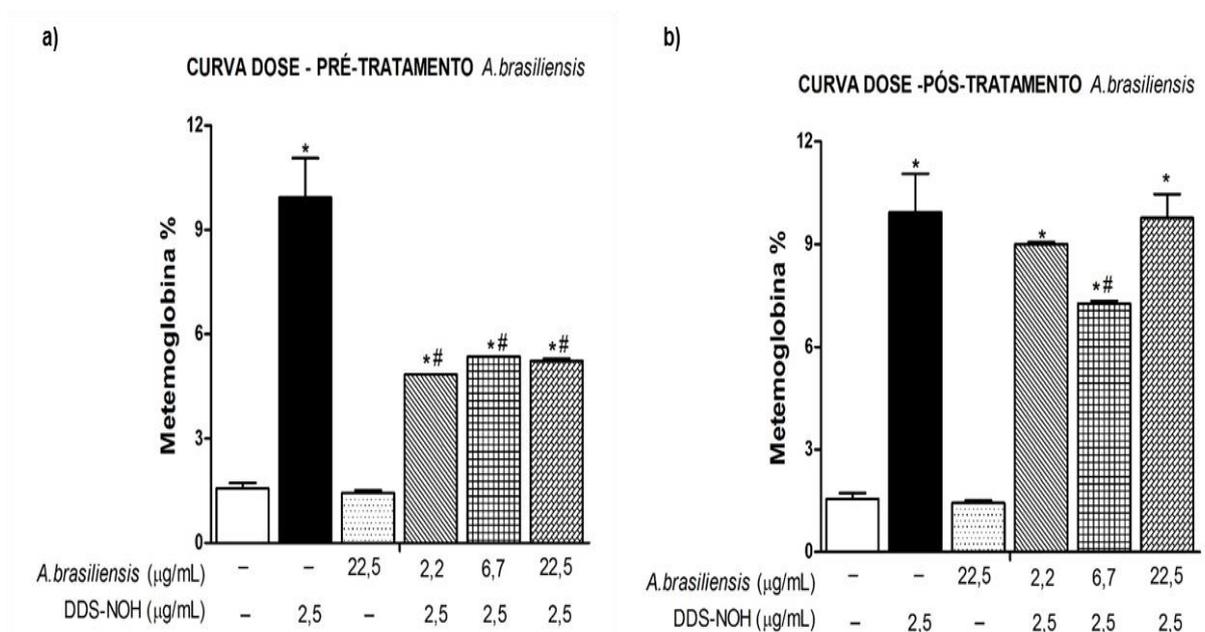


Figura 27: Percentual de MetHb induzida por DDS-NOH (2,5 µg/mL) em suspensão de eritrócitos normais que foram pré e pós-tratados com *A. brasiliensis* (2,2; 6,7; 22,5 µg/ml) por 60 min a 37°C *in vitro*. Como grupos controles, utilizaram-se células tratadas somente com *A. brasiliensis* e metanol. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo com metanol; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

5.4 Efeito do Pré e Pós-tratamento da GSH-EE na formação de MetHb induzida pela DDS-NOH em eritrócitos *in vitro*

A figura 28a mostra que no pré-tratamento com a GSH-EE, a partir da concentração de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ foi capaz de inibir significativamente o %MetHb ($\# p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g/mL}$).

Entretanto, no pós-tratamento com GSH-E, na figura 28b, observa-se que somente as concentrações de 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$ foram capaz de reverter significativamente o %MetHb ($\#p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g/mL}$), sendo esta concentração escolhida para os ensaios da curva temporal.

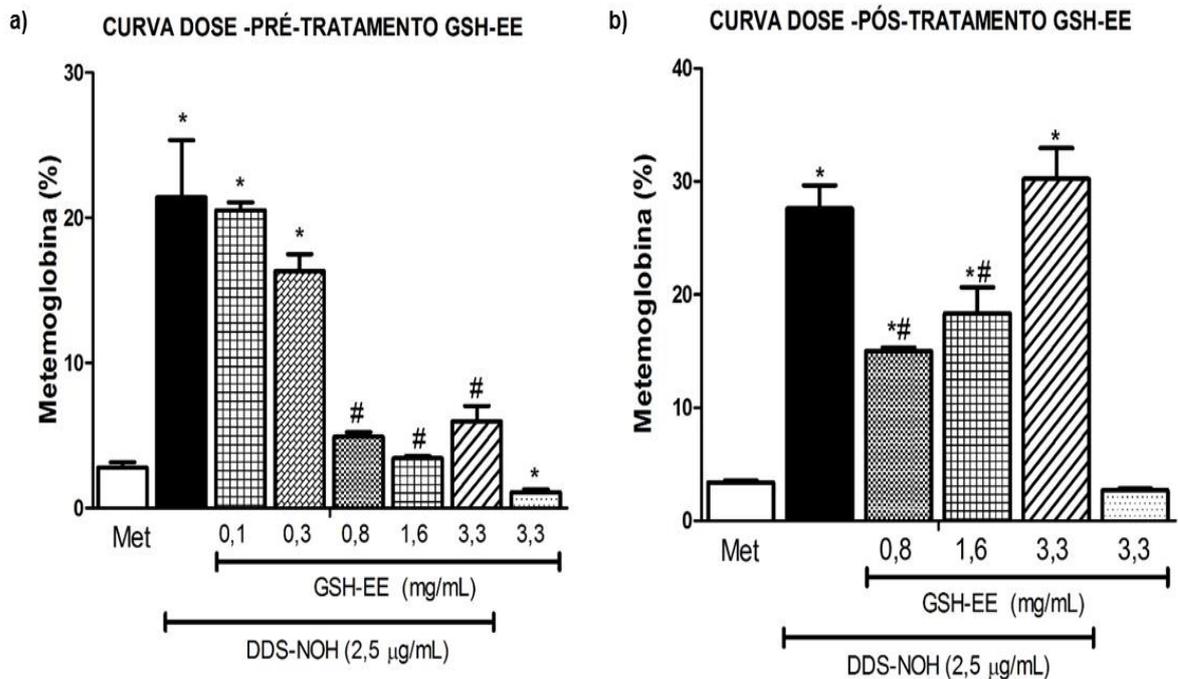


Figura 28: Percentual de MetHb induzida por DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g/mL}$) em suspensão de eritrócitos normais que foram pré e pós-tratados com GSH-EE (0,1; 0,3; 0,8; 1,6; 3,3 mg/ml) por 60 min a 37°C *in vitro*. Como grupos controles, utilizaram-se células incubadas somente com GSH-EE e metanol. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo com metanol; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 $\mu\text{g/mL}$).

5.5 Avaliação temporal do pré-tratamento de NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos *in vitro*

A figura 29a e 29b mostra que o pré-tratamento com a NAC ou *A. brasiliensis* a partir de 60 min foi capaz de proteger as células do efeito metemoglobinizante induzido pela DDS-NOH (2,5µg/mL) (# $p \leq 0,05$). Por outro lado, a partir de 30 min, a GSH-EE foi capaz de prevenir a %MetHb (# $p \leq 0,05$), porém em uma concentração mais elevada (0,8 mg/mL) quando comparado ao NAC (1,6 µg/mL) e o *A. brasiliensis* (6,7 µg/mL).

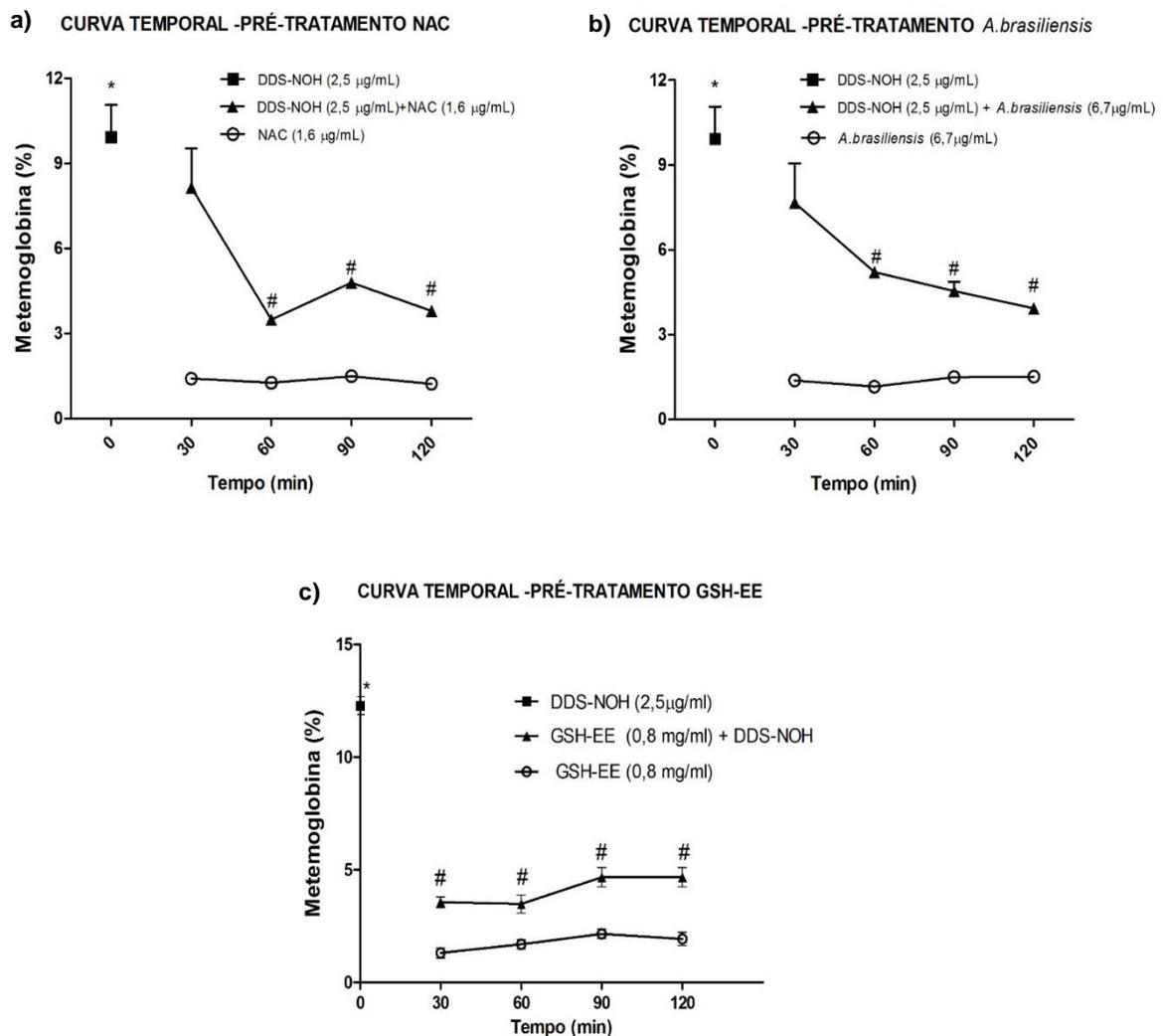
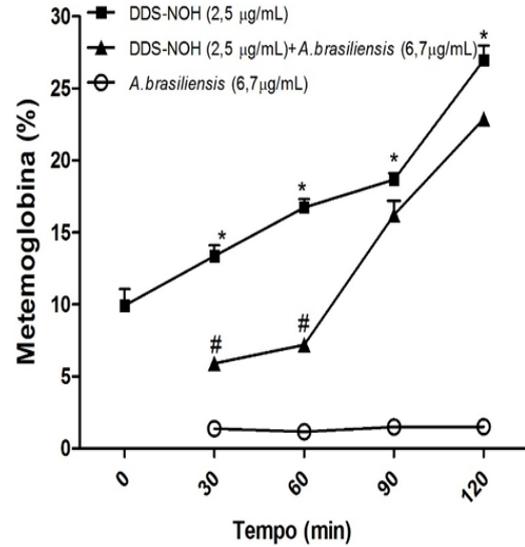
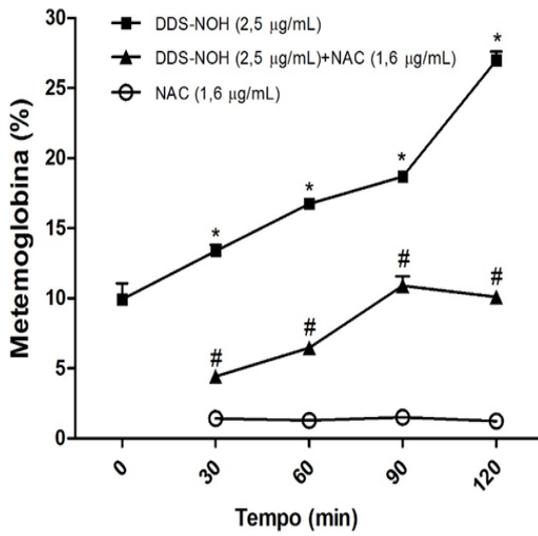


Figura 29: Percentual de MetHb induzida por DDS-NOH (2,5 µg/mL) em suspensão de eritrócitos normais que foram pré-tratados com NAC (1,6 µg/mL), *A. brasiliensis* (6,7 µg/mL) e GSH-EE (0,8 mg/mL) por diferentes tempos (60 30, 60, 90 e 120 min). Como grupos controles, utilizaram-se células tratadas somente com NAC (1,6 µg/mL), *A. brasiliensis* (6,7 µg/mL) e GSH-EE (0,8 mg/mL). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle somente com o antioxidante; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

5.6 Avaliação temporal do pós-tratamento da NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE na formação de MetHb induzida por DDS-NOH em eritrócitos *in vitro*

Os dados mostram que a capacidade metemoglobinizante da DDS-NOH é dependente do tempo de exposição, assim quanto maior o tempo de exposição a DDS-NOH maior será o % MetHb (Figura 30 a, b e c). Além disso, na figura 30^a, observa-se que todos os tempos de pós-tratamento com a NAC (30, 60, 90 e 120 min) foram eficazes em reverter significativamente o %MetHb induzida pelo DDS-NOH (2,5 µg/mL). Por outro lado, somente os tempos de 30 e 60 min de pós-tratamento com *A. brasiliensis* foram eficazes em reverter significativamente o %MetHb induzido pela DDS-NOH (2,5 µg/mL) (Figura 30b). De maneira semelhante, a GSH-EE foi capaz de reverter o %MetHb nos tempos de 60, 90 e 120 min (Figura 30c).

a) CURVA TEMPORAL - PÓS-TRATAMENTO NAC b) CURVA TEMPORAL - PÓS-TRATAMENTO *A. brasiliensis*



c) CURVA TEMPORAL - PÓS-TRATAMENTO GSH-EE

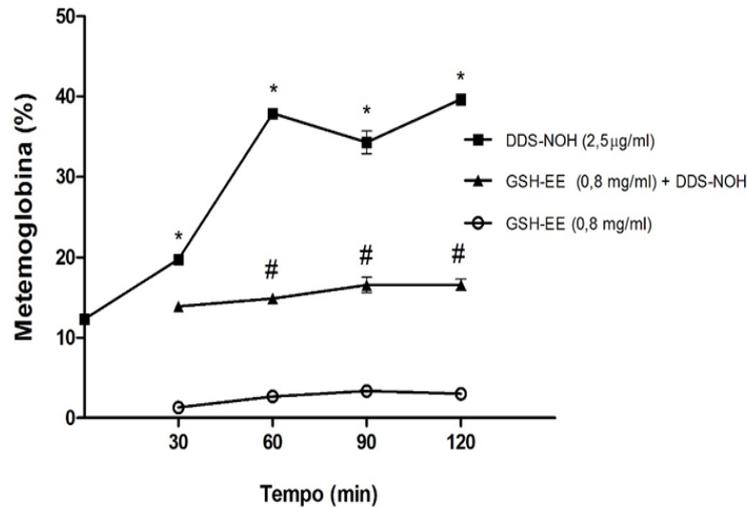


Figura 30: Percentual de MetHb induzida por DDS-NOH (2,5 µg/mL) em suspensão de eritrócitos normais que foram pós-tratados com NAC (1,6 µg/mL), *A. brasiliensis* (6,7 µg/ml) e GSH-EE (0,8 mg/ml) por diferentes tempos (60 30, 60, 90 e 120 min). Como grupos controles, utilizaram-se células tratadas somente com NAC (1,6 µg/mL), *A. brasiliensis* (6,7 µg/ml) e GSH-EE (0,8 mg/ml). Os dados foram expressos em média ± desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle somente com o antioxidante. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto ao DDS-NOH (2,5 µg/mL).

5.7 Comparações entre os efeitos do pré e pós-tratamento anti-metemoglobinizante do AM, NAC e *A. brasiliensis* em eritrócitos *in vitro*

De acordo com a figura 31a, o pré-tratamento com AM (15ng/mL), utilizado como controle positivo, foi o mais eficaz em inibir significativamente o %MetHb induzida pela DDS-NOH (2,5 µg/mL), se comparado ao NAC (1,6 µg/mL) e *A. brasiliensis* (6,7 µg/mL). De maneira similar, também foi observado que o pós-tratamento com AM foi mais eficaz em reverter significativamente o % MetHb ($p \leq 0,05$) quando comparado a NAC e o *A. brasiliensis* (Figura 31b).

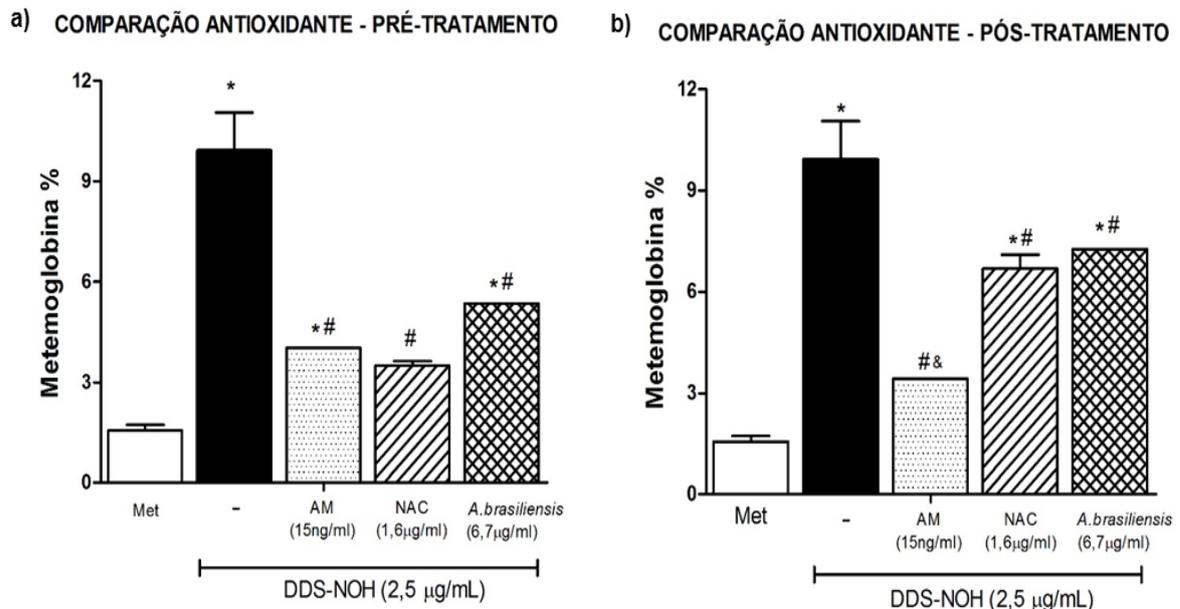


Figura 31: Comparação das médias do % MetHb obtidas em suspensão de eritrócitos normais pré e pós-tratamentos com AM (15ng/mL), NAC (1,6 µg/mL) e *A. brasiliensis* (6,7 µg/mL) *in vitro*. O grupo controle foi incubado somente com metanol. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo com metanol; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL). & $p \leq 0,05$ comparado ao grupo NAC (1,6 µg/mL) e *A. brasiliensis* (6,7 µg/mL).

5.8 Efeito do pré e pós-tratamento com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE na atividade da SOD em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) *in vitro*

A atividade da SOD eritrocitária foi avaliada em suspensões de eritrócitos pré e pós-tratados com a concentração mais eficaz de NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE que preveniu e reverteu o %MetHb, conforme a figura 32 (a e b).

Em relação ao pré-tratamento, a figura 32a mostra que a DDS-NOH (2,5µg/mL) aumentou a atividade de SOD após 60 min de pós-incubação, por outro lado a NAC e o *A. brasiliensis* foram capazes de reduzir a atividade de SOD induzido pelo DDS-NOH (2,5µg/mL).

Na avaliação de pós-tratamento com os antioxidantes (NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE), a figura 32b mostra que a DDS-NOH (2,5µg/mL) reduziu a atividade de SOD e o pós-tratamento com os antioxidantes por 60 min foi capaz de reverter a atividade de SOD retornando aos valores basais (grupo MET).

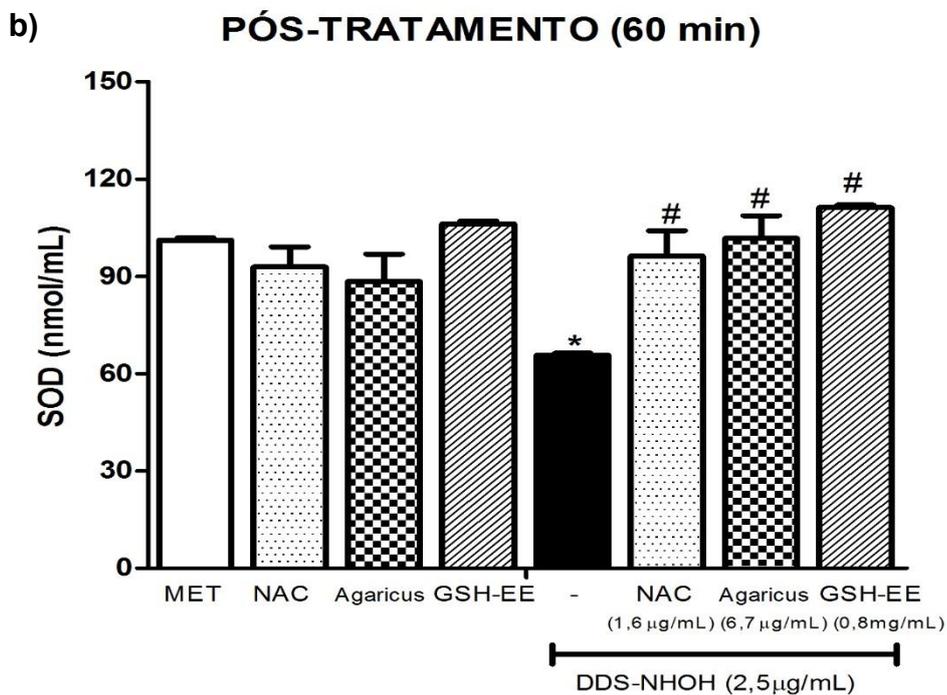
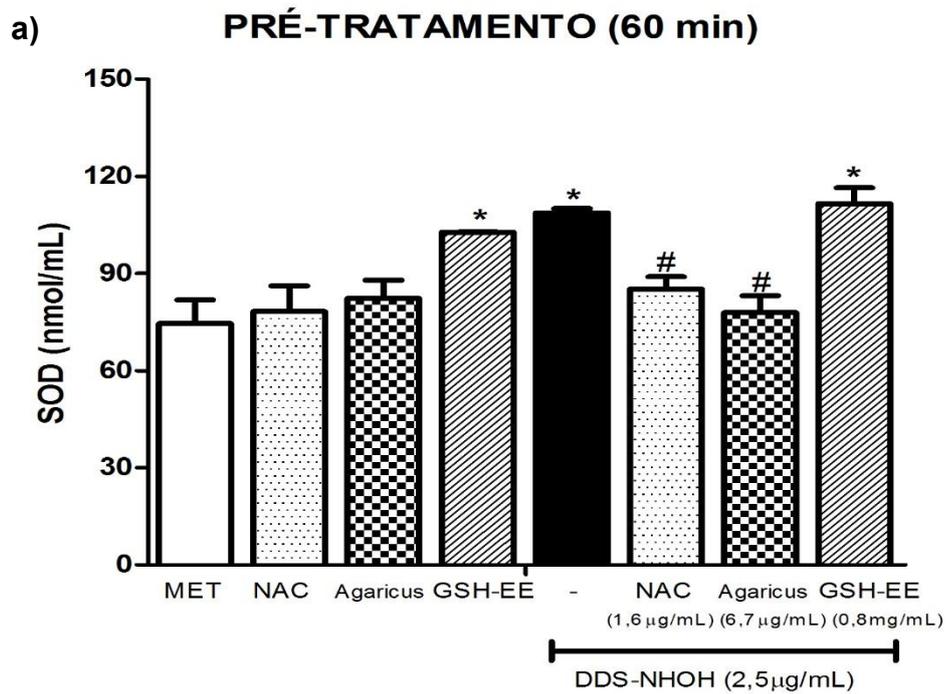


Figura 32: O efeito da DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre a atividade da SOD em suspensão de eritrócitos pré e pós-tratados com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas diferentes. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo com metanol; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

5.9 Efeito do pré e pós-tratamento com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE na atividade da CAT em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) *in vitro*

O efeito da DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre a atividade da CAT eritrocitária foi avaliado em suspensões de eritrócitos pré e pós-tratados com a concentração mais eficaz de NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE que preveniu e reverteu o %MetHb, conforme a figura 33 (a e b).

Em relação ao pré-tratamento, a figura 33a mostra que a DDS-NOH (2,5µg/mL) não alterou a atividade de CAT, permanecendo com valores basais (grupo Met), entretanto, os controles antioxidantes NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE elevaram a atividade desta enzima. O pré-tratamento com NAC e GSH-EE nos eritrócitos incubados com DDS-NOH levou a um aumento da atividade de CAT. Por outro lado, o pré-tratamento com *A. brasiliensis* reduziu a atividade de CAT nos eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/mL).

No pós-tratamento, a figura 33b mostra que a incubação de eritrócitos com DDS-NOH (2,5µg/mL) também não alterou a atividade de CAT, enquanto o pós-tratamento com antioxidantes NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE nos eritrócitos normais e incubados com DDS-NOH levou a redução da atividade de CAT (#p ≤ 0,05) comparado ao grupo DDS-NOH e grupo MET.

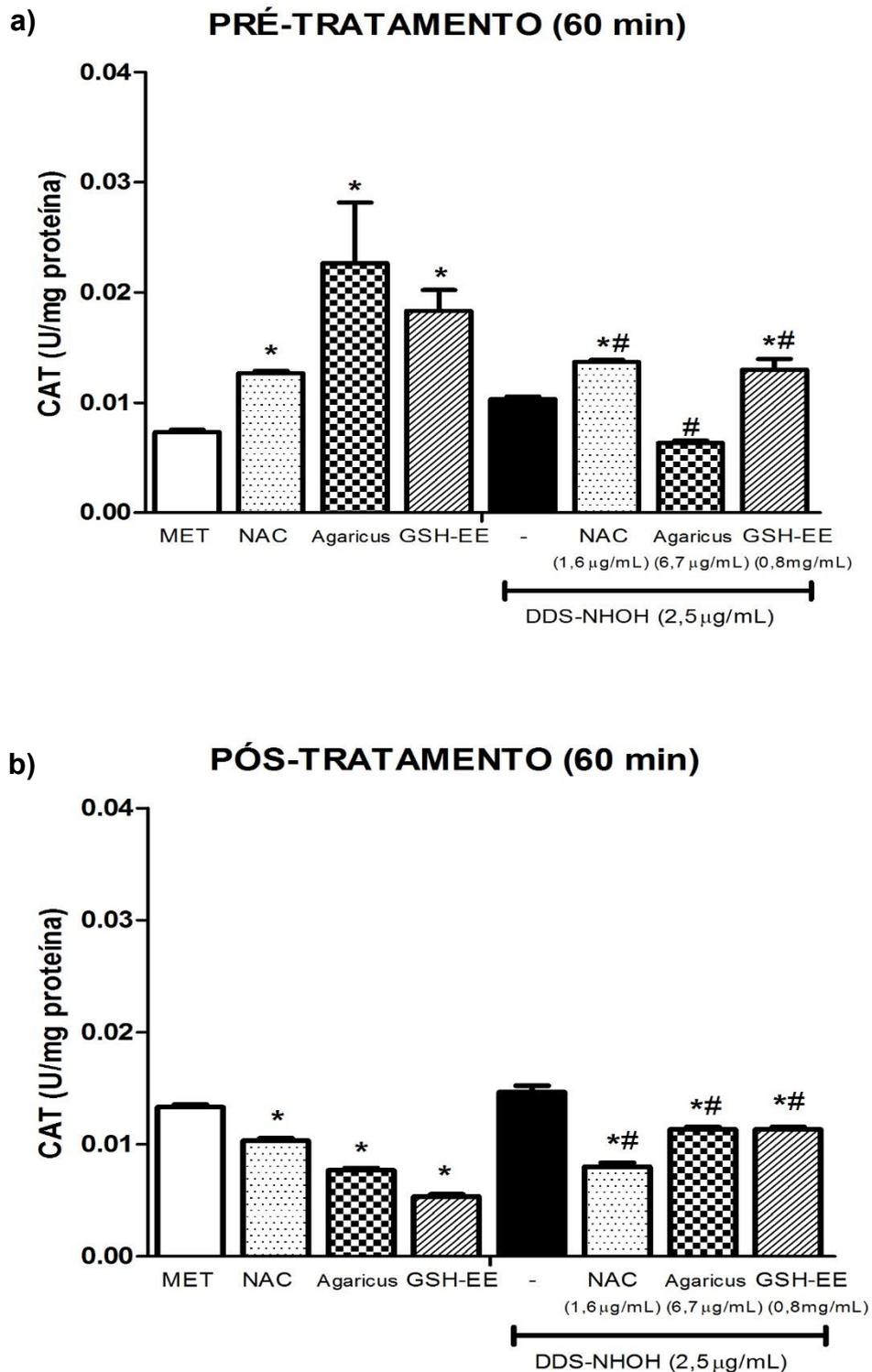


Figura 33: O efeito da DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre a atividade da CAT em suspensão de eritrócitos pré e pós-tratados com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas diferentes. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo com metanol; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

5.10 Efeito do pré e pós-tratamento com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE nos níveis de GSH em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) *in vitro*

O efeito da DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre os níveis de GSH eritrocitária foi avaliado em suspensões de eritrócitos pré e pós-tratados com a concentração mais eficaz de NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE que preveniu e reverteu o %MetHb, conforme a figura 34 (a e b).

Em relação ao pré-tratamento, a figura 34a mostra que a incubação com DDS-NOH (2,5µg/mL) não alterou os níveis de GSH quando comparado ao grupo MET. O pré-tratamento com GSH-EE nos eritrócitos normais aumentou os níveis de GSH em relação aos grupos incubados com DDS-NOH e controle MET. Assim como, o pré-tratamento com NAC e *A. brasiliensis* nos eritrócitos incubados com DDS-NOH também levou um aumento nos níveis de GSH em relação ao grupo DDS-NOH.

No pós-tratamento, a figura 34b mostra que nem o pós-tratamento com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE e nem incubação com DDS-NOH (2,5µg/mL) alteraram os níveis de GSH em relação ao controle metanol.

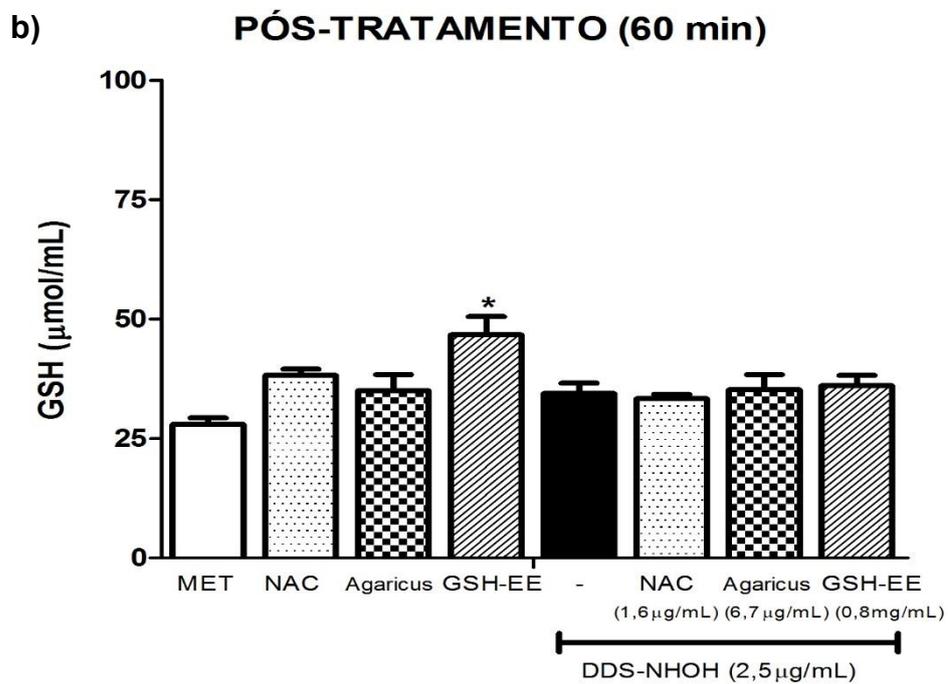
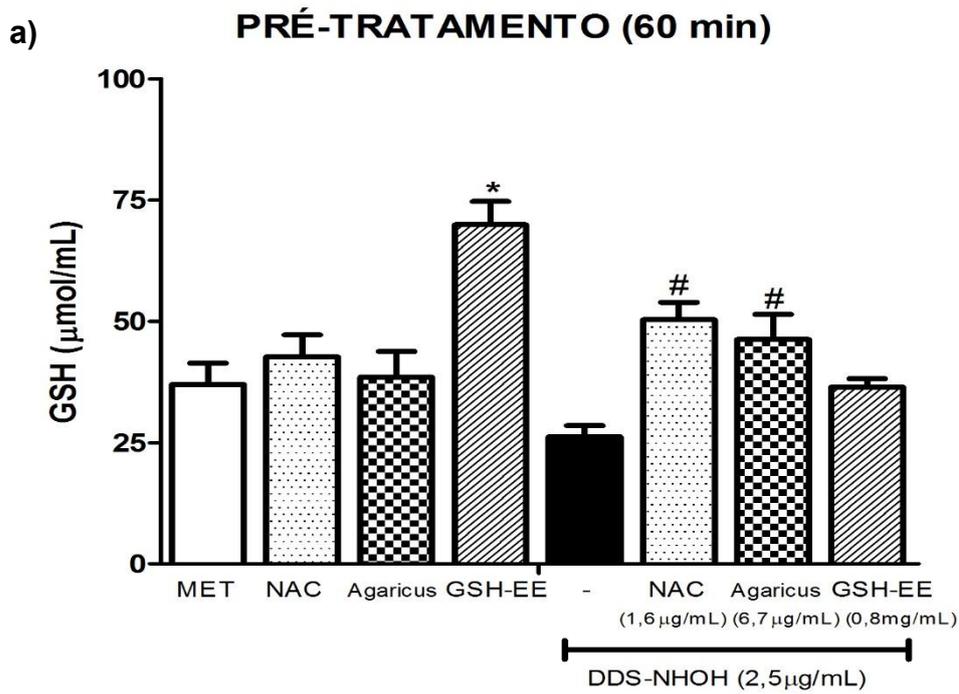


Figura 34: O efeito da DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre a GSH em suspensão de eritrócitos pré e pós-tratados com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas diferentes. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo com metanol; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

5.11 Efeito do pré e pós-tratamento com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE na avaliação de TEAC em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) *in vitro*

O efeito da DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre os níveis de TEAC foi avaliado em suspensões de eritrócitos pré e pós-tratados com a concentração mais eficaz de NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE que preveniu e reverteu o %MetHb, conforme a figura 35 (a e b).

Em relação ao pré-tratamento, a figura 35a mostra que a incubação com DDS-NOH (2,5µg/mL) aumentou os níveis de TEAC, assim como, na presença dos controles antioxidantes NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE, em relação ao controle metanol. No entanto, o pré-tratamento com NAC e *A. brasiliensis* nos eritrócitos incubados com DDS-NOH foi capaz de reverter o aumento nos níveis de TEAC induzidos pela DDS-NOH.

No pós-tratamento, a figura 35b mostra que os controles antioxidantes NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE levaram a um aumento nos níveis de TEAC em relação ao controle metanol. A incubação com DDS-NOH (2,5µg/mL) e o pós-tratamento com antioxidantes nos eritrócitos incubados com DDS não alteraram os níveis basais de TEAC.

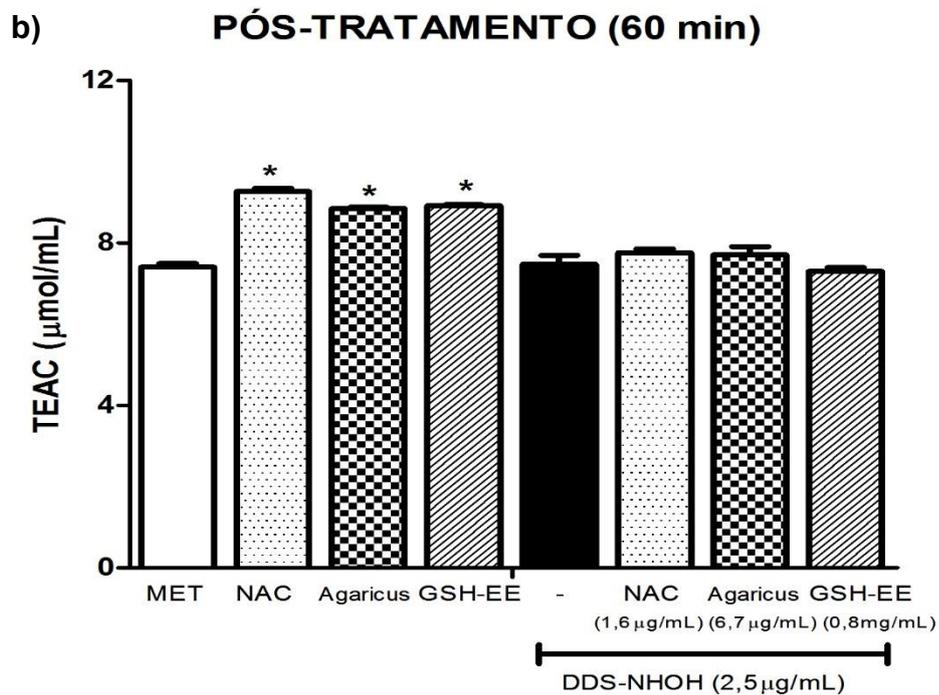
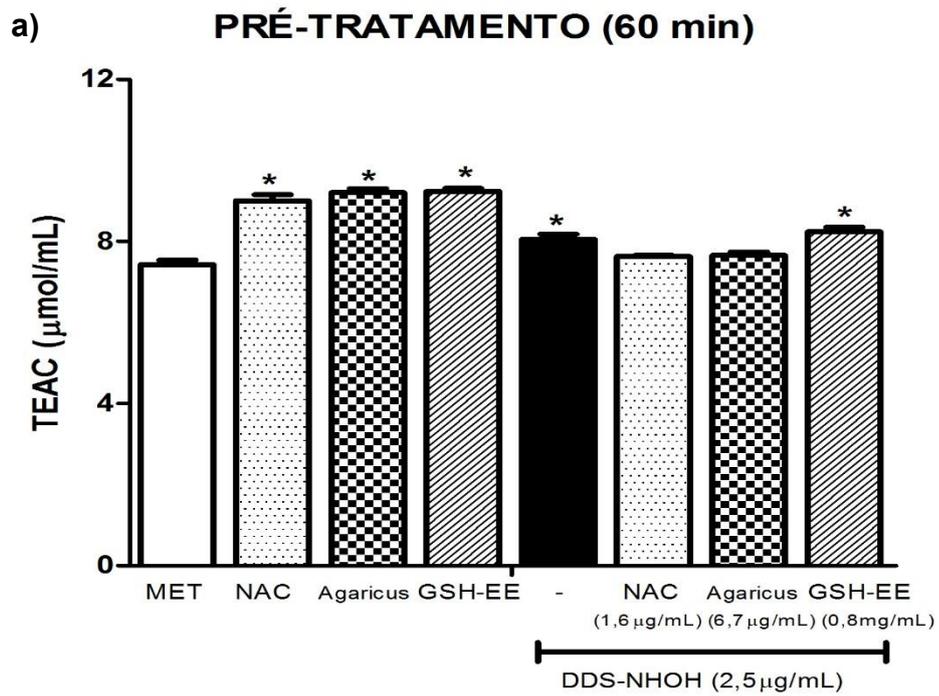


Figura 35: Efeito da DDS-NHOH (2,5 µg/mL) sobre o TEAC em suspensão de eritrócitos pré e pós-tratados com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas diferentes. *p ≤ 0,05 comparado ao grupo com metanol; #p ≤ 0,05 comparado ao grupo exposto a DDS-NHOH (2,5 µg/mL).

5.12 Efeito do pré e pós-tratados com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE nos níveis de MDA em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) *in vitro*

O efeito da DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre os níveis de MDA eritrocitária foi avaliado em suspensões de eritrócitos pré e pós-tratados com a concentração mais eficaz de NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE que preveniu e reverteu o %MetHb, conforme a figura 36 (a e b).

Em relação ao pré-tratamento, a figura 36a mostra que a incubação com DDS-NOH (2,5µg/mL) aumentou os níveis de MDA, e o pré-tratamento com *A. brasiliensis* e, principalmente com o GSH-EE foram capazes de reduzir os níveis de MDA induzido pela DDS-NOH (#p ≤ 0,05).

No pós-tratamento (figura 36b), os dados mostram que a incubação com DDS-NOH (2,5µg/mL) também aumentou os níveis de MDA. Entretanto, somente o pós-tratamento com GSH-EE foi capaz de reverter os níveis de MDA induzido pela DDS-NOH (#p ≤ 0,05).

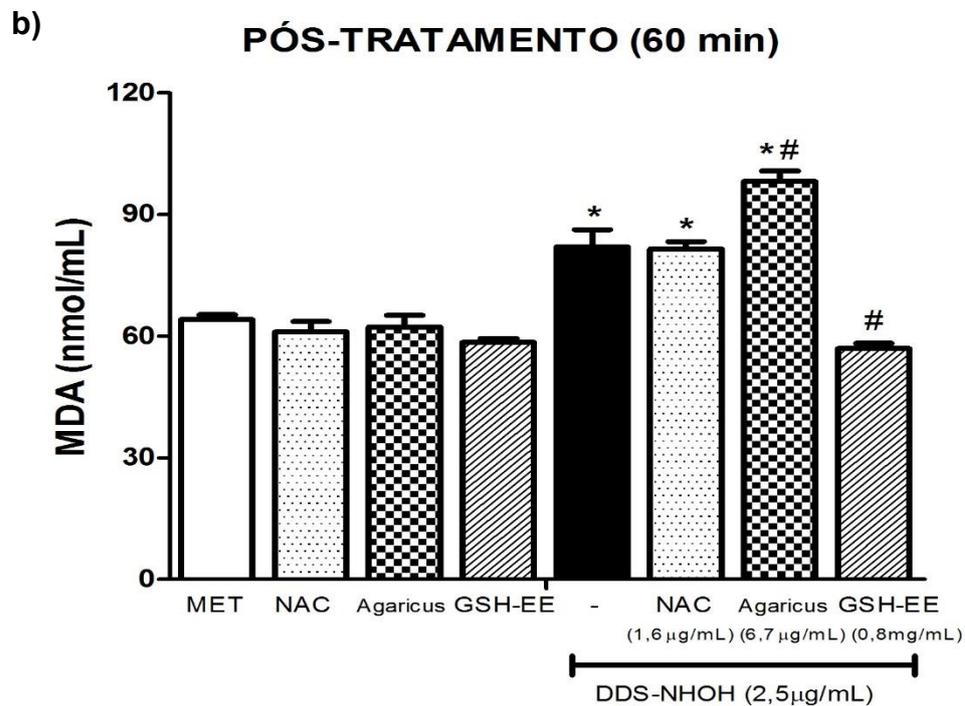
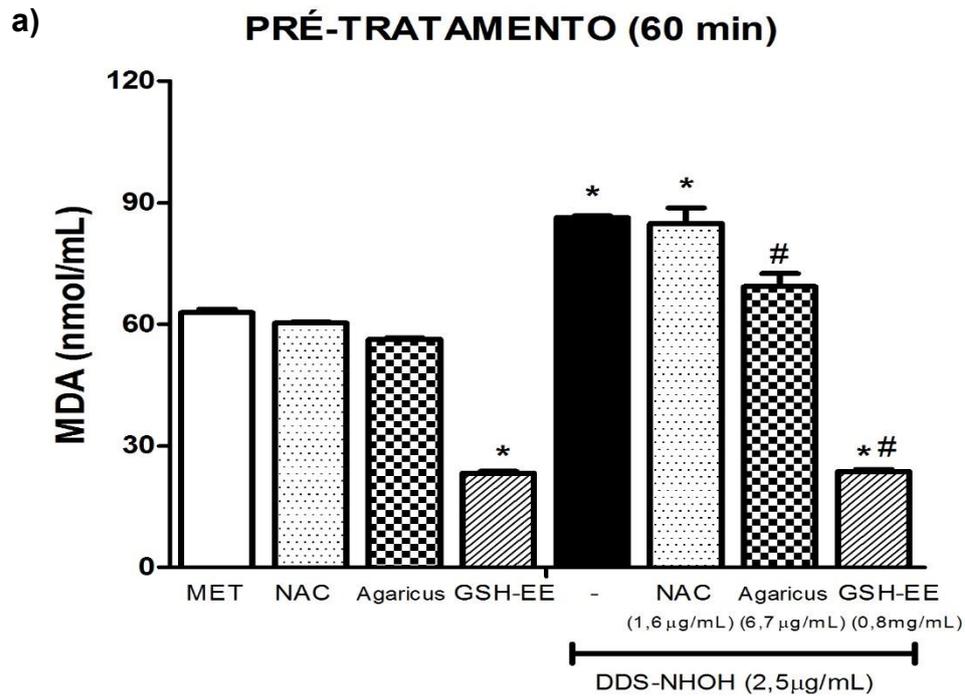


Figura 36: Efeito da DDS-NOH (2,5 µg/mL) sobre o MDA em suspensão de eritrócitos pré e pós-tratados com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas diferentes. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo com metanol; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

5.13 Efeito do pré-tratamento com NAC e *A. brasiliensis* na detecção de EROs intracelulares em suspensões de eritrócitos incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) *in vitro*

Para avaliar a produção de EROs em suspensões de eritrócitos (hematócrito a 5%), estas células foram incubadas com DDS-NOH por 30 minutos e ao mesmo tempo incubadas com DCFH-DA (10mM). Para comparar o efeito oxidativo do DDS-NOH (2,5 µg/mL), utilizou-se o TBHP (40µM), um agente oxidante que é capaz induzir elevados níveis de EROs em eritrócitos. Além disso, foi avaliado o potencial antioxidante da NAC e *A. brasiliensis*, a partir do pré-tratamento de suspensões de eritrócitos a 5% com estes antioxidantes, antes da exposição a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

A figura 37 (a e b) mostra que o TBHP induziu a produção de EROs nos eritrócitos e o pré-tratamento com NAC e *A. brasiliensis* não alterou os níveis de EROs induzidos pelo TBHP. Além disso, a DDS-NOH também induziu a produção de EROs e o pré-tratamento com NAC e o *A. brasiliensis* foi capaz de reduzir os níveis de EROs induzido pela DDS-NOH.

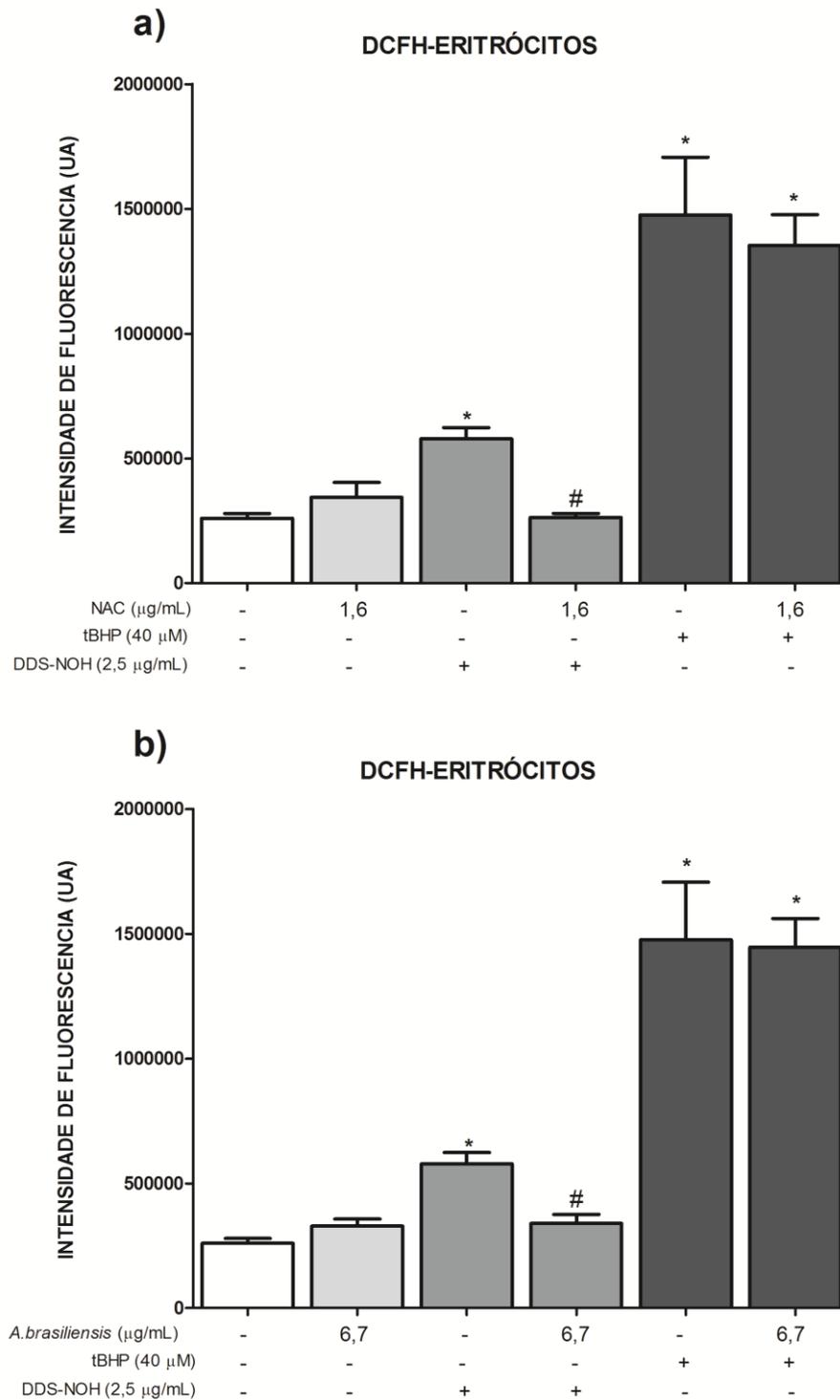


Figura 37: O efeito da DDS-NOH (2,5 µg/ml) e do potencial antioxidante da NAC e *A. brasiliensis* na produção de EROs em suspensão de eritrócitos (Hematócrito a 5%). Os valores são representados pelo percentual de células fluorescentes, as quais indicam a presença de EROs no meio intracelular. O grupo controle positivo foi TBHP (40µM). Os dados foram expressos em % células fluorescentes, sendo os resultados realizados em triplicatas. *p ≤ 0,05 comparado ao grupo com metanol; #p ≤ 0,05 comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

5.14 Detecção de EROs intracelulares em leucócitos pré-tratados com NAC e *A. brasiliensis* incubados com DDS-NOH (2,5µg/ml) *in vitro*

Para avaliar a produção de EROs em leucócitos, estas células foram incubadas com DDS-NOH por 30 minutos e ao mesmo tempo incubadas com DCFH-DA (10mM). Para comparar o efeito oxidativo da DDS-NOH (2,5 µg/mL), utilizou-se o TBHP (40µM), um agente oxidante que é capaz induzir elevados níveis de EROs em leucócitos. Além disso, foi avaliado o potencial antioxidante da NAC e *A. brasiliensis*, a partir do pré-tratamento em leucócitos com estes antioxidantes, antes da exposição a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

A figura 38 (a e b) mostra que a DDS-NOH (2,5 µg/mL) e o TBHP induziram uma produção acentuada de EROs. No entanto, o pré-tratamento com o NAC foi capaz de reduzir os níveis de EROs induzidos pela DDS-NOH e TBHP, enquanto o *A. brasiliensis* somente foi capaz de reduzir a produção de EROs induzidos pelo TBHP.

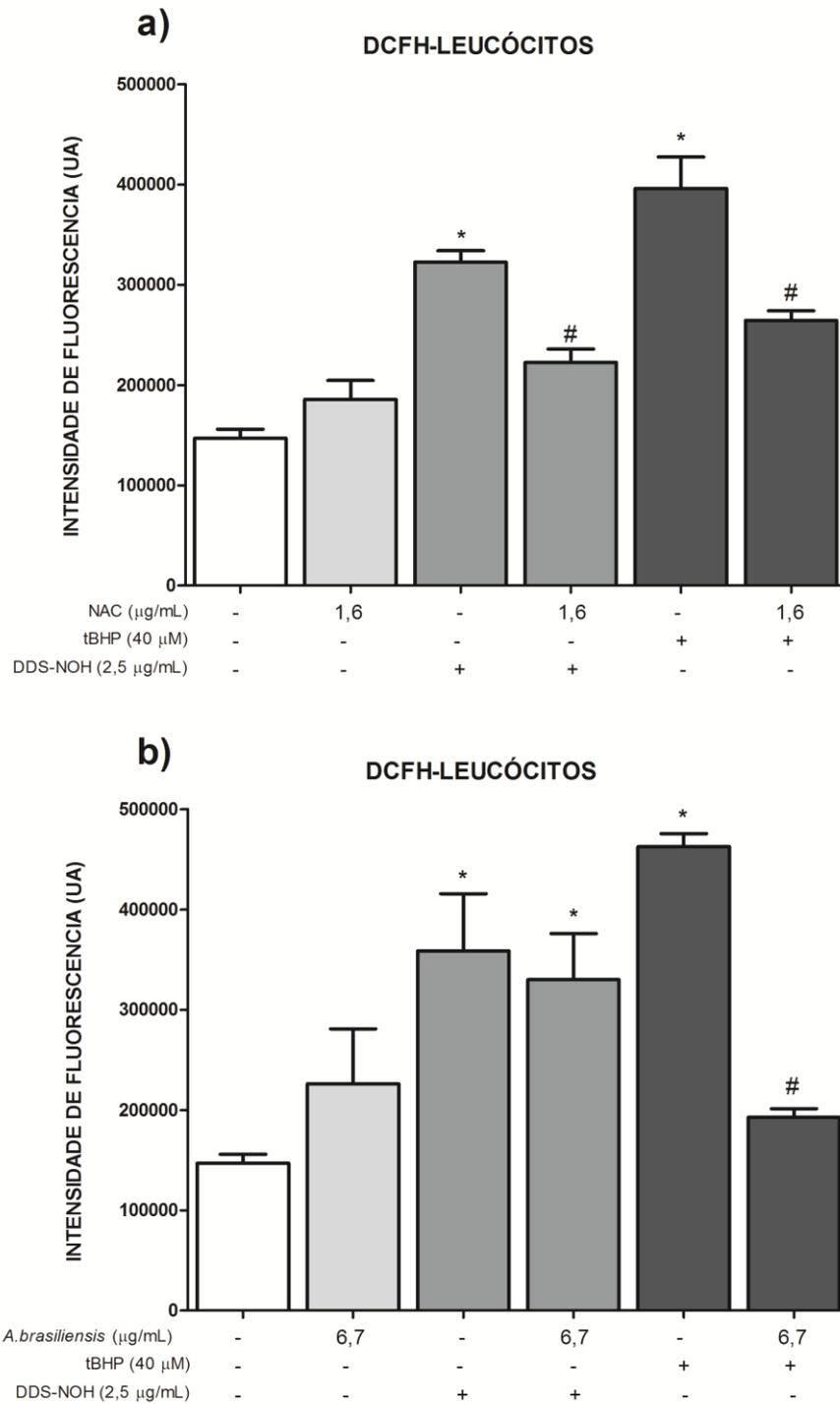


Figura 38: O efeito da DDS-NOH (2,5 µg/ml) e do potencial antioxidante da NAC e *A. brasiliensis* na produção de EROs em leucócitos. Os valores são representados pelo percentual de células fluorescentes, as quais indicam a presença de EROs no meio intracelular. O grupo controle positivo foi TBHP (40µM). Os dados foram expressos em % células fluorescentes, sendo os resultados realizados em triplicatas. *p ≤ 0,05 comparado ao grupo com metanol; #p ≤ 0,05 comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

5.15 Avaliação do dano em DNA exposto ao DDS-NOH e do potencial antioxidante da NAC *in vitro*, através do ensaio cometa

Os resultados demonstraram que a DDS-NOH (2,5 µg/ml) foi capaz de induzir danos no DNA em leucócitos do sangue periférico (*p ≤ 0,05). Além disso, quando as células foram tratadas com NAC, este antioxidante protegeu os leucócitos humanos do dano de DNA induzido pela DDS-NOH *in vitro* (Figura 39 A, B, C e D).

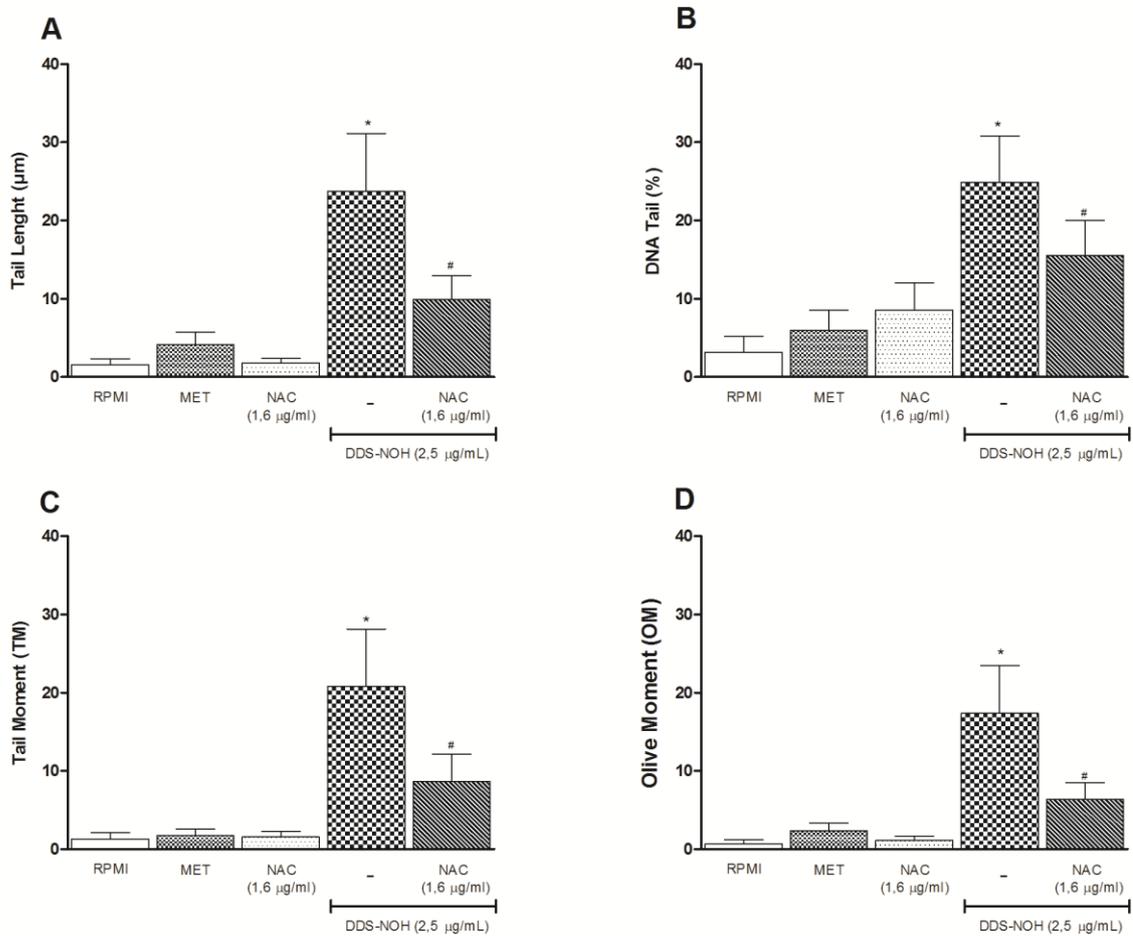


Figura 39: Efeito do dano em DNA exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL) e do potencial antioxidante da NAC em leucócitos do sangue periférico *in vitro*, através do ensaio cometa. O grupo controle positivo foi T-BHP (200µM). Os dados foram expressos em média ± desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. *p ≤ 0,05 comparado ao grupo com metanol; #p ≤ 0,05 comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

5.16 Avaliação do dano em DNA exposto ao DDS-NOH e do potencial antioxidante do *A. brasiliensis* *in vitro*, através do ensaio cometa

Os resultados demonstraram que a DDS-NOH (2,5 µg/ml) foi capaz de induzir dano no DNA de leucócitos do sangue periférico. Entretanto, quando as células foram tratadas com *A. brasiliensis*, este antioxidante protegeu os leucócitos humanos do dano de DNA induzido pela DDS-NOH *in vitro* (Figura 40 A, B, C e D).

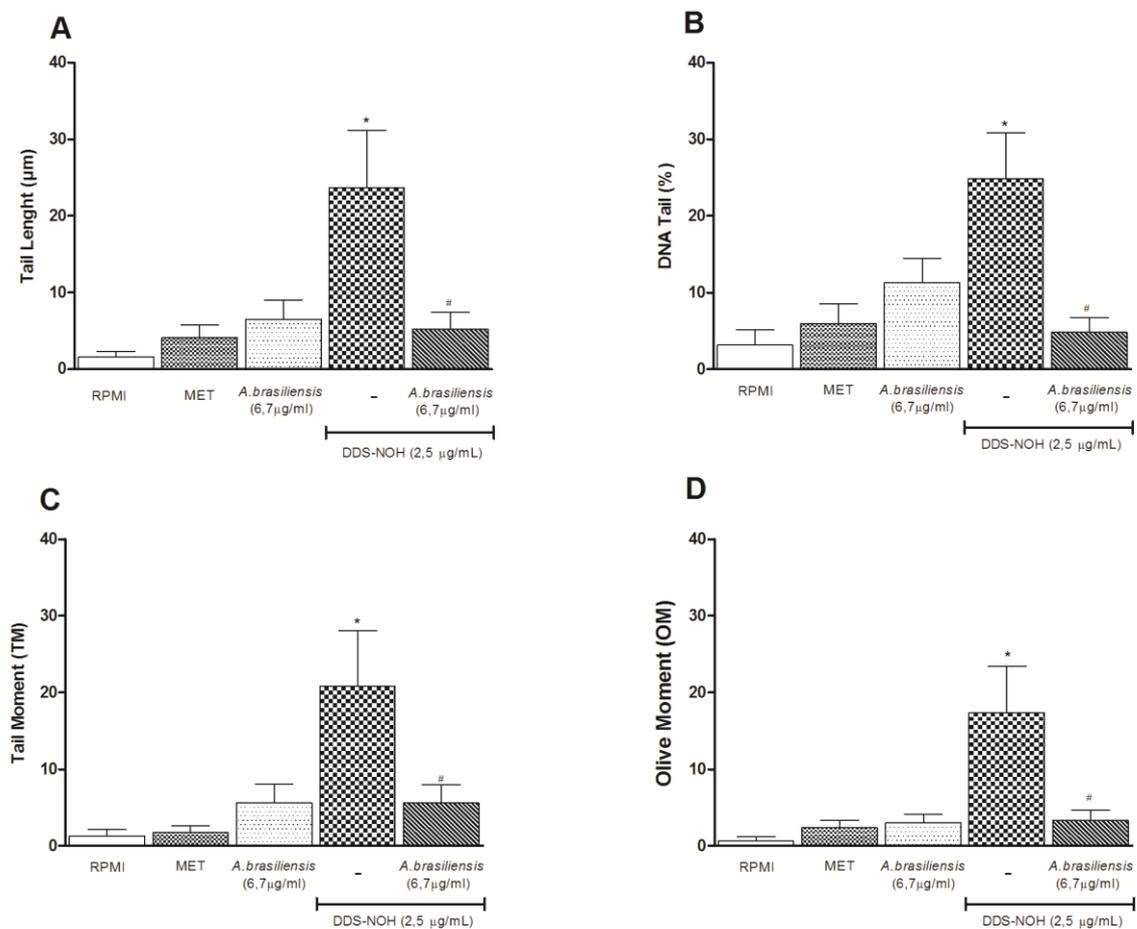


Figura 40: Efeito do dano em DNA exposto ao DDS-NOH (2,5 µg/mL) e do potencial antioxidante do *A. brasiliensis* em leucócitos do sangue periférico *in vitro*, através do ensaio cometa. O grupo controle positivo foi T-BHP (200µM). Os dados foram expressos em média ± desvio padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. *p ≤ 0,05 comparado ao grupo com metanol; #p ≤ 0,05 comparado ao grupo exposto a DDS-NOH (2,5 µg/mL).

6 DISCUSSÃO

Os alterações hematológicas, como a MetHb e hemólise são os achados hematotóxicos mais freqüentes durante a PQT, e se mostram significativos, mesmo em doses terapêuticas para tratar a hanseníase (100 mg dapsona/dia) (HALIM e OGBEIDE, 2002). A presença destas alterações está associada ao metabolito da DDS, a DDS-NOH como o principal responsável pelas RAM mais comuns citadas (Coleman, 1993), uma vez que a DDS quando incubada com eritrócitos não induz nenhum efeito hematotóxico (GROSSMAN e JOLLOW, 1988).

Em nosso estudo também foi demonstrado o efeito hematotóxicos *in vitro* induzidos pela DDS-NOH, no qual esse composto nas concentrações de 2,5; 5; 7,5 e 10 µg/mL foi capaz de induzir a formação de elevados níveis de MetHb (10 a 25%). Além disso, observou-se que o efeito metemoglobinizante da DDS-NOH foi dose dependente. Estes dados corroboram com outro estudo do nosso grupo de pesquisa como o de Albuquerque et al. (2015) que avaliou o percentual de formação de MetHb induzido em eritrócitos por DDS-NOH nas mesmas concentrações de 2,5; 5; 7,5 e 10 µg/mL *in vitro*, e demonstrou que o metabólito foi capaz de induzir 19 a 40 % de MetHb, sendo este efeito também dose-dependente.

Nesse sentido, Vage et al. (1994) mostraram que diferentes concentrações da DDS-NOH (10 a 100.000µM) levam também a formação de MetHb, cuja curva dose-resposta apresentou efeito máximo (Emáx) de 81% de MetHb, assim como Reilly et al. (1999) que utilizou eritrócitos humanos e obteve Emáx de 83%. Por outro lado, em nosso estudo o Emáx da DDS-NOH foi de 25% de MetHb. Além disso, Vage et al. (1994) relataram que tanto a DDS-NOH quanto a MADDS-NOH são capazes de induzir MetHb em eritrócitos humanos *in vitro*.

Coleman e Taylor (2003) demonstraram que a exposição de eritrócitos humanos saudáveis *in vitro*, frente a exposição com a DDS-NOH na concentração de 0,1 mM e nos tempos de pré-incubação de 30, 60 e 120 minutos, é capaz de induzir significativamente 40 a 80% a formação de MetHb. Em estudo semelhante Ciccoli et al. (1999) relataram que os glóbulos vermelhos tratados com DDS-NOH apresentaram aumento significativo na formação de MetHb quando comparados ao controle. Isto sugere que a presença deste metabólito hidroxilado seja responsável pelos efeitos hematotóxicos observados durante o tratamento com DDS.

O principal mecanismo associado à formação de MetHb pela DDS-NOH é que a Hb sofreria oxidação por este composto, levando a formação de MetHb e um composto derivado da DDS, denominado de nitrosobenzeno. Em seguida, o nitrosobenzeno é reduzido pela enzima NADH-metemoglobina redutase e pela GSH novamente à DDS, dando continuidade ao processo de oxidação da Hb. Estima-se que este processo se repita até que os níveis de GSH estejam esgotados (COLEMAN e JACOBUS, 1993; MELLO, 2005).

Este mecanismo também foi sugerido por Reilly et al. (1999) que demonstraram que o potencial de induzir MetHb nos eritrócitos *in vitro* está relacionado ao ciclo de oxidação-redução com a oxihemoglobina e com moléculas O₂, produzindo MetHb e EROs, respectivamente. Entretanto, este efeito hematotóxico da DDS-NOH não ocorre somente na deficiência de G6PD ou situações de depleção da atividade de GSH, que é uma das principais causas da formação de MetHb pela DDS-NOH.

Além disso, Coleman (1993) associa a anemia e a metemoglobinemia causadas pela DDS a uma desnaturação oxidativa na membrana dos eritrócitos, acelerando os processos de hemólise celular. Além disso, Bordin et al. (2010) mostraram que a DDS-NOH induz alterações progressivas nos eritrócitos, inicialmente pelo domínio citosólico das proteínas de suas membranas correspondentes, a banda 3. Nesse sentido, estes autores observaram a formação de MetHb e a fosforilação da tirosina de banda 3 no domínio citosólico que é responsável pelas trocas aniônicas (BAGGIO et al. 1993), incluindo a regulação de glicólise (LOW et al. 1993), alterações na morfologia (BORDIN et al. 1995), volume (MUSCH et al. 1999) e senescência dos eritrócitos (BORDIN et al. 2009).

Em virtude destes efeitos tóxicos associados ao uso da DDS, gerados por seu metabólito DDS-NOH, várias terapias alternativas *in vitro* e *in vivo* vêm sendo estudadas com intuito de melhorar a adesão ao uso da DDS. Dentre estas terapias, destacam-se as intervenções com fontes ricas em antioxidantes, como a NAC e o *A. brasiliensis*, que podem prevenir os efeitos adversos e constituir uma estratégia de proteção nos pacientes com hanseníase em uso de PQT (BORAN et al. 2008; EL-HUSSEINI e AZAROV, 2010).

Em relação aos tratamentos com antioxidantes *in vitro*, nossos dados mostraram que a concentração de 1,6 µg/ml foi mais eficaz em inibir ou reverter a formação de MetHb tanto no pré quanto no pós-tratamento com a NAC,

respectivamente. Em relação à curva temporal, a partir de 60 min, a NAC foi capaz de proteger os eritrócitos do efeito metemoglobinizante da DDS-NOH. Por outro lado, em todos os tempos de pós-tratamento com NAC, verificou-se que este antioxidante foi eficaz em reverter o %MetHb. Estes dados mostram que a NAC é um antioxidante capaz tanto de proteger quanto reverter os danos oxidativos em eritrócitos causados pela DDS-NOH.

Nesse sentido, Wright et al. 1996 avaliaram o potencial da NAC em reduzir a MetHb induzida por nitrito de sódio *in vitro*. Os resultados demonstraram que nos tempos de incubação de 30 e 90 minutos a NAC não conseguiu evitar o aumento de MetHb. Entretanto nos tempos de 150, 210, 270 e 330 min, a NAC conseguiu reduzir a formação de MetHb, em relação ao controle negativo. Em outro estudo, Wright et al. 1998 demonstraram que a NAC reduziu a formação de MetHb induzida por hidroxilamina, nos tempos de 60 a 300 minutos após a adição da NAC, em eritrócitos com deficiência de G6PD *in vitro*.

Entretanto, Coleman et al. 2003 avaliaram o efeito anti-metemoglobinizante do DHLA, ALA, NAC e ascorbato mediada por xenobióticos em eritrócitos humanos *in vitro*. Estes autores relataram que nenhum dos antioxidantes (ALA, DHLA, NAC e o ascorbato) apresentou efeito protetor sobre a MetHb induzida por nitrito mesmo no pré-tratamento, adição simultânea com o estímulo ou 30 e 60 min pós adição dos agentes. Entretanto, a NAC se mostrou eficiente em reduzir a formação de MetHb a partir de 120 min de incubação.

Os possíveis mecanismos de ação antioxidante da NAC capaz de reverter a MetHb podem estar ligados à sua habilidade em reduzir a cistina extracelular em cisteína, que é absorvida dez vezes mais rápida, podendo ser utilizada na síntese de GSH reduzindo a MetHb em Hb. Além disso, a síntese de GSH tem um papel indireto como antioxidante, por aumentar a atividade da glutationa-S-transferase, que fornece GSH para a inativação de peróxidos através da atividade catalisada pela GSH-Px. A ação direta da NAC está associada à sua capacidade de reverter diretamente a MetHb em Hb e por apresentar em sua estrutura o grupo tiol livre, capaz de interagir com os grupos eletrófilos de EROs do metabolismo respiratório, levando a formação de substâncias menos reativas, sendo a NAC dissulfeto o maior produto (WRIGHT et al. 1996; MELLO, 2005).

A capacidade da NAC em combater os metabólitos oxidantes é uma das principais vantagens sobre o AM. Nesse sentido, algumas drogas, como anilina que

oxidam a Hb ciclicamente por meio de seus metabólitos, tem sua toxicidade, como a metemoglobinemia, revertida em pacientes pelo tratamento inicial com AM. Além disso, acredita-se que a NAC também interrompa o ciclo de formação de MetHb induzida por anilinas, por mecanismo dependente de GSH (HARVEY et al. 1983).

No caso de pacientes com deficiência de G6PD, o tratamento com AM na reversão de MetHb induzida pela DDS-NOH, pode representar um problema, visto que estes pacientes não produzem NADPH intracelular suficiente para reduzir MetHb, por conseguinte, a terapia com AM é muitas vezes ineficaz nestes pacientes. Por outro lado, a síntese intracelular de GSH necessita somente de glutamato, glicina e cisteína fornecida pela NAC, e não é dependente de NADPH (WRIGHT et al. 1996). Desta forma, a NAC poderia ser uma alternativa eficaz para indivíduos deficientes de G6PD com metemoglobinemia. Esta hipótese de terapia alternativa foi demonstrado anteriormente no estudo de Wright et al. 1998.

A NAC apesar de se mostrar como um antioxidante capaz de prevenir e reverter nas concentrações de 1,6 e 4,8 µg/ml a MetHb induzida pela DDS-NOH, este antioxidante apresenta ação questionável que poderia restringir seu uso, por que dependendo da dose, a NAC pode se comportar como um pró-oxidante. Assim como, a associação de NAC com DDS-NOH, ao invés de proteger, pode potencializar a oxidação do ferro da Hb. Fatos que explicam os nossos dados, os quais a NAC nas concentrações de 16; 48; 163 µg/mL potencializou o %MetHb induzido pela DDS-NOH (2,5 µg/mL), mostrando um potencial pró-oxidante. Corroborando Moraes et al. 2008, ao avaliar o potencial efeito protetor da NAC na hemotoxicidade induzida pela DDS em ratos, percebeu que a NAC ao invés de prevenir a formação de MetHb induzida pelo DDS foi capaz de potencializar o efeito metemoglobinizante.

O principal mecanismo que está associado à ação pró-oxidante da NAC é a sua capacidade de regenerar a N-hidroxilamina enquanto promove a regeneração da GSH, com isso a N-hidroxilamina promove a oxidação da oxiemoglobina, ciclo que somente finaliza quando a GSH eritrocitária estiver quase depletada. Entretanto, a doação de grupos sulfidrílicos oriundos da NAC permite uma continua formação de MetHb em eritrócitos (MELLO, 2005; MORAES et al. 2008). Nesse sentido, Coleman e Jacobus (1993) em estudo *in vitro* mostraram que o composto nitrosoareno formado após a ação oxidativa da hidroxilamina sobre a Hb, pode sofrer ação da GSH de duas formas distintas: reduzindo o nitrosoareno até o precursor hidroxilado

ou reagindo com este composto formando um derivado sulfenamida. No primeiro caso, quando há formação da hidroxilamina a partir do nitrosoareno, o processo de formação de MetHb se reinicia, formando assim um ciclo redox que só termina quando os níveis de GSH são reduzidos. Dentro das células, forma-se um equilíbrio entre a velocidade de regeneração da DDS-NOH e da formação de MetHb.

Dentre os fatores que afetam o equilíbrio do sistema redox, destaca-se a alteração da formação de MetHb induzida pela DDS. A NAC, por ser precursora da GSH, altera tal equilíbrio proporcionando maior capacidade de regeneração da N-hidroxilamina. Por outro lado, quando o derivado nitrosoareno eventualmente não participa desse ciclo redox, pode se ligar a GSH ou outros grupos tióis formando um derivado sulfenamida ou outros adutos de estabilidade variável. A hidrólise desse adutos ou da sulfenamida libera então a amina livre da DDS, que se difunde para fora do eritrócito (MORAES et al. 2008).

Afim de verificar a importância da GSH neste processo, realizou-se tratamentos com GSH-EE em eritrócitos, a fim de avaliar o seu efeito sobre a MetHb induzida pela DDS-NOH *in vitro*. Nossos dados mostram que o pré-tratamento nas concentrações de 0,8; 1,6 e 3,3 mg/ml com GSH-EE foi capazes de inibir % MetHb induzida por DDS-NOH. No pós-tratamento, somente as concentrações de 0,8 e 1,6 mg/ml foram capazes de reverter o %MetHb induzida pelo metabólito. Quanto ao tempo, no pré-tratamento com GSH-EE, a partir de 30 min, a GSH-EE foi eficaz em prevenir a formação de MetHb induzida pela DDS-NOH. Enquanto que no pós-tratamento com GSH-EE, somente a partir de 60 min, este antioxidante foi capaz de reverter a MetHb. Tais resultados demonstram o papel antioxidante da GSH-EE em reduzir ou reverter a formação de MetHb nos eritrócitos.

Além da NAC e GSH-EE, este trabalho também avaliou o efeito protetor do *A. brasiliensis* na MetHb induzida pela DDS-NOH *in vitro*, mostrando que no pré-tratamento com o *A. brasiliensis*, todas as concentrações foram capazes de inibir % MetHb. Entretanto, no pós-tratamento com *A. brasiliensis*, apenas a concentração de 6,7 µg/mL foi capaz de reverter o %MetHb. Em relação ao tempo, no pré-tratamento com *A. brasiliensis*, a partir de 60 min, o *A. brasiliensis* foi capaz de proteger as células do efeito metemoglobinizante induzido pela DDS-NOH. Por outro lado, no pós-tratamento com *A. brasiliensis*, os tempos de 30 e 60 min permitiram que este fungo reverta o % MetHb *in vitro*. Estes resultados demonstram que o *A. brasiliensis*,

assim como a NAC, apresenta potente ação antioxidante capaz de proteger ou reverter os danos oxidativos causados pela DDS-NOH nos eritrócitos.

O poder antioxidante do *A. brasiliensis* de prevenir e reverter a MetHb pode ser atribuído aos compostos fenólicos e polissacarídeos de sua composição, os quais são essenciais em seu crescimento e mecanismo de defesa. Com isso, essas substâncias ativas são as mais pesquisadas e terapeuticamente úteis para saúde (SOOB RATTEE et al. 2005). Nesse sentido, antioxidantes ricos em compostos fenólicos, como vinho, tiveram sua atividade demonstrada por Tedesco et al. (2000), que avaliaram o efeito protetor de polifenóis presentes em vinhos, e perceberam que quando incubados com eritrócitos humanos, estes antioxidantes foram capazes de reduzir significativamente a formação de MetHb induzida pelo T-BHP, bem como reduziu a hemólise gerada por H₂O₂.

Dentre os polifenóis do vinho se destaca o RSV, que segundo Pandey e Rizvi (2010) quando incubado com eritrócitos expostos ao TBHP *in vitro* foi capaz de proteger os eritrócitos, após 30 min de incubação com RSV, efeito protetor que foi reduzido após 120 min. Este efeito protetor do RSV também foi comprovado por nosso grupo de pesquisa, como no estudo de Albuquerque et al. (2015), que constatou o potencial redutor do RSV, visto que este compostos protegeu eritrócitos da formação de MetHb induzida por DDS-NOH, de maneira dose e tempo dependente, principalmente após 60 e 90 min.

A ação antioxidante da maior parte dos polifenóis, como os que existem no *A. brasiliensis*, está associada com 3 processos: 1) aumento do nível intracelular de GSH; 2) bloqueio de influxo de Ca²⁺; 3) remoção de EROS ou inativação dos radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas interrompendo desta forma a reação em cadeia (RICE-EVANS et al. 1996; GITIKA et al. 2006). Logo, a Hb que está altamente concentrada nos eritrócitos e envolvida em uma série de reações de redução-oxidação, é a principal responsável por reações indutoras de estresse oxidativo nos eritrócitos, pelo fato de se auto-oxidar, produzindo MetHb e o radical ânion superóxido (RIFKIND et al. 2004). Por isso, a proteção desta proteína é importante para a manutenção da integridade funcional e morfológica dos eritrócitos.

Dentre os antioxidantes avaliados (NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE), constatou-se que a NAC apresentou melhor eficácia na prevenção e reversão da formação de MetHb em eritrócitos expostos a DDS-NOH *in vitro*, visto que em menor

concentração apresentou estes efeitos comparado aos outros antioxidantes, tanto no pré-tratamento e pós-tratamento.

Ao comparar o efeito protetor de AM e dos antioxidantes NAC e *A. brasiliensis*, o pré-tratamento com AM (15ng/mL) foi mais eficaz em proteger a Hb, impedindo a formação de MetHb induzida pela DDS-NOH (2,5 µg/mL), se comparado a NAC (1,6 µg/mL) e *A. brasiliensis* (6,7 µg/mL). Efeito similar foi observado no pós-tratamento, o AM (15ng/mL) também foi mais eficaz em reverter a formação de %MetHb, em relação ao NAC (1,6 µg/mL) e o *A. brasiliensis* (6,7 µg/mL). Recentemente, estes dados também foram mostrados por nosso grupo, em que o AM também foi mais eficaz que o RSV em proteger e reverter a formação de %MetHb induzida por DDS-NOH (MALCHER, 2012; ALBUQUERQUE et al. 2015).

A capacidade do AM em reverter a MetHb de maneira mais eficiente que a NAC e o *A. brasiliensis* tanto *in vivo* como *in vitro* (GIBSON, 2002), pode estar associada ao fato do AM ser uma substância doadora de elétrons que participa da troca de eletrons com a metahemoglobina redutase dependente de NADPH. Na presença desta enzima e de NADPH, o AM é rapidamente reduzido a branco de metileno que, por sua vez, reduz a MetHb não-enzimaticamente, reduzindo o íon férrico para íon ferroso. Para isso, a sua redução requer a via da hexose monofosfato intacta para a regeneração do NADPH. Com isso, a utilização do AM é ineficaz em pacientes com deficiência de G6PD, visto que o AM pode induzir hemólise nestes pacientes (WARD e McCARTHY, 1998).

Com intuito de proteger os eritrócitos dos danos oxidativos, o organismo se defende por meio das defesas antioxidantes, as quais desempenhariam o papel de regenerar ou prevenir a oxidação de substratos, mantendo o equilíbrio dos processos de oxi-redução celular (HALLIWELL, 2000). Em função disto, houve a necessidade de avaliar o efeito de NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE sobre parâmetros oxidativos induzidos pelo DDS-NOH, tais como fatores antioxidantes (atividade das enzimas CAT e SOD, níveis GSH) e pró-oxidantes (EROs) e danos em moléculas (nível de MDA e dano em DNA). Nesse sentido, os antioxidantes CAT e SOD são um grupo de enzimas especializadas, cuja finalidade é reagir com compostos que causam danos oxidantes e detoxificá-los do organismo. Todas as células eucarióticas contam com numerosas enzimas que desempenham esta tarefa, todavia, a GSH-Px, SOD, CAT são as três principais classes de enzimas mais investigadas neste processo.

Quanto à atividade da SOD no pré-tratamento, nossos dados mostram que a incubação com DDS-NOH aumentou a atividade de SOD, por outro lado quando tratadas com NAC e *A. brasiliensis* houve redução de sua atividade. Diferentemente do pré, no pós-tratamento a incubação com DDS-NOH reduziu a atividade de SOD, porém quando tratadas com NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE a SOD teve sua atividade aumentada.

O aumento da atividade da SOD no pré-tratamento quando incubado com DDS-NOH, está relacionado a detoxificação das EROs geradas pela agressão oxidativas. Com isso, quanto maior a agressão no eritrócito, maior será a taxa de ativação e regeneração desta enzima (MORAES et al. 2008). Entretanto, a diminuição da SOD na presença dos antioxidantes, pode está associado ao fato destes compostos atuarem, em um primeiro momento, mais eficientemente do que a SOD ou estes antioxidantes podem estar inibindo o sitio de ativação da SOD, uma que esta enzima necessita de metais como Cu-Zn para sua atividade (HARRIS, 1991).

A redução dos níveis de SOD no pós-tratamento pode está associada à ação indireta da DDS, uma vez que o metabólito DDS-NOH ao sofrer auto-oxidação pelo O_2 leva a formação de derivados arilnitrosos (nitrosobenzeno) e a produção de $O_2^{\bullet-}$ (CRIBB et al. 1991). Com isso, o $O_2^{\bullet-}$ pode sofrer reação não-enzimática com o óxido nítrico levando a formação de peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$), que além inibir a SOD, também desempenha um papel importante na destruição do *M. leprae* (MACMILLAN-CROW et al. 1996). Por outro lado, o aumento de sua atividade no pós-tratamento com os antioxidantes pode estar associado a estímulos da expressão gênica da SOD no núcleo celular, o que acarretaria aumento nas concentrações desta enzima nos eritrócitos com intuito de catalisar a reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , gerados pela DDS-NOH (BHADWAT e BORADE, 2000).

Estes dados diferem de outro estudo de nosso grupo, que não mostrou diferença na atividade de SOD em nenhum dos grupos estudados (ALBUQUERQUE et al. 2015). Além disso, Martins et al. 2009 também não observaram diferença na atividade de SOD em pacientes com anemia falciforme que faziam a suplementação ou não com ALA. Entretanto, no estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, Schalcher et al. 2014 mostraram que a atividade de SOD eritrocitária foi menor nos pacientes com hanseníase do que nos indivíduos saudáveis. Estes resultados foram

similares a outros estudos (PRASAD et al. 2007), e que mesmo após o uso da PQT, os níveis de SOD permaneceram reduzidos (VIJAYARAGHAVAN et al. 2005).

Em relação à CAT, no pré-tratamento, nossos dados mostram que o DDS-NOH não alterou a atividade de CAT, porém esta enzima teve sua atividade aumentada quando as células foram pré-tratadas com NAC e GSH-EE e incubadas com DDS-NOH, enquanto que o *A. brasiliensis* reduziu a atividade de CAT. No pós-tratamento, a incubação com DDS-NOH também não alterou a atividade de CAT, assim como os antioxidantes testados.

A ausência de efeito dos antioxidantes sobre a atividade de CAT corroboram com os estudos de Schalcher et al. (2014) e Albuquerque et al. (2015). Entretanto, o aumento de sua atividade quando as células foram pré-tratadas somente com NAC e GSH-EE, pode estar relacionado a um fator de proteção, antes da agressão com DDS-NOH gerar H₂O₂. Já no pós-tratamento, a redução na atividade de CAT nos grupos tratados com antioxidantes, demonstram que uma vez estabelecida à agressão com DDS-NOH, estes antioxidantes não conseguem estimular a atividade de CAT.

Estudos mostraram que a redução na atividade da CAT pode estar associada a fatores inerentes aos indivíduos, por exemplo, no caso de deficiências enzimáticas em virtude de mutações genéticas (GÓTH et al. 2004) ou na redução da síntese de CAT. Esta redução da síntese de CAT pode ser devido a alterações em sua expressão gênica (REIMER et al. 1994), ocasionada pela presença de certos íons (LAI et al. 1995), citocinas (YASMINEH et al. 1991) e fármacos (VEGGI et al. 2008). No caso da infecção por *M. leprae*, supõe-se que este agente pode necessitar de íons e/ou metais presentes no hospedeiro, a fim de regular a expressão de alguns de seus fatores de resistência (BANERJEE et al. 2011).

Outro mecanismo de defesa antioxidante do organismo contra fenômenos oxidativos intracelulares é a GSH, que é um tripeptídeo presente em altas concentrações no meio intracelular de células animais e na maioria das plantas e bactérias. No interior destas células pode se apresentar na forma oxidada ou reduzida, sendo que nos eritrócitos humanos cerca de 99, 75% do total da GSH encontrada está na forma reduzida (MEISTER, 1983).

Neste trabalho, no pré-tratamento, a incubação com DDS-NOH não alterou os níveis de GSH, por outro lado houve aumento nas concentrações de GSH nos grupos tratados com NAC e *A. brasiliensis* em relação ao grupo DDS-NOH. Em

estudo realizado por Schalcher et al. 2014, os níveis de GSH em pacientes com hanseníase em uso de PQT foram maiores que os pacientes sem tratamento. Em estudo semelhante, Veggi et al. 2008 relataram que as concentrações de GSH no fígado de camundongos machos estavam aumentados durante tratamento com DDS-NOH, no entanto nas fêmeas, as concentrações de GSH foram similares ao grupo controle. Por outro lado, outros estudos demonstraram redução nos níveis de antioxidantes não enzimáticos como a GSH em pacientes com hanseníase (VIJAYARAGHAVAN et al. 2005; PRASAD et al. 2008).

De acordo com Costagliola (1990), a taxa de recuperação eritrocitária da GSH ocorre em menos de 10 minutos, mesmo que o eritrócito esteja exposto aos compostos oxidantes. Com isso, a taxa de redução da GSSG para forma GSH ocorre de forma sustentada visando o aumento deste tripeptídeo na célula. Esta hipótese foi observada por Reilly et al. (1999), que mostraram que os metabólitos da DDS não são responsáveis pela redução significativa de GSH em eritrócitos humanos, porque a GSH que é consumida nos processos de reciclagem das hidroxilaminas é rapidamente regenerada.

Além da mensuração não enzimática da GSH e da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, é importante a avaliação da capacidade antioxidante total ou “status” antioxidante total, o qual tem se mostrado relevante em análise de compostos antioxidantes em amostras biológicas. Esta avaliação fornece informações biológicas gerais do sistema antioxidante total do organismo, pois detecta a presença de agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, ao invés da determinação das concentrações destes antioxidantes de forma individual (GHISELLI et al. 2000).

Em nosso estudo foi observado que durante o pré-tratamento, a DDS-NOH aumentou os níveis de TEAC e a incubação com *A. brasiliensis* reduziu os níveis de TEAC induzido por DDS-NOH. Já no pós-tratamento, nem a incubação com DDS-NOH e os antioxidantes não alteraram os níveis de TEAC. Em estudo por Schalcher et al. 2014 foi mostrado aumento de TEAC no plasma dos pacientes com hanseníase sem tratamento e com tratamento, quando comparado ao controle. Os autores acreditam que os dados encontrados neste estudo, não foram provocados pelo *M. leprae* e nem pela administração de PQT. Este aumento observado de TEAC pode está relacionado a aumento de antioxidantes tíois GSH ou não-tíois, que tem suas sínteses relacionadas principalmente com fatores nutricionais. Além disso,

muitas proteínas como a ceruloplasmina, transferrina, e pequenas moléculas antioxidantes tais como, vitaminas C e E, e ácido úrico contribuem para aumento nos níveis de TEAC no plasma (RAHMAN et al. 2000).

Para mensurar os níveis de peroxidação lipídica durante os tratamentos neste estudo, utilizou-se a técnica de dosagem do MDA. O MDA é formado a partir da degradação dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) em lípidos de membrana (TRIMBAKE et al. 2013; GARAD et al. 2014), sendo utilizado como indicador de dano celular gerado pela ação de EROs no organismo e de processos oxidativos de membrana (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; DEL RIO et al. 2005). Na hanseníase, o MDA é um indicador de danos nos tecidos e no sangue, pois possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados nesta doença (ANDRADE JR et al. 2005; BAGIS et al. 2005). Por outro lado, alguns estudos também não mostraram alteração nos níveis de MDA na hanseníase, mesmo durante o uso de PQT (REDDY et al. 2003; PRASAD et al. 2008; SCHALCHER et al. 2014)

Em relação ao pré-tratamento, os dados mostram que a incubação com DDS-NOH aumentou os níveis de MDA, sugerindo que a DDS-NOH é responsável pelo estresse oxidativo nas hemácias. Além disso, o pré-tratamento com NAC não foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica. Por outro lado, *A. brasiliensis* e GSH-EE reduziram os níveis de MDA induzidos pela DDS-NOH, mostrando que estes antioxidantes foram mais eficientes do que a NAC em prevenir o aumento progressivo de MDA, mesmo depois da agressão.

Já no pós-tratamento, a incubação com DDS-NOH também aumentou os níveis de MDA. O NAC e *A. brasiliensis* não alteram os níveis de MDA induzido pela DDS-NOH. Estes dados mostram que uma vez estabelecida a agressão, tais antioxidantes teriam pouca atividade contra as lesões oxidativas, sendo mais eficiente na prevenção do que na reversão da peroxidação lipídica ocasionada pelo DDS-NOH. Porém, no grupo tratado com GSH-EE houve redução nos níveis de MDA em relação ao grupo DDS-NOH, mostrando que dentre os antioxidantes testados a GSH-EE apresentou melhor ação preventiva e na reversão da peroxidação lipídica nos eritrócitos. Este efeito da GSH está relacionado a sua ampla ação antioxidante, por exemplo, como cofator de muitas enzimas contra o estresse oxidativo gerado pela DDS-NOH, como a GSH-Px e a glutathione-S-transferase; sequestra radicais $\cdot\text{OH}$ e $\text{O}_2\cdot^-$ e regenera a maioria dos antioxidantes,

como as vitaminas C e E, a suas formas ativas. Estas e outras funções fazem da GSH o principal antioxidante responsável pela prevenção e redução dos níveis de peroxidação lipídica (VALKO et al. 2007).

Em estudo realizado por Schalcher et al. 2014, observou-se que os valores de MDA nos pacientes hansênicos sem tratamento mostraram níveis similares ao controle e o tratamento com PQT não alterou os níveis de MDA nestes pacientes. Estes dados mostram que não está ocorrendo peroxidação lipídica no plasma destes pacientes. Um aspecto importante que pode explicar os níveis normais de MDA nos pacientes com hanseníase após o início do PQT foi à elevada concentração de GSH, visto que este antioxidante é considerado um potente inibidor do processo de peroxidação lipídica, e está associado à regulação dos níveis de MDA a valores normais nestes pacientes.

Para a determinação da concentração de EROs nos eritrócitos e leucócitos expostos ao potencial oxidante da DDS-NOH (2,5 µg/mL) e do potencial antioxidante da NAC e *A. brasiliensis*, foi realizado uma técnica de fluorímetro utilizando o DCFH-DA. Esta técnica é considerada uma excelente ferramenta para verificar a liberação de EROs em células, tais como radical $\bullet\text{OH}$, peroxila, radical alcóxila, $\text{ONOO}\bullet$, bem como H_2O_2 (WANG e JOSEPH, 1999). Os resultados mostraram que a DDS-NOH (2,5 µg/mL) induziu uma produção acentuada de EROs nos eritrócitos e leucócitos incubados *in vitro* com este metabólito. Está produção de EROs foi mais evidente em eritrócitos do que em leucócitos, e isto está relacionado ao fato da DDS-NOH e o TBHP atuarem por mecanismos semelhantes nos eritrócitos, como na oxidação de GSH por GSH-Px e pela reação do TBHP ou DDS-NOH com a Hb, ambos formando EROs e MetHb (DOMANSKI et al. 2005).

No entanto, na presença dos antioxidantes NAC e *A. brasiliensis*, observou-se que foram capazes de reduzir quantidades acentuadas de EROs geradas pela DDS-NOH em eritrócitos e leucócitos. O potencial antioxidante da NAC em eritrócitos, deve-se ao fato deste antioxidante exercer função de sequestro de EROs, inibição de peroxidação lipídica e indução de GSH (MANSOUR et al. 2005; RAFTOS et al. 2007). Enquanto que em leucócitos, além destes efeitos, a NAC exerce ação nas mitocôndrias, inibindo a fosforilação oxidativa e adutos do DNA mitocôndrial (KOZHUKHAR et al. 2006).

A ação antioxidante do *A. brasiliensis* em eritrócitos e leucócitos, pode está relacionada principalmente ao sequestro de EROs pelos compostos fenólicos ou

indução de enzimas antioxidantes. Além disso, a presença de fenóis em sua composição pode estabilizar as membranas celulares, através da diminuição de sua fluidez por impedimento estérico, o que reduziria a difusão dos radicais livres (ARORA et al. 2000).

Estes dados corroboram parcialmente com outro estudo do nosso grupo de pesquisa, como o de Albuquerque et al. (2015) que demonstraram que a DDS-NOH foi capaz de induzir produção acentuada de EROs nos eritrócitos. Entretanto estas EROs foram reduzidas quando na presença de RSV (1000 μ M) e ALA (100 e 1000 μ M). Em estudo semelhante, Vyas et al. (2005) demonstraram a elevada produção de ROS em cultura de células, a partir da incubação com os metabólitos DDS-NOH e MADDS-NOH, bem com o efeito redutor do ácido ascórbico na neutralização de EROs induzidas por estes metabólitos.

No que diz respeito ao ensaio cometa, esta técnica é um método simples, rápido, barato, flexível e, sobretudo sensível para detectar danos no DNA (TICE et al. 2008). É considerado um ensaio de mutagenicidade altamente eficaz a curto prazo (GOLLAPUDI et al. 1995).

Os resultados demonstraram através deste ensaio, que a DDS-NOH (2,5 μ g/ml) foi capaz de induzir danos no DNA em leucócitos do sangue periférico. Este efeito, também foi observado por outros estudos de nosso grupo de pesquisa como o de Malcher, 2012 e Albuquerque et al. (2015). A esse respeito, Gandhi e Singh et al 2004 relataram que pacientes com hanseníase na PQT possuíam muitas células com comprimentos mais longos de migração de DNA do que as células de pacientes não tratados. Além disso, alguns estudos relataram anormalidades cromossômicas estruturais em fibroblastos da pele cultivados de pacientes com hanseníase tratados com DDS (HACHEL et al. 1985) e em leucócitos humanos *in vitro* (KALAISELVI et al. 2002). Os radicais tóxicos tais como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , O_2 e $\bullet OH$ gerados pela DDS e seus metabolitos, podem também provocar danos no DNA, causando rupturas dos filamentos e/ou lesões alcalinos-lábil (GANDHI et al. 2004; KASAI, 1997). Em estudo realizado por Rimolli e Godoy (2001), os autores comprovaram o potencial oxidativo deste metabólito em nível de membrana e proteínas celulares.

Entretanto, com intuito de proteger as células de danos em DNA causados pela DDS-NOH, este trabalho utilizou antioxidantes para alcançar tal efeito. Os resultados demonstraram que quando as células foram tratadas com NAC e *A. brasiliensis*, estes antioxidantes protegeram os leucócitos humanos *in vitro* do

estresse oxidativo induzido pela DDS-NOH, impedindo os danos no DNA. Em estudo semelhante do nosso grupo de pesquisa, Albuquerque et al. (2015) demonstraram que estes danos foram reduzidos na presença dos antioxidantes RSV e ALA. Outros estudos mostraram que os antioxidantes, como as vitaminas C e E podem também proteger contra a genotoxicidade causada pela PQT em pacientes com hanseníase (KALAISELVI et al. 2002; ALY et al. 2002; VIJAYARAGHAVAN et al. 2005).

Os mecanismos pelos quais a NAC e o *A. brasiliensis* previnem o dano em DNA ocasionado pela DDS-NOH, não estão completamente elucidados. Mas acredita-se que a NAC previna o dano em DNA devido ao grupo tiol em sua estrutura que é capaz de reduzir a reatividade das EROs (MAJANO et al. 2004; RAFTOS et al. 2007) ou devido a sua ação moduladora nos mecanismos de reparo do DNA, como inibição de mutações espontâneas, correção de hipometilação e proteção das enzimas nucleares (RELIENE et al. 2004). Além disso, estudos demonstram que a síntese de GSH por meio do estímulo da NAC, também é capaz de reduzir tal efeito oxidativo ao DNA (RELIENE et al. 2009).

Diferentemente da NAC, o efeito preventivo do *A. brasiliensis* no dano em DNA, está associado a presença de beta-glucanas em sua composição conforme demonstrado no estudo de Lazarova et al. (2004) em células de fígado de ratos *in-vitro*. Este polissacarídeo é o principal responsável pelo efeito imunomodulador e antitumoral deste antioxidante (DALLA SANTA et al. 2009). Além disto, os compostos fenólicos contidos no *A. brasiliensis* podem reduzir o dano ao DNA devido à combinação de suas atividades quelantes e de sequestro de radicais livres (MORIDANI et al. 2003).

O desenvolvimento deste trabalho foi de suma importância, pois avaliou a ação de antioxidantes contra a MetHb e danos em DNA *in vitro*, tendo a MetHb como principal RAM presente em pacientes hansenianos em PQT. Além disso, os resultados demonstraram que a suplementação com os antioxidantes, NAC e *A. brasiliensis* podem ser promissores na PQT da hanseníase.

7 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi possível concluir que:

- O metabólito DDS-NOH foi capaz de induzir MetHb *in vitro*;
- O pré-tratamento com NAC, *A. brasiliensis* e GSH preveniu a formação de MetHb induzida pela DDS-NOH, sendo que no pós-tratamento, a NAC foi mais eficiente do que o *A. brasiliensis* e GSH-EE;
- O pré-tratamento com NAC e *A. brasiliensis* reduziram a atividade de SOD e aumentaram os níveis de GSH, enquanto NAC e GSH-EE aumentaram a atividade de CAT induzida por DDS-NOH;
- No pós-tratamento, a NAC, *A. brasiliensis* e GSH-EE aumentaram a atividade de SOD e reduziram CAT induzida por DDS-NOH, mas não alteraram os níveis de GSH;
- Em relação aos danos oxidativos, no pré-tratamento, o *A. brasiliensis* e a GSH-EE reduziram os níveis de MDA induzidos por DDS-NOH, enquanto que no pós-tratamento, somente o GSH-EE foi capaz de reduzir a produção de MDA;
- Em eritrócitos e leucócitos, a NAC e *A. brasiliensis* foram capazes de reduzir a EROs induzido por DDS-NOH;
- No dano em DNA, a NAC e o *A. brasiliensis* foram capazes de inibir o dano em DNA ocasionado pelo DDS-NOH;

Estes dados demonstram que os compostos antioxidantes avaliados, apresentam potenciais terapêuticos na prevenção da MetHb e no dano em DNA induzido por DDS-NOH, sendo a NAC mais eficaz em inibir ou reverter estes efeitos em células humanas.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. In: Packer L. Methods in Enzymology, Vol. 105. **Academic Press, Orlando.**, p. 121–126, 1984.
- 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, 2015.
- ALY, F. A AND DONYA, S. M. In vivo antimutagenic effect of vitamins C and E against rifampicin-induced chromosome aberrations in mouse bonemarrow cells. **Mutat. Res.**, v. 518, p. 1-7, 2002.
- ANDRADE JUNIOR., D.R., SOUZA, R.B., SANTOS, S.A., ANDRADE, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.31, n. 1, p. 60-68, 2005.
- ARORA, A.; BYREM, T. M.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Arquivos of Biochemistry and Biophysics.**, v. 373, n.1, p.102-109, 2000.
- BAGIS, S.; TAMER, L.; SAHIN, G.; BILGIN, R.; GULER, H.; ERCAN, B.; ERDOGAN, C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder?. **Rheumatology International**, v.25, n.3, p.188-190, 2005.
- BANERJEE, S.; FARHANA, A.; EHTESHAM, N.Z.; HASNAIN, S.E. Iron acquisition, assimilation and regulation in mycobacteria. Infection, genetics and evolution. **Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases.**, v.11, n.5, p. 825-38, 2011.
- BARBISAN, L.F.; MIYAMOTO, M.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on a rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **J Ethnopharmacol.**, v.83, p. 25-32, 2002.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Quimica nova**, V. 29(1), p. 113-126, 2006.
- 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 Chemistry.**, V. 111, n. 1, p. 61-66, 2008.
- BELAND, F. A. e KADLUBAR, F. F. Metabolic activation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hydrocarbons. **Handbook Exp. Pharmacol.**, v. 94, p. 267–325, 1990.

BEUTLER, E. **Red Metabolism: a Manual of Biochemical methods.**, 3^o edition. Orlando:Grune&Straton: 1984.

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

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.; CLARI, G.; MORO, I.; DALLA VECCHIA, F. e MORET, V. Functional link between phosphorylation state of membrane proteins and morphological changes of human erythrocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 213, p. 249–257, 1995.

BORDIN, L.; FIORE, C.; BRAGADIN, M.; BRUNATI, A. M. e CLARI, G. Regulation of membrane band 3 Tyr-Pby proteolysis of p72syk and possible involvement in senescence process. **Acta. Biochim. Biophys.** v. 41, p. 846–851, 2009.

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

BRADSHAW, T. P.; MCMILLAN, D. C.; CROUCH, R. K. e JOLLOW, D. J. Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsona hydroxylamine. **Free Radic Biol Med.**, v. 22, 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, **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.

BUCARETCHI, F.; MIGLIOLI, L.; BARACAT, E. C. E.; MADUREIRA, P. R.; DE CAPITANI, E. M.; VIEIRA, R. J. Exposição aguda à dapsona e metemoglobinemia em crianças:tratamento com doses múltiplas de carvão ativado associado ou não ao azul de metileno. **Jornal de Pediatria.**, v. 76(4): 290-294, 2000.

BUKOWSKA, B. E KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters.**, v.152, p.73–84, 2004.

CAMELINI, C. M.; MARASCHIN, M.; MENDONÇA, M. M.; ZUCCO, C.; FERREIRA, A. G.; TAVARES, L. A. Structural characterization of β -glucans of *Agaricus*

brasiliensis in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. **Biotechnology Letters.**, v. 27, p. 1295-1299, 2005.

CASADEVALL, V.U. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo em modelos celulares. Barcelona, 2009. Facultat de Farmàcia – Departament de Fisiologia - Universitat de Barcelona.

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

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

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

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

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

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

COLEMAN, M. D.; FERNANDES S.; KHANDERIA L. A preliminary evaluation of a novel method to monitor a triple antioxidant combination (vitamins E, C and a-lipoic acid) in diabetic volunteers using in vitro methaemoglobin formation. **Environmental Toxicology and Pharmacology.**, v. 14, p. 69- 75, 2003.

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

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

COLLINS, A. R.; DOBSON,V. L.; DUSINSKA, M.; KENNEDY,G. AND STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutat. Res.**, 375, p. 185-193, 1997.

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

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

D'SOUZA, D. AND DAS, B.C. Genotoxic effects of *Mycobacterium leprae* infection in humans. **Mutat. Res.**, v. 305, p. 211-222, 1994.

D'SOUZA, D.; DAS, B. C. AND THOMAS, I.M. Cytogenetic studies in leprosy patients before and after chemotherapy. **Hum. Genet.**, v. 87, p. 665-670, 1991.

DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.; DESTÉFANIS, V. F. M.; LEIFA, F.; TARARTHUCH; A. L.; LIMA FILHO CAVALCANTE, J. H.; FIGUEIREDO, B. C.; DALLA SANTA, O. R.; RAYMUNDO, M. S.; HABU, S.; SOCCOL, C. R. Kidney Function Indices in Mice after Long Intake of *Agaricus brasiliensis* Mycelia (= *Agaricus blazei*, *Agaricus subrufescens*) Produced by Solid State Cultivation. **Journal of Biological Sciences.**, v. 9, n. 1, p. 21-28, 2009.

DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.; FERNANDES, L. C.; BONATTO, S. J. R.; BELLO, S. R.; MONTEIRO, M. C.; KHALIL, N. M.; DALLA SANTA, O. R.; SOCCOL, C. R.; GERN, J. C.; SANTOS, C. A. M. *Agaricus brasiliensis*-enriched functional product promotes in mice increase in HDL levels and immunomodulate to Th1 CD4+T subsets. *A. brasiliensis* functional product and biological benefits. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy.**, v. 4, n. 4, p. 957-970, 2010.

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

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

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, p. 319–323, 1999.

DIJKGRAAF, G. J. P.; HUIJUAN, L.; BUSSEY, H. Cell-wall β -glucans of *Saccharomyces cerevisiae* In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, v. 6, p. 179-213, 2002.

DODD S, DEAN O, COPOLOV D, MALHI G, BERK M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. **Expert Opin Biol Ther.**, v. 8(12): 1955-62, 2008.

DOMANSKI, A. V.; LAPSHINA, E. A.; ZADODNIK, I. B. Oxidative processes induced by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells: chemiluminescence studies. **Biochemistry**. v. 70, n.7, p. 761-769, 2005.

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, p.748e5–748e10, 2010.

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

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

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

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

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

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. **eCAM**, v. 5(1), p. 3–15, 2008.

FORD, P. G. Dapsona. **Current Problems in Dermatology.**, v. 12, n. 5, p. 242-5, 2000.

FREI, B. Molecular and biological mechanism of antioxidant action. **Fed. Am. Soc. for Ex. Bio. J.**, v. 13, p. 963-964, 1999.

FURMAN, A. E. F. Ação antioxidante de extrato padronizado de ginkgo biloba em eritrócitos de indivíduos normais e de portadores de anemia falciforme, submetidos à sobrecarga oxidativa, in vitro. **Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná.**, 2011

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

GANDHI1, G AND SINGH, B.; DNA damage studies in untreated and treated leprosy patients. **Mutagenesis.**, vol. 19 no. 6 p. 483-488, 2004.

GARAD A.S.; SURYAKAR A.N.; SHINDE C.B. Oxidative Stress and Role of Thiol in Leprosy. **International Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.**; vol. 3: p. 22-26, 2014.

GEORGAKOULI, K. et al. α -Lipoic acid supplementation up-regulates antioxidant capacity in adults with G6PD deficiency. **Food Chem. Toxicol.**, 2013.

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

GIBSON, Q. Introduction: congenital methemoglobinemia revisited. **Blood.**, v. 100, 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. **British Journal of Clinical Pharmacology.**, v.40, n.6, p.531-8, 1995.

GITIKA, B.; SAI, R. M.; SHARMA, S. K.; ILAVAZHAGAN, G.; BANERJEE, P. K. Quercetin protects C6 glial cells from oxidative stress induced by tertiary-butylhydroperoxide. **Free Radic. Res.**, v. 40, p. 95–102, 2006.

GOLLAPUDI, B.B.; MCFADDEN, L. G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mut Res.**, v. 347, p. 97–99, 1995.

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

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

GRASSO, S.; SCIFO, C.; CARDILE, V.; GULINO, R. e RENIS, M. Adaptative responses to the stress induced by hyperthermia or hydrogen peroxide in human fibroblasts. **Experimental Biology and Medicine.**, v. 228, p.491–498, 2003.

GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology.**, 11.ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003.

GROSSMAN, S.; BUDINSKY, R. e 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, p. 870–877, 1995.

GROSSMAN, S.J.; JOLLOW, D.J. Role of dapsone hydroxylamine in dapsone-induced hemolytic anemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 244, p. 118–125, 1988.

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

HACHEL, C.; BEIGUELMAN, B. Chromosomal aberrations in cultures of skin fibroblasts of leprosy patients. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.**; v. 53, p. 533–539, 1985.

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

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

HARRIS, J. R. **Blood cell biochemistry**. London: Plenum Press,. v. 3: Erythroid Cells. Cap. 7. 1991

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

HEGDE et al. Oxidized Base Damage and Single-Strand Break Repair in Mammalian Genomes: Role of Disordered Regions and Posttranslational Modifications in Early Enzymes. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 110, p. 123–153, 2012.

HENNEBERG, R. Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de pacientes de hemoglobina S. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.**, 2013.

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

HUANG, S-J; MAU, J-L. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of g-irradiation. **LWT.**, v. 39, p. 707–716, 2006.

JONG, C. S. Fungal cell wall glycans In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers: Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH., v. 6. p. 159-178, 2002.

K. G. BHATTACHARYYA, S. S. GUPTA, COLLOIDS AND SURFACES A: Physicochem. **Eng. Aspects.**, v. 277, p. 191, 2006.

KALAISELVI, K., RAJAGURU, P., PALANIVEL, M.; USHARANI, M. V. AND RAMU,G. Chromosomal aberrations, micronucleus and comet assay on peripheral blood lymphocytes of leprosy patients undergoing multidrug treatment. **Mutagenesis.**, v.17, p. 309-312, 2002.

KASAI, H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. **Mutat Res** v. 387, p.147–163, 1997.

KASAI, H.; HE, L. M.; KAWAMURA, M.; YANG, P.T. ; DENG, X.W.; MUNKANTA, M.; YAMASHITA, A.; TERUNUMA, H.; HIRAMA, M.; HORIUCHI, I.; NATORI, T.; KOGA, T.; AMANO, Y.; YAMAGUCHI, N.; Ito M. IL-12 Production Induced by *Agaricus blazei* Fraction H (ABH) Involves Toll-like Receptor (TLR). **eCAM**. v.3 (1): p. 259–267, 2004.

KER, Y. B.; CHEN, K. C.; CHYAU, C. C.; CHEN, C. C.; GUO, J. H.; HSIEH, C.L.; WANG, H.E.; PENG, C. C.; CHANG, C. H.; PENG, R. Y. Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* Mycelia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v. 53, p. 7052-7058, 2005.

KIM, D. e GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 27–49, 2005.

KOHN, H.I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **J Pharmacol Experimen Ther.**; v 82, p. 292-300, 1944.

KOZHUKHAR, A. V.; YASINSKA, I. M.; SUMBAYEV, V. V. Nitric oxide inhibits HIF-1 α protein accumulation under hypoxic conditions: implication of 2-oxoglutarate and iron. **Biochimie.**, v 88, n 5, p. 411–8, 2006.

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

LAZAROVA M, LABAJ J, KOVACIKOVA Z, SLAMENOVA D. Diet containing fungal (1 \rightarrow 3)- β -glucan derivative exhibits protective effects against DNA lesions induced in freshly isolated rat cells. **Neoplasma.**, v 51, p. 431–5, 2004.

LEHNINGER, A. L. **Lehninger princípios de bioquímica.**, 3. ed. São Paulo, 2002.

LEHNINGER, A.; NELSON, B.; COX, M. **Princípios de Bioquímica.** Sarvier, 3. ed., São Paulo, 1995.

LISOVSKAYA et al. Clotrimazole enhances lysis of human erythrocytes induced by t-BHP. **Chemico-Biological Interactions.**, v. 180, p. 433–439, 2009.

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

LORENZI TF. Fisiologia das células do sangue e hemostasia. In: LORENZI TF, D'AMICO E, DANIEL MM, SILVEIRA PAA, BUCCHERI.V. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica.**, 3ª Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p.45-192, 2003.

LORENZI, T. F. Manual de hematologia propedêutica e clínica. **Guanabara Koogan.**, Rio de Janeiro., 4 ed. p. 44-83, 2011.

LOW, P. S.; RATHINAVELU, P. e HARRISON, M. L. Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein band 3. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p.14627–14631, 1993.

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

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

MADER, S. **Inquiry to life.**, MacGraw Hill Companies, 8.ed. 1997.

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.

MAJANO, P.L.; MEDINA, J.; ZUBIA, I.; SUNYER, LOURDES.; LARA-PEZZI, E.; MALDONADO-RODRIGUEZ, A.; LÓPEZ-CABRERA, M.; MORENO-OTERO, R. N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. **J Hepatol.**, v. 40, n. 4, p. 632-7, 2004.

MALCHER, N.S.; Avaliação do metabólito dapsona-hidroxilamina na formação de metemoglobina e dano de DNA em modelo *in vitro*. **Relatório técnico – científico/ programa institucional de bolsas de iniciação científica**, 2012.

MALUF, S.W; AND ERDTMANN, B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell-gel electrophoresis. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 124, p. 71-75, 2001.

MANSOUR, HEBA H.; HAFEZ, H. F.; FAHMY, N. M.; HANAFI, N. Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. **biochemical pharmacology.**, V. 75, p. 773-780, 2008.

MARTINS, V. D.; MANFREDINI, V.; PERALBA, M. C. R.; BANFATO, M. S. Alpha-lipoic acid modifies oxidative stress parameters in sickle cell trait subjects and sickle cell patients. **Clin. Nut.**, v. 28, p. 192–197, 2009.

MASJEDI, M. R.; HEIDARY, A.; MOHAMMDI, F.; VELAYATI, A. A; AND DOKOUHAKI, P. Chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes of patients before and after exposure to anti-tuberculosis drugs. **Mutagenesis.**, v. 15, p. 489-494, 2000.

MASSY, Z.A.; STENVINKEL, P.; DRUEKE, T.B.; The Role Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. **Seminars in Dialysis.**, v.22, n.4, p. 405-408, 2009.

MCCORD, J and FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry.**, v.244, n.2, p.6049-6055, 1969.

MCMILLAN, D. C.; SIMSON, J.V.; BUDINSKY, R. A. e JOLLOW, D. J. Dapsone-induced hemolytic anemia: effect of dapsone hydroxylamine on sulfhydryl status, membrane skeletal proteins and morphology of human and rat erythrocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 274, p. 540–547, 1995.

MEHTA, A.; MASON, P. J.; VULLIAMY, T. J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Bailliere's Clinical Haematology.**, v. 13, n. 1, p. 1521–38, 2000.

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

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

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*, 84: 407-412, 1993.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural and Biological Chemistry.**, v. 54, p. 2889-2896, 1990.

MIZUNO, T.K. *Agaricus blazei* Murrill medicinal and dietary effects. **Food Rev Int.**, v. 11, p.167–72, 1995.

MONTEIRO et al. Development and characterization of a new oral dapsone nanoemulsion system: permeability and in silico bioavailability studies. **Inter. J. of Nanomedicine.**, v. 7, p. 5175-5182, 2012.

MORAES, N.V.; MELLO, M.H.; SOUZA, A.M.; SAMPAIO, S.V.; QUEIROZ, R.H.C. Potencialização do efeito metemoglobinizante da dapsona em ratos pela n-acetilcisteína. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, V. 44, n 1, p. 99-104, 2008.

MORIDANI, M. Y. et al. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. **Free Radic Biol Med.**, v. 34, n.2, p. 243-53, 2003.

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

MURRAY, R. K.; GRANER, D. K.; MAYES, P.A.; RODWELL, U. W. Harper. **Bioquímica**. 7.ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

MUSCH, M. W.; HUBERT, E. M. e GOLDSTEIN, L. Volume expansion stimulates p72syk and p56lyn in skate erythrocytes. **J. Biol. Chem.** v. 274, p.7923–7928, 1999. n.1, p.118-25, 1988.

NAGATA, J.; HIGASHIUESATO, Y.; CHINEN, I; SAITO, M.; IWABUCHI, K.; ONO, K. Effects of Water-Soluble Hemicellulose from Soybean Hull on Serum Antibody Levels and Activation of Macrophages in rats. **J. Agric. Food. Chem.**, 49(10): 4965-4970, 2001.

NOLIN, T.D.; MCMENAMIN, M. E.; HIMMELFARB, J. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.852, n.1-2, p.554-561, 2007.

PANDEY, K. B. e RIZVI, S. I. Protective Effect of Resveratrol on Markers of Oxidative Stress in Human Erythrocytes Subjected to In Vitro Oxidative Insult. **Phytother. Res.**, v. 24, p. S11–S14, 2010.

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

PARK, Y. et al. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 107, n.4, p. 1289-94, 2010.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Determinação da concentração de beta-glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.**, v. 23, n. 3, p. 312-316, 2003.

PEÑUELA, O. A. Hemoglobina: Una molécula modelo para el investigador. **Colombia Médica.**, v. 36, n.3, p. 215-224, 2005.

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

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.

PERCY, M. J. e LAPPIN, T. R. Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b5 reductase deficiency. **British Journal of Haematology.**, v. 141, p. 298–308, 2008.

PESSÔA, M. C. A. O efeito dos antioxidantes ácido alfa-lipoico e resveratrol em parâmetros do estresse oxidativo no uso da poliquimioterapia para hanseníase. **Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Pará- Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas**, 2014.

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

PRASAD, R.; SINGH, R.; MISHRA, O. P. e PANDEY, M. Dapsone Induced Methemoglobinemia : Intermittent vs Continuous Intravenous Methylene Blue Therapy. **Indian Journal of Pediatrics.**, v. 75, p. 245-247, 2008.

RAFTOS, J.E.; WHILLIER, S.; CHAPMAN, B.E.; KUCHEL, P.W. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** V. 39 p.1698–1706, 2007.

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

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, p.1231-1237, 1999.

RED CELL BIOLOGY: Erythropoiesis, Apoptosis, and Metabolism. Disponível em: <<http://faculty.washington.edu/calvoc/Documents/LabM321/Lectures/3RBC.ppt>>. Acesso em 10/02/2015.

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

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

REILLY, T. P.; WOSTER, P. M. e SVENSSON, C. K. Methemoglobin formation by hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone: Implications for differences in adverse drug reactions. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics.**, v. 288, p. 951–959, 1999.

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

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

RELIENE, R.; FISCHER, E.; SCHIESTL, R. H. Effect of N-Acetyl Cysteine on Oxidative DNA Damage and the Frequency of DNA Deletions in *Atm*-Deficient Mice. **CANCER RESEARCH.**, v 64, p. 5148–5153, 2004.

RELIENE, RAMUNE.; POLLARDA, J. M.; SOBOL, Z.; TROUILLER, B.; GATTI, R. A.; SCHIEST, R. H. N-acetyl cysteine protects against ionizing radiation-induced DNA damage but not against cell killing in yeast and mammals. **Mutation Research** v. 665, p. 37–43, 2009.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, p. 933–956, 1996.

RIFKIND, J. M. e RAMASAMY, S. Redox reactions of hemoglobin. **Antioxid Redox Signal.**, v. 6, n. 3, p. 657-666, 2004.

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

RIMOLI, L.F.; GODOY, M, F. Efetividade da vitamina E sobre o estresse oxidativo, em hansenianos da forma multibacilar sob tratamento. **Hansen Int.**, v. 36, n. 1, p. 17-21, 2011.

ROSS, G. D.; VĚTVIČKA, V.; YAN, J.; XIA Y.; VĚTVIČKOVÁ, J. Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer (Review). **Immunopharmacology.**, v. 42, p. 61 – 74, 1999.

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

SALVEMINI, F.; FRANZE, A.; LERVOLINO, A. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 274, p. 2750–2757, 1999.

SARDAS, S.; YILMAZ,M.; OZTOK,U.; CAKIR, N. AND KARAKAYA, A.E. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. **Mutat. Res.**, v. 490, p. 123-129, 2001.

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, 2014.

SCHIFF, D. E.; ROBERTS, W. D. e 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.

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

SHIKAMA, K. The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: Venerable Puzzle. **Chem. Rev.**, v.98, p.1357-1373,1998.

SHIVA, S.; HUANG, Z.; GRUBINA, R.; SUN, J.; RINGWOOD, L. A.; MACARTHUR, P. H.; XU, X.; MURPHY, E.; DARLEY-USMAR, V. M. e GLADWIN, M. T. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. **Circ. Res.**, v.100, p. 654-661, 2007.

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

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R. AND SCHNEIDER,E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOARES, A.A.; SOUZA, C.G.; DANIEL, F.M.; FERRARI, G.P.; COSTA, S.M; PERALTA, R.M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. **Food Chemistry.**, v. 112, p. 775-781, 2009.

SOBRATTEE, M. A. NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMAB, Ou.I. BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation research. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; IKEHARA, Y.; INAFUKU, K.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S. Secretion of TNF- α , IL-8 and Nitric Oxide in Macrophages Activated with *Agaricus blazei* Murril Fractions in vitro. **Cell structure and function.**, v. 26, p.103-108, 2001.

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

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet.**, v. 364, n.9442, p. 1343-60, 2004.

LIU, T.; LI, Y.; DU, Q.; SUN, J.; JIAO, Y.; YANG, G.; WANG, Z.; XIA, Y.; ZHANG, W.; WANG, K.; ZHU, H.; WU, D. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces., v. 90 p.197, 2012.

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

TEDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; IACOMINO, G.; RUSSO, G. L.; CARRATURO, A.; FARUOLO, C.; MOIO, L. e PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. **J. Nutr. Biochem.**, v. 11, p. 114-9, 2000.

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

THUONG-NGUYEN, V.; KADUNCE, D. P.; HENDRIX, J. D.; GAMMON, W. R. e ZONE, J. J. Inhibition of neutrophil adherence to antibody by dapsone: A possible therapeutic mechanism in the treatment of IgA dermatoses. **J. Invest. Dermatol.**, v. 100, p. 349–355, 1993.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen.**; v. 35, p. 206–221, 2008.

TICE, R. R.; STRAUSS, G.H.S. AND PETERS, W.P. High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. **Mutat. Res.**, 271, p. 103—113, 1992.

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.**, Charleston, v. 22, n. 7, p. 1183-93, 1997.

TRIMBAKE SB, SONTAKKE AN, DHAT VV. Oxidative stress and antioxidant vitamins in leprosy. **International Journal of Research in Medical Sciences**; v. 1, p. 226-229, 2013.

TUMUR, Z.; SHIMIZU, H.; ENOMOTO, A.; MIYAZAKI, H.; NIWA, T. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation. **American Journal Nephrology.**, v.31, n. 5, p. 435-41, 2010.

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

URSINI, M. V.; PARRELLA, A.; ROSA, G. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. **Biochemical Journal.**, v. 323, p. 801–806, 1997.

VAGE, C.; SAAB, N.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Dapsone-induced hematologic toxicity: comparison of the methemoglobin-forming ability of hydroxylamine metabolites of dapsone in rat and human blood. **Toxicology and Applied Pharmacology.**, v.129, n.2, p. 309-16, 1994.

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

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

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

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

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

VYAS, P.; ROYCHOWDHURY, S.; WOSTER, P. e 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, p. 275–286, 2005.

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

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

WASSER, S.P.; DIDUKH, M.Y.; AMAZONAS, M.A; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A.F. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake Mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms.**, v. 4, p. 267-290, 2002.

WASSER, S.P.; WEIS, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology.**, v. 19, p. 65-96, 1999.

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

WOLVERTON, S. E. Monitoring for adverse effects from systemic drugs used in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology.**, v. 26, p. 661-79, 1992.

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

WRIGHT, R. O.; LEWANDER, W. J.; WOOLF, A. D. Methemoglobinemia: Etiology, Pharmacology, and Clinical Management. **Annals Of Emergency Medicine.**, v. 34, n. 5, p. 646-656, 1999.

WRIGHT, R. O.; WOOLF, A. D.; SHANNON, M. W.; N-acetylcysteine reduces methemoglobin in in vitro model of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Acad Emerg Med.**, V 5, p. 225-229, 1998.

WRIGHT, R.O.; MAGNANI, B. J.; SHANNON, M. W. N-acetylcysteine reduces methemoglobin in vitro. **Ann Emerg Med.**, V. 28, p. 499-503, 1996.

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

YUMINAMOCHI, E.; KOIKE, T.; TAKEDA, K.; HORIUCHI, I.; OKUMURA, K. Interleukin-12- and interferon- γ -mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei* Murill. **Immunology.**, v. 121, p. 197–206, 2007.

ZHU, Y. e STILLER, M. Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. **J. of the Am. Ac. of Dermatol.**, v. 45, n. 3, p. 420-434, 2001.

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

ANEXO A: TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



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

Você está sendo convidado (a) para participar como voluntário em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Sendo uma delas sua, e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/ICS - Sala 13 - Campus Universitário, nº 01, Guamá; CEP: 66075-110 - Belém-Pará. Tel/Fax. 3201-7735 E-mail: cepccs@ufpa.br

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa será realizada pelo aluno de Mestrado em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFPA) Antonio Rafael Quadros Gomes, sob orientação da Professora Doutora Marta Chagas Monteiro, (Fone: (91) 981917135) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UFPA. Tem como objetivo Avaliar o efeito protetor de antioxidantes na metemoglobinemia e no dano em DNA induzido pelo metabólito dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH) em modelos in vitro, correlacionando à ocorrência (ou reversão) do estresse oxidativo. Os voluntários serão alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ UFPA, sendo que a obtenção do sangue venoso para a preparação será em local apropriado e por um profissional habilitado. Os critérios de exclusão serão o uso recente de algum medicamento, doenças crônicas, menor de 20 anos e maiores de 45 anos e uso de tabaco. Todo material coletado nesta pesquisa ficará sob a guarda da pesquisadora responsável durante o período de utilização e logo depois será destruído.

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

Marta Chagas Monteiro (Orientadora)

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE ANTIOXIDANTES NA METEMOGLOBINA E DANO EM DNA INDUZIDO PELO METABÓLITO DDS-NHOH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS *in vitro*

Pesquisador: Marta Chagas Monteiro

Versão: 1

CAAE: 42778714.5.0000.0018

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - ICS/UFPA **Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.173.696

Data da Relatoria: 26/05/2015

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo apresentado dispõe de metodologia e critérios definidos conforme resolução 466/12 do CNS/MS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados contemplam os sugeridos pelo Sistema CEP/CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto somos pela aprovação do protocolo. Este é nosso parecer, SMJ.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 06 de Agosto de 2015

Assinado por:
Wallace Raimundo Araujo dos Santos
(Coordenador)