

# ACÇÃO ANTIOXIDANTE DO CALCIFEROL NA METEMOGLOBINA E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS PELA DAPSONA-HIDROXILAMINA IN VITRO

Kaio Murilo Monteiro Espíndola<sup>1</sup>; Pricila Rodrigues Gonçalves<sup>1</sup>; Everton Luiz Pompeu Varela<sup>1</sup>; Bruno Alexandre Quadros Gomes<sup>2</sup>; Marta Chagas Monteiro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduação, <sup>2</sup>Mestrado, <sup>3</sup>Doutorado  
Universidade Federal do Pará (UFPA)  
pri.pharma.12@gmail.com

**Introdução:** A dapsona (DDS), que faz parte do tratamento poliquimioterapia (PQT) da hanseníase, junto com rifampicina e clofazimina, frequentemente está relacionada a graves reações adversas aos pacientes. Esses efeitos tóxicos são provocados principalmente pelo metabólito DDS-NOH, e são indicativos de alterações no estado redox, caracterizados por estresse oxidativo, levando a alterações hematológicas (metemoglobinemia e anemia hemolítica) e no Sistema Nervoso Central, comprometendo o tratamento. De fato, DDS-NOH induz a formação de metemoglobina (MetHb), pela oxidação de íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ) a íon férrico ( $Fe^{3+}$ ), e hemólise em pacientes durante a PQT, o que ocasionando a liberação de  $Fe^{2+}$  no organismo, que em excesso torna-se prejudicial ao equilíbrio redox. Deste modo, a presença de DDS-NOH é essencial para o desenvolvimento dos efeitos hematotóxicos e neurotóxicos observados durante tratamento com DDS. Nesse sentido, o ! calciferol (vitamina D), cuja principal função consiste na regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea, pode ter propriedades antioxidantes e importante papel na redução dos altos níveis de MetHb induzidos durante a PQT, bem como conferir proteção aos eritrócitos. Além da citotoxicidade, a MetHb pode ter importante papel no transporte e acúmulo intracelular de ferro no tecido cerebral. Desta forma, é importante investigar a formação de MetHb e estresse oxidativo, que podem constituir um mecanismo comum na hemólise e desenvolvimento de neurodegeneração. De fato, o calciferol é um composto lipossolúvel e em sua estrutura química e de seus metabólitos, apresentam ramificações hidroxílicas, possivelmente relacionadas a uma atividade antioxidante. **Objetivos:** Este projeto tem o objetivo de avaliar os efeitos do calciferol na redução dos níveis de metemoglobina e sobre o estresse oxidativo causado pela DDS-NOH em modelo in vitro. **Métodos:** Foram coletadas amostras de sangue total de 10 voluntários sadios entre 18 e 25 anos, o qual foi lavado e as hemácias foram separadas para preparar suspensões a 50%, as quais foram incubadas para a realização dos testes bioquímicos. Assim, as hemácias foram pré-tratadas com 100  $\mu$ L de DDS-NOH 2,5  $\mu$ g/mL por 60 minutos e, posteriormente, tratados com 100  $\mu$ L de calciferol em diferentes concentrações (5, 10, 20, 50 e 100  $\mu$ M) por mais 60 minutos. Após a incubação das amostras, foram avaliados os seguintes parâmetros: percentual de MetHb pelo método proposto por Hegesh (1970), onde observa-se a variação de absorvância causada pela adição de cianeto de potássio (KCN) no hemolisado tamponado com ferricianeto de potássio ( $K_3Fe(CN)_6$ ), com absorvância em 632 nm; Determinação da capacidade antioxidante da amostra pelo Método do TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao trolox), adaptado por Rufino et al. (2007), que consiste na inibição do do cátion ABTS<sup>+</sup>, por antioxidantes presentes na amostra em uma reação colorimétrica com absorvância em 734 nm; Peroxidação Lipídica, através do Malondialdeído (MDA), método proposto por STEELS et al. (1994) e baseia-se na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, formando o complexo MDA-TBA de cor rósea, com absorvância em 535 nm; determinação do óxido nítrico (NO), pelo método de Granger et al (1990), onde a reação de nitrito presente no soro e o reagente de Griess originam um cromógeno de cor rosa, que

é detectado por espectrofotometria a 540 nm. Os dados foram analisados pelo programa Prism 5.0, através da Análise de Variância (ANOVA) oneway, seguido pelo teste de Tukey, considerando  $p \leq 0,05$ . **Resultados e Discussão:** Atualmente, o antídoto mais eficaz para níveis elevados de MetHb é o azul de metileno que atua como um cofator no processo de redução da MetHb pela ação da enzima NADPH redutase. Esse composto é administrado por via intravenosa, 1-2 mg / kg de peso corporal durante um período de 5 minutos, mas pode ser tóxico em altas doses (COOPER, 1997). Por isso, várias outras terapias vêm sendo estudadas, especialmente as que usam antioxidantes (Bergamaschi et al. 2011). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com DDS-NOH levou a um aumento da formação de MetHb e o pré-tratamento com calciferol foi capaz de reverter esses efeitos, especialmente nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  e efeito semelhante ao azul de metileno (40nM). Além disso, DDS-NOH reduziu TEAC, levando a um aumento os níveis de NO e MDA que caracteriza uma elevação de estresse oxidativo. No entanto, o calciferol foi capaz de aumentar TEAC e diminuir os níveis de MDA e NO. A lipoperoxidação causada principalmente pelo radical  $\text{OH}\cdot$ , pode ser catalisada por íons Fe através da conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcoxila,  $\text{LO}\cdot$  e peroxila,  $\text{LOO}\cdot$ ), que por sua vez, iniciam uma cadeia de reações denominada ramificação que podem promover a hemólise e intensificando a agressão oxidativa pela liberação de  $\text{Fe}^{2+}$  que tem ação catalítica na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) por um processo denominado reação de Fenton (PRASAD 2007). Apesar da literatura não dispor de estudos sobre a ação do calciferol sobre a MetHb, há pesquisas que sugerem que o calciferol pode ter propriedades antioxidantes, reestabelecendo o equilíbrio redox, tem efeito antiproliferativo em alguns tipos de tumores e imunomodulador em doenças autoimunes (Konety et al, 2000). Assim, a redução dos níveis de MetHb pelo calciferol pode diminuir os efeitos hematotóxicos e neurológicos causados pela DDS-NOH, podendo futuramente ser útil como terapia adjuvante durante o tratamento da Hanseníase. Além disso, este estudo a cerca da avaliação do estresse oxidativo tem relevância significativa na busca de biomarcadores do estresse oxidativo, que desempenham importante papel na gênese de processos metabólicos associados a patologias, incluindo no sistema nervoso, podendo facilitar o diagnóstico, bem como, a elucidação de mecanismos e implicações biológicas do dano oxidativo, possibilitando o planejamento de ações eficazes no controle e prevenção de vários da doença (BARBOSA et al., 2008). **Conclusão:** Nosso estudo permitiu concluir que o calciferol deve apresentar propriedades antioxidantes capazes de reverter a oxidação da hemoglobina, além de aumentar a capacidade antioxidante e reestabelecendo o equilíbrio redox. Portanto, estudos adicionais são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos na redução da MetHb e o potencial efeito do calciferol como agente antioxidante e terapêutica aos efeitos adversos na terapia da Hanseníase.

### Referências:

1. Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. C. G.; Paula, S. O.; Minin, V. P. R.; Bressan, J. Oxidative stress: assessment of biomarkers. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de alimentos e nutrição.*, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.
2. Bergamaschi, M.M.; Steinhorst, G. K.; Valério, D. A.; Queiroz, R. H. Curcumin could prevent methemoglobinemia induced by dapsone in rats. *Food and Chemical toxicology.*, v. 49, p. 1638-1641, 2011.
3. Cooper, H. A. Methemoglobinemia caused by benzocaine topical spray. *South Med. J.*, v. 90, p. 946-948, 1997.

4. Konety BR.; Leman E; Vietmeier B; Arlotti J; Dhir R; Getzenberg RH. In Vitro and In Vivo Effects of Vitamin D (Calcitriol) Administration on The Normal Neonatal and Prepubertal Prostate. The Journal of Urology, Vol. 164, 1812–1818, 2000.
5. Prasad, C.V.B.; Kodliwadmata, M.V.; Kodliwadmata, G.B. Erythrocyte superoxide dismutase, catalase activities and hydrogen peroxide induced lipid peroxidation in leprosy. Leprosy! Review. v.78, p. 391–397, 2007.