

## EFEITOS DO ALFA-TOCOFEROL NA A METEMOGLOBINA E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS PELA DAPSONA-HIDROXILAMINA IN VITRO

Pricila Rodrigues Gonçalves<sup>1</sup>; Everton Luiz Pompeu Varela<sup>1</sup>; Antônio Rafael Quadros Gomes<sup>2</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 Hanseníase ou Mal de Hansen (MH) é uma doença infectocontagiosa, crônica, causada pelo bacilo intracelular obrigatório, denominado *Mycobacterium leprae*. A poliquimioterapia (PQT) padronizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é constituída pelos medicamentos, rifampicina, dapsona (DDS) e clofazimina, e se constitui hoje como a principal estratégia para interromper a cadeia de transmissão do *M. leprae*. No entanto, a DDS, especialmente seu metabólito dapsona-hidroxicilamina (DDS-NOH), é responsável por grande número de reações adversas, tais como alterações hematológicas (metemoglobinemia e anemia hemolítica) e no Sistema Nervoso Central. Tais efeitos induzidos por DDS-NOH são indicativos de alterações no estado redox, caracterizados por estresse oxidativo, levando formação de metemoglobina (MetHb). De fato, DDS-NOH induz a formação de MetHb e hemólise em pacientes durante a PQT, e ocasionando a liberação das moléculas de Fe no organismo, que em excesso se torna 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. Para a manutenção do estado reduzido, as hemácias possuem várias formas de defesa antioxidante, entre elas, as moléculas pequenas, como glutatona reduzida (GSH), a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADPH),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e as vitaminas C. Os compostos com propriedades antioxidantes como o  $\alpha$ -tocoferol, podem ter importante papel na redução dos altos níveis de MetHb, bem como conferir proteção às eritrócitos. De fato, o  $\alpha$ -tocoferol tem elevada capacidade antioxidante e pode ser útil na redução da MetHb e combate ao estresse oxidativo.

**Objetivos:** Assim, este trabalho tem o objetivo avaliar os efeitos do  $\alpha$ -tocoferol na redução dos níveis de metemoglobina e sobre o estresse oxidativo induzido 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  $\alpha$ -tocoferol 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<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), 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 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. Por isso, várias outras terapias vêm sendo estudadas, especialmente as que usam antioxidantes. Nossos resultados mostraram que a DDS-NOH causa o aumento da formação de MetHb e a adição do  $\alpha$ -tocoferol foi capaz de reverter esses efeitos, em quase todas as concentrações (10, 20, 50 e 100  $\mu$ M), tendo efeito semelhante ao azul de metileno (40nM). Além disso, DDS-NOH reduziu TEAC, com aumento de MDA e NO, caracterizando estresse oxidativo. No entanto, o  $\alpha$ -tocoferol foi capaz de aumentar TEAC e diminuir os níveis de MDA e NO. Estudos realizados por Vijayaraghavan, et al. (2005), mostraram que suplementação com o  $\alpha$ -tocoferol previne o estresse oxidativo causado por ROS e aumenta o estado antioxidante durante o curso crônico da doença e do tratamento PQT. O  $\alpha$ -tocoferol é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares, podendo prevenir ou reduzir os danos causados pela peroxidação lipídica (Kay et al. 1986; Chandra et al. 2013). Além disso, pode aumentar a síntese e concentração de GSH do eritrócito, devido a indução da glutathione sintase ou por uma redução do uso de GSH para a detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidos pela peroxidação lipídica da membrana celular, tais como radical superóxido, radical hidroxila, e oxigênio singlet (Machlin e Bendich, 1987). Desta forma, é possível deduzir que a membrana pode estar sendo protegida pela presença de  $\alpha$ -tocoferol (COSTAGLIOLA et al, 1985). Estes estudos corroboram com nossos resultados e fornecem bases para compreender que, devido a sua alta capacidade antioxidante,  $\alpha$ -tocoferol pode reestabelecer o equilíbrio redox e diminuir os efeitos hematotóxicos e neurológicos causados pela DDS-NOH, podendo ser útil como terapia adjuvante durante o tratamento da Hanseníase. **Conclusão:** A partir desses resultados, concluímos que o  $\alpha$ -tocoferol apresenta propriedades antioxidantes capazes de reverter a oxidação da hemoglobina, diminuindo as concentrações de MetHb, além de aumentar a capacidade antioxidante total, reestabelecendo o equilíbrio redox. Assim, novos estudos são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos na redução da MetHb e o potencial efeito do  $\alpha$ -tocoferol como agente terapêutica aos efeitos adversos na terapia da Hanseníase, podendo apresentar maior efetividade, menor custo e baixa toxicidade.

## Referências:

1. Chandra P; Sharma D.; Gupta A; Sowmya MK. An In-vitro study of Lipid peroxidation, Vitamin E and Vitamin C levels in saliva of oral precancerous patients in District Hapur of Uttar Pradesh. International Journal of Biomedical And Advance Research, IJBAR, 04 (04), 2013.
2. Costagliola, C.; Linbondi, M.; Menzione, M.; Rinaldi, E.; Auricchio, G. Vitamin E and red blood cell glutathione. Metabolism, Philadelphia, v. 34, n. 8, p. 712-713, 1985.

3. Kay, M.M.B.; Bosman, G.J.C.G.M.; Shapiro, S.S.; Bendich, A.; BASSEL, P.S. Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., v.83, p.2463-2467. 1986.
4. Machlin, L.J.; Bendich, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. FASEB J. 1 ed., 1987, p. 441-445.
5. Vijayaraghavan, R. et al. 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. 1121-1128, 2005.