



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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ALFA  
LIPÓICO NA NEUROINFLAMAÇÃO E ESTRESSE  
OXIDATIVO NO HIPOCAMPO INDUZIDOS POR DAPSONA  
EM MODELO ANIMAL**

**Sávio Monteiro dos Santos**

BELÉM - PA

2019



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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ALFA  
LIPÓICO NA NEUROINFLAMAÇÃO E ESTRESSE  
OXIDATIVO NO HIPOCAMPO INDUZIDOS POR DAPSONA  
EM MODELO ANIMAL**

Aluno: Sávio Monteiro dos Santos

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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

2019

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

---

S237a Santos, Sávio Monteiro dos  
Avaliação do efeito protetor do ácido alfa lipóico na  
neuroinflamação e estresse oxidativo no hipocampo  
induzidos por dapsona em modelo animal / Sávio Monteiro  
dos Santos. — 2019.  
74 f. : il. color.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marta Chagas Monteiro  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. dapsona. 2. ácido alfa lipóico. 3. estresse oxidativo.  
4. hipocampo. 5. neuroinflamação. I. Título.

CDD 615.1

---

SÁVIO MONTEIRO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ALFA  
LIPÓICO NA NEUROINFLAMAÇÃO E ESTRESSE  
OXIDATIVO NO HIPOCAMPO INDUZIDOS POR DAPSONA  
EM MODELO ANIMAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro, PPGCF/UFPA (Orientadora)

---

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima, PPGCF/UFPA

---

Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado, PPGNBC/UFPA

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a cada ser vivo que, de alguma forma, contribuiu com o desenvolvimento da ciência e, agora, faz parte destas páginas e de um pequeno espaço no Universo.

## ΕΠΪΓΡΑΦΕ

*“Expecto Patronum”*

*J.K. Rowling*

## RESUMO

Dapsona (DDS) é um fármaco da poliquimioterapia da hanseníase e pode ser usado para tratar outras doenças, tanto infecciosas como inflamatórias. Contudo, as reações adversas (RAM), principalmente distúrbios hematológicos e neurológicos podem limitar o uso desta droga. O principal mecanismo de toxicidade é a oxidação de hemoglobina e consequente liberação de ferro, um metal altamente catalítico de processos oxidativos. Por outro lado, reações no sistema nervoso provocadas por DDS não são bem descritas, ainda que o dano nestes tecidos tenha como uma das causas o acúmulo de ferro, levando à neurodegeneração. Nesse sentido, antioxidantes como o ácido  $\alpha$  - lipóico (ALA) podem auxiliar contra os efeitos tóxicos do uso de fármacos como DDS. Assim, avaliar o perfil oxidativo gerado por DDS e sua relação com a neuroinflamação e o efeito do ALA constituem o objetivo deste trabalho. Para isto, foram dosados TEAC, GSH, TBARS, SOD, CAT e Ferro, citocinas IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-4 e BDNF, além da imunofenotipagem de células macrofágicas/microglial (F4/80+) e astrócitos (GFAP) no hipocampo de camundongos tratados com DDS (40 mg/Kg/5 dias e com doses de ALA em 12,5, 25 e 50 mg/Kg. Os dados obtidos mostram aumento de TBARS e níveis de ferro e redução de TEAC e GSH no grupo tratado com DDS. Os grupos tratados com ALA apresentam aumento de TEAC e GSH, além da diminuição de TBARS. Citocinas IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-4 tiveram aumento da expressão, acompanhado pela redução de BDNF em grupo DDS em contraste aos grupos tratados com ALA. Além disto, a imunofenotipagem de astrócitos e microglia mostrou o perfil de migração característico de processos inflamatórios no grupo DDS. Contudo, ALA apresentou capacidade de proteção contra os danos oxidativos atuando por mecanismos múltiplos, com potencial ação anti-inflamatória e imunomoduladora sobre o SNC. Dessa forma, é possível concluir que o tratamento prolongado de DDS provoca estresse oxidativo e inflamação no hipocampo e níveis elevados de ferro podem levar à geração de espécies reativas de oxigênio e consequente dano oxidativo no tecido. Por outro lado, o antioxidante ALA reverte o estresse oxidativo e neuroinflamação causados por DDS.

Palavras-chave: dapsona, ácido  $\alpha$ -lipóico, estresse oxidativo, hipocampo, ferro, neuroinflamação,

## ABSTRACT

Dapsone (DDS) is a leprosy multidrug therapy and can be used to treat other infectious and inflammatory diseases. However, adverse reactions (AR), especially haematological and neurological disorders, may limit the use of this drug. The main mechanism of toxicity is hemoglobin oxidation and consequent release of iron, a highly catalytic metal from oxidative processes. On the other hand, nervous system reactions caused by DDS are not well described, although damage to these tissues is caused by iron accumulation, leading to neurodegeneration. In this sense, antioxidants such as  $\alpha$  - lipoic acid (ALA) may help against the toxic effects of drugs such as DDS. Thus, evaluating the oxidative profile generated by DDS and its relationship with neuroinflammation and the effect of ALA constitute the objective of this work. It was measured TEAC, GSH, TBARS, SOD, CAT and iron, cytokines IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-4 and BDNF, as well as immunophenotyping of macrophage/microglial cells (F4/80+) and astrocytes (GFAP) in the hippocampus of mice treated with DDS (40 mg / kg / 5 days and with ALA doses at 12.5, 25 and 50 mg / kg. The data obtained show increased TBARS and iron levels and reduced TEAC and GSH in the group treated with The ALA-treated groups show increased TEAC and GSH, as well as a decrease in TBARS IL-1 $\beta$ , IL-17 and IL-4 cytokines increased expression, accompanied by a reduction in BDNF in the DDS group in contrast to the treated groups. In addition, the immunophenotyping of astrocytes and microglia showed the characteristic migration profile of inflammatory processes in the DDS group. However, ALA showed protection against oxidative damage acting by multiple mechanisms, with potential anti-inflammatory and immunomodulatory action on ALA. Thus, it is possible to We conclude that prolonged treatment of DDS causes oxidative stress and inflammation in the hippocampus and elevated iron levels can lead to the generation of reactive oxygen species and consequent oxidative tissue damage. On the other hand, the antioxidant ALA reverses the oxidative stress and neuroinflammation caused by DDS.

Keywords: dapsone,  $\alpha$  - lipoic acid, antioxidant, oxidative stress, hippocampus, iron, neuroinflammation,



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fórmula estrutural de dapsona (DDS) .....	16
<b>Figura 2</b>	Mecanismo de ação da DDS no interior de microrganismos	17
<b>Figura 3</b>	Proposta de mecanismos de bioativação e detoxificação de DDS .....	19
<b>Figura 4</b>	Mecanismos de transporte e absorção do ferro no tecido cerebral.....	23
<b>Figura 5</b>	Estrutura química do Ácido $\alpha$ -lipóico (ALA) .....	30
<b>Figura 6</b>	Divisão dos grupos de animais .....	37
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática do delineamento experimental .....	38
<b>Figura 8</b>	Representação esquemática da determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC) ....	39
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática da determinação de glutathiona reduzida (GSH) .....	40
<b>Figura 10</b>	Procedimento para determinação da SOD .....	41
<b>Figura 11</b>	Procedimento para determinação da atividade da enzima catalase (CAT) .....	42
<b>Figura 12</b>	Representação esquemática da dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) .....	43
<b>Figura 13</b>	Efeito do tratamento com ALA sobre TEAC .....	47
<b>Figura 14</b>	Efeito do ALA nos níveis de GSH .....	48
<b>Figura 15</b>	Efeito de Dapsona sobre níveis de SOD .....	49
<b>Figura 16</b>	Efeito de Dapsona sobre os níveis de CAT .....	50
<b>Figura 17</b>	Efeito do ALA sobre os níveis de TBARS .....	51
<b>Figura 18</b>	Efeito do ALA sobre os níveis de ferro .....	52
<b>Figura 19</b>	Efeito de Dapsona sobre macrófagos/microglia (F4/80+) e astrócitos (GFAP+) no hipocampo .....	54
<b>Figura 20</b>	Efeito Dapsona sobre níveis de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-4 e BDNF no hipocampo .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>% MetHb</b>	Percentual de metemoglobina
<b>·OH</b>	Radical hidroxila
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>µg/mL</b>	Micrograma por mililitro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>µmol/L</b>	Micromol por litro
<b>ABTS·</b>	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
<b>ADHL</b>	Acido dihidrolipóico – forma reduzida do ALA
<b>ALA</b>	Acido α-lipóico
<b>AM</b>	Azul de metileno
<b>CAT</b>	Enzima catalase
<b>Cis</b>	Cisteína
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>DCF</b>	Diclorofluoresceína
<b>DCFH</b>	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
<b>DDS</b>	Dapsona
<b>DDS-NO</b>	Dapsona nitrosoareno
<b>DDS-NOH</b>	Dapsona-hidroxilamina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'- ditio-bis (2-nitrobenzóico)
<b>ERN</b>	Espécie reativa de nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécie reativa de oxigênio
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Íon ferroso
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Íon férrico
<b>Gli</b>	Glicina
<b>Glu</b>	Glutamato
<b>GPx</b>	Glutaciona peroxidase
<b>GSH</b>	Glutaciona reduzida
<b>GSSG</b>	Glutaciona oxidada
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon potássio
<b>L·</b>	Radical lipídico
<b>LH</b>	Ácido graxo poli-insaturado
<b>LO·</b>	Radicais alcóxil
<b>LOO·</b>	Radical peróxil
<b>LOOH</b>	Hidroperóxido lipídico
<b>LOX</b>	Lipoxigenase
<b>MADDS</b>	Monoacetildapsona
<b>MADDS-NOH</b>	Monoacetildapsona-hidroxilamina
<b>MDA</b>	Malondialdeído

<b>MetHb</b>	Metemoglobina
<b>MetHba</b>	Metemoglobinemia
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Na<sup>+</sup></b>	Íon de sódio
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NAT</b>	N-acetiltransferase
<b>ng/mL</b>	Nanograma por mililitro
<b>Nm</b>	Nanomêtro
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOH</b>	Grupo funcional hidroxilamina
<b>O<sup>2</sup></b>	Oxigênio molecular
<b>O<sup>2•-</sup></b>	Ânion radical superóxido
<b>OMS</b>	Organização mundial da saúde
<b>PABA</b>	Ácido <i>p</i> -aminobenzoico
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salina
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>Ph</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PQT</b>	Poliquimioterapia
<b>RAM</b>	Reação adversa ao medicamento
<b>RMP</b>	Rifampicina
<b>RNA</b>	Acido ribonucleico
<b>ROH</b>	Álcool
<b>ROO</b>	Peróxido orgânico
<b>ROO<sup>•</sup></b>	Radical peroxila
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>RSV</b>	Resveratrol
<b>SH</b>	Grupo sulfidríla
<b>SO<sub>2</sub></b>	Grupo sulfonil
<b>SOD</b>	Enzima superóxido dismutase
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre esclarecido
<b>TEAC</b>	Capacidade antioxidante em equivalência ao trolox
<b>TNB</b>	Ácido nitrobenzóico
<b>Trx</b>	Tiorredoxina
<b>TrxR</b>	Tiorredoxina redutase
<b>U/mg</b>	Unidade por miligrama
<b>UI/mL</b>	Unidades internacionais por mililitro

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1.	Dapsona e Seus Metabólitos .....	16
2.2.	Efeitos do Ferro No Sistema Nervoso Central .....	20
2.3.	Neuroinflamação .....	26
2.4.	Ácido Alfa Lipóico.....	30
3.	OBJETIVOS.....	35
3.1.	Objetivo Geral .....	35
3.2.	Objetivos Específicos.....	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1.	Animais e Procedência .....	36
4.2.	Administração de Dapsona e do Ácido Lipóico .....	36
4.3.	Coleta de Amostras.....	38
4.4.	Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TEAC) .....	39
4.5.	Determinação da Atividade da Glutathiona Reduzida (GSH).....	40
4.6.	Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) .....	41
4.7.	Determinação da Atividade da Catalase (CAT).....	42
4.8.	Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) .....	43
4.9.	Determinação da Concentração de Ferro .....	44
4.10.	Determinação da Expressão de IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-4 e BDNF .....	44
4.11.	Imunofenotipagem de células macrofágicas/microglial e astrócitos	45
4.12.	Análise Estatística.....	45
5.	RESULTADOS .....	47

5.1. Avaliação de parâmetros do estresse oxidativo (TEAC, GSH, SOD, CAT e TBARS) no hipocampo de animais tratados com múltiplas doses de DDS e do efeito antioxidante do pós-tratamento com ALA. ....	47
5.2. Avaliação de níveis de ferro no hipocampo dos animais tratados com DDS, na presença ou não de ALA. ....	51
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	67
8. REFERÊNCIAS .....	68
ANEXOS.....	75

## 1. INTRODUÇÃO

Dapsona (4,4'-diaminodifenil- sulfona) ou DDS é um fármaco utilizado na poliquimioterapia da hanseníase (VADHER e LALLJEE, 1992), no tratamento de malária, (SHANKS et al. 1992) nos casos de resistência a Cloroquina (WOZEL, 1989) e na malária não complicada, ocasionada por *Plasmodium falciparum* (AMUKOYE et al.1997). A sua atividade antimicrobiana tem como mecanismo de ação a inibição da produção do ácido fólico, visto que há um antagonismo competitivo entre dapsona e o ácido para-aminobenzóico (PABA) pelo sítio ativo de dihidropteroatosintetase (COLEMAN, 1993; ANNIGERI et al. 2007). Este mecanismo confere a característica bacteriostática, sendo a droga de escolha para o tratamento das formas multibacilares e paucibacilares da hanseníase. O grupo sulfonamida presente na molécula apresenta atividade contra *Mycobacterium leprae* (SENER et al. 2006).

Além disso, já é conhecido a ação antimicrobiana/antiprotzoária da DDS, cujo potencial anti-inflamatório é semelhante ao dos anti-inflamatórios não esteroides (AINES). Neste contexto, uso de DDS em distúrbios inflamatórios mediados por anticorpos, como algumas dermatoses bolhosas e dermatite herpetiforme é bem estabelecido (WOZEL et al. 2014). Nestes casos, ocorre diminuição da infiltração de neutrófilos no tecido afetado (LANG, 1979), devido ao bloqueio de mecanismos de adesão mediados pelas integrinas (BOOTH et al. 1992). Além disso, o DDS inibe a atividade de mieloperoxidase, a explosão respiratória e a atividade das enzimas lisossomais dos neutrófilos. Portanto, a ação anti-inflamatória da DDS parece estar relacionada à sua ação nas funções dos neutrófilos (WOLF et al. 2001; OLIVEIRA et al. 2014).

A administração de DDS, mesmo em baixas doses diárias de 100mg, é a principal responsável por reações adversas (RAM) em pacientes hansenianos (COLEMAN e TINGLE, 1992). A maioria dos pacientes apresenta alterações hematológicas, tais como indução da formação de metemoglobina (MetHb) e hemólise com presença de corpúsculo de Heinz (RIMIOLLI, 2001). Além disso, alguns estudos relatam que a DDS e seus metabólitos podem alterar a homeostase do ferro e levar a disfunção mitocondrial, assim como estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a neurotoxicidade e neuroinflamação (PILONI et al. 2013;

URRUTIA, 2014). No aspecto neurológico, um desenvolvimento sutil e lento de neuropatias periféricas, sensoriais e motoras também são reações já descritas em pacientes que fizeram uso de DDS (RHODES, 1995; MCCARTY, 2010). O uso de dapsona pode levar ao desenvolvimento de atrofia ótica, ainda que em níveis clínicos discretos (CHALIOULIAS, 2006). Este perfil de reações adversas de DDS, especialmente de aspectos hematológicos e no sistema nervoso, torna seu uso limitado nos pacientes em tratamentos prolongados (DEGOWIN et al. 1966; COLEMAN, 1995).

Neurotoxicidade relacionada ao uso de DDS é descrita em uma variedade de efeitos adversos de base neurológica. O mais comum destes efeitos é a neuropatia periférica, um distúrbio do sistema nervoso periférico que pode ser classificado segundo a forma, sintomas ou tipo de fibra acometida. Os mecanismos tóxicos desta reação não são conhecidos, porém, estudos de condução nervosa demonstraram amplitude axonal reduzida e evidências de deservação (PRATT e WEIMER, 2005) sugerindo perda de tecido nervoso causada por uso de DDS. Além disso, DDS pode estar relacionada a distúrbios no SNC devido ao fato de ser um agente indutor da formação de MetHb. Este mecanismo oxidativo pode levar ao acúmulo de ferro no organismo (MELLS et al. 2010). Com isto, o transporte de ferro na forma  $Fe^{3+}$  através de MetHb pode induzir apoptose de células endoteliais, levando a lesão de pequenos vasos encefálicos. Assim, a passagem deste íon se torna possível no SNC, onde poderá causar os danos oxidativos às células e tecidos (MOHOROVIC et al. 2014)

Atualmente, o tratamento mais eficaz para uma das principais reações provocadas por DDS, a metemoglobinemia, consiste no uso de azul de metileno (AM). Seu mecanismo é baseado no processo de redução da MetHb pela ação da enzima NADPH redutase, que atua como um cofator neste processo (CURRY, 1982; MANSOURI e LURIE, 1993;). Esse composto é administrado por via intravenosa, 1-2 mg / kg de peso corporal durante um período de 5 minutos (COOPER, 1997). No entanto, doses maiores que 4 mg/kg podem desencadear sintomas como dispneia, dor precordial, cianose persistente e anemia hemolítica (SILLS e ZINKHAM, 1994; SHIHANA et al. 2010). Durante sua utilização, o AM ativa a NADPH-MR, um sistema enzimático alternativo, fundamental na redução da MetHb. Esse sistema reduz o AM a leucoazul de metileno, um agente redutor, que por mecanismo não-enzimático reduz a MetHb em Hb (HAYMOND et al. 2005).

Embora o tratamento com DDS provoque uma série de reações adversas, ainda é indispensável o seu uso terapêuticamente, visto que o seu potencial terapêutico supera as desvantagens do seu emprego clínico. Especialmente no tratamento da hanseníase em áreas de grande prevalência, cuja poliquimioterapia é uma das formas de controle da disseminação do *M. leprae*, mas as reações adversas dos fármacos, principalmente o DDS, podem agravar consideravelmente o curso da doença (FISCHER, 2017). Assim, a busca de produtos naturais com menor toxicidade e que apresentem ação antioxidantes tem gerado grande interesse na reversão de distúrbios hematológicos e no SNC ocasionados por fármacos oxidativos como o DDS. Neste sentido, várias terapias vêm sendo estudadas, tais como o oxigênio hiperbárico, o ácido ascórbico (O'DONOHUE et al. 1980; BORAN et al. 2008; EL-HUSSEINI e AZAROV, 2010) e resveratrol (LEONARD et al. 2003). Além disso, o piruvato de etila e a curcumina também mostraram eficácia contra a metemoglobinemia induzida por dapsona em ratos (JO et al. 2008; BERGAMASCHI et al. 2011). Uma das propostas de molécula antioxidante é o ácido  $\alpha$ -lipóico (ALA), um composto natural sintetizado por plantas e animais (REED, 2001).

O ácido  $\alpha$ -lipóico (ALA; ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico), considerado um potente antioxidante, vem sendo estudado por apresentar boa atividade no combate às espécies reativas de oxigênio (ERO), tanto em meio lipídico quanto aquoso. Esta característica o diferencia dos demais antioxidantes comumente utilizados (PACKER et al. 1999; BILSKA e WLODEK, 2005). Quanto aos efeitos do ALA sobre reações provocadas por dapsona, estudos mostraram que este composto reduz a metemoglobinemia induzida pelo metabólito mono acetildapsona-hidroxilamina (MADDS-OH) (COLEMAN e WALKER, 2000). Por outro lado, o ALA também é um cofator essencial para a atividade de enzimas mitocondriais e tem sido explorado no tratamento de doença de neurodegenerativas, como Alzheimer. Pesquisas mostram que o tratamento com ALA reverteu ou preveniu algumas das características da doença de Alzheimer em modelos *in vivo* e *in vitro* (CONSTANTINESCU et al. 1994; HAN et al. 1997; MOINI et al. 2002; BILSKA e WLODEK 2005). Desta forma, seria de grande interesse investigar a ação anti-inflamatória e antioxidante do ALA na neurotoxicidade induzida por dapsona em modelo animal.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Dapsona e Seus Metabólitos

A dapsona (4,4'-diaminodifenil-sulfona) ou DDS (Figura 1), também é conhecida com outras sinonímias, tais como, diadifenilsulfona, sulfonildianilina, disulfona e sulfona. Este fármaco é um pó cristalino inodoro branco, cuja fórmula molecular é  $C_{12}H_{12}N_2O_2S$  (GRUNWALD e AMICHAH, 1996; FARHI et al. 2005).

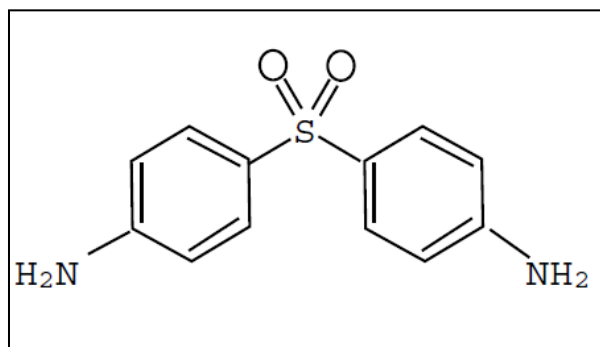


Figura 1 - Fórmula estrutural da DDS.  
Fonte: SÁNCHEZ- SALDAÑA, 2008.

A presença do grupo sulfonil, na DDS, é essencial para sua atividade farmacológica, tais como ação anti-inflamatória e antibacteriana/antiprotozoário (TINGLE et al. 1990; FORD, 2000; PANIKER e LEVINE, 2001). A propriedade anti-inflamatória da DDS ainda não é completamente compreendida, contudo, sabe-se que esta atividade provavelmente não está relacionada a sua ação antibacteriana, com isso pode ser usada em doenças inflamatórias não-infecciosas, tais como: dermatite herpetiforme, dermatite linear IgA, artrite reumatóide, vasculite leucocitária e lúpus eritematoso sistêmico bolhoso (COLEMAN, 1993; ZHU e STILLER, 2001) e como adjuvante sistêmico combinado com corticóide no tratamento do pênfigo vulgar oral (BERNABÉ et al. 2005).

Por outro lado, a ação bacteriostática da DDS está relacionada com sua interação com o sítio ativo da enzima dihidropteroatosintetase (Figura 2), que leva a inibição da síntese de ácido fólico, um evento essencial para síntese de purinas e consequente formação de RNA e DNA, inibindo, assim, o crescimento de micro-

organismos, como o *M. leprae* (WOLVERTON, 1992; COLEMAN,1993; FARHI et al. 2005).

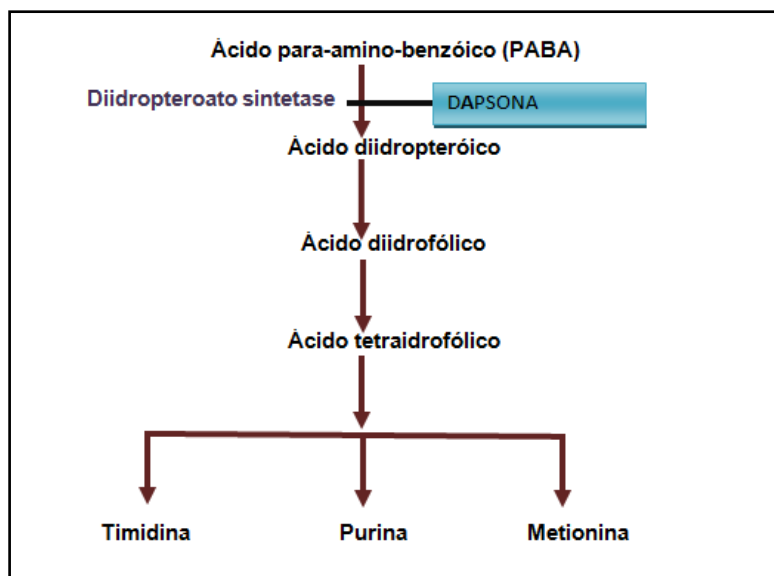


Figura 2 - Mecanismo de ação da DDS no interior de microrganismos  
Fonte: Adaptado de Farhi et al. 2005

Além do uso da DDS com rifampicina e clofazimina na PQT, ela também é utilizada em conjunto com a pirimetamina na profilaxia e no esquema alternativo no tratamento da toxoplasmose e da pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (PODZAMCZER et al. 1995; EL-SADR et al. 1998). Na malária causada por *Plasmodium falciparum* é preconizado à associação da DDS com o clorproguanil como antimalárico de ação esquizonticida e em esquemas profiláticos contra infecções não complicadas por este protozoário (BRASIL, 2008).

Em relação as suas propriedades farmacocinéticas, DDS tem absorção quase completa pelo trato gastrintestinal, sua distribuição ocorre por todo líquido corpóreo, atingindo quase todos os tecidos. Aproximadamente, 70% DDS se encontra ligada a proteínas plasmáticas, com concentração plasmática variando entre 0,4 a 1,2 mg/L, após 24 h da ingestão de 100 mg/dia do fármaco (ELLARD, 1966; SHEPARD, 1976; ZUIDEMA et al. 1986).

A principal via de excreção da DDS é a urinária, com uma pequena quantidade eliminada por via biliar (ELLARD, 1966; FORD, 2000). Após uma dose única deste fármaco, aproximadamente 50% é excretado durante as primeiras 24 horas (GLAZKO et al. 1968). Na urina o principal metabólito encontrado é a monoacetildapsona (MADDS), conjugada com o ácido glicurônico (MELLO, 2005).

A DDS apresenta meia-vida de eliminação com uma variação interindividual de 14 a 83 horas e valores médios em torno de 30 horas, sendo que geralmente, 90% de uma dose única de 100mg do fármaco é eliminada, em média em 9 dias. Já em tratamentos prolongados, esse fármaco pode ser encontrado nos fluidos biológicos até por um período de 35 dias após sua administração. Possivelmente, a explicação para o longo tempo de meia-vida desse fármaco, seja a circulação êntero-hepática e a extensa ligação às proteínas plasmáticas, que varia de 70 a 90% a taxa de ligação da DDS e 99% a ligação da monoacetil hidroxilamina (MADDS-OH) (MELLO, 2005).

A biotransformação da DDS ocorre principalmente no fígado, por N-acetilação realizada pela enzima N-acetiltransferase e N-hidroilação através da via citocromo P450 (GILL et al. 1995; WOZEL, 2010). Este segundo processo é responsável pela produção de metabólitos hidroxilados, como a DDS-hidroxilamina (DDS-NHOH) e MADDS-NHOH (Figura 3), responsáveis pelos distúrbios hematológicos, como hemólise e metemoglobina (MetHb), causados pelo uso deste fármaco (VAGE et al. 1994; WOZEL 2010).

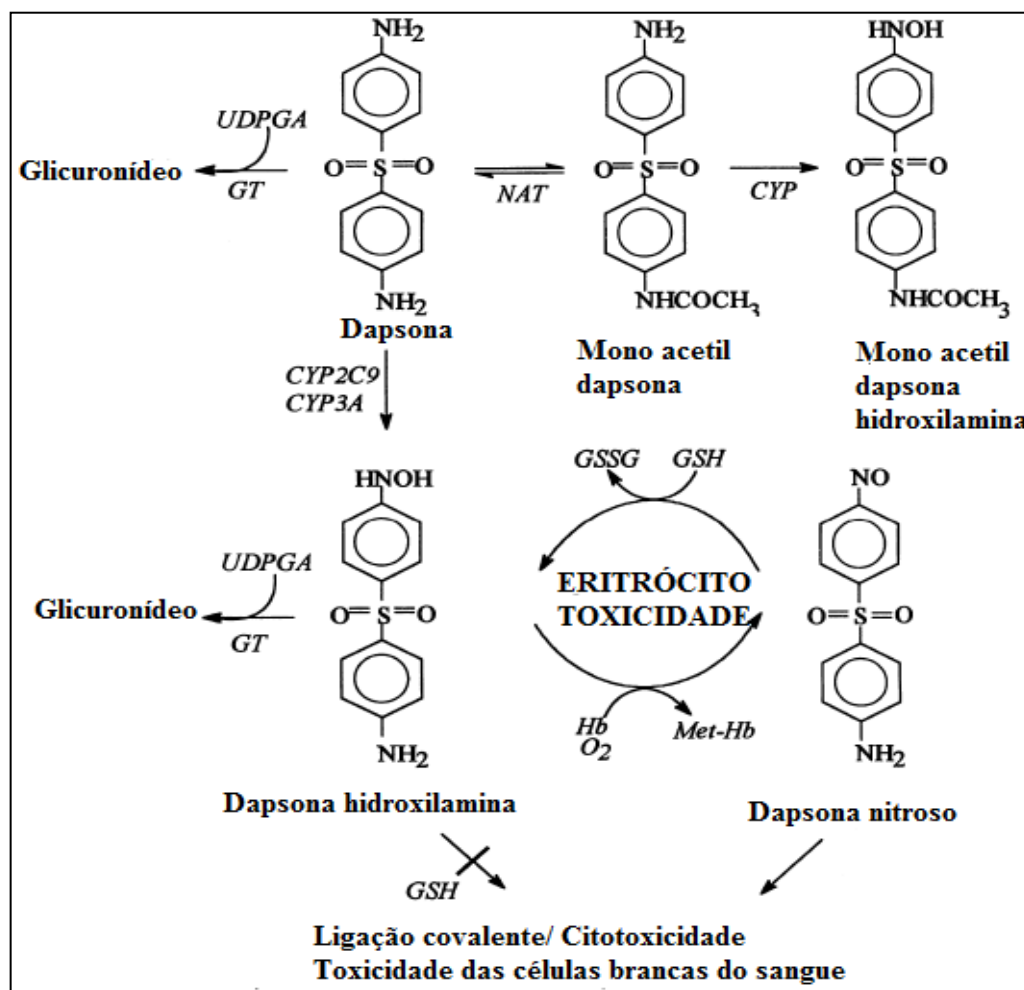


Figura 3 - Proposta de mecanismos de bioativação e detoxificação de DDS. CYP: Citocromo P-450; Hb: hemoglobina; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidadas; NAT: N-acetil-transferase; GT: glucuronil-transferase; UDPGA: ácido uridina difosfato glucurônico; MetHb: Metemoglobina; O<sub>2</sub>: oxigênio. Fonte: Adaptado de Gill et al.1995

As reações adversas relacionadas ao uso da DDS variam desde problemas digestivos, náuseas, vômitos e estomatite, a manifestações menos comuns, como: hepatites tóxicas, icterícia colestática, reações cutâneas por fotossensibilidade, psicoses, e uma síndrome que ficou conhecida por “Síndrome da Sulfona”, caracterizada por *rash* cutâneo, aumento de linfonodos, icterícia, hepatoesplenomegalia e linfocitose com linfócitos atípicos (SÁNCHEZ-SALDAÑA, 2008). Casos clínicos de anemia hemolítica e MetHb são frequentemente encontrados na literatura, e podem ocorrer mesmo em doses terapêuticas (MAYO et al. 1987; COLEMAN, 1995; LANDERS et al. 1996; QUEIROZ et al. 1997; WARD E MCCARTHY, 1998; SALAMAT e WATSON, 2003).

No sistema nervoso, os efeitos oxidativos de DDS levam a danos principalmente em nervos periféricos, causando neuropatia periférica. O mecanismo de injúria às células do sistema nervoso periférico (SNP) não é bem descrito, porém existem suposições de que o dano tecidual é decorrente de uma ação neurotóxica direta de DDS, que apresenta habilidade de se concentrar no SN (MCCARTY, 2010). Adicionalmente, no sistema nervoso central (SNC), os efeitos adversos de DDS são pouco descritos, sendo apenas suposto que, por ser uma molécula altamente lipossolúvel e de baixo peso molecular (GATTI, et al. 1997), DDS se difunde no tecido cerebral facilmente. Contudo, o principal mecanismo de dano ao SNC parece estar relacionado ao ferro oxidado durante o processo de formação de MetHb. Na forma  $Fe^{3+}$ , este íon tem grande potencial de causar danos aos tecidos que estiver livre, assim como gerar mais radicais livres e assim ocasionar maiores danos neste tecido (MINHAS et al. 2014).

## **2.2. Efeitos do Ferro No Sistema Nervoso Central**

O cérebro tem uma das maiores taxas de atividade metabólica e, por essa razão, tem a segunda maior quantidade de Fe seguido do fígado, com isso alguns estudos associam o comprometimento da homeostase de Fe com consequente acumulação desse elemento no sistema nervoso central (SNC), que podem levar a muitos distúrbios neurodegenerativos, tais como Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington (BERG e YODIM, 2006; GAGGELLI et al. 2006; PAL et al. 2006; LUMSDEN et al. 2007; ALTAMURA e MUCKENTHALER, 2009; JOMOVA et al. 2010; MOHOROVIC et al. 2014).

Regiões cerebrais como o hipocampo são áreas de especial interesse na pesquisa dos mecanismos de distúrbios neurodegenerativos. Miller et al (2017) demonstraram relação de maior acúmulo de proteínas associadas a doenças como Alzheimer nesta região do cérebro. Esta estrutura encefálica com formato de ferradura, localizada no lobo temporal medial nos dois hemisférios do cérebro, compõe parte crucial do sistema límbico. O hipocampo apresenta funções relacionadas à formação de memórias, comportamentos emocionais, adaptativos e reprodutivos. O

sistema de células hipocampais funciona como um indicador de memórias, enviando a informação para outra região de armazenamento e recuperando-a quando necessário. Esta área cerebral é umas das mais sensíveis a desordens metabólicas (SADEGHI, et al. 2016), contudo está associada a desordens ocasionadas por estresse oxidativo, incluindo o depósito de ferro (GAO, et al. 2017).

O acúmulo de ferro em regiões como o hipocampo tem sido estudado no intuito de elucidar os mecanismos subjacentes ao dano provocado pela presença aumentada deste metal no SNC. Um destes mecanismos aponta a ligação do íon férrico em regiões específicas da proteína Tau em neurônios, resultando na fosforilação desta proteína e seu conseqüente acúmulo, gerando os emaranhados neurofibrilares. O depósito destas proteínas está relacionado às bases da Doença de Alzheimer (GAO, et al. 2017). Outro mecanismo oxidativo sugerido para os danos ocasionados pelo ferro livre é a formação de peróxido lipídico levando a toxicidade celular, com conseqüente indução de apoptose ou necrose (EGAÑA, et al. 2003).

No intuito de proteger o SNC, vários mecanismos de retroalimentação formam um sistema de controle elaborado para garantir a concentração de Fe precisamente equilibrada, para isto a barreira hematencefálica (BHE) representa o principal obstáculo que limita a entrada deste metal e, por conseqüente sua sobrecarga. Com isso, vias de transporte seletivas, como Tf, receptor de transferrina (TfR), ferritina (Ft), ferroportina (Fpn) e transportador divalente de metal 1 (DMT-1) visam garantir um nível precisamente equilibrado de Fe no SNC (FILLEBEEN et al. 1999; HENTZE et al. 2004; MOOS et al. 2007).

No plasma humano em condições fisiológicas as moléculas de Fe normalmente se encontram na forma de  $Fe^{3+}$  (~20  $\mu M$ ) ligada à Tf (Tf ~ 40  $\mu M$ ) e, portanto, não agride o organismo. Entretanto, em condições de sobrecarga de Fe a Tf é saturada e o  $Fe^{3+}$  que não está ligado a Tf será reduzido a forma  $Fe^{2+}$  resultando na formação de NTBI que atinge concentrações de 1-20  $\mu M$ . No líquido cefalorraquidiano em que a concentração de Tf é baixa (< 0,5  $\mu M$ ), a NTBI pode alcançar concentração milimolar (<1 mM) (SAVMAN et al. 2005).

Até o momento, concentrações de NTBI no cérebro ainda não foram detectadas, fato que pode ser atribuído à presença da BHE com suas células endoteliais vasculares ligadas por junções de oclusão, que resulta em uma barreira

física impedindo a troca de componentes entre os tecidos cerebrais e fluidos do sangue (MOOS et al. 2007). Conseqüentemente, o tecido encefálico não pode captar Fe diretamente do sistema circulatório, com isto a principal via de absorção é mediada por células endoteliais vasculares (*brain vascular endothelial* [BVECs]) presentes na BHE (Figura 6). Ao contrário das pequenas moléculas de gás, como O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> que se difundem livremente através das membranas lipídicas para o cérebro, o influxo de Fe ocorre através dos TfR expressos em BVECs, estes receptores possuem uma estrutura dimérica de alta afinidade pelo complexo Fe<sub>2</sub>-Tf presente no plasma (AISEN, 2004).

Portanto, o Tf-Fe<sub>2</sub> se liga ao TfR e acontece a endocitose do Fe que é temporariamente armazenado em endossomos (MOOS e MORGAN, 1998; ABBOTT et al. 2006; KE e QIAN, 2007; MILLS et al. 2010). Posteriormente, dois mecanismos estão associados a liberação de Fe das BVECs para o meio extracelular, os quais são iniciados pela ação de bomba para prótons que reduzem o pH no interior do endossoma, provocando alteração conformacional em ambas as unidades Fe<sub>2</sub>-Tf e TfR. Por sua vez, este evento resulta na liberação de Fe<sup>3+</sup> o qual pode ser exportado diretamente para o meio extracelular por exocitose (Figura 4) (HENTZE et al. 2004). Durante a exocitose, ocorre também a saída de íons H<sup>+</sup>, com isto, o pH do endossoma retorna a neutro, provocando a dissociação da apo-Tf (Tf sem Fe) do TfR, assim, a molécula de Tf é reciclada e poderá ser reutilizada no transporte de Fe novamente (HARE et al. 2013).

Outra via para o efluxo do íon Fe<sup>3+</sup> ocorre quando o mesmo é liberado no endossoma e é rapidamente reduzido a Fe<sup>2+</sup>, pelo antígeno epitelial transmembrana de próstata tipo 1-4 (STEAP 1-4), viabilizando sua saída para o citosol das BVECs via DTMF-1 (DeDOMENICO et al. 2008). Os íons Fe<sup>2+</sup> presentes no citosol das BEVCs são disponibilizados ao meio extracelular via proteína transmembrana ferroportina (Fpn) o qual é rapidamente convertido a Fe<sup>3+</sup> pela enzima ferroxidase dependente de cobre (WU et al. 2004; MILLS et al. 2010).

Assim, a maioria do Fe<sup>3+</sup> presente no meio extracelular formará complexos com ascorbato, citrato e ATP, e assim será reduzido a Fe<sup>2+</sup> e, portanto, pode ser absorvido pelos astrócitos por DTMF-1, Outra via de captação de Fe pelos oligodendrócitos envolve receptores Tim2 aos quais se acoplam a ferritina (Ft), proteína secretada no

oro e que pode transportar até 4500 átomos de Fe, o complexo Ft-Tim2 desempenham um papel importante no fornecimento de Fe durante os processos de organogênese e mielinização neuronal (FISHER et al. 2007; TODORICH et al. 2008; LI et al. 2009; TODORICH et al. 2009). Já nos neurônios a absorção de Fe é feita por DMT-1 e TfR, sendo que estas foram as únicas células neurais onde foram detectadas a expressão de receptor de Tf (MILLS et al. 2010).

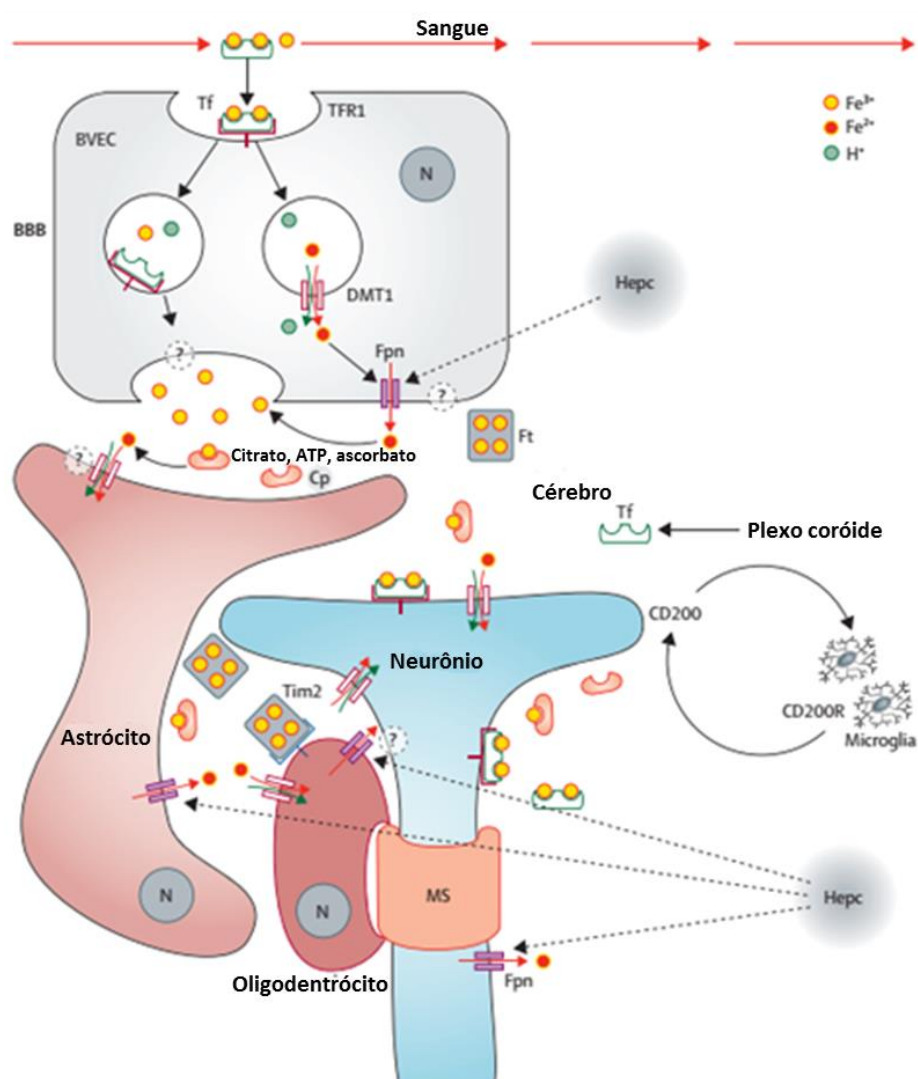
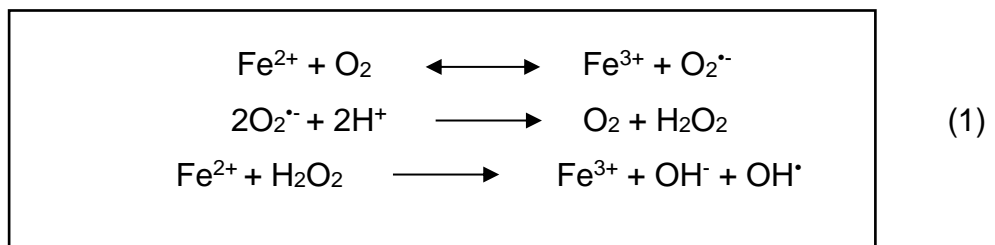


Figura 4: Mecanismos de transporte e absorção do ferro no tecido cerebral (WARD et al. 2014).

Vários fatores podem afetar os mecanismos de absorção/transporte do Fe como as mutações genéticas e os agentes oxidantes que causam MetHb e assim levam ao acúmulo deste metal no organismo (MELLS et al. 2010). Recentemente,



Mohorovic et al. (2014) relataram a importância da MetHb como transportador do  $\text{Fe}^{3+}$ , sendo que os mecanismos oxidativos deste íon podem induzir a apoptose das células endoteliais, levando a lesão dos pequenos vasos encefálicos. Esse mecanismo torna possível a passagem de MetHb e de Fe nesse tecido, possibilitando assim o acúmulo desses componentes no parênquima cerebral com posterior redistribuição para os astrócitos, neurônios e outras células neurais, fato que gera danos teciduais ocasionados pelo estresse oxidativo. Os mecanismos oxidativos estão associados a ação catalítica do Fe na geração de ERO por um processo denominado de reação de Fenton (Equação 1) (MATSUBARA, 1997; PROUSEK, 2007):



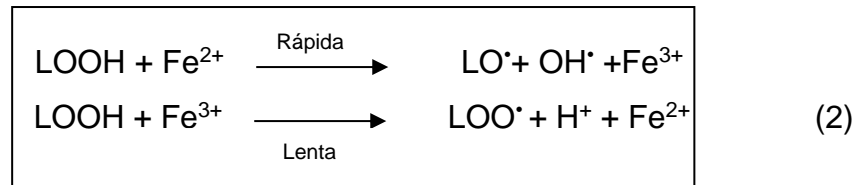
Equação 1: Reação de Fenton

O potencial catalítico do Fe tem sido associado à amplificação de danos no tecido encefálico pós-acidente vascular encefálico, visto que nesta patologia há grande quantidade de ferro livre que podem catalisar e produzir mais radicais livres e, conseqüentemente, ocasionar mais danos nesse tecido (MINHAS et al. 2014).

De maneira geral, todas as células e componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, entretanto, a membrana é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que promove alterações estruturais e na permeabilidade das membranas celulares (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Desta forma, essas alterações membranares levam a perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas, ativação de enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos (malonaldeído), ocasionando a morte celular (HERSHKO, 1989).

A lipoperoxidação também pode ser catalisada por íons Fe, por 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 ser rápidas ou lentas dependendo da valência do Fe (Equação 2) (BORG e SCHAICH, 1988).



Equação 2: Peroxidação lipídica catalisada pelos íons Fe.

O radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) é reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação, porém os íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  também desempenham papel determinante na iniciação deste processo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Deste modo, é necessário a realização de estudos que possam elucidar o papel da DDS no acúmulo de Fe nos níveis de MetHb e nos possíveis danos no SNC, assim como avaliar o desequilíbrio oxidativo entre os fatores pró e anti-oxidantes, e propor terapias antioxidantes que apresentem mecanismos neuroprotetores para reestabelecer os níveis de MetHb e o equilíbrio redox do organismo.

Estudos acerca da avaliação do estresse oxidativo tem mostrado elevada relevância na busca de biomarcadores de prognósticos, diagnósticos e preditivos. Nesse sentido, os marcadores oxidativos desempenham importante papel na gênese dos processos metabólicos associados a patologias, incluindo as do sistema nervoso central. Desta forma, esforços têm sido realizados na identificação de marcadores para avaliação do estresse oxidativo, para sistematizar sua utilização no 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 processos patológicos (MAYNE, 2003; REYES et al. 2006; VINCENT et al. 2007; BARBOSA et al. 2008).

Além disso, a busca por composto que possam atenuar este processo é de extrema relevância para pacientes que fazem uso de DDS como terapêutica. Neste sentido, os estudos relatam que, geralmente, pacientes que apresentam taxas de MetHb abaixo de 10% não apresentam sinais e sintomas. Contudo, a partir de 10-20%

de MetHb, percebe-se o desenvolvimento de sinais clínicos leves como cianose e em casos mais graves, com valores acima de 50% de MetHb, os sintomas exibidos são convulsões, arritmias, acidose coma e morte (SALAS, 2006).

Diante destas reações adversas que limitam o uso clínico da DDS, várias terapias que revertam esses efeitos tóxicos vêm sendo estudadas, tais como o uso de oxigênio hiperbárico, o ácido ascórbico (O'DONOHUE et al. 1980; BORAN et al. 2008; EL-HUSSEINI e AZAROV, 2010), curcumina (BERGAMASCHI et al. 2011) e o ácido  $\alpha$ -lipóico (ALA) (COLEMAN e WALKER, 2000; BILSKS e WLODEK, 2005).

### **2.3. Neuroinflamação**

O desequilíbrio no metabolismo e consequente acúmulo de ferro, bem como sua reatividade células do córtex cerebral foram relacionados à neurodegeneração e indução do estresse oxidativo cerebral em uma série de doenças neurodegenerativas (VAN BERGEN et al. 2016; BUIJS, 2017). Assim, a deposição anormal de ferro pode ocasionar morte celular associado ao acúmulo de ERO e danos patológicos (DIXON e STOCKWELL, 2014). Em algumas regiões cerebrais, os altos níveis de ferro podem predispor indivíduos a alto risco de declínio cognitivo e motor (LI et al. 2015).

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

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

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

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

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

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

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

A microglia e monócitos/macrófagos ativados são definidos como clássicos (pró-inflamatórios; tipo M1) ou alternativos (anti-inflamatórios ou protetores; tipo M2) em condições fisiopatológicas. Mais precisamente, a micróglia tipo M1 secreta citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-23, e exacerba a inflamação e a lesão tecidual. Em contraste, a micróglia tipo M2 secreta citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-13, e fatores de crescimento como VEGF e BDNF, suprime a inflamação e promove a recuperação dos tecidos. Além disso, o BDNF e o seu receptor trkB são expressos em macrófagos e desempenham papéis autócrinos e parácrinos na modulação da regeneração e angiogênese após lesão do nervo. Adicionalmente, dados recentes sugerem que o pró-BDNF (precursor do BDNF) é um fator supressor da migração e infiltração de macrófagos e pode ter um papel prejudicial após a lesão medular (BOVOLENTA et al. 2010).

Crítica para a regulação da resposta imune, a resposta inicial tipo M1 é tipicamente seguida por uma ativação secundária tipo M2 que é importante para a cicatrização de feridas e supressão da inflamação (GRETER et al. 2015). Essas alterações em micróglia ativada são implicadas tanto na iniciação quanto na progressão de doenças neurodegenerativas, pois, quando ativada, a micróglia é capaz de adquirir fenótipos diversos e complexos, o que permite participar da resposta citotóxica, regulação imune e resolução de lesões (WARD et al. 2014).

IL-4 é produzida por vários subtipos de células linfóides ativadas. As células TH2 são particularmente fontes importantes dessa citocina, pois são críticas para iniciar a imunidade humoral contra patógenos extracelulares. Em macrófagos, IL-4 inibe a secreção de quimiocinas pró-inflamatórias e citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , prejudicando a capacidade dessas células de produzir ERO e ERN, e bloqueia a expressão de moléculas de adesão celular induzidas por IFN $\gamma$ , como ICAM e E-

selectin. No entanto, a IL-4 também pode induzir macrófagos a aumentar sua síntese de IL-12, fornecendo um mecanismo de feedback negativo para regular a resposta Th2 (MAK, 2006).

Paralelo a ativação microglial, os astrócitos também tem importante papel como marcador de agressão neurotóxica, principalmente pela expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), uma proteína de filamento intermediário presente em vários tipos de células neurais, principalmente astrócitos, formando parte do citoesqueleto. GFAP está aumentada em lesões cerebrais de roedores (GLUSHAKOVA et al. 2018). A indução dessa proteína é rápida, frequentemente maciça e pode resultar em mudanças na morfologia do astrócito. Tanto a lesão astrocítica primária, como as respostas gliais secundárias à lesão neuronal podem induzir aumento de GFAP, apoiando o uso dessa proteína como um marcador de lesão neurotóxica (PYLE, 2010).

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

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

## 2.4. Ácido Alfa Lipóico

O ácido  $\alpha$ -lipóico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico- ALA) é também conhecido como ácido tióico e lipoamida, é um ácido graxo que contém um anel tiolano com uma ponte dissulfeto entre os carbonos 6 e 8 (Figura 5).

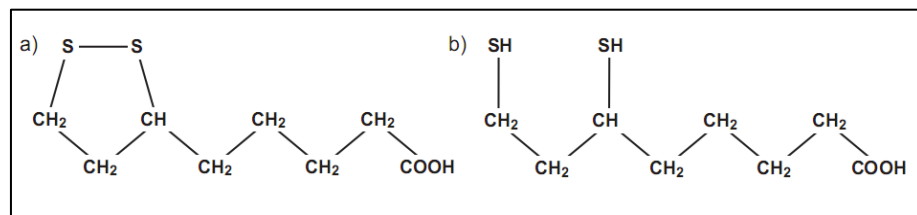


Figura 5 - Estrutura química do Ácido  $\alpha$ -lipóico (a) e a estrutura química da sua forma reduzida (ADHL) (b). Fonte: BILSKA e WLODEK, 2005.

O ALA é um composto naturalmente encontrado em praticamente todas as espécies vegetais e animais, em células procariontes e eucariontes (PACKER et al. 2001). A sua síntese em animais e vegetais ocorre devido o ALA estar covalentemente ligado ao grupo amino de lisinas residuais e atuar como cofator em de enzimas mitocondriais, catalisando descarboxilação oxidativa do piruvato,  $\alpha$ -cetogluturato e cadeias ramificadas de  $\alpha$ -cetoácidos formados durante a transaminação da leucina, isoleucina e valina (BILSKS e WLODEK, 2005; PACKER et al. 2001).

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

Estudos *in vitro* mostram que o ALA diminui a suscetibilidade plasmática à oxidação (MARANGON et al. 1999), protegendo eritrócitos humanos contra hemólise induzida por radicais peróxido (CONSTANTINESCU et al. 1994), e aumenta a síntese de GSH em eritrócitos humanos isolados (HAN et al. 1997). Conforme Perez e Castaneda (2006) a capacidade antioxidante do ALA está relacionada à presença de um grupamento tiol, que é capaz de reagir diretamente com radicais oxidantes, portanto ele é considerado um excelente antioxidante com valor terapêutico em patologias relacionadas a produção acentuada de ERO, incluindo diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer.

Coleman e Walker (2000) mostraram que o ALA quando incubado com eritrócitos de humanos diabéticos e não diabéticos *in vitro*, provocou uma redução acentuada da MetHb induzida por MADD-NOH. Outros estudos mostram que o ALA pode reverter ou prevenir algumas das características da doença de Alzheimer em modelo *in vivo* e *in vitro* (PEREZ e CASTANEDA, 2006) e melhorar o estado antioxidante cerebral (MOINI et al. 2002; BILSKA e WLODEK, 2005; PEREZ e CASTANEDA, 2006).

Os principais mecanismos de ação ALA e ADHL sugeridos são: aumento da produção de acetilcolina ativando acetilcolinesterase, aumento da absorção de glicose fornecendo assim mais acetilCo-A para produção de acetilcolina, quelação de metais de transição inibindo assim a formação de ERO e produtos de peroxidação lipídica, induzindo a produção de enzimas envolvidas na síntese de glutatona e outras enzimas antioxidantes protetoras (PACKER et al. 1999). Assim, atuando no reparo de moléculas danificadas pelo estresse oxidativo e ainda formam um par redox ADHL/ALA com potencial de redução mais negativo ( $E_0' = -0,32 \text{ V}$ ) que os pares glutatona reduzida/glutatona oxidada (GSH/GSSG) e cisteína/cistina (CSH/CSSC) ( $E_0' = -0,24$  e  $-0,22\text{V}$ , respectivamente). Devido a seu potencial redox, o DHALA é capaz de reduzir a GSSG a GSH e a CSSC a CSH. No caso da GSH em particular, o par redox ADHL/ALA pode funcionar como um sistema de reciclagem alternativo a atividade da glutatona redutase, sem gasto de NADPH (PACKER et al. 1999).

Atualmente, o antídoto mais eficaz para níveis elevados de MetHb é o azul de metileno que atua como um cofator para acelerar a redução MetHb pela ação da enzima NADPH redutase (CURRY, 1982; MANSOURI e LURIE, 1993). O esquema



de administração é por via intravenosa (1-2 mg / kg de peso corporal) durante um período de 5 minutos (COOPER, 1997). Entretanto, em indivíduos com deficiência de G6PD, resultante da incapacidade do ciclo glicolítico da hexose monofosfato em produzir NADPH, o azul de metileno não consegue ser convertido da sua forma oxidada para a forma reduzida (leucobase), com isso ocorre o agravamento da metemoglobinemia nos pacientes (RIEDER, 1985).

O ácido alfa lipóico tem sido largamente utilizado em produtos farmacêuticos e nutracêuticos, justamente por apresentar propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (IKUTA et al. 2017; BITTNER et al. 2017). A atividade química de ALA é devida principalmente ao anel ditiolano, cuja presença dos átomos de enxofre confere uma alta densidade eletrônica à molécula de ALA. Estes efeitos, aliado às características hidrofílica e lipofílica da molécula (DINICOLA et al. 2017b), assim como seu status de agente mais eficiente dentre todos os antioxidantes (TIBULLO et al. 2017), sustentam estudos realizados com modelos de suplementação em doenças metabólicas e neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. ALA é classificado como um antioxidante neuroprotetor ideal devido sua capacidade de atravessar a barreira hemato encefálica e seu perfil de captação uniforme por todo o sistema nervoso central e periférico (ZHAO et al. 2015; MARBOOB et al. 2016). Sintetizado de novo nas mitocôndrias de células animais e vegetais, bem como em micro-organismos, o ácido alfa lipóico também pode ser obtido da dieta, através do consumo de carnes e vegetais de folhas verde escuras e (ROBERTS et al. 2015)

A biossíntese de ALA ocorre em pequenas quantidades nas mitocôndrias a partir do ácido octanoico (ZEHNPFENNIG et al. 2015. IKUTA et al. 2017), um processo celular natural durante o metabolismo de ácidos graxos. Por outro lado, a produção de ALA pela indústria resulta de síntese química e este processo requer catalisadores tóxicos na adição dos átomos de enxofre (SUN et al. 2017). Adicionalmente, ALA é encontrado em forma de suplementos compostos da mistura racêmica de seus isômeros R-ALA e S-ALA em concentrações de 50 a 600 mg (DÖRSAM e FAHRER, 2015), ou do isômero R-ALA isolado, com doses de 200 a 300 mg (YOON et al. 2016). O isômero R-ALA é instável em temperaturas acima de 49° C, enquanto a mistura racêmica se mantém estável em temperaturas entre 60 e 62° C. Em estudos de farmacocinética em indivíduos saudáveis, o isômero R-LA apresenta maior nível de absorção, enquanto o isômero S-LA auxilia neste percentual, impedindo a

polimerização da forma R-LA (SEIFAR et al. 2017). Neste sentido, o uso de suplementos com a mistura racêmica é mais viável em relação ao isômero R-ALA (UCHIDA et al. 2017).

Na suplementação de ALA, com a administração oral o composto é rapidamente absorvido e eliminado por via renal. Devido sua característica anfifílica, ALA é amplamente distribuído por todos os compartimentos do corpo, incluindo CNS (PECORA et al. 2016). ALA apresenta tempo médio para atingir a concentração plasmática máxima ( $t_{max}$ ) de 15 minutos e média de meia-vida plasmática ( $t_{1/2}$ ) de 14 minutos (YOON et al. 2016). Estes valores farmacocinéticos diferem entre alguns autores, estando o  $t_{max}$  em até 30 minutos após administração oral (IKUTA et al. 2017) (10 minutos em ratos) e  $t_{1/2}$  em torno de 30 minutos. A meia-vida curta de ALA é resultado de ampla extração e metabolismo hepático, que reduz a bioequivalência a 30 % da dose ingerida, em média (PECORA et al. 2016). Múltiplos fatores influenciam na bioequivalência do ALA, dentre os quais a ingestão alimentos, que interfere na absorção de ALA, seja na mistura racêmica ou isômeros isolados. Assim, é recomendado o consumo de ALA 30 minutos antes ou 2 horas após a ingestão de alimentos (SEIFAR et al. 2017). A alta variação em parâmetros farmacocinéticos de ALA foi reportada em vários estudos, porém não está completamente explicada. Mudanças em condições fisiológicas, como absorção gástrica e perfusão hepática, ou interação droga-droga e mecanismos de sistema de entrega de droga são algumas justificativas para a variação, porém ainda não completamente elucidados (RHEE et al. 2018).

A absorção de pelo menos 93% da dose administrada de ALA, demonstrada em um estudo com ratos, ocorreu no trato gastrointestinal, incluindo estômago (TEICHERT et al. 2003). No intestino, ALA é internalizado nas células através de receptores denominados  $Na^+$ /multivitamin transporter (SMVT). Em humanos, a variante hSMVT (human  $Na^+$ /multivitamin transporter) é responsável pelo transporte de biotina e ácido pantothenic, íons de Iodo e ALA racêmico. Contudo, evidências in vitro sugerem a existência de mais de um mecanismo de transporte celular envolvendo outros transportadores de ácidos graxos, como monocarboxilic acid transporter (MCT) (ZEHNPFENNIG et al. 2015). De fato, a absorção intestinal de ALA parece ser bastante variável, devido a existências de meios de transporte do ALA ainda não completamente elucidados. Esta complexidade de um sistema de absorção

e distribuição aos tecidos sugere a existência de vários fatores envolvidos, por exemplo, competição de substrato, mecanismos regulatórios transcricionais, traducionais e pós-traducionais (SHAY et al. 2009).

Assim, após sua internalização na célula, ALA é catabolizado, através de  $\beta$ -oxidação ou redução enzimática a ácido dihidrolipóico (DHHLA), que junto com ALA formam uma dupla de moléculas com alta capacidade antioxidante (ROBERTS et al. 2015), gerando um potencial de redução de  $-0.32$  V (SHAY et al. 2009). A redução de ALA a DHHLA ocorre sob ação de enzimas como dihidrolipoamide dehydrogenase mitocondrial, glutathione redutase citoplasmática ou extracelular e thioredoxina redutase citoplasmática (FRATANTONIO et al. 2018). A  $\beta$ -oxidação é a principal via de metabolização do ALA, resultando da oxidação da cadeia lateral de carbonos, gerando vários metabólitos (TEICHERT et al. 2003). Além disto, ALA sofre alquilação por ação de S-metiltransferases e com isto, apenas 0,2 % da dose administrada é excretada na urina de forma inalterada (RHEE et al. 2018). Em diferentes espécies, foram identificados 12 metabólitos de ALA (SCHUPKE et al. 2001), sendo pelo menos 5 na espécie humana. O ácido 4,6-bismetiltiohexanóico (BMHA) foi identificado como o principal metabólito em amostras de urina de voluntários saudáveis após a administração oral de ALA, seguidos de menores concentrações de ácido 6,8-bismetil-octanóico (BMOA) e 2,4-bismetiltio ácido butanoico (BMBA). (TEICHERT et al. 2003). Até a momento, não existem estudos que comprovem outras vias de eliminação de ALA e seus metabólitos após suplementação.

Estudos in vitro, em animais e ensaios clínicos já demonstraram o perfil farmacocinético e de segurança do ALA (YOON et al. 2016), elucidando características interessantes da molécula, seja em sua forma racêmica ou dos isômeros. Por outro lado, existem ainda poucos dados disponíveis de estudos em indivíduos idosos (BITTNER, 2017). Assim, isto representa uma inconveniente falta de informações precisas em grupos notadamente atingidos por doenças associadas ao envelhecimento, como AD. Contudo, os avanços em investigação dos mecanismos de ALA ligados aos processos associados aos distúrbios mitocondriais e de outras vias celulares associadas à distúrbios neurodegenerativos vêm sendo alcançados em trabalhos de todos os níveis nos últimos anos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar efeito antioxidante e anti-inflamatório do ácido alfa lipóico na neurotoxicidade hipocampal induzida pela dapsona em modelo animal.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- a. Avaliar os parâmetros do estresse oxidativo (TEAC, MDA, GSH, SOD, CAT e NO) no hipocampo de animais tratados com múltiplas doses de DDS;
- b. Quantificar populações celulares específicas no hipocampo de animais tratados com múltiplas doses de DDS, como microglial e astrocitária, usando marcadores imunquímicos como os marcadores GFAP e F4/80;
- c. Avaliar o efeito do ALA na neurotoxicidade hipocampal induzida por dapsona em modelo animal;
- d. Avaliar o efeito do ALA no estresse oxidativo no hipocampo induzido por dapsona em modelo animal;
- e. Quantificar os níveis de ferro no hipocampo dos animais tratados com DDS, tratados ou não com ALA.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais e Procedência**

Para este estudo, foram utilizados 105 camundongos *Mus musculus*, adultos machos, da linhagem Swiss, com massa corpórea variando de 35 a 40g, com 8 semanas de vida, provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC-PA). Os camundongos foram alojados em gaiolas para cinco animais, sendo mantidos sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e em ciclo alternado de 12 horas de claro/escuro. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante o período dos experimentos. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPA sob o nº 2411100816, conforme certificado em anexo.

### **4.2. Administração de Dapsona e do Ácido Lipóico**

A dapsona foi dissolvida em dimetilsulfóxido 2% (DMSO) e administrada via intraperitoneal (i.p) na concentração de 40mg/kg, já o ácido  $\alpha$ -lipóico foi dissolvido em solução salina 0,9% e administrado por via oral (gavagem) em diferentes concentrações. A disposição de grupos e regime de doses está apresentada na Figura 6. A Figura 7 apresenta o delineamento experimental adotado para a obtenção de amostras e os testes realizados.

<b>ANIMAIS</b>	<b>GRUPOS</b>	<b>REGIME DE MÚLTIPLAS DOSES</b>
<b>CONTROLES</b>	<b>Basal</b> (n=10)	50µL de DMSO via i.p. e 50µL de solução salina a 0,9% por gavagem, durante 5 dias consecutivos.
	<b>0</b> (n= 10)	50µL de DDS em uma solução de 40mg/kg de DDS diluído em DMSO por via i.p., durante 5 dias consecutivos.
<b>EXPERIMENTAIS</b>	<b>ALA 12,5</b> (n=10)	50µL de solução de 12,5mg/kg de ALA em solução salina, que será administrado por gavagem durante 4 dias após o tratamento com 50µL de DDS em uma solução de 40mg/kg de DDS diluído em DMSO por via i.p., durante 5 dias consecutivos.
	<b>ALA 25</b> (n=10)	50µL de solução de 25mg/kg de ALA em solução salina, que será administrado por gavagem durante 4 dias após o tratamento com 50µL de DDS em uma solução de 40mg/kg de DDS diluído em DMSO por via i.p., durante 5 dias consecutivos.
	<b>ALA 50</b> (n=10)	50µL de solução de 50 mg/kg de ALA em solução salina, que será administrado por gavagem durante 4 dias após o tratamento com 50µL de DDS em uma solução de 40mg/kg de DDS diluído em DMSO por via i.p., durante 5 dias consecutivos.

Figura 6. Divisão dos grupos de animais, controles e experimentais e o respectivo regime de múltiplas doses

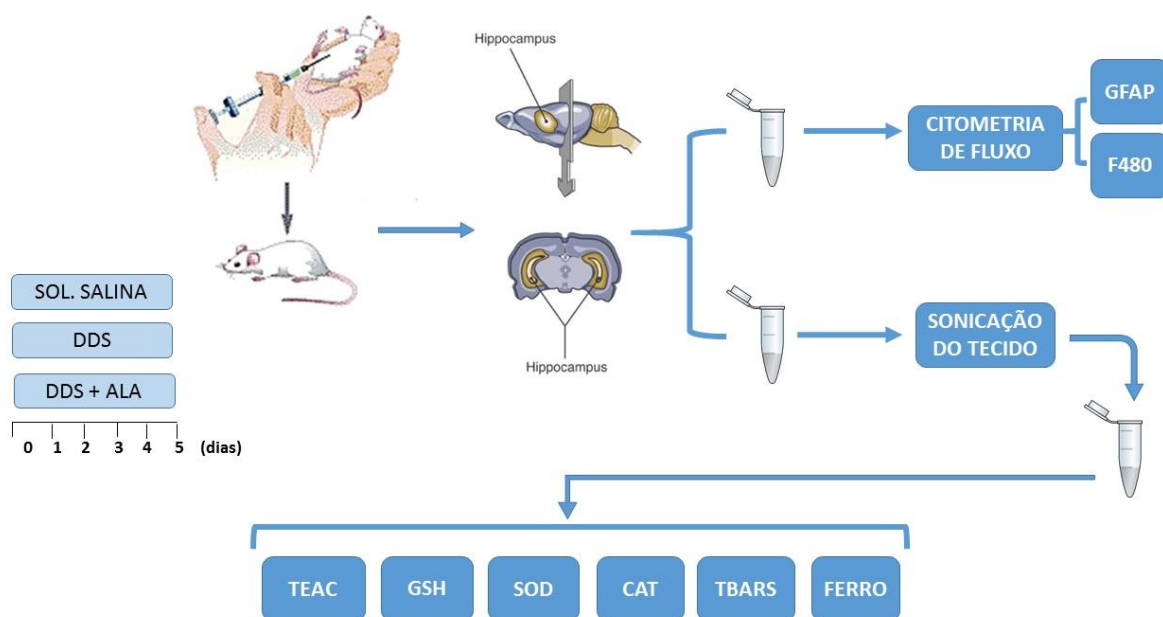


Figura 7. Representação esquemática do delineamento experimental.

### 4.3. Coleta de Amostras

Após 24h do término do tratamento farmacológico com DDS e/ou ALA e dos grupos controle, os animais foram anestesiados com quetamina (1,5  $\mu\text{L/g}$  de peso corporal) e xilazina (0,5  $\mu\text{L/g}$  de peso corporal) e submetidos a eutanásia por exsanguinação para a coleta de sangue total por punção cardíaca.

Em seguida, foi realizada uma craniotomia para a retirada do encéfalo e posterior separação do hipocampo. Cada região do encéfalo coletada (caracterizada como hipocampo) foi pesada e colocada em microtubos com de PBS na proporção de 1:10 e sonicados. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante coletado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. A partir das amostras de sangue foram avaliados os níveis de MetHb, DDS, marcadores da defesa antioxidante e do estresse oxidativo.

Todos os animais eutanasiados, após a coleta de material biológico, foram acondicionados em sacos plásticos para resíduos biológicos, em seguida congelados até o seu recolhimento e descarte pela empresa especializada, contrata pela UFPA,

de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos da Saúde (PGRS) da instituição.

#### 4.4. Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TEAC)

A determinação da capacidade antioxidante total foi realizada através da técnica da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico; 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 ( $K_2S_2O_8$ ; Sigma-Aldrich 60490), produzindo diretamente o cátion radical  $ABTS^{+\cdot}$  (radical 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato], sal de diamônio), cromóforo de coloração verde/azul (VASCONCELOS et al. 2007). A adição de antioxidantes presentes na amostra a este cátion radical pré-formado o reduz novamente a ABTS, em escala dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante 5 minutos. Os resultados foram expressos em  $\mu M/mL$ . O procedimento experimental está ilustrado na Figura 8.

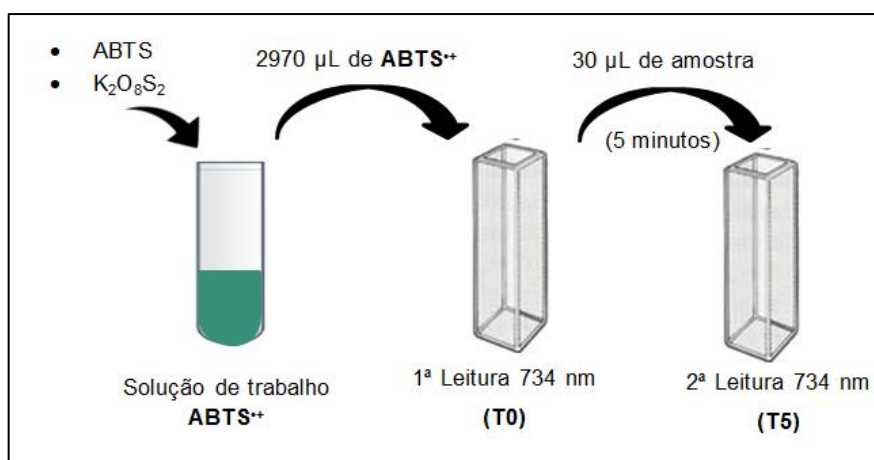


Figura 8 - Representação esquemática da determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC).



#### 4.5. Determinação da Atividade da Glutathiona Reduzida (GSH)

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

As amostras foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 2% e o sobrenadante coletado para análise após centrifugação a 3000 rpm por 5 min. Inicialmente, foi retirada uma alíquota de 20  $\mu$ L de cada amostra e colocada em tubo de ensaio contendo 3 mL de tampão PBS/EDTA e 20  $\mu$ L de água destilada para a realização da 1ª leitura da amostra (T0), em seguida foi adicionado 100  $\mu$ L de DTNB e após 3 minutos realizou a 2ª leitura da amostra (T3). A diferença nas absorvâncias (T3 – T0) é proporcional à concentração de GSH, expressa em  $\mu$ M/mL (Figura 9).

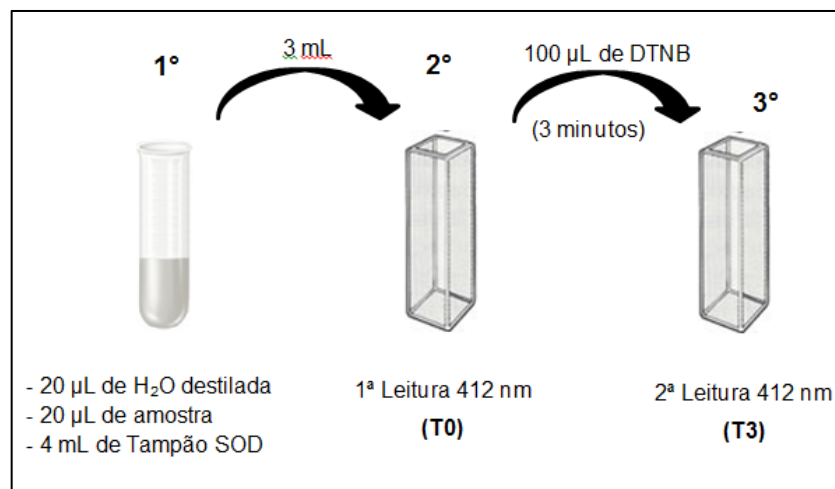


Figura 9 - Representação esquemática da determinação da glutathiona reduzida (GSH).

#### 4.6. Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da atividade da SOD será realizada segundo a técnica preconizada por McCord e Fridowich (1969) adaptada. Esta metodologia é de detecção indireta da atividade da SOD, pois a presença desta enzima na amostra, promove a conversão do  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , impedindo consequentemente a redução do citocromo C, que é detectada por espectrofotometria em comprimento de onda de 550nm. A atividade da enzima SOD será expressa em nmol/ mL do hemolisado e dos órgãos dos animais tratados e os controles. Neste ensaio, uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que promove 50% de inibição da redução do citocromo C à 25°C em pH 7,8.

Após o preparo das amostras, uma alíquota de 50  $\mu$ L foi adicionada a uma mistura de tampão, citocromo C 0,075mM, hipoxantina (Sigma-Aldrich) 1,5 mM e xantina oxidase (Sigma-Aldrich) 56 mM; a solução resultante foi incubada a 37°C e ao abrigo da luz e, após 15 min, foi realizada uma única leitura na faixa de 550 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimatzu). Os valores de absorbância foram aplicados em curva padrão de citocromo C para determinação da concentração enzimática, expressa em Unidade SOD/mg proteína: uma unidade de SOD é a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a velocidade de redução do citocromo C em pH 7,8. O procedimento é ilustrado na Figura 10.

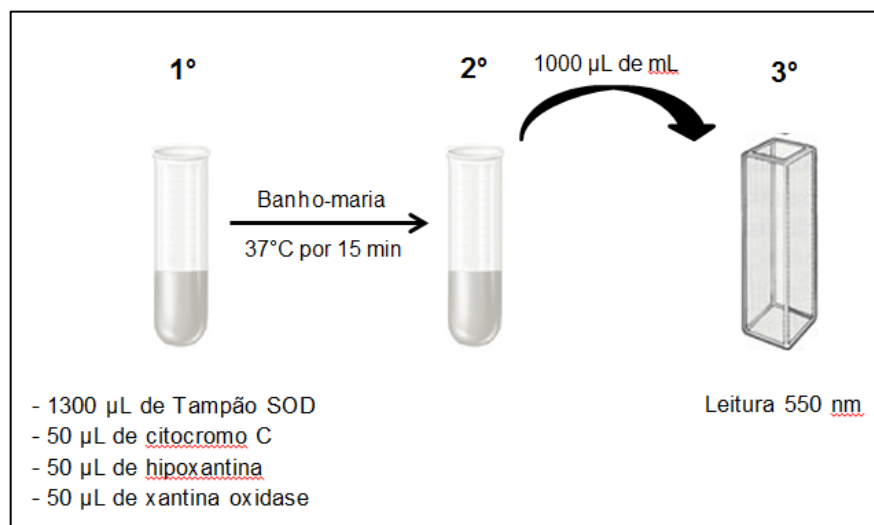


Figura 10 - Procedimento para determinação da SOD.

#### 4.7. Determinação da Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi determinada conforme o método descrito por Aebi (1984), que avalia a capacidade da catalase presente na amostra converter o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Merck) em água e oxigênio. Assim, para verificar o decaimento do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , alíquotas das amostras diluídas foram adicionadas a 900  $\mu\text{L}$  de solução de reação (Tampão TRIS base,  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e água ultrapura) em pH 8 (BUKOWSKA e KOWALSKA, 2004). A diminuição da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi verificada a  $\lambda=240$  nm em espectrofotômetro a 25°C durante 60 seg. A atividade de catalase foi definida como a atividade necessária para degradar um 1 mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 60 seg, em pH 8 a 25°C, sendo expressa como U/mg Hb nos eritrócitos. Os dados de atividade enzimática obtida no ensaio da CAT foram normalizados pelas respectivas concentrações de proteínas totais, usando-se o Kit comercial Doles. O procedimento para dosagem de CAT está representado na Figura 11.

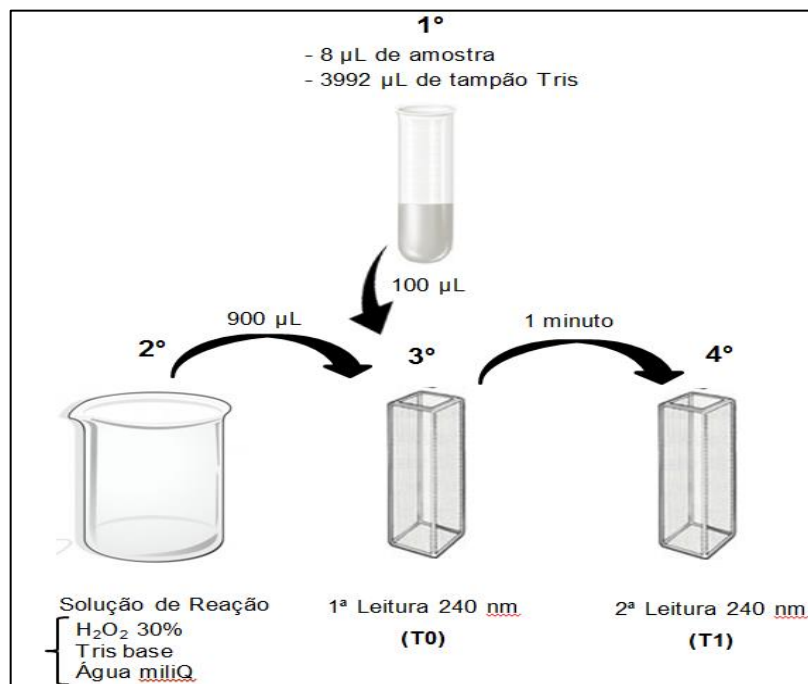


Figura 11 - Procedimento para determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

#### 4.8. Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

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

O procedimento consiste no preparo inicial do fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 75 mM, Synth, 35210) em água acidificada (pH 2,5). Esta solução é utilizada na preparação do TBA (10 nM). Adiciona-se 100 µl de amostra à 500µl da solução de ácido tiobarbitúrico 10 nM. Em seguida leva-se ao banho-maria (94°C por 60 min); adiciona-se 2,0 ml de álcool 1-butílico, homogeneiza-se vigorosamente em vórtex e posteriormente submete-se a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos; coleta-se 1,0 ml do sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535 nm (Figura 12). O padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano - Sigma-Aldrich, T9889) foi utilizado para a realização da curva padrão, com resultados expressos em µM/L.

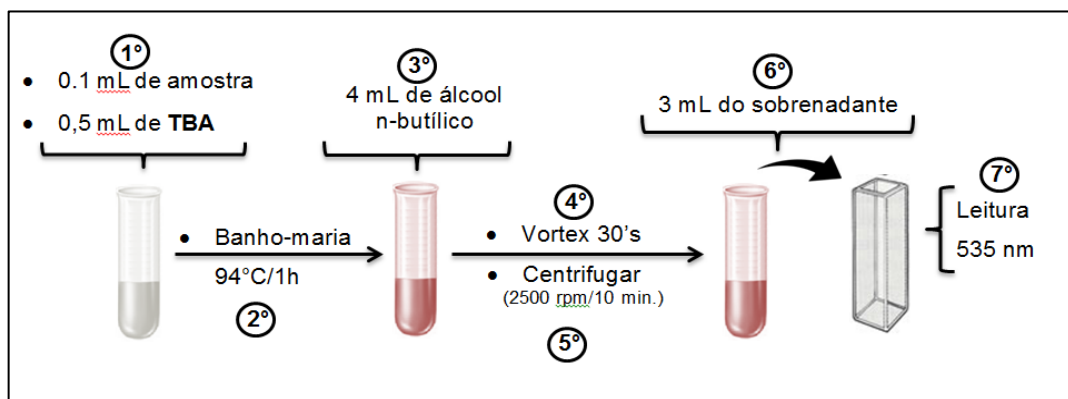


Figura 12 - Representação esquemática da dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

#### **4.9. Determinação da Concentração de Ferro**

A concentração de ferro nas amostras foi determinada pelo método colorimétrico de Goodwin (1966), modificado. Para isso, foram utilizados 50µl de cada amostra e as leituras foram feitas em espectrofotômetro em 565nm. Os tubos utilizados na manipulação das amostras durante os procedimentos foram de plástico e descartáveis, para evitar a contaminação com traços de ferro. Na análise, o ferro é liberado da transferrina em meio ácido tamponado e na presença de ácido tioglicólico é reduzido a Fe<sup>+2</sup>. O íon reduzido liga-se ao reagente de cor (ferrozine), formando um complexo molecular de coloração rósea, cuja intensidade da cor produzida é diretamente proporcional à concentração de ferro na amostra. Os resultados foram expressos em mg/L.

#### **4.10. Determinação da Expressão de IL-1β, IL-17, IL-4 e BDNF**

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

O teste de ELISA (do inglês “Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay”) baseia-se nas reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Todas as citocinas foram medidas pelo método de ELISA, como descrito. Resumidamente, placas de microtitulação de fundo chato foram revestidas durante 3 h com um mAb MD2 de captura (Innogenetics, Gent, Belgium) a 10 µg/ml in a 0.1 M em tampão de carbonato a 0,1 M (pH 9,6, 50 µL/poço) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os passos subsequentes de incubação foram em volumes de 50 µL, seguidos de lavagem com PBS suplementado com 0,05% (v / v) de Tween-20.

As placas foram lavadas duas vezes e incubadas por 1h com PBS / 3% BSA (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após a lavagem, amostras contendo citocinas recém-descongeladas diluídas em PBS / BSA a 3% foram então adicionadas e incubadas

overnight a 4 ° C. As placas foram lavadas e o mAb MD1 biotilado foi adicionado durante 2 h (37, 5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com estreptavidina acoplada a peroxidase (Genzyme Corp., Cambridge, MA), 1/5000 diluídas em PBS a 3% durante 1 h (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e lavado, e a atividade enzimática foi determinada com o substrato 1,2-fenileno-diamina (Fluka, Buchs, Suíça) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) em tampão de substrato, pH 5,4. A reação foi parada adicionando um volume igual de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M aos poços. As placas foram lidas a dois comprimentos de onda de 490 e 405 nm em leitor de microplacas (Bio-Rad, Richmond, CA).

#### **4.11. Imunofenotipagem de células macrofágicas/microglial e astrócitos**

A imunofenotipagem de células macrofágicas/microglial (F4/80+) e astrócitos (GFAP) foi realizada por citometria de fluxo (Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer). Para a imunomarcagem foi utilizada a técnica de imunofluorescência direta, onde uma amostra de hipocampo de 1,5×10<sup>8</sup> cel/mL foi pré-incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, com cinco microlitros de um dos seguintes anticorpos monoclonais: anticorpo anti-F4/80<sup>+</sup> conjugado a PE (Sigma-Aldrich) e anti-GFAP conjugado a FITC (Thermo Fisher Scientific). Amostras de animais basais (sem tratamento) e animais com dapsona ou dapsona + ALA foram avaliadas quanto a intensidade de expressão e percentagem de células positivas para F4/80<sup>+</sup> e GFAP, medida pela intensidade média de fluorescência. Para cada amostra de animais submetida à citometria de fluxo, foram analisados 10.000 eventos utilizando Attune NxT Software.

#### **4.12. Análise Estatística**

Os dados foram submetidos à análise estatística, onde cada parâmetro foi analisado inicialmente em relação aos possíveis pontos discrepantes (*outliers*), sendo utilizado o cálculo do intervalo interquartil. Para cada parâmetro analisado foi realizada Análise Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para a comparação de pares

de médias. Para verificação de possível correlação entre parâmetros, foi realizado o teste de correlação de Pearson. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação de parâmetros do estresse oxidativo (TEAC, GSH, SOD, CAT e TBARS) no hipocampo de animais tratados com múltiplas doses de DDS e do efeito antioxidante do pós-tratamento com ALA.

A Figura 13 mostra que o tratamento com DDS levou a uma redução na capacidade antioxidante total pelo método TEAC no hipocampo dos animais tratados em relação aos animais sem tratamento (Grupo basal). No tratamento com ALA, todas as doses deste antioxidante foram capazes de reverter a ação oxidativa de DDS no hipocampo, reestabelecendo a capacidade antioxidante total aos níveis basais. O grupo tratado com DDS e pós-tratados com AM não apresentou diferença significativa na capacidade antioxidante total quando comparado ao grupo DDS, mostrando que o AM não foi capaz de reverter o efeito oxidativo do DDS *in vivo*.

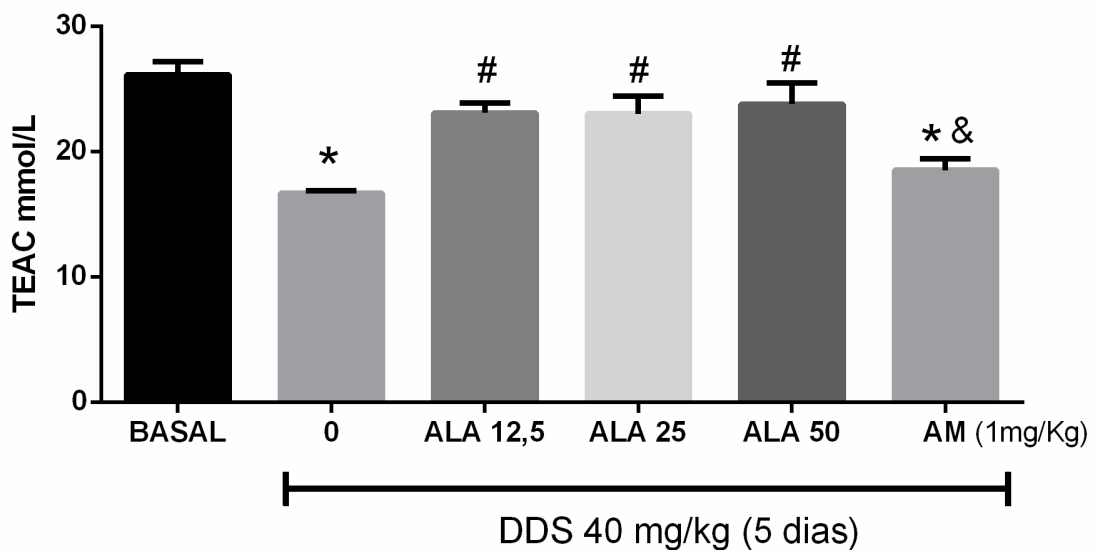


Figura 13 - Efeito do tratamento com ALA sobre a capacidade antioxidante total em hipocampo de camundongos tratados com DDS. # $p \leq 0,05$  comparado a DDS; \* $p \leq 0,05$  comparado grupo BASAL sem tratamento, & $p \leq 0,05$  comparado aos grupos ALA 12,5; ALA 25 e ALA 50 mg/Kg. ALA: Ácido  $\alpha$ -lipóico; TEAC: Capacidade Antioxidante Equivalente ao TROLOX; DDS: Dapsona; AM: Azul de metileno



Em relação aos níveis do tripeptídeo GSH (antioxidante endógeno), os múltiplos tratamentos com DDS foram capazes de reduzir os níveis de GSH no hipocampo dos animais tratados com este fármaco em relação aos animais sem tratamento (Figura 14). O pós-tratamento com ALA nas doses de 12,5 e 25 mg/Kg ( $p = 0,01$  para a dose de ALA 12,5 e  $p < 0,0001$  para ALA 25) reverteram esta redução nos níveis de GSH hipocampal induzida pelo tratamento com DDS *in vivo*. No entanto, somente a dose de 25 mg/Kg foi capaz de elevar os níveis de GSH aos valores basais (Figura 14). Por outro lado, o tratamento com o AM não alterou significativamente ( $p > 0,05$ ) os níveis de GSH no hipocampo comparado ao grupo DDS sem tratamento.

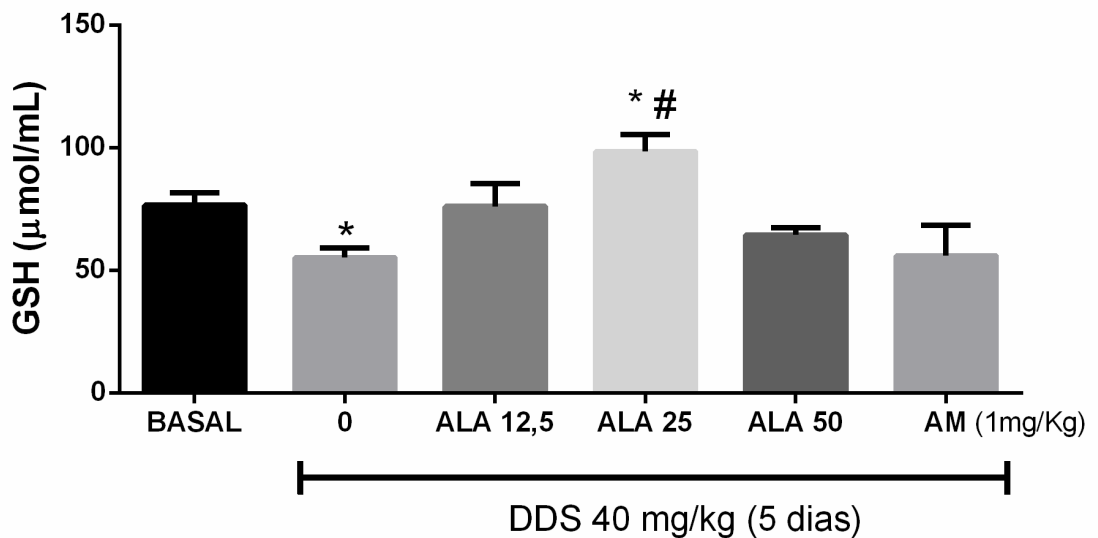


Figura 14 - Efeito do ALA nos níveis de GSH em células do hipocampo de camundongos tratados com DDS. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas. # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo BASAL; \* $p \leq 0,05$  comparado ao DDS sem tratamento. ALA, ácido  $\alpha$ -lipóico; DDS, dapsona; GSH, glutathiona; AM, azul de metileno

A Figura 15 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu a atividade de SOD no hipocampo em relação ao controle (grupo basal;  $p < 0,05$ ). Os tratamentos com ALA nas concentrações de 12,5 e 25 mg/kg e AM (1mg/kg) não alteraram a atividade de SOD comparado ao grupo DDS. Os grupos de tratamento se não mostraram capacidade de restaurar a atividade de SOD ( $p < 0,05$ ).

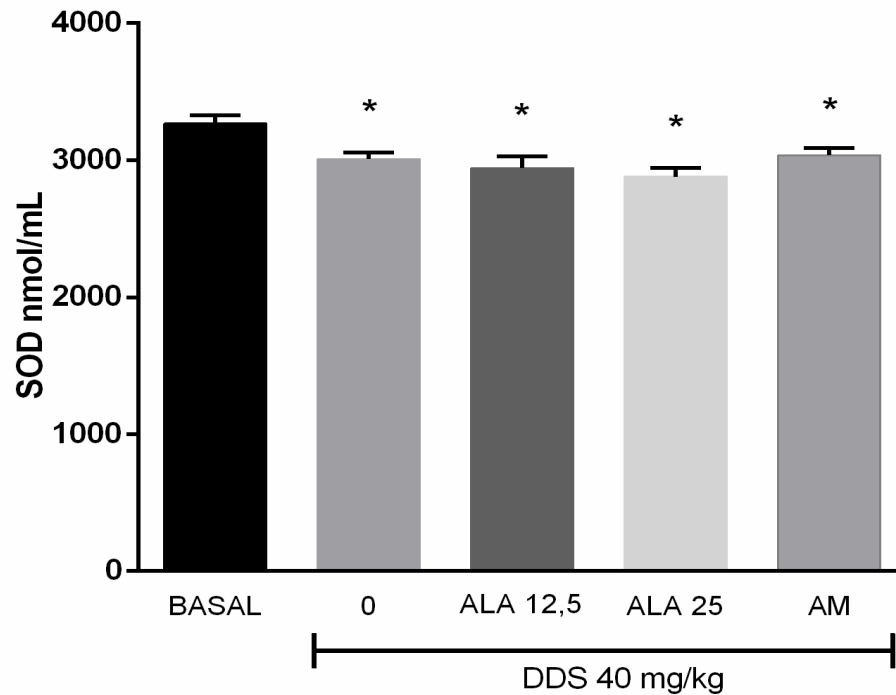


Figura 15: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a atividade de Superóxido Dismutase (SOD) no hipocampo de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25 mg/kg) e azul e metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo basal; ALA: ácido  $\alpha$ -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno.

A Figura 16 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, diminuiu a atividade de CAT no hipocampo em relação ao controle (grupo basal). Em relação ao tratamento com o ALA, ambas as doses de 12,5 e 25 mg/kg, foram capazes de reestabelecer a atividade de CAT ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo DDS. O tratamento com AM (1mg/kg) também mostrou aumento de níveis de CAT quando comparado ao grupo DDS, ainda que tenha mantido níveis mais baixos que os basais.

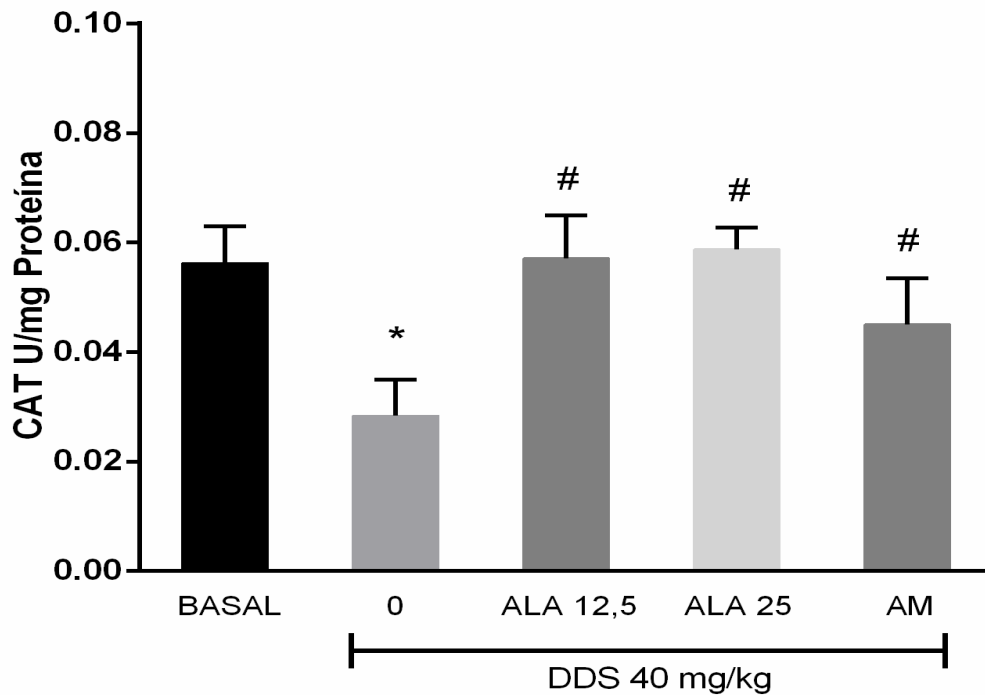


Figura 16: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre a atividade de Catalase (CAT) no hipocampo de camundongos e do pós-tratamento com ALA em duas doses (12,5 e 25 mg/kg) e azul de metileno (1mg/kg), durante 5 dias consecutivos. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo basal; # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: ácido  $\alpha$ -lipóico, DDS: dapsona, AM: Azul de metileno 1mg/kg.

A avaliação da peroxidação lipídica, por TBARS, que expressa os danos em lipídios ocasionados pelo desequilíbrio oxidativo em células e tecidos, como o hipocampo, foi mostrada na Figura 17. Os animais tratados com múltiplas doses de DDS apresentaram aumento nos níveis TBARS no hipocampo em relação aos animais sem tratamento, mostrando que a DDS levou ao estresse oxidativo com possível aumento de MDA nestes animais tratados. Todos as doses de pós-tratamentos com ALA foram capazes de inibir a peroxidação lipídica hipocampal induzida pela DDS (Figura 17). Interessantemente, o tratamento com AM também foi capaz de inibir a produção MDA hipocampal induzida pela DDS, embora não altere os níveis dos antioxidantes testados acima.

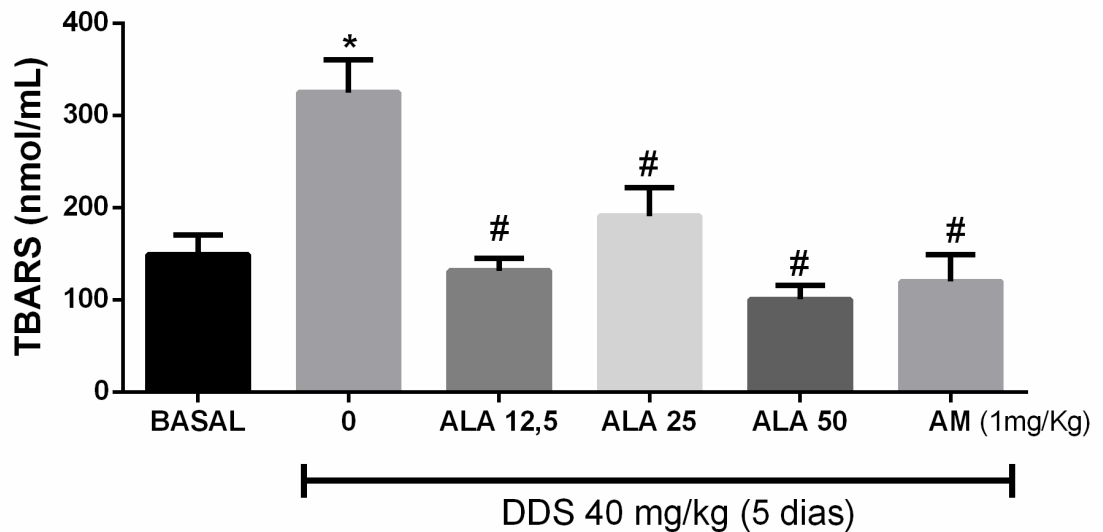


Figura 17 - Efeito do ALA sobre os níveis de TBARS em hipocampo de animais tratados com DDS \* $p \leq 0,05$  comparado ao BASAL; # $p \leq 0,05$  comparado ao DDS sem tratamento. ALA: Ácido  $\alpha$ -lipóico; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA: malondialdeído; DDS: Dapsona; AM: Azul de metileno.

## 5.2. Avaliação de níveis de ferro no hipocampo dos animais tratados com DDS, na presença ou não de ALA.

A fim de avaliar o efeito do DDS no acúmulo de Ferro em áreas importantes do SNC, como o Hipocampo, os animais foram tratados com múltiplas doses de DDS. A Figura 19 mostra que o tratamento com DDS elevou os níveis de ferro acumulados no hipocampo em relação aos animais sem tratamento com o fármaco. Além disso, verificou-se se o pós-tratamento com compostos como ALA (12,5, 25 e 50 mg/Kg) ou AM (1mg/Kg) alteraram o acúmulo de ferro hipocampal induzido pelo tratamento com DDS. Nossos resultados demonstram que todas as doses de ALA e a dose de AM foram capazes de reverter o acúmulo de ferro no hipocampo induzido pela dapsona, apresentando valores deste metal similar aos níveis basais (Figura 18).

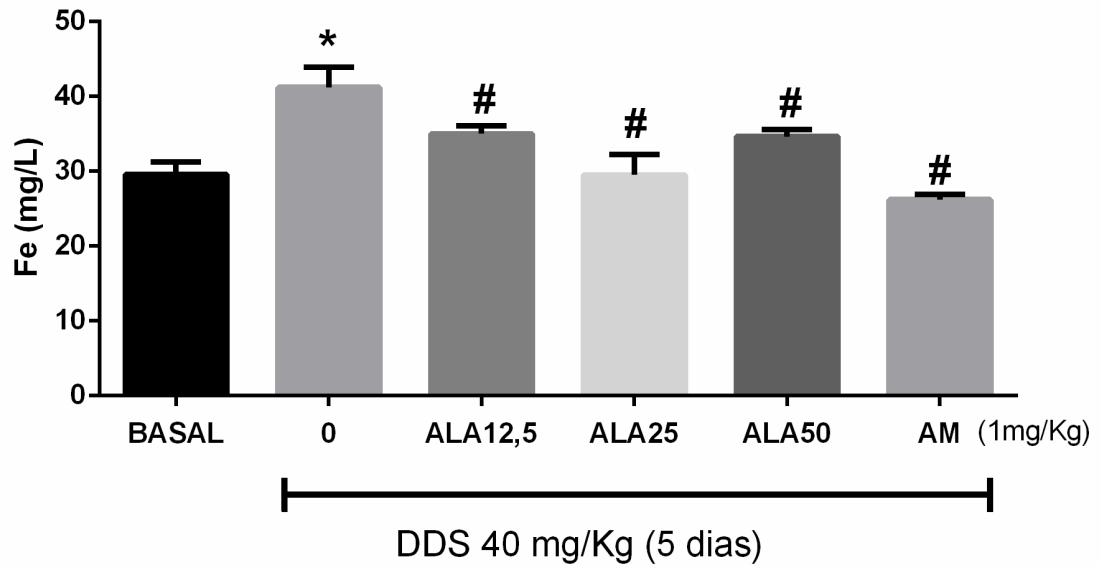


Figura 18 - Efeito do ALA sobre os níveis de ferro em hipocampo de animais submetidos ao tratamento de múltiplas doses com DDS \* $p \leq 0,05$  comparado ao BASAL; # $p \leq 0,05$  comparado ao DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: Ácido  $\alpha$ -lipóico; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA: malondialdeído; DDS: Dapsona; AM: Azul de metileno.

### 5.3. Avaliação de Perfil Celular e Citocinas no Hipocampo de animais tratados com DDS, na presença ou não de ALA.

Para a avaliação do perfil de ativação de macrófagos/micróglia e astrócitos no hipocampo foram usados marcadores fluorescentes de F4/80 e GFAP, respectivamente, e analisados por citometria de fluxo. A Figura 19 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, após 4h, elevou o percentual da população macrófágica/microglial que expressa baixos (“low”) níveis do marcador F4/80+ (população recém-migrada) no hipocampo em relação ao grupo basal ( $p < 0,05$ ). No entanto, não alterou o percentual de macrófagos/microglia ativados ou diferenciados, população que expressa altos (“high”) níveis de F4/80+. Por outro lado, o pós-tratamento com ALA 25 mg/kg foi capaz de estimular a ativação ou diferenciação de macrófagos/micróglia, levando a um aumento no percentual da população F4/80+high e diminuição da população F4/80+low, mostrando que o ALA pode levar a ativação ou diferenciação de um perfil de macrófagos/micróglia no hipocampo.

Em relação aos astrócitos, o tratamento com DDS 40mg/kg diminuiu o percentual de astrócitos com baixa (low) expressão de GFAP, e aumentou o percentual de astrócitos com elevada (high) expressão de GFAP (astrócitos reativos) em relação ao grupo basal, mostrando que a DDS estimulou a reatividade de astrócitos no hipocampo. Interessantemente, o pós-tratamento com ALA 25 mg/kg mostrou um efeito imunoregulador sobre astrócitos estimulados pelo DDS, retornando aos níveis basais o perfil de astrócitos com baixa e alta expressão de GFAP. Estes dados mostram que o tratamento com ALA pode atuar com ação anti-inflamatória ou imunomoduladora diminuindo a população de astrócitos reativos (GFAP+high ) no hipocampo comparado ao grupo DDS.

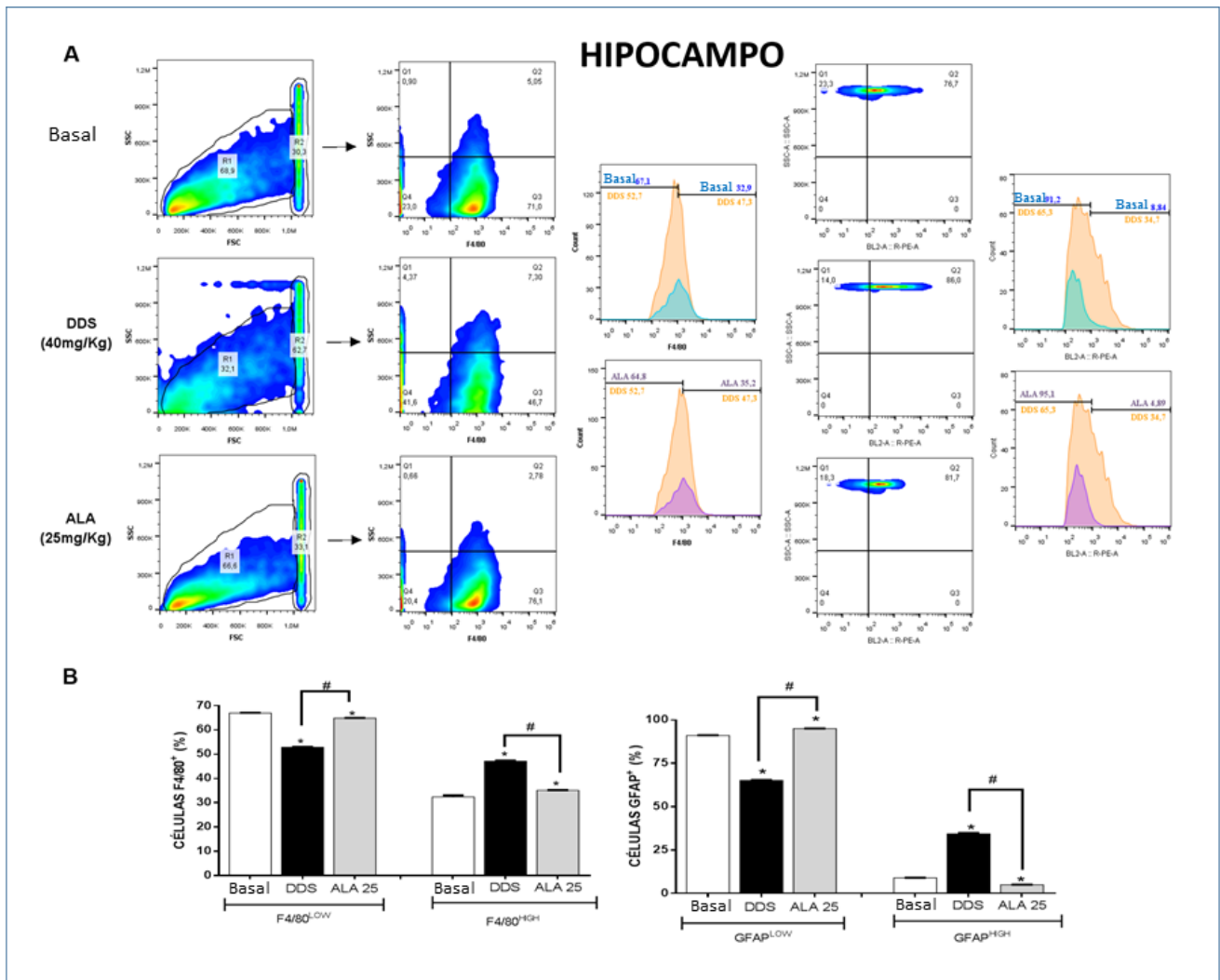


Figura 19: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre macrófagos/microglia (F4/80+) e astrócitos (GFAP+) no hipocampo de camundongos e do pós-tratamento com ALA 25mg/kg, durante 5 dias consecutivos. A: População positiva para F4/80+ e GFAP, análises por citometria de fluxo; B: Percentual de expressão de macrófagos/microglia (F4/80+) e astrócitos (GFAP+). \* $p \leq 0,05$  comparado grupo basal; # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: ácido  $\alpha$ -lipóico, DDS: dapsona.

Para avaliar a resposta inflamatória no hipocampo induzidos pelos tratamentos com DDS ou DDS+ALA, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-17) e anti-inflamatória (IL-4) e a produção de BDNF foram dosadas neste tecido. A Figura 20 mostra que o tratamento com DDS 40mg/kg, em 4h, aumentou a expressão de IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-4 no hipocampo em relação ao grupo basal ( $p < 0,05$ ), no entanto, reduziu a produção de BDNF, mostrando que o DDS induz um processo inflamatório e confirmando o seu efeito oxidativo neste tecido, já mostrado pelos níveis elevados de MDA (Figura 20). No entanto, o pós-tratamento com ALA 25 mg/kg foi capaz de reduzir a produção de

IL-1 $\beta$  e aumentar os níveis de BDNF, mas não alterou os níveis de IL-17 e IL-4 no hipocampo após o tratamento com DDS ( $p < 0,05$ ), mostrando ações anti-inflamatória e antioxidante neste tecido.

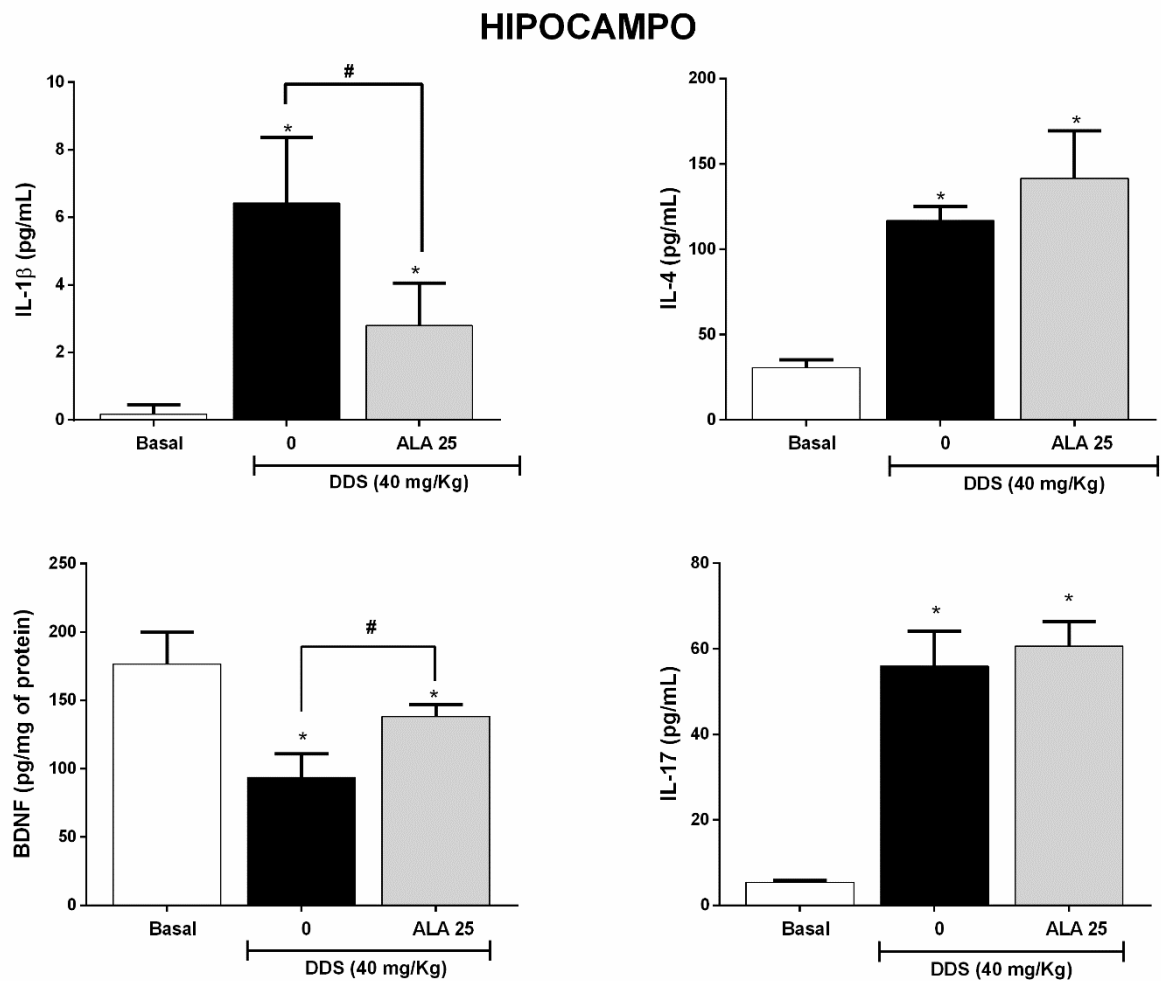


Figura 20: Efeitos da Dapsona 40 mg/kg (ip) sobre os níveis de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-4 e BDNF no hipocampo de camundongos e do pós-tratamento com ALA 25mg/kg, durante 5 dias consecutivos. \* $p \leq 0,05$  comparado grupo sham; # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo DDS sem tratamento com antioxidante. ALA: ácido  $\alpha$ -lipóico, DDS: dapsona.



## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que o regime de tratamento em múltiplas doses com DDS diminuiu a capacidade antioxidante total e os níveis de GSH no hipocampo dos animais tratados com este fármaco. No presente estudo, o grupo tratado com DDS, apresentou redução de níveis de GSH, bem como a diminuição da capacidade antioxidante total, aumento de peroxidação lipídica e elevação de níveis de ferro. Além disto, este grupo apresentou menores níveis de enzima catalase, assim como uma redução de níveis de enzima superóxido dismutase. Neste caso, a metabolização hepática de DDS nos animais tratados levou à formação de seus metabólitos e conseqüentemente às alterações dos parâmetros avaliados. Adicionalmente, a avaliação de marcadores de inflamação em tecido nervoso mostrou perfil inflamatório evidente no grupo tratado com dapsona na dose de 40 mg/kg, com populações distintas de micróglia e aumento de citocinas pró inflamatórias. Este perfil foi reduzido com o tratamento com ALA, principalmente na dose de 25 mg/kg.

Os achados decorrentes da toxicidade provocada por DDS em um modelo animal de avaliação tecidual em SNC permitem reforçar evidências do potencial oxidativo da DDS, destacando o potencial neurotóxico deste fármaco. Seu perfil farmacocinético e farmacodinâmico, principalmente como fármaco causador de efeitos adversos relacionados ao estresse oxidativo já é conhecido. DDS, cuja metabolização ocorre no fígado pelo complexo enzimático citocromo P450, gera metabólitos que são responsáveis por danos oxidativos. Tais metabólitos, dapsona hidroxilamina (DDS-NOH) e monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH) são considerados agentes pró-oxidantes e responsáveis por reações adversas relacionadas à terapia com esta droga (ELLARD et al. 1972; VAGE et al. 1994; SCHIFF et al. 2006). Estudos realizados *in vitro* demonstraram o efeito hematotóxico destes metabólitos, contudo a forma hidroxilamina é a mais relacionada à formação de MetHb e diminuição da concentração de GSH (CICCOLI et al. 1999; REILLY et al. 2000).

No sistema nervoso, DDS fármaco é capaz de provocar danos oxidativos em células e tecido nervosos, visto que sua característica química confere à molécula alta lipossolubilidade. O baixo peso molecular também confere à estrutura química a

capacidade de se difundir facilmente pelo SNC (GATTI et al. 1997). Ainda assim, quanto aos danos provocados por estresse oxidativo induzido por DDS no SNC, existem poucos dados na literatura que possam ser comparados aos resultados obtidos neste estudo. Contudo, um estudo realizado por Sadeghi e colaboradores (2016) mostrou associações entre o estresse oxidativo e depósito de ferro no hipocampo, nos quais os níveis elevados de ferro estavam associados a um aumento na peroxidação lipídica e ativação de vias apoptóticas. Nesse sentido, nossos dados também mostraram que tanto os níveis de ferro quanto a peroxidação lipídica estão aumentados no grupo tratado com múltiplas doses de DDS. Estes mecanismos de danos provocados por ferro refletem seu potencial catalítico em vias de estresse oxidativo, sendo capaz de provocar a formação de espécies reativas de oxigênio e consequente estresse oxidativo em diversas macromoléculas em células e tecidos (CICCOLI et al. 1999).

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

A capacidade antioxidante total reflete de forma inespecífica uma série de mecanismos relacionados a vias antioxidantes, sejam endógenas ou exógenas. No caso dos grupos tratados com o ácido  $\alpha$ -lipóico neste estudo, observa-se uma recuperação do sistema antioxidante que havia sido inibido pelo uso da dapsona *in vivo*. O desequilíbrio entre os fatores oxidativos e antioxidantes pode ser explicado por aumentos das vias oxidativas e maior consumo das defesas antioxidantes levando ao seu esgotamento nos animais tratados com dapsona. Nesse sentido, vários estudos mostram que metabólitos de dapsona, principalmente DDS-NOH, são responsáveis por provocar diminuição de glutathiona (BORDIN et al. 2014). Com isso, os animais que receberam pós-tratamento com ALA apresentaram reestabelecimento do equilíbrio oxidativo, mediado pelo uso do agente antioxidante. Um dos mecanismos

antioxidantes do ALA deve estar baseado nas características moleculares do ALA, cujo isômero R, reconhecidamente de melhor perfil farmacocinético de absorção (GLEITER et al. 1996; HERMANN et al. 1996; BREITHAUPT- GROGLER et al. 1999), é metabolizado em ácido dihidrolipoico, um potente redutor tiol com atividade antioxidante, capaz de aumentar esta atividade mitocondrial e celular e dessa forma induzir a síntese de glutathione (PACKER et al. 2001; SUH et al. 2001). No nosso estudo, o tratamento com DDS diminuiu as concentrações de GSH no hipocampo dos camundongos, o que sugere que esta região encefálica sofre uma queda no status antioxidante, via consumo de GSH, dependente do tempo e da ação de DDS e seus metabólitos, resultando em estresse oxidativo. Nossos dados corroboram com Al Shahrani et al., (2017), que verificaram que ERO pode causar disfunção mitocondrial e reduzir os níveis de GSH no tecido cerebral, resultando em estresse oxidativo.

O aumento da capacidade antioxidante total, já descrito em estudos anteriores com antioxidantes, pode resultar de uma ação direta ou indireta sobre o sistema antioxidante (HAGER et al. 2001). Diretamente, o ALA tem a capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio. Neste caso, a ação direta do ALA pode refletir a capacidade de neutralização das espécies reativas, considerando ainda a característica hidro/lipossolúvel da molécula (PACKER et al., 1999; BILSKA e WLODEK, 2005), que pode favorecer sua ampla distribuição. Indiretamente, ALA pode atuar como cofator enzimático em pontos-chave da defesa antioxidante endógena. Por exemplo, o ALA pode estimular a síntese de moléculas de GSH, fato que pode ter ocorrido nos animais pós-tratados com 25 mg/Kg de ALA. Nesta faixa de dose, é sugerido que o ALA tenha atuado na reversão do estresse oxidativo, possivelmente por mecanismos dependentes do aumento da atividade mitocondrial, através redução da cistina a cisteína que eleva a biossíntese da GSH (PACKER et al. 2001; SUH et al. 2001).

Xenobióticos que geram metabólitos reativos, como é o caso da dapsona, apresentam conjugação de GSH com oxidantes e a inibição da síntese desta enzima como principais mecanismos de diminuição dos níveis de GSH (JADHAV et al. 2007). Desta forma, estes compostos podem induzir a oxidação da Hb gerando ERO (MURAKAMI e MAWATARI, 2003) que iniciam a peroxidação de lipídios de membrana. Além disso, vários estudos relatam a importância da GSH na indução da atividade da GPx e na reciclagem de ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol no organismo

(NUTTALL et al. 1999). Com isso, a diminuição da concentração de GSH pode reduzir fatores antioxidantes não-enzimáticos e a capacidade de remover o  $O_2^{\bullet-}$  e o  $H_2O_2$  do interior das células. Além disto, em modelo animal, ALA mostrou seu potencial neuroprotetor contra danos isquêmicos em camundongos, através da expressão de PGC-1 $\alpha$  dependente de SIRT1, uma importante proteína indutora de capacidade antioxidante e redutora da produção EROs (FU et al. 2014).

Outro resultado de estresse gerado por desequilíbrio redox é a disfunção mitocondrial células neuronais e astrocíticas parece exibir uma resposta direta sobre a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e sua capacidade de gerar ATP. Além disso, o estado antioxidante, particularmente no metabolismo da GSH, parece ser diferente em astrócitos e células neuronais (POPE, 2008). Neurônios aparentam ter uma proteção conferida pela disponibilidade de GSH dos astrócitos contra ERO e ERN. Este aumento no conteúdo de GSH ocorre como consequência da transferência de precursores de GSH de astrócitos para neurônios. Uma interferência nesse processo resulta na falha das células neuronais em aumentar seu o status de GSH e torna a cadeia de transporte de elétrons suscetível a danos oxidativo (GEGG, 2005). De fato, muitos estudos relatam que o estresse promove mudanças nos níveis ERO e GSH, bem como na atividade de enzimas antioxidantes em regiões cerebrais como o hipocampo (KUMAR et al. 2011; FREITAS et al. 2014).

No presente estudo, o aumento síntese de GSH com ALA na dose de 25mg/kg levou à suposição de que esta dose apresenta melhor ação antioxidante. Adicionalmente, as doses de 12,5 e 50 mg/Kg não mostraram atividade sobre esta via, sugerindo que exista uma faixa ideal na concentração deste antioxidante para maior aproveitamento de sua ação. Por outro lado, estudos que avaliaram um perfil voltado para a neuroinflamação, sugerem doses de 100 a 200 mg/Kg para inibição de vias inflamatórias no sistema nervoso central, como via de sinalização MAPK (mitogen activated proteinkinase), relacionada a vias ERK e JNK e Nf-kB. Sob condições de distúrbios metabólicos, o microambiente celular pode acumular ERO e assim modificá-lo, e conseqüentemente ativar vias de sinalização de processos inflamatórios (LIU et al. 2017). Neste contexto, ALA pode atuar na redução de espécies reativas de oxigênio por captura direta destas moléculas.

Através do aumento da concentração de antioxidantes endógenos, como GSH e ácido ascórbico, ALA pode proteger as células contra citotoxicidade promovida por agentes oxidantes (PACKER et al. 2001). Este mecanismo, dependente da própria defesa antioxidante, é sugerido para justificar a proteção conferida pelo ALA contra a peroxidação lipídica. Esta ação pode estar relacionada aos isômeros de ALA cuja atividade é atribuída aos grupos tiol que reagem com radicais oxidantes. Com isto, o equilíbrio redox intracelular é reestabelecido diretamente pela retirada destes radicais através da ação do ALA (WOLLIN e JONES, 2003) ou pelo aumento dos níveis de GSH. Adicionalmente, glutathione também pode apresentar a capacidade de ação sinérgica com GPx, relacionada à redução de peróxidos orgânicos. Desta forma, níveis equilibrados de defesa antioxidante endógena, induzidas por moléculas como isômeros de ALA podem conferir a capacidade de proteção contra a peroxidação lipídica. Neste ponto, as doses de ALA testadas mostraram perfil protetor frente ao dano provocado pelo estresse oxidativo resultante do uso de DDS, possivelmente devido a ação direta de redução de espécies reativas, pois níveis de GSH apresentaram aumento somente na concentração de 25 mg/Kg.

Os mecanismos subjacentes de ALA sobre vias celulares são ainda incompletamente elucidados quando se trata de vias celulares específicas. Ainda que seu potencial antioxidante, quelante e na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial já tenha sido amplamente descrito, mais estudos são necessários para esclarecer de fato todas as possibilidades de interação com moléculas intra e extracelulares, endógena, exógenas e sobre como estas interações se refletem em efeitos. Nosso estudo mostrou que o ALA nas doses utilizadas (12,5 e 25mg/kg) foi capaz de aumentar ou reestabelecer os níveis de GSH após tratamento com DDS. Desta forma, é provável que ALA possa agir diretamente como indutor da síntese de GSH no hipocampo, mas também de forma indireta pela via da SIRT-1, para aumentar a capacidade antioxidante e reduzir os efeitos tóxicos da DDS.

Dinicola et al (2017) realizaram estudo em human neuroblastoma SK-N-BE cells tratadas com ALA em concentração de 0,5 mM durante 24 horas. Este trabalho demonstrou atividade reguladora epigenética de ALA sobre a expressão dos genes IL-1B e IL-6, responsáveis pela codificação das interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6, respectivamente. Os autores investigaram a metilação de DNA como possível mecanismo para a regulação que ALA exerce sobre as regiões gênicas. Nesse

sentido, verificaram menores níveis de mRNA de ambos os genes no grupo tratado com ALA em comparação com grupo não tratado. A detecção e quantificação de IL-1 $\beta$  e IL-6, realizada por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), também revelou níveis mais baixos no sobrenadante da cultura de células tratadas com ALA, em comparação com sobrenadante de células não tratadas. Adicionalmente, os níveis de metilação do DNA foram inversamente correlacionados aos níveis de mRNAs codificados para as referidas interleucinas em células tratadas. Este mesmo grupo de pesquisa, em outro estudo com tratamento de ALA sobre células de ovário, obteve resultados similares sobre interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 (DINICOLA et al. 2017a). Os dados obtidos neste estudo possibilitam sugerir que estas citocinas pró-inflamatórias relacionadas a diversos processos patológicos, incluindo neurodegeneração, são moduladas por ALA, direta ou indiretamente (DINICOLA et al. 2017b).

Em um estudo para avaliar o potencial neuroprotetor e ALA e contribuir para a elucidação de possíveis vias associadas ao efeito, ratos machos Wistar foram tratados com uma dose de 30 mg/kg/dia de ALA via intraperitoneal durante 11 dias. Após o final do tratamento, os autores avaliaram o comportamento sobre memória e aprendizado dos animais, assim como parâmetros de estresse oxidativo no tecido cerebral coletado. Assim, foi observado aumento de estresse oxidativo em todo o tecido cerebral, incluindo as áreas responsáveis por memória e aprendizado, como córtex, hipocampo e striatum. Nestes tecidos, os níveis de peroxidação lipídica aumentaram, assim como os níveis de GSH, CAT e SOD reduziram. Por outro lado, a suplementação com ALA reverteu este perfil oxidativo, com valores GSH no córtex próximos aos valores de grupo controle e GPx reduzida em todos os tecidos analisados. No grupo ALA, os níveis de catalase foram mantidos próximos aos valores do grupo controle, diferente do grupo escopolamina. Além disso, os autores observaram discreta redução de valores de SOD nos animais tratados com ALA. Estes achados reafirmam o perfil de ALA sobre o estresse oxidativo em um modelo animal, sugerindo benefícios sobre este aspecto em outras doenças associadas a danos neuronais (TZVETANOVA et al. 2018).

A mensuração dos níveis de ferro no tecido nervoso é um dos parâmetros que pode contribuir para a compreensão de alguns dos efeitos adversos de dapsona no SNC. Neste sentido, a correlação de quantidade de ferro e dano oxidativo provocado por DDS hipocampo pode ser indicativo de maior lesão tecidual associado ao fármaco.

Estudos relacionam o estresse oxidativo à diminuição dos níveis de GSH e ao consequente acúmulo de ferro através do aumento dos níveis de receptor de transferrina (YARJANLI et al. 2017). Assim, nossos dados mostraram que o tratamento com dapsona ocasionaram maior acúmulo de ferro e aumento de MDA no hipocampo dos animais tratados. Além disso, o dano causado por agentes pró-oxidantes como os metabólitos de dapsona induzem a formação de MetHb, um dos principais fatores relacionados ao acúmulo do ferro (MELLS et al. 2010). Hemoglobina oxidada se torna transportador de  $Fe^{3+}$ , íon relacionado a diversos mecanismos de danos a tecidos irrigados pela circulação sanguínea (MOHOROVIC et al. 2014). Esse mecanismo permite a passagem de MetHb e de Ferro no tecido, possibilitando assim o acúmulo desses componentes no parênquima cerebral com posterior redistribuição para os astrócitos, neurônios e outras células neurais.

Com o acúmulo de ferro no sistema nervoso central, os mecanismos oxidativos são resultado da ação catalítica do deste metal, gerando espécies reativas de oxigênio através da reação de Fenton (MATSUBARA, 1997; PROUSEK, 2007). O uso de dapsona por períodos prolongados leva ao constante dano oxidativo, levando principalmente a formação de MetHb e, conseqüentemente o carreamento de ferro na forma  $Fe^{3+}$  aos tecidos. Concentrações elevadas de ferro podem exceder a capacidade de sequestro de ferro celular por proteínas de armazenamento ou outras moléculas e assim, a concentração de ferro intracelular livre pode aumentar, podendo ser prejudicial e causar danos oxidativos e morte celular. No entanto, o acúmulo de ferro em regiões específicas do cérebro ocorre em muitas doenças neurodegenerativas e, muitas vezes, está associada ao estresse oxidativo e ao dano celular (KRUSZEWSKI, 2003). Desta forma, a elevação do acúmulo nos níveis de ferro encontrados na região do hipocampo dos animais tratados com dapsona, observados no presente estudo, apontam para que o uso de dapsona pode alterar mecanismos reguladores do transporte de ferro no sistema nervoso e com isto desencadear processos que levem ao dano celular e tecidual, culminando em efeitos fisiopatológicos no SNC. Por outro lado, o pós-tratamento com ALA, mostram níveis de ferro menores comparados ao grupo DDS (ALA 0), sugerindo um mecanismo de controle destes níveis de ferro promovido pelo ALA.

A neuroinflamação no hipocampo causada por DDS e seus metabólitos (DDS-NOH), está provavelmente associada ao esgotamento de GSH e aumento na

produção de ERO, levando ao estresse oxidativo e consequente modificação do ambiente neuronal, propiciando a instalação e cronificação do processo inflamatório. Além disso, DDS e DDS-NOH podem provocar oxidação da Hb e hemólise, com liberação de ferro na circulação sistêmica, ocasionando efeitos oxidativos em vários órgãos, incluindo o cérebro e áreas específicas como o hipocampo. Essa sobrecarga de ferro pode levar a produção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$ , que induzem a produção adicional de ERO e NO. Tais mediadores e os ERONS podem levar a neurotoxicidade e morte neuronal, conforme relatado em casos de doenças neurodegenerativas e alterações neurológicas relevantes provocadas por fármacos como a DDS.

Para a avaliação do efeito neuroinflamatório de DDS, bem como o papel de ALA nesse processo, marcadores neurogliciais foram quantificados no tecido cerebral, especificamente na região do hipocampo. Assim, marcadores como F4/80+, relacionado a atividade macrófágica e microglial, GFAP, marcador relacionado a atividade astrocitária puderam fornecer um panorama deste cenário celular em animais submetidos ao tratamento com DDS. Nesse sentido, nossos dados mostraram que o tratamento com DDS 40mg/kg não levou a ativação de macrófagos/microglia e nem estimulou a reatividade de astrócitos no hipocampo dos camundongos, mas induziu um influxo recente de macrófagos/microglia e astrócitos neste tecido. Por outro lado, o pós-tratamento com ALA (25 mg/kg) estimulou a ativação de um perfil de macrófagos/microglia, mas reduziu a reatividade de astrócitos. Esses resultados mostraram que a DDS, a princípio, induziu influxo macrófagos/microglia e astrócitos no hipocampo, mas não levou a ativação destas células. No entanto, ALA levou a ativação de macrófagos/microglia e reduziu a reatividade de astrócitos, mostrando uma ação imunoestimuladora sobre células macrófágicas no hipocampo, que é fundamental para a regulação na produção de ROS, estresse oxidativo e neurotoxicidade.

O tratamento com ALA interfere na ativação microglial, reduzindo este efeito, assim como apresenta capacidade moduladora sobre o perfil macrófágico, inibindo o fenótipo de macrófagos M1 (inflamatório) e estimulando o perfil M2 (anti-inflamatório), que possivelmente reduz o dano neuronal (WARD et al. 2014). Em um modelo de oclusão da artéria cerebral média em ratos e um modelo de inflamação microglial induzida por LPS *in vitro* forneceu dados para inferir sobre o potencial efeito de ALA



sobre a ativação de micróglia. Os resultados mostraram que ALA 20 mg/kg e 40 mg/kg diminuiu o tamanho do infarto, o edema cerebral e os déficits neurológicos. Além disso, ALA induziu a polarização da micróglia ao fenótipo M2, modulou a expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 e atenuou a ativação de NF-Kb, sugerindo que ALA tem efeito benéfico no AVC experimental via modulação da polarização da micróglia M1/M2, sendo o potencial mecanismo de ALA a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B (WANG et al. 2018).

A população celular composta por astrócitos exibe perfil de ativação diferente e resulta em funções distintas. Assim, dependendo do contexto de sua ativação, estas células podem atuar na sobrevivência e regeneração neuronal de um modo protetor ou impeditivo. As principais alterações reativas dos astrócitos *in vivo* são a regulação positiva de GFAP. Paralelamente, o papel da micróglia ativada em processos astrogliais após lesão cerebral deve ser considerado, já que a micróglia em seu estado ativado pode suportar o início da astrogliose, mas pode retardar ou reduzir a formação de cicatriz glial subsequente (RÖHL et al. 2007). Pekny et al. (2007) demonstraram um efeito neuroprotetor de astrócitos reativos no neurotrauma em um estágio inicial; em um estágio posterior, visto que estas células facilitam a formação de cicatrizes gliais pós-traumáticas e inibem a regeneração do SNC. Eskes et al (2003) relatam que a micróglia reage precocemente a uma agressão neurotóxica. No entanto, os fatores extrínsecos e as interações célula-célula que levam à ativação microglial e, conseqüentemente a um resultado neuroprotetor ou neurodegenerativo, ainda precisam ser elucidados. Nossos resultados com o perfil distinto de ALA sobre estas populações celulares evidenciam a existência de fatores relacionados à interação de ALA como modulador ou ativador direto em vias de sinalização que culminam na ativação de micróglia e redução de atividade astrocitária. Todavia, estes mecanismos carecem de investigações aprofundadas para melhor compreensão dos efeitos de ALA sobre o controle da neuroinflamação.

Além da ativação microglial e astrocitária, no contexto da neuroinflamação e atividade anti-inflamatória, foram quantificadas as citocinas de IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-4, bem como níveis de BDNF no hipocampo. Nossos resultados mostraram que o tratamento com DDS 40mg/kg aumentou a produção de IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-4 no hipocampo, e reduziu a expressão de BDNF em relação aos animais sem tratamento. Por outro lado, o tratamento com ALA (25 mg/kg) reduziu a expressão da citocina inflamatória IL-1 $\beta$

e aumentou os níveis de BDNF no hipocampo, mas não alterou a produção da citocina anti-inflamatória IL-4 e nem da citocina inflamatória IL-17. Esses dados mostram claramente que a DDS induziu neuroinflamação no hipocampo, e levou ao estresse oxidativo nesse tecido, que pode ocasionar ansiedade e depressão por interferir negativamente nas vias de sinalização de BDNF. Níveis reduzidos deste fator no grupo DDS indicam que vias de expressão ou mesmo sobre a transcrição podem estar comprometidas por efeito de DDS. Por outro lado, o pós-tratamento com ALA na dose 25 mg/kg mostrou relativo aumento da expressão de BDNF, possibilitando inferir que ALA atua na indução da expressão, direta ou indiretamente.

Li et al (2014) relataram o perfil inflamatório da microglia em camundongos com diferentes características de ansiedade e encontraram alto perfil de ansiedade em camundongos DBA/2J naíve e significativa polarização M1 microglial. Além disso, os camundongos expressaram níveis mais elevados de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no hipotálamo antes e depois da estimulação com LPS. Em modelos de toxicidade induzida por DDS *in vitro*, a presença de citocinas pró-inflamatórias aumentou a toxicidade de DDS e DDS-NOH, através da redução no conteúdo de GSH. De fato, foram avaliados os efeitos do pre-tratamento com TNF- $\alpha$  nos níveis de GSH e ERO e se observou uma diminuição significativa na GSH após 24h, enquanto que a formação de ERO foi aumentada na presença de DDS-NOH. Khan et al (2006). Portanto, é provável, que a DDS e seus metabólitos possam causar neuroinflamação e neurotoxicidade, assim como estresse oxidativo no SNC, atuando por formas sinérgicas ou antagônicas em resposta ou estímulos a produção e efeito de citocinas. Além disso, estudos adicionais devem ser aplicados neste modelo de neurotoxicidade induzida por DDS na presença de ALA para melhor compreensão das interações presentes nesta associação e quais possíveis mecanismos estão envolvidos nas respostas inflamatória e anti-inflamatória.

ALA usando neste modelo de tratamento com esquema pós-indução de toxicidade mostrou ação anti-inflamatória e antioxidante, através da redução de IL-1 $\beta$ , mas de IL-4, assim como aumentou os níveis de BDNF, levando a diminuição da neurotoxicidade induzida por DDS. De acordo com Dinicolas et al (2017b), as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do ALA são exercidas através da modulação do NF- $\kappa$ B, que reflete sobre a expressão de diferentes citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 $\beta$  e IL-6; e mostraram que a hipermetilação do DNA de IL-

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

Outro possível mecanismo associado ao efeito de ALA reside na redução da permeabilidade da BHE e dos níveis de TNF- $\alpha$ , assim como os níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo e no córtex pré-frontal. Assim, ALA diminui a neuroinflamação pela redução dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , bem como aumenta a atividade antioxidante nas estruturas cerebrais agudamente após a indução da sepse. (GIUSTINA et al. 2017). Em modelos animais de encefalomielite autoimune experimental (EAE) para avaliação da atividade anti-inflamatória de ALA, Li et al (2018), demonstraram que ALA reduz os níveis de MDA, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , e aumenta SOD e células Treg (Células T regulatórias), o que mostra que, além da redução do estresse oxidativo, o ALA apresenta propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras na EAE. Assim, as possibilidades de aplicação de ALA são vastas, não somente em hanseníase ou outras doenças cujo tratamento é baseado em fármacos oxidantes, mas também em condições de processos inflamatórios crônicos e agravos de saúde associados ao estresse oxidativo e inflamação, como é o caso de doenças neurodegenerativas.

Desse modo, o possível uso terapêutico de ALA depende basicamente das suas propriedades antioxidantes para remover ou prevenir a formação de ERO, e de suas propriedades quelantes, para remover as quantidades excessivas de ferro de regiões cerebrais específicas mais vulneráveis, como o hipocampo. Assim, o ALA deve essencialmente ser capaz de penetrar as membranas celulares, bem como na BHE, para combater as ERO geradas durante o estresse oxidativo, atingindo regiões com acúmulo de ferro, sem reduzir o ferro ligado à transferrina plasmática, e ser capaz de remover o ferro quelável do local de acúmulo ou transferi-lo para outras proteínas biológicas, tais como transferrina circulante. Por tudo isso, acreditamos que o ALA é uma alternativa terapêutica útil e promissora para o tratamento de doenças e agravos relacionados ao aumento do estresse oxidativo, assim como da inflamação, especialmente em regiões do SNC como o hipocampo, em indivíduos em uso crônico de DDS, diminuindo as reações adversas e aumentando a adesão ao tratamento.

## 7. CONCLUSÕES

A partir deste modelo experimental, podemos concluir que:

- O tratamento com DDS reduziu a capacidade antioxidante (TEAC), SOD e CAT no hipocampo, assim como também diminuiu as concentrações de GSH neste tecido. O tratamento com ALA em todas as concentrações aumentou ou reestabeleceu os níveis de TEAC, GSH, SOD e CAT após o tratamento com DDS;
- DDS aumentou as concentrações de TBARS e de ferro no hipocampo dos camundongos. O tratamento com o ALA reduziu os níveis de TBARS e ferro induzidos pelo DDS no hipocampo;
- DDS também promoveu o influxo microglial e astrocitário no hipocampo, e induziu a produção de IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-4, e reduziu BDNF neste tecido. No entanto, o pós-tratamento com ALA estimulou a ativação macrofágica e inibiu a reatividade de astrócitos, assim como inibiu a produção de IL-1 $\beta$  e aumentou BDNF no tecido hipocampal.

## 8. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*;v. 105, p. 121-126, 1984.
- AMUKOYE, E. et al. Chlorproguanil-Dapsone: Effective Treatment for Uncomplicated *Falciparum* Malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 41, n. 10, p. 2261-2264, 1997.
- ANNIGERI, S. R.; METGUD, S. C.; PATIL, J. R. Lepromatous leprosy of histoid type. *Indian J. Med. Microbiol.*, v. 25, p.70–71, 2007.
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.*, v. 32, p. 279-312, 1987.
- 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.
- BHATTACHARYYA, S.; DARBY, R.; BERKOWITZ, A.L.; Antibiotic-Induced Neurotoxicity *Curr Infect Dis Rep* 2014 16:448
- 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.
- BILSKA, A.; WLODEK, L. Lipoic acid- the drug of the future?. *Pharmacological Reports.*, v. 57, p. 570-577, 2005.
- BILSKA, A.; WLODEK, L. *Pharmacol. Rep.* 2005, v. 57, p. 570.
- 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.
- BOVOLENTA, Roberta et al. Hippocampal FGF-2 and BDNF overexpression attenuates epileptogenesis-associated neuroinflammation and reduces spontaneous recurrent seizures. *Journal of neuroinflammation*, v. 7, n. 1, p. 81, 2010.
- BRASIL. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica., 2002.
- BRASIL. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília : Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 6. ed. rev. – Ministério da Saúde, 2005. 320 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2008. Acesso em 14/06/2011.

BRASIL, Programa Nacional de Controle de hanseníase. Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde., 2008.

BUKOWSKA, B.E; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters.*, v. 158, p73-84, 2004.

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

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

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

CONSTANTINESCU, A.; TRITSCHLER, H.; PACKER, L. Alpha-lipoic acid protects against hemolysis of human erythrocytes induced by peroxy radicals. *Biochemistry & Molecular Biology International.*, v.33, p. 669-679, 1994.

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

CURRY, S. Methemoglobinemia. *Ann. Emerg. Med.* v. 11, p. 214–221, 1982.

EGAÑA, J. T.; et al Iron-induced oxidative stress modify tau phosphorylation patterns in hippocampal cell cultures *BioMetals* 16: 215–223, 2003

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.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 82, n. 1, p. 70-7, May 1959.

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

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos doenças relacionadas. *Revista da associação médica brasileira.* v.43, n. 1, p. 61-68, 1997.

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

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, v.105, p.114-21, 1984.

GAO et al; Brain Iron Deposition And Body Iron Level In Mci MOLECULAR MEDICINE REPORTS 16: 8209-8215, 2017

GATTI, G.; et al; Penetration of dapsone into cerebrospinal fluid of patients with AIDS Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1997) 40, 113–115

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. Mcgraw-Hill, 10ed, 2003

GOODWIN, J.; MURPHY, B.; GUILLEMETTE, M.; Clin Chem. 1966; 12:47

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.

GRANGER, D. L.; HIBBS, J. B.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Metabolic fate of Larginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. J Clin Invest. v. 85, n. 1, p. 264-273, 1999.

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

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

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactivities species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. British Journal of Pharmacology, v.142, n. 2, p.231-255, 2004.

HALL, A. H.; KULIG, K. W.; RUMACK, B. H. Drug- and chemical-induced methaemoglobinaemia. Clinical features and management. Med. Toxicol., v. 1, p. 253–260, 1986.

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

HEGESH, E.; GRUENER, R.N.; COHEN, S.; BOCHKOVSKY, R.; SHUVAL, H.I. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. Clinica Chimica Acta, v.30, n.3, p. 679- 82, Dec. 1970.

JOPLING, W. H. References to “side-effects of antileprosy drugs in common use”. Leprosy Review., v. 56, p. 61-70, 1985.

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

KWADIJK, S.; TORAÑO, J. S. High-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of dapsone and its hydroxylated metabolite in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, v. 16, p. 203–208, 2002.

LANDERS, D.; BERGIN, C.; O'LEARY, A.; MERRY, C.; KEATING, S.; MULCAHY, F. Dapsone induced methaemoglobinaemia. *Int. J. STD AIDS*, v.7, n.6, p.445-447, 1996.

LIU, Y.; et al. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 56. 2017. 219–224

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

LEXIS, L. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S.  $\alpha$ -Tocopherol and  $\alpha$ -Lipoic Acid Enhance the Erythrocyte Antioxidant Defence in Cyclosporine A-Treated Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.*, v. 98, p. 68–73, 2006.

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

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

McCARTY, M.; JAMES, Q. DEL ROSSO; How Clinically Relevant is Dapsone-related Peripheral Neuropathy? An Overview of Available Data with Emphasis on Clinical Recognition. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology.* Vol. 3; N.3; 2010.

MILLER, J. A. et al.; Neuropathological and transcriptomic characteristics of the aged brain. *Neuroscience* 2017; 6: e 31126

MITRA AK, THUMMEL KE, KALHORN TF, KHARASCH ED, UNADKAT JD, SLATTERY JT. Metabolism of dapsone to its hydroxylamine by CYP2E1 *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.58, p.556–566, 1995.

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

O'DONOHUE JR., W. J.; MOSS, L. M.; ANGELILLO, V. A. Acute methemoglobinemia induced by topical benzocaine and lidocaine. *Arch. Intern. Med.*, v. 140, p. 1508–1509, 1980.

ONROY, J. M.; BAKER, J. D.; MARTIN, W. J.; BAILEY, M. K.; DORMAN, B. H. Acquired methemoglobinemia from multiple oxidants. *Southern Med Journ.*, v. 86, n.10, p. 1156-1159, 1995.



PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. *Free Radical Biol. Med.* 1995, v. 19, p. 227.

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

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

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

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

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, p. 391–397, 2007.

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

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

REHMAN, H. U. Methemoglobinemia. *Ewj.m.*, 2001. v. 175, p. 193-196.

RIEDER, F.R. Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia. In: WYNGAARDEN, J.B., SMITH Jr., L.H., *Cecil textbook of medicine*. 17. ed. Philadelphia: Saunders, 1985. p.934-935.

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.

ROSEN, P. J.; JOHNSON, C.; MCGEHEE, W. G.; BEUTLER, E. Failure of methylene blue treatment in toxic methemoglobinemia. *Ann. Intern. Med.*, v. 75, p. 83–86, 1971.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J. & SAURA-CALIXTO, F. D. (2007). Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado técnico, Embrapa Agroindústria Tropical, 1-4.

SADEGHI, A.; et al. The Effect of Diabetes Mellitus on Apoptosis in Hippocampus: Cellular and Molecular Aspects *International Journal of Preventive Medicine* 2016;7:57

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

SÁNCHEZ- SALDAÑA, L. Medicamentos antiguos y vigentes en dermatología. *Dermatología Peruana*, v.18, n.3, p. 229-26, Jul./Set. 2008.

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

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*. v. 91; n.3C, p. 31S-38S, 1991.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid insaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, v. 140, p. 569-576, 1994.

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

TEICHERT, J.; TUEMMERS, T.; ACHENBACH, H.; PREISSE, C.; HERMANN, R.; RUUS, P.; PREISSE, R. Pharmacokinetics of alfa-lipoic acid in subjects with kidney damage and end-stage renal disease. *J.Clin. Pharmacol.*, v.35, p.313-328, 2005.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*. v. 27, n.3 p. 502-22, 1969.

TINGLE, M. D.; COLEMAN, M. D.; PARK, B. K. An investigation of the role of metabolites in dapsone-induced methaemoglobinaemia using a two compartment *in vitro* test system. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 30, p. 829-838, 1990.

UEHLEKE, H.; TABARELLI, S. N-hydroxylation of 4,4'-diaminodiphenylsul-phone (Dapsone) by liver microsomes, and in dogs and humans. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, v. 278, p. 55–68, 1973.

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

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

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

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

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

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

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

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

WOZEL, V.E.G.; Innovative Use of Dapsone. *Dermatol Clin* 28. 2010 599–610

WOZEL, V.E.G.; BLASUM, C.; Dapsone in dermatology and beyond. *Arch Dermatol Res* 2014 306:103–124

WRIGHT, R.O.; MAGNANI, B.; SHANNON, M. W.; WOOLF, A. D. N-Acetylcysteine reduces methemoglobin *in vitro*. *Ann. Emerg. Med.*, v. 28, p. 499-503, 1996.

YANG, J.J. ; LIN, N. ; LV, R. ; SUN, J.; ZHAO, F.; ZHANG, J.; XU, J. G. Methemoglobinemia misdiagnosed as ruptured ectopic pregnancy. *Acta Anaesthesiol Scand*, v. 49, p.586-588, 2005.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews.*, v.74, n.1, p.139-162, 1994

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

## ANEXOS



**UFPA**  
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

## CERTIFICADO

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

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

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

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

Origem: **Biotério Central ICB/UFPA**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 6 semanas**

N: **105**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

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

Belé, 28 de outubro de 2017

*M<sup>a</sup> Viviana B. Monteiro*

Profa. Dra. Maria Viviana Barros Monteiro

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

*Vanessa J. de Mello*

Profa. Dra. Vanessa J. de Mello

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará