



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

**EFEITOS DO QUELANTE DE FERRO, A DEFEROXAMINA,
SOBRE AS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E COGNITIVAS
INDUZIDAS PELA DAPSONA, EM MODELO ANIMAL**

Paulo Fernando Santos Mendes

Belém - PA
2020



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

**EFEITOS DO QUELANTE DE FERRO, A DEFEROXAMINA,
SOBRE AS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E COGNITIVAS
INDUZIDAS PELA DAPSONA, EM MODELO ANIMAL**

Paulo Fernando Santos Mendes

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (PPGCF-UFPA) como requisito para a obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas.

Área de concentração: fármacos e medicamentos

Linha de pesquisa: Avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos.

Orientadora: Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Belém - PA
2020

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)

- M538e Mendes, Paulo Fernando Santos
EFEITOS DO QUELANTE DE FERRO, A
DEFEROXAMINA, SOBRE AS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS
E COGNITIVAS INDUZIDAS PELA DAPSONA, EM
MODELO ANIMAL / Paulo Fernando Santos Mendes. —
2020.
XVIII, 81 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^ª. Dra. Marta Chagas Monteiro
Coorientação: Prof^ª. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz
Maia
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2020.
1. Deferoxamina. 2. Dapsona. 3. Hipocampo. 4.
Estresse oxidativo. 5. Ferro. I. Título.

CDD 615.1

PAULO FERNANDO SANTOS MENDES

**EFEITOS DO QUELANTE DE FERRO, A DEFEROXAMINA,
SOBRE AS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E COGNITIVAS
INDUZIDAS PELA 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.^a Dr.^a Marta Chagas Monteiro, PPGCF/UFPA (Orientadora)

Prof. Dr. José Luís Soares Vieira, PPGCF/UFPA

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima, PPGCF/UFPA

DEDICATÓRIA

A minha FAMÍLIA, que durante a execução desta jornada foi minha “mola propulsora” e fonte de motivação, em especial nos momentos de maior dificuldade.

Agradecimentos

A Deus, por me permitir este momento;

Nenhuma obra, particularmente uma dissertação de mestrado, pode ser levada a bom termo sem apoios pessoais e institucionais. De ambos me beneficieei e, por isto, não poderia deixar de os registrar aqui;

A minha família que tem sido meu pilar de sustentação, pelo apoio e incentivo nos momentos de maior dificuldade enfrentado no decorrer deste ciclo;

A professora Dra. Marta Chagas Monteiro pela dedicação na orientação deste trabalho e principalmente por ter oportunizado o acesso ao LABEIM, o que me permitiu a realização deste projeto.

A professora Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia pela dedicação na orientação deste trabalho. Assim como, pelas palavras de motivação quando este trabalho ainda estava em fase de projeto.

Ao Professor Dr. Sandro Percário por todo auxílio e contribuição a este trabalho.

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêutica pelo suporte técnico-científico no decorrer deste projeto.

Aos amigos do LAPEO por todo o auxílio na execução da fase experimental, em especial as colegas Thuany Peres, Camila Rodrigues e Rafael Quadros.

Aos amigos Bruno Alexandre Quadros Gomes, Everton Luiz Pompeu Varela e Joni Tetsou Sakai por todo incentivo e parceria desde o planejamento deste trabalho, fatores que contribuíram de forma significativa para a minha reinserção ao mundo acadêmico.

Ao Instituto Evandro Chagas que nos forneceu os camundongos para a realização dos experimentos.

Por todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste trabalho.

“Cada sonho que você deixa pra trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”.

Steve Jobs

RESUMO

MENDES, P. F. S. **Efeitos do quelante de ferro, a deferoxamina, sobre as alterações oxidativas e cognitivas induzidas pela dapsona, em modelo animal.** 81f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

A dapsona (DDS) é um antibiótico que atua inibindo a síntese do folato, apresentando boa ação bacteriostática. No entanto, pode acarretar eventos adversos severos como distúrbios neurológicos, metemoglobinemia e hemólise. Estes distúrbios hematológicos levam a alteração da homeostasia do ferro e com isto aumenta a formação de ERO's que podem levar a um dano celular e tecidual. Esta alteração apresenta um papel importante nas doenças neurodegenerativas, seja como um agente causador e/ou intensificador nessas doenças. Neste contexto, fizemos uso de um quelante de ferro, a deferoxamina (DFX), para avaliar seus efeitos na formação de ERO desencadeadas pelo aumento no ferro livre induzido pelo uso de DDS. Para isto, foi induzido a alteração da homeostasia do ferro, em camundongos Swiss, fazendo-se uso de DDS, seguido de administração de DFX. Após isto, foi realizado a dosagem de parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo e no plasma, além da dosagem dos níveis de ferro. Nossos resultados mostraram que a DDS diminuiu a TEAC e que o tratamento com DFX restabeleceu. Além disso, a DDS diminuiu a GSH e o tratamento com DFX restabeleceu. Aumentou a LPO e o tratamento com DFX reduziu este efeito, aumentou a concentração de ferro e que foi revertido pelo tratamento com DFX. Adicionalmente, os animais foram submetidos ao labirinto aquático de Morris, onde nossos resultados mostraram que os animais tratados com DDS apresentaram uma redução na capacidade mnemônica e que o tratamento com DFX foi capaz de inibir a perda. Estes resultados sugerem que o uso de quelantes de ferro podem ser uma alternativa para reduzir os efeitos de acúmulo de ferro no sistema nervoso observados nas doenças neurodegenerativas.

Palavra-chave: deferoxamina, dapsona, hipocampo, estresse oxidativo, ferro

ABSTRACT

MENDES, P. F. S. **Effects of the iron chelator, deferoxamine, on oxidative and cognitive changes induced by dapsone, in an animal model.** 81f. Dissertation (Master's) - Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2020.

Dapsone (DDS) is an antibiotic that works by inhibiting folate synthesis, showing good bacteriostatic action. However, it can lead to severe adverse events such as neurological disorders, methemoglobinemia and hemolysis. These hematological disorders lead to the alteration of iron homeostasis and thereby increase the formation of ROS that can lead to cellular and tissue damage. This change plays an important role in neurodegenerative diseases, whether as a causative and / or intensifying agent in these diseases. In this context, we used an iron chelator, deferoxamine (DFX), to evaluate its effects on the formation of ROS triggered by the increase in free iron induced by the use of DDS. For this, the alteration of iron homeostasis was induced in Swiss mice, using DDS, followed by the administration of DFX. After that, oxidative stress parameters were measured in the hippocampus and plasma, in addition to the measurement of iron levels. Our results showed that DDS decreased TEAC and that DFX treatment was restored. In addition, DDS decreased GSH and DFX treatment was restored. It increased the LPO and the treatment with DFX reduced this effect, increased the concentration of iron and that was reversed by the treatment with DFX. Additionally, the animals were submitted to the Morris water maze, where our results showed that animals treated with DDS showed a reduction in mnemonic capacity and that treatment with DFX was able to inhibit loss. These results suggest that the use of iron chelators may be an alternative to reduce the effects of iron accumulation on the nervous system observed in neurodegenerative diseases.

Keyword: Deferoxamine, Dapsone, Hippocampus, Oxidative Stress, Iron

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estrutura química da Dapsona.
- Figura 2** Mecanismo de ação da DDS.
- Figura 3** Esquemática dos mecanismos de biotransformação da Dapsona.
- Figura 4** A absorção do ferro heme nos enterócitos, mediada pela Proteína transportadora do Heme-1 (HCP-1) e do ferro não heme, mediada pela proteína transportadora de metal divalente (DMT1).
- Figura 5** Metabolismo do ferro cerebral.
- Figura 6** Acúmulo de ferro cerebral com o envelhecimento.
- Figura 7** Equação de Fenton.
- Figura 8** Estrutura química da deferoxamina
- Figura 9** Representação esquemática da grupos e de tratamento
- Figura 10** Representação esquemática da divisão de grupos e vias de administração dos fármacos.
- Figura 11** Representação esquemática do teste Labirinto Aquático de Morris.
- Figura 12** Representação esquemática da coleta de material biológico por grupo experimental.
- Figura 13** Representação esquemática da determinação do percentual de Metemoglobina (MetHb).
- Figura 14** Representação esquemática da determinação da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC).
- Figura 15** Representação Esquemática da Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).
- Figura 16** Representação esquemática de determinação da atividade da glutatona reduzida (GSH).
- Figura 17** Representação esquemática da determinação das concentrações de ferro.

- Figura 18** Efeito do tratamento com DFX sobre o percentual de metemoglobina em animais tratados com DDS.
- Figura 19** **(a)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de Ferro plasmático de animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de LPO no plasma de animais tratados com DDS.
- Figura 20** **(a)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis GSH no plasma de animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de TEAC no plasma de animais tratados com DDS.
- Figura 21** **(a)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de ferro no hipocampo de animais tratados por 10 dias. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de LPO no hipocampo de animais tratados com DDS.
- Figura 22** **Figura 22 (a)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de GSH no hipocampo de animais tratados por 10 dias. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de TEAC no hipocampo de animais tratados com DDS
- Figura 23** Efeito do tratamento com DFX sobre a Latência em segundos durante a fase de treino em animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS.
- Figura 24** **(a)** Efeito do tratamento com DFX sobre o tempo no quadrante alvo (Q IV) de animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre a latência de primeira entrada no quadrante alvo de animais tratados com DDS. **(c)** Efeito do tratamento com DFX sobre a velocidade média de nado de animais tratados com DDS.
- Figura 25** **(a)** Efeito do tratamento com DFX sobre o tempo no quadrante alvo (Q IV) de animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre a latência de primeira entrada no quadrante alvo de animais tratados com DDS. **(c)** Efeito do tratamento com DFX sobre a velocidade média de nado de animais tratados com DDS.

Figura 26 Mecanismo de oxidação de hemoglobina por ação de dapsona hidroxilamina

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Demonstração de cálculo de extrapolação alométrica de dose da DDS.
- Quadro 2** Esquematização de grupos e esquemas de tratamentos.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato]
ATP	Adenosina trifosfato
BVEC	Células endoteliais vasculares cerebrais
BHE	Barreira hematoencefálica
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFZ	Clofazemina
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DA	Doença de Alzheimer
DDS	Dapsona
DDS-NOH	Dapsona hidroxilamina
DDS-NO	Dapsona nitroso
DFX	Deferoxamina
DTNB	Ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
Dcytb	Citocromo redutase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FACFAR	Faculdade de Farmácia
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
Fpn	Ferroportina
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GSH	Gluttiona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HHE	4- hidroxí-2-hexenal
HNE	4-hidroxinonenal
Hb	Hemoglobina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Hepc	Hepcidina
IEC	Instituto Evandro Chagas
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potássio

K ₃ Fe(CN) ₆	Ferricianeto de potássio
KCN	Cianeto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potássio
LPO	Peroxidação lipídica
MADDS	Monoacetil-dapsona
MADDS-NOH	Monoacetildapsona hidroxilamina
MDA	Malondialdeído
MetHb	Metemoglobina
MetHba	Metemoglobinemia
MS	Ministério da Saúde
MWM	Labirinto aquático de Morris (Morris Water Maze)
NADH-MR	NADH metemoglobina redutase
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NAT	n-acetiltransferase
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito
NO ₃	Nitrato
O ^{2•-}	Ânion radical superóxido
OH•	Íon hidroxila
OH•	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PQT	Poliqumioterapia
RMP	Rifampicina
RPM	Rotações por minuto
SINAN	Sistema de Informação e Agravo de Notificação
SO ₂	Grupo sulfeto
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox
Tf	Transferrina
Tf-Fe ³⁺	Complexo ferro transferrina
TfR	Receptor de transferrina
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
Triton X-100	t-Octylphenoxyethoxyethanol
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 Dapsona e seus metabolitos	9
2.2 O metabolismo do ferro (Homeostasia do ferro)	12
2.3 Ferro e o estresse oxidativo	16
2.4 Quelantes de ferro e doenças neurodegenerativas	18
2.4.1 DEFEROXAMINA	19
2.5 Neurotoxicidade e Neuroinflamação induzida por DDS	20
2.6 Hipocampo e processo de formação de memória	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivos gerais	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS:	25
4.1 Animais e procedência	25
4.2 Doses e preparo de soluções	25
4.2.1 EXTRAPOLAÇÃO ALOMÉTRICA DE DOSE.....	25
4.2.2 SOLUÇÃO DE DAPSONA A 4MG/ML.....	27
4.2.3 SOLUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO	27
4.2.4 SOLUÇÃO DE DEFEROXAMINA 4MG/ML	27
4.3 Grupos experimentais e regime de tratamentos	28
4.4 Teste do comportamento	29
4.4.1 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (MORRIS WATER MAZE)	30
4.5 Coleta de amostra	32
4.5.1 COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE DE PARAMETROS OXIDATIVOS NO SANGUE E NO HIPOCAMPO.	33
4.5.2 DESCARTE DE MATERIAL BIOLÓGICO	33
4.6 Análises parâmetros bioquímicos e oxidativos.	33
4.6.1 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE METEMOGLOBINA.....	33
4.6.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EQUIVALENTE AO TROLOX (TEAC)	35
4.6.3 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)	36
4.6.4 DETERMINAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA	37
4.6.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FERRO.....	38

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 Metemoglobina e parâmetros oxidativos sanguíneos.....	41
6.1.1 METEMOGLOBINA.....	41
6.1.2 FERRO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	41
6.1.3 NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES.....	42
6.2 Parâmetros oxidativos no hipocampo.....	43
6.2.1 FERRO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	43
6.2.2 NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES.....	44
6.3 Análise de parâmetros cognitivos em modelo de Labirinto aquático de Morris.....	45
6.3.1 AVALIAÇÃO DE APRENDIZADO (LATÊNCIA - FASE DE TREINO).....	45
6.3.2 MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO.....	46
6.3.3 MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO.....	48
7 DISCUSSÃO.....	51
8 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	69
A - Certificado da comissão de ética no uso de animais.....	69

1 INTRODUÇÃO

A dapsona é um antibiótico sintético da família da sulfonas que apresenta também boa atividade anti-inflamatória. É um dos fármacos mais importantes na poliquimioterapia da Hanseníase, apresenta ação bacteriostática por inibir a síntese do folato no *Mycobacterium leprae*. Além disto, a dapsona pode ser utilizada no tratamento de diversas condições clínicas. Particularmente no pioderma gangrenoso, dermatite herpetiforme, no tratamento da pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* em pacientes portadores de HIV, lúpus eritematoso sistêmico bolhoso e úlceras aftosas graves (DHOPLE, 1999; BURKE *et al.*, 2013; WHO, 2017; BARROS *et al.*, 2020).

A dapsona é um fármaco com grande potencial oxidante mesmo em doses terapêuticas, seu metabolismo ocorre principalmente no fígado, gerando por N-hidroxilação, os seguintes metabolitos monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH) e dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH), intermediários altamente reativos e citotóxicos (VEGGI *et al.*, 2008). Estes metabolitos provocam alteração na homeostasia, através da indução do estresse oxidativo por meio de desbalanço nas reações de oxirredução e desregulação no metabolismo do ferro, levando ao aumento na formação espécies reativas de oxigênio (ERO, ELLARD *et al.*, 1972; VAGE *et al.*, 1994; BRADSHAW *et al.*, 1995; SCHIFF *et al.*, 2006).

O ferro é essencial em diversos processos biológicos fundamentais no sistema nervoso central (SNC), incluindo transporte de oxigênio, síntese de DNA, respiração mitocondrial, síntese de mielina, síntese e metabolismo de neurotransmissores (MENG *et al.*, 2017; URANGA e SALVADOR, 2018; SINGH *et al.*, 2019). No entanto, a sobrecarga deste mineral pode induzir neurotoxicidade por aumentar a produção de radicais livres, levando ao estresse oxidativo e a reações inflamatórias (KRUSZEWSKI, 2003; HENTZE *et al.*, 2010; WANG e PANTOPOULOS, 2011; YAN *et al.*, 2018).

Neste sentido, evidências experimentais demonstrara alterações comportamentais associado a sobrecarga de ferro. A barreira hematoencefálica (BHE) regula a entrada de ferro no SNC. A pesar deste mecanismo de defesa, se a sobrecarga persistir por um período prolongado pode ocasionar danos na BHE e com isto aumentar a entrada de ferro no SNC, e por consequência o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO; HAN e KIM, 2015).

O acúmulo de ferro em regiões como o hipocampo tem sido estudado no intuito de elucidar os mecanismos relacionados ao dano provocado pelo aumento das concentrações deste metal no SNC, um destes mecanismos aponta a ligação do íon férrico em regiões específicas da proteína Tau em neurônios, que pode levar a fosforilação desta proteína e seu conseqüente acúmulo, gerando os emaranhados neurofibrilares. Esta reação em cadeia está relacionada com a fisiopatologia da doença de Alzheimer (GAO *et al.*, 2017). Além disto, o ferro livre pode induzir danos oxidativos, via reação de Fenton, com geração de radical hidroxila (OH[•]), o que leva a formação de peróxido lipídico podendo desencadear toxicidade celular, com conseqüente indução de apoptose ou ferroptose (EGAÑA *et al.*, 2003; WARD *et al.*, 2014; LEE e LEE, 2019).

Recentemente, mostrou-se associação entre a desregulação de ferro, indução de estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas. Dentre estas, Alzheimer e Parkinson (HAN e KIM, 2015; GAO *et al.*, 2017; LEE e LEE, 2019). O ferro quando em níveis elevados pode se acumular no SNC, devido a saturação das ligações em proteínas reguladoras, como neuromelanina e ferritina, que leva ao acúmulo de ferro livre e ocasiona eventos tóxicos, principalmente em neurônios (WARD *et al.*, 2014; LEE e LEE, 2019; SINGH *et al.*, 2019). Antioxidantes celulares como glutatona reduzida (GSH) e superóxido dismutase (SOD) são produzidos para limitar este dano. No entanto, estes antioxidantes possuem eficácia limitada para neutralizar determinada quantidade de radicais livres (WELCH *et al.*, 2002; GAASCH *et al.*, 2007).

Durante o envelhecimento, complexos de ferro podem ser formados e se acumular em regiões específicas do cérebro e com isto podem desencadear comprometimento motor, cognitivo e no comportamento (MILLS *et al.*, 2010; KOSKENKORVA-FRANK *et al.*, 2013; WARD *et al.*, 2014, HAN e KIM, 2015). Por isto, torna-se necessário compreender o papel do ferro neste contexto, se o acúmulo deste metal pode ser é um evento inicial que leva a morte neuronal e/ou uma conseqüência da morte neuronal relacionadas a progressão das doenças neurodegenerativas. Bem como, se este acúmulo pode estar relacionado com alterações na homeostasia do ferro, neuroinflamação e aumento da permeabilidade da BHE (DE LIMA *et al.*, 2007; MILLS *et al.*, 2010; HAN e KIM, 2015; LEE e LEE, 2019). Neste contexto, este estudo tem o objetivo de avaliar os efeitos do tratamento com DFX, um quelante de ferro, após a alteração da homeostasia do ferro induzida por dapsona.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dapsona e seus metabolitos

A dapsona é um dos fármacos utilizados na poliquimioterapia para o tratamento da Hanseníase padronizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e tem sido considerada a principal estratégia para o interromper a cadeia de transmissão do *Micobacterium Leprae* (WHO, 2017). Este fármaco é responsável pelo desencadeamento de reações adversas mais severas no tratamento da Hanseníase, tais como metemoglobinemia (MetHba) e anemia hemolítica (RIMOLI, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2014; LEE e GEETHA, 2015). Além disto, alguns estudos tem descrito que a DDS e seus metabólitos podem estar associados a alterações da homeostase do ferro e com isto levar a disfunção mitocondrial e estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias o que podem induzir a neuroinflamação (PILONI *et al.*, 2013; URRUTIA *et al.*, 2014).

A dapsona (4,4'-diaminodifenil-sulfona) ou DDS, é um derivado da anilina, é estruturalmente a mais simples das sulfonas, compartilhando com estas à similaridade estrutural. Consiste em um grupo sulfeto (SO₂) ligado a dois grupamentos aminobenzeno, responsável pelas atividades farmacológicas deste fármaco, é um pó cristalino branco, inodoro, pouco solúvel em água e de fórmula molecular C₁₂H₁₂N₂O₂S (Figura 1; GRUNWALD e AMICHAJ, 1996; ZHU e STILLER, 2001; GOULART *et al.*, 2002; FARHI *et al.*, 2005; WOZEL e BLASUM, 2014).

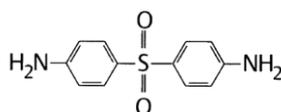


Figura 1 - Estrutura química da Dapsona - Fonte: Adapto de Wozel e Blasum, 2014.

A DDS é caracterizada por apresentar vários efeitos farmacológicos, tais como antibacteriano, antiprotzoário e anti-inflamatório (WOZEL e BLASUM, 2014). Apresenta similaridade estrutural ao ácido p-aminobenzóico (PABA) e sua ação bacteriostática é caracterizada por atuar inibindo por antagonismo competitivo com o PABA o sítio de ação da enzima diidropteroato sintetase levando desta forma a inibição da síntese de ácido dihidrofólico, produto essencial para síntese de purina e

pirimidinas e por consequência inibe a síntese de DNA e RNA, fato que justifica o grande espectro de ação deste fármaco (WOLVERTON, 1992; COLEMAN, 1993; ZHU e STILLER, 2001; GOULART *et al.*, 2002; FARHI *et al.*, 2005; ANNIGERI *et al.*, 2007; SCHALCHER *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

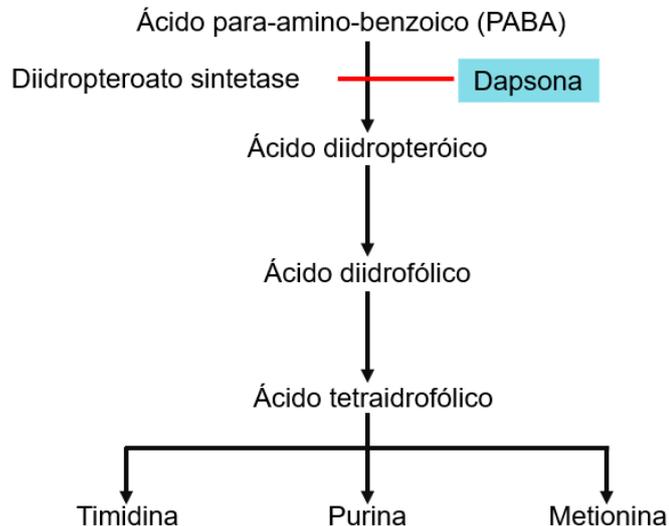


Figura 2 - Mecanismo de ação da DDS. - Fonte: Adapto de Farhi *et al.*, 2005.

A DDS é facilmente absorvida pelo trato gastrointestinal com biodisponibilidade de cerca de 80 a 85%, atinge pico máximo de concentração de 2 a 8 horas após a ingestão, a meia vida plasmática pode variar de 24 a 36 horas e os níveis séricos se estabilizam de 7 a 10 dias após o início do tratamento, liga-se facilmente as proteínas plasmáticas podendo alcançar valores superiores a 86%, é facilmente distribuída por todos os órgãos e tecidos, difunde-se através da barreira hematoencefálica, placenta e pode ser excretado no leite materno. Cerca de 70-85% do que absorvido é excretado pela urina na forma de glucoronídeos e somente cerca de 10% é excretado através da bile. (ZHU e STILLER, 2001; WOZEL e BLASUM, 2014; SCHALCHER *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Após a absorção, a DDS sofre circulação entero-hepática, sendo metabolizada no fígado e podendo ainda sofrer biotransformação por leucócitos polimorfonucleares ativados (PMN). No fígado, a DDS pode ser metabolizada por duas vias, sendo elas a acetilação por meio da n-acetiltransferase (NAT) que a converte em monoacetil-dapsona (MADDS) e pela via da hidroxilação mediada pelas enzimas do citocromo p-450 que fornecerá como produto a dapsona hidroxilamina

(DDS-NOH) e a monoacetildapsona hidroxilamina (MADDS-NOH, GILL *et al.*, 1995; WOZEL e BLASUM, 2014; SCHALCHER *et al.*, 2014).

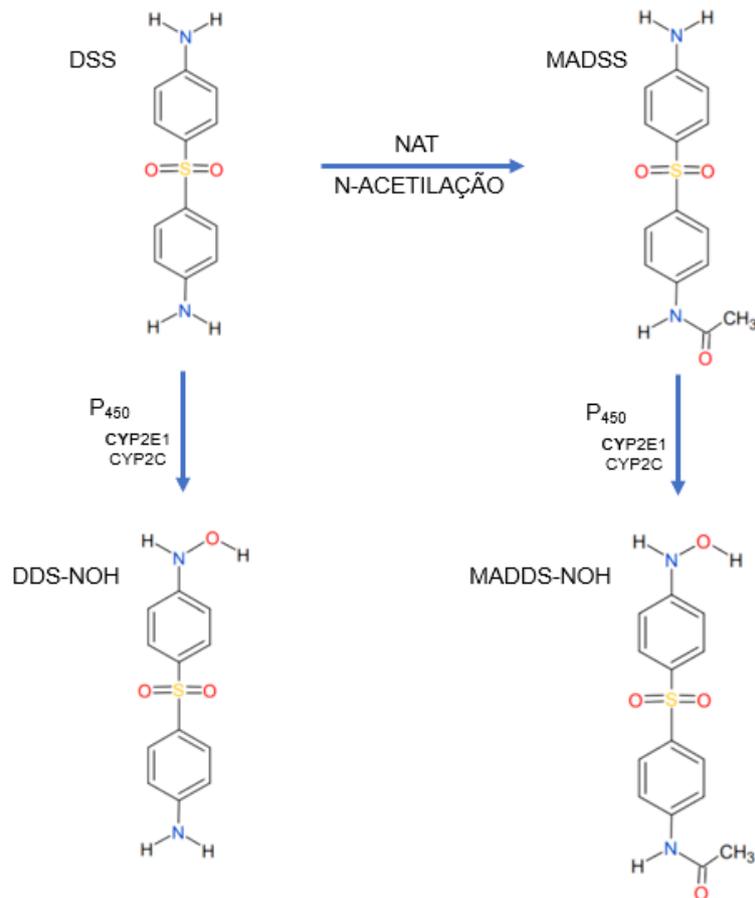


Figura 3 - Esquematização dos mecanismos de biotransformação da Dapsona. P450, citocromo P450; DDS, dapsona; DDS-NOH, dapsona-hidroxilamina; MADSS, monoacetildapsona; MADDS-NOH, monoacetildapsona-hidroxilamina; NAT, N-acetiltransferase. Fonte: Adaptado de GILL *et al.*, 1995.

Os metabólitos hidroxilados da DDS, em especial a DDS-NOH, são responsáveis pelos eventos adversos mais comuns ao uso de DDS, tais como o aumento da taxa de metemoglobina (MetHb), hemólise e mais raramente agranulocitose, estes eventos são inevitáveis podem variar apenas a intensidade destes, dependendo da dose (WOZEL e BLASUM, 2014; SCHALCHER *et al.*, 2014; LEE e GEETHA, 2015). Além disto, a DDS e seus metabólitos podem alterar a homeostase do ferro, visto que este metal pode levar a processos oxidativos via reação de Fenton e de Haber-Weiss e com isto induzir a disfunção mitocondrial ou estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a neurotoxicidade e neuroinflamação (URRUTIA *et al.*, 2014).

2.2 O metabolismo do ferro (Homeostasia do ferro)

O ferro utilizado pelo organismo é obtido através da dieta alimentar ou da reciclagem de hemácias senescentes (GROTTO, 2008). O ponto crítico para homeostase do ferro é a sua absorção no duodeno através da dieta alimentar, onde a desregulação nesse mecanismo pode levar a deficiência ou a sobrecarga deste mineral. O mecanismo de regulação ocorre com a descamação da mucosa e da pele, durante a menstruação ou outras perdas de sanguíneas. A maior parte do ferro encontra-se na hemoglobina dos eritrócitos e nas mioglobinas, enquanto o excesso armazena-se no fígado e nos macrófagos do sistema imune (SALVADOR, 2010; URANGA e SALVADOR, 2018).

O ferro pode ser absorvido por diversos mecanismos diferentes, e na forma iônica (não-heme) ou ligado ao grupo heme. Sendo este último obtido através da mioglobina da carne vermelha ou da hemoglobina, transportado através da membrana apical mediado pelo transportador de folatos acoplado a prótons (HCP1, denominada anteriormente como proteína transportador do heme-1), após ser internalizado no enterócito o ferro heme é metabolizado pela heme oxigenase-1 (HO-1) que libera o Fe^{2+} . O HCP1 atua como regulador na homeostasia, na carência de ferro a proteína se desloca do citoplasma para a membrana promovendo uma maior absorção do metal, enquanto que na sobrecarga ocorre o movimento inverso e com isto reduz a absorção (MIRET *et al.*, 2003; SHAYEGHI *et al.*, 2005; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2007; BELAIDI e BUSH, 2016; URANGA e SALVADOR, 2018).

O ferro não heme (Fe^{3+}) não é absorvido, sendo este inicialmente reduzido pela ação de redutase férrica, enzima denominada de citocromo duodenal b (Dcytb) localizado na superfície apical do enterócito, no lúmen intestinal, para em seguida ser transportado para o citoplasma através da proteína apical transmembranar dos enterócitos, a proteína transportadora de metal divalente (DMT1, MIRET *et al.*, 2003; SHAYEGHI *et al.*, 2005; GROTTO, 2008; BELAIDI e BUSH, 2016; URANGA e SALVADOR, 2018). Após absorvido, o Fe^{2+} pode ser oxidado e posteriormente complexado a ferritina (Fr) ou transportado através da membrana basolateral dos enterócitos para corrente sanguínea através da ferroportina (Fpn). Durante o efluxo o Fe^{2+} é oxidado pela hefaestina (Hef), uma enzima oxidase localizada na membrana basal do epitélio duodenal e desta forma poder ligar-se a transferrina (Tf), após ligado

a Tf o ferro permanece em sua forma não reativa, desta forma, não levando riscos aos tecidos (GROTTO, 2008; BELAIDI e BUSH, 2016; URANGA e SALVADOR, 2018).

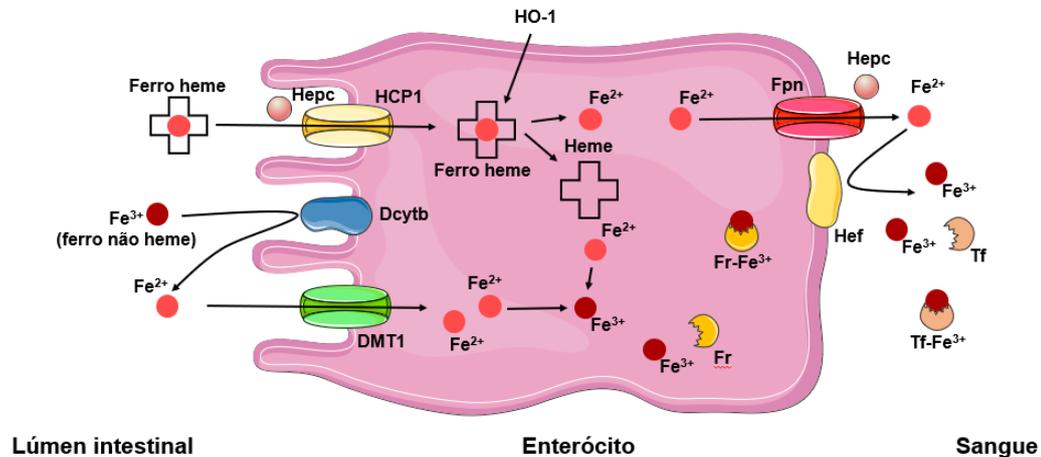


Figura 4: A absorção do ferro heme nos enterócitos, mediada pela Proteína transportadora do Heme-1 (HCP-1) e do ferro na heme, mediada pela proteína transportadora de metal divalente. Fonte: Mendes, 2020. DTM1: Transportador de metal divalente 1; Hepc: hepcidina; HCP1: transportador de folatos acoplado a prótons. Fr: ferritina; Tf: transferrina; Fr-Fe³⁺: Complexo ferro ferritina; Tf-F e³⁺: complexo ferro transferrina; Hef: Hefaestina; Fe²⁺: íon ferro ferroso; Fe³⁺: íon ferro férrico; Dcytb: citocromo redutase; HO-1: Heme oxidase.

Outro ponto de grande relevância na regulação da homeostase ferro é a hepcidina (Hepc), um hormônio peptídico produzido pelo fígado. Atua como regulador (positivo ou negativo) da captação do ferro, em estados inflamatórios e níveis elevados de ferro, a Hepc é sintetizada e liberada na circulação em maior quantidade. Quando em hipóxia, a produção de Hepc é reduzida ou até mesmo inibida (GOZZELINO e AROSIO, 2016). Na regulação positiva evita a captação e entrada de ferro no epitélio duodenal e a reciclagem deste metal ligado a proteína heme, enquanto que na regulação negativa a Hepc se liga à ferroportina promovendo a sua internalização e subsequente degradação (GROTTO, 2008).

No cérebro, a captação do ferro ocorre através da barreira hematoencefálica (BHE), o ferro ligado a transferrina (complexo Tf-Fe³⁺) é captado através do receptor de transferrina (TfR) nas células endoteliais vasculares da BHE. Os neurônios também expressam um receptor homólogo ao TfR, sendo chamado de TfR2 e estes apresentam função semelhante ao TfR, atuando desta forma na captação do Tf-Fe³⁺. Enquanto que ferro não ligado a transferrina é captado pelo DMT1. A seguir o ferro é exportado com “mediação” da Fpn e DMT1 através da membrana abluminal das células endoteliais da BHE para os compartimentos cerebrais. O Tf-Fe³⁺ encontrado nos fluidos intersticiais se move livremente e encontra-se disponível para captação

pelos neurônios, astrócitos e microglia que expressam TfR (WARD *et al.*, 2014; URANGA e SALVADOR, 2018).

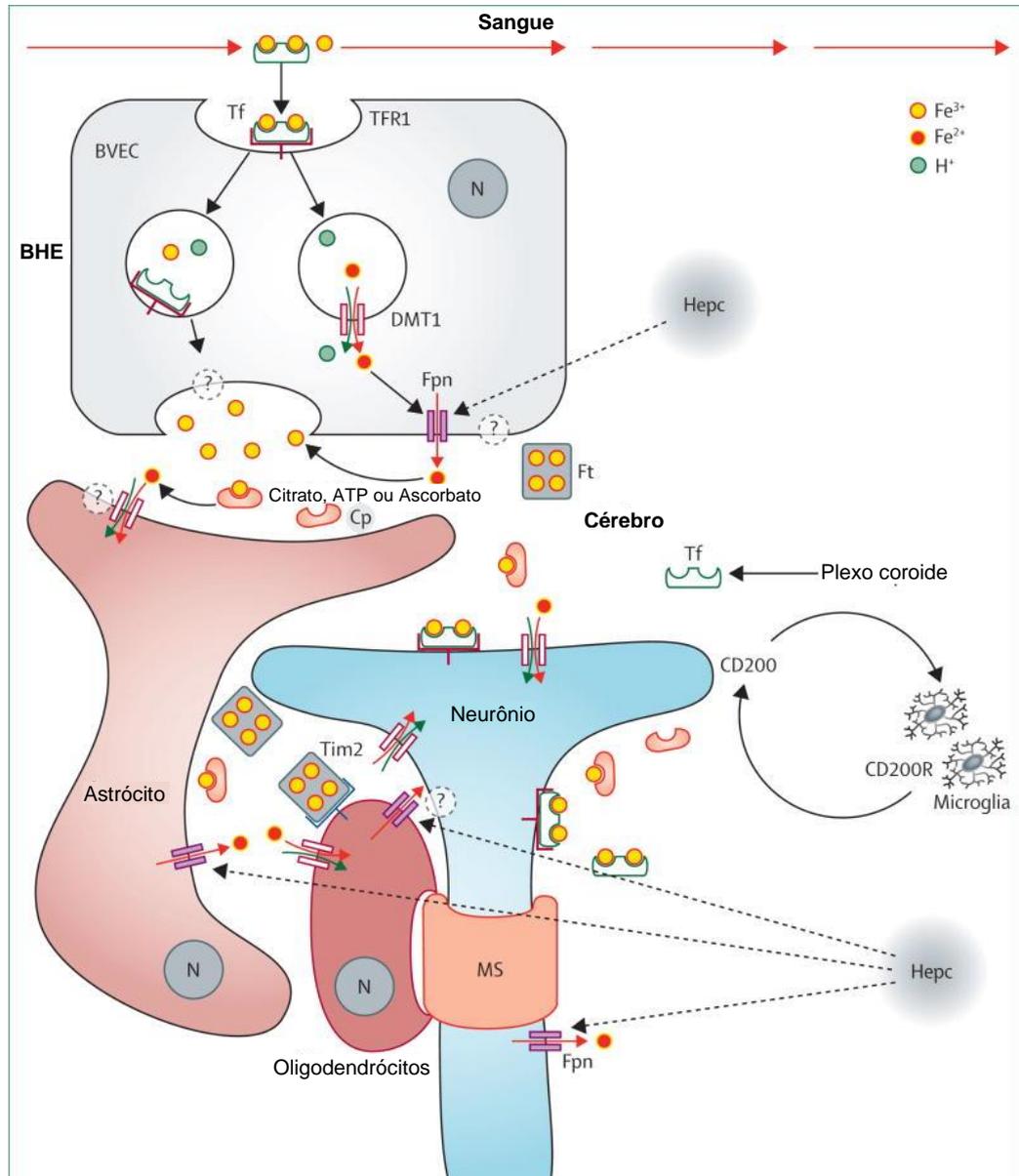


Figura 5: Metabolismo do ferro cerebral, adaptado de Ward *et al.*, 2014. BHE = barreira hematoencefálica. TfR = receptor de transferrina. Tf = transferrina. Fe^{2+} = ferro ferroso. Fe^{3+} = ferro férrico. BVEC = células endoteliais vasculares cerebrais. Cp = ceruloplasmina. Fpn = ferroportina. DMT1 = transportador de íons metálicos divalentes 1. Ft = ferritina. IRP = proteína reguladora de ferro. IRE = elemento responsivo ou regulador do ferro. Hepc = hepcidina. N = núcleo. MS = bainha de mielina. ? = caminho ou mecanismo desconhecido. CD200 = glicoproteína de membrana OX-2. CD200R = receptor CD200.

O TfR é distribuído de forma desigual no endotélio cerebral, o que faz com que o ferro seja encontrado em diferentes concentrações nos diversos compartimentos cerebrais. O hipocampo é uma região do cérebro em que as células apresentam uma elevada expressão de TfR, fazendo desta forma que esta região apresenta maior

concentração de ferro do que áreas que apresentam menor expressão de TfR, como por exemplo o córtex (URANGA e SALVADOR, 2018). No cérebro, a transferrina é sintetizada pelo plexo coroide e por oligodendrócitos, mas apenas o plexo coroide a secreta, o ferro adquirido pelos neurônios ocorre principalmente através do sistema transferrina-TfR, e são exportados através da ferroportina (WARD *et al.*, 2014).

No entanto, através de processos perivasculares os astrócitos se ligam a membrana abluminal da BHE, liga-se também aos neurônios, e em função disto, os astrócitos desempenham um papel importante na regulação da absorção de ferro cerebral. Os astrócitos não expressam TfR, mas absorve o ferro na barreira hematoencefálica via DMT1 que são expressos nos processos perivasculares ligados a BHE. Enquanto que o efluxo de ferro nos astrócitos ocorre através da ferroportina e ceruloplasmina (WARD *et al.*, 2014).

A deficiência de ferro impede o crescimento e pode levar a morte celular, oposto a isto a sobrecarga intracelular é citotóxico e pode induzir a apoptose ou ferroptose por diversos mecanismos. O ferro tende a acumular lentamente no cérebro no decorrer do envelhecimento normal e/ou nos processos neurodegenerativos, neste último podendo ocorrer de forma mais acelerada. No entanto, este acúmulo ocorre sem que haja aumento da ferritina, fato que contribui para que o ferro livre atue como cofator na formação de ERO (MILLS *et al.*, 2010; SALVADOR, 2010).

Neste sentido, a sobrecarga de ferro é uma condição clássica encontrada em diversas doenças neurodegenerativas, em especial nas doenças de Alzheimer, de Parkinson e de Huntington. O acúmulo de ferro livre é um processo normal durante o envelhecimento cerebral, este evento pode desencadear processos neurodegenerativos visto que o ferro é altamente reativo a água e ao oxigênio e esta elevada reatividade pode levar a produção de ERO, e por consequência causar danos irreversíveis às membranas celulares e ao DNA (MILLS *et al.*, 2010; URANGA e SALVADOR, 2018; PLASCENCIA-VILLA e PERRY, 2018; SINGH *et al.*, 2019)

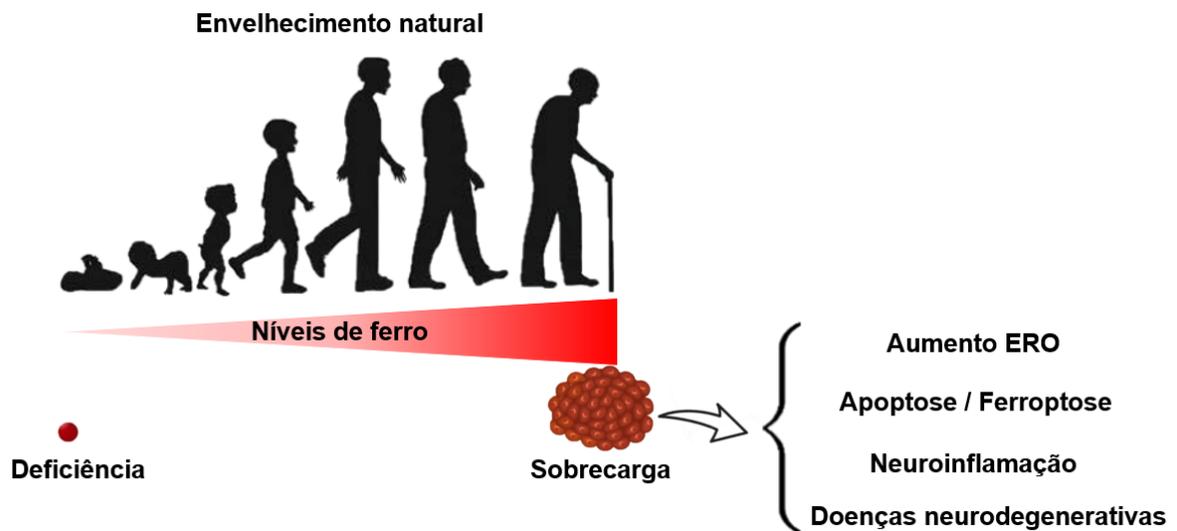


Figura 6: Acúmulo de ferro cerebral com o envelhecimento natural.

Neste contexto, 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 e o depósito desta proteína está relacionado a fisiopatogenia da doença de Alzheimer (GAO *et al.*, 2017). Além disto, SANTOS (2000) demonstrou, em outro trabalho de nosso grupo de pesquisa, o acúmulo de ferro no hipocampo de animais tratados com DDS. Outro mecanismo oxidativo sugerido para os danos ocasionados pelo ferro livre é a formação de peróxido lipídico levando a citotoxicidade, com conseqüente indução de apoptose ou ferroptose (EGAÑA *et al.*, 2003).

2.3 Ferro e o estresse oxidativo

A reação química do íon ferro com peróxido de hidrogênio leva a formação de radical hidroxila (OH^\cdot), via reação de Fenton (Figura 6, $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\cdot + \text{OH}^-$), sendo esta considerada a espécie reativa de oxigênio com maior potencial de dano, por reagir com um elevado número de constituintes celulares. Quando estes radicais são formados as proximidades da membrana fosfolipídica podem desencadear a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados e nos fosfolipídios, e desta forma os

hidroperóxidos de lipídios vão quebrar e dar origem a uma variedade de derivados de lipídeos, dentre eles o malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal (HNE) e 4- hidroxi-2-hexenal (HHE; MILLS *et al.*, 2010; WARD *et al.*, 2015).

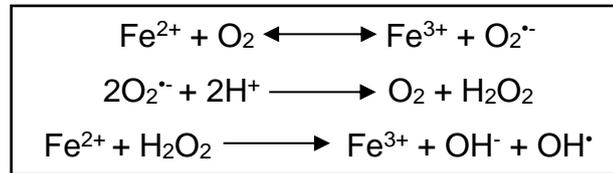


Figura 7 - Equação de Fenton.

O ferro é o metal em maior abundância no homem, pode ser encontrado em sua forma oxidada (Fe^{3+}) e em sua forma reduzida (Fe^{2+}), que é rapidamente oxidado a Fe^{3+} em soluções aquosa, o estado Fe^{3+} é insolúvel em pH neutro. O ferro é transportado e armazenado por proteínas específicas como a transferrina, lactoferrina, ferritina e heme (WEINBERG, 1990; PUNTARULO, 2005). Este metal está distribuído por todos os sistemas biológicos onde atua como cofator catalisando diversos processos biológicos imprescindíveis para a manutenção da vida. Neste contexto, pode apresentar funções essenciais (respiração celular, replicação de DNA e divisão celular) ou especializadas (transporte de oxigênio e neurotransmissão; MILLS *et al.*, 2010; PILONI *et al.*, 2013; WARD *et al.*, 2015; DUSEK *et al.*, 2016; URANGA e SALVADOR, 2018; MASALDAN *et al.*, 2019).

O ferro pode atuar como um agente oxidante, e levando a oxidação de biomoléculas, com danos teciduais e perda de função. Neste sentido, o ponto crítico para homeostase do ferro é a sua absorção no duodeno, através da dieta alimentar, onde a desregulação nesse mecanismo pode levar a deficiência ou a sobrecarga de ferro. (SALVADOR, 2010; URANGA e SALVADOR, 2018; MASALDAN *et al.*, 2019). No envelhecimento, é observado a elevação do ferro cerebral ligado a ferritina e a neuromelanina em diversas regiões cerebrais sem causar dano tecidual aparente. Entretanto, o acúmulo de ferro livre no SNC pode desencadear processos neurodegenerativas (WARD *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2019). Apesar da relação entre o acúmulo de ferro livre e doenças neurodegenerativas, até o momento não foi esclarecido se este processo antecede a morte neuronal e/ou se decorre dela (QIAN e SHEN, 2001; MILLS *et al.*, 2010; URANGA e SALVADOR, 2018; LEE e LEE, 2019).

2.4 Quelantes de ferro e doenças neurodegenerativas

Dentre os possíveis alvos terapêuticos relacionados ao ferro e aos distúrbios neurodegenerativos estão os fármacos quelantes de ferro, esta terapia é aplicada na supressão da formação de radicais livres, diminuindo os níveis de ferro que atuam como catalisador no processo de formação de radicais livres. Fármacos quelantes são compostos com afinidade ou tendência de fazer ligações com íons metálicos e formar uma estrutura complexa e estável o suficiente de forma que seja dificilmente quebrada por moléculas orgânicas endógenas (FLORA e PACHAURI, 2010; MILLS *et al.*, 2010).

O uso de quelantes de ferro na prática clínica iniciou por volta da década de setenta (1970), no século passado, com o uso da DFX que mesmo com resultados significativos na clínica dos pacientes com talassemia e com sobrecarga de ferro, motivou pesquisa no sentido de encontrar um novo fármaco que pudesse ser administrado por via oral, visto que a DFX é administrada por via parenteral. Diante disto, através de esforços em pesquisa foram incluídos outros fármacos como a Deferiprona e o Deferasirox. Atualmente, aplicam-se diversos protocolos clínicos com o uso de quelantes de ferro, em alguns deles se faz a associação de quelantes para um melhor resultado (NURCHI *et al.*, 2016).

O uso destes fármacos na prática clínica tem sido no sentido de atenuar e/ou proteger os pacientes dos efeitos adversos da sobrecarga e toxicidade do ferro em órgão e tecidos advindos da circulação deste metal não ligado a transferrina e neste contexto reduzir a formação espécies reativas de oxigênio, via reação de Fenton. Recentemente, tem sido utilizado na remoção de estoque de ferro em órgão onde possam estar desenvolvendo ação tóxica, dentre elas a síndrome do desconforto respiratório no adulto, isquemia do miocárdio, câncer e malária (FAA e CRISPONI, 1999; NURCHI *et al.*, 2016). Além disto, foi demonstrado que a DFX diminui o declínio cognitivo em paciente com doenças de Alzheimer (FLORA e PACHAURI, 2010; MILLS *et al.*, 2010).

Fármacos quelantes de ferro devem ser altamente seletivos ao ferro, apresentar baixa toxicidade mesmo após quelar-se ao metal, apresentar uma maior afinidade ao ferro do que os compostos endógenos, ter boa absorção entérica e boa disponibilidade nas células-alvo (NURCHI *et al.*, 2016). Além disto devem apresentar elevada solubilidade em água, de difícil metabolização, elevada permeabilidade para atingir tecidos de armazenamento de metais, manter a capacidade de quelar mesmo

quando submetidos ao pH dos fluidos corporais e principalmente após ligar-se aos metais formar compostos menos tóxicos que os íons dos metais (FLORA e PACHAURI, 2010).

Nos últimos anos, tem-se considerado possibilidade do uso de quelantes de ferro na terapia farmacológica de prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas a fim de remover possíveis acúmulos de ferro em regiões cerebrais. Neste sentido, o quelante deve apresentar elevada capacidade de atravessar membranas celulares e em especial a BHE, deve apresentar ainda a capacidade de ligar-se ao ferro livre, transferindo-o para as proteínas circulantes, mas sem apresentar a capacidade de ligar-se ao ferro ligado a transferrina do plasma. Além disto, também deve apresentar baixa toxicidade, baixo custo e ser administrado preferencialmente por via oral (SANTOS *et al.*, 2009; WARD *et al.*, 2015).

Número crescente de estudos corroboram o conceito de que a alteração na regulação de ferro cerebral desempenha um papel importante na etiologia das doenças neurodegenerativas. A alteração da homeostase do ferro celular no SNC pode levar ao aumento da absorção de ferro por áreas específicas do cérebro. Esta teoria é corroborada por achados de aumento nas concentrações de ferro em áreas específicas do cérebro causadas por disfunção de proteínas envolvidas no transporte e armazenamento, como a aceruloplasmina e ferritina (MILLS *et al.*, 2010; DUSEK *et al.*, 2016).

Somando-se aos fatores relacionados a produção de radicais livres são alterações na produção de metaloproteínas, que pode desencadear a ativação de micróglias que podem levar a neuroinflamação e com isto desencadear a morte celular pela via dependente de ferro (ferroptose; DUSEK *et al.*, 2016).

2.4.1 DEFEROXAMINA

A Deferoxamina (DFX) é um ácido tri-hidroxâmico, sideróforo, produzido e secretado por *Streptomyces pilosus*, é conhecido por sua forte afinidade de ligação ao íon ferro trivalente (Fe^{3+}) e reduzida por outros metais, e que foi usado inicialmente na intoxicação aguda por ferro e apenas na década de 1970 foi introduzido na prática clínica para o tratamento de pacientes com talassemia e com sobrecarga de ferro, o elevado peso molecular do DFX faz com que seja pouco absorvido, quando

administrado, por via oral, apresenta baixa ligação a proteínas plasmáticas (<10%) e meia vida plasmática bastante curta que pode variar de 5 a 10 minutos, sendo uma pequena parte metabolizada no plasma e o restante nos hepatócitos, o que é determinante para que este fármaco seja administrado por via intramuscular ou subcutânea com auxílio de bomba de infusão (VERMYLEN, 2008; FLORA e PACHAURI, 2010; NURCHI *et al.*, 2016).

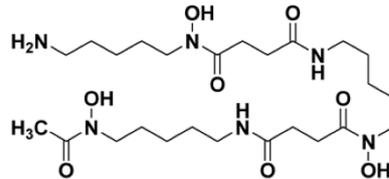


Figura 8 - Estrutura química da deferoxamina - Fonte: Adaptado de YANG *et al.*, 2014.

Quando complexado ao ferro forma o composto denominado ferrioxamina que é rapidamente eliminado principalmente através da via renal e de até um terço através da via biliar, sendo este último eliminado através das fezes. É um fármaco bem tolerado e com poucos eventos adversos que incluem toxicidade oftálmica e auditiva, aumento de suscetibilidade as infecções bacterianas e fúngicas, reações alérgicas e cutâneas, náuseas e vômitos, trombocitopenia, diarreia, febre, câimbras nas pernas, taquicardia e em raros casos podendo apresentar efeitos adversos nos pulmões, rins e sistema nervoso (BOSQUE *et al.*, 1995; FLORA e PACHAURI, 2010).

A maior parte dos portadores de doenças neurodegenerativas não apresentam alteração na homeostase do ferro, assim sendo, para estes indivíduos será necessário baixas doses de quelantes de ferro para alcançar o efeito esperado e com isto uma menor incidência de efeitos adversos (WARD *et al.*, 2015).

2.5 Neurotoxicidade e Neuroinflamação induzida por DDS

A neurotoxicidade é caracteriza-se pela promoção de eventos adversos no SNC, sistema nervoso periférico ou órgãos sensoriais. Estas alterações podem promover modificação nos parâmetros bioquímicos, eletroencefalograma, testes psicológicos e comportamentais, axonopatia e morte celular (MATTAPPALIL e MERGENHAGEN, 2014). Os eventos adversos da DDS sobre o SNC são subnotificados e os mecanismos envolvidos ainda são relativamente desconhecidos.

Sabe-se que indivíduos com doenças renal, doença prévia no sistema nervoso e geriátricos possuem uma maior predisposição a estas reações (GRILL e MAGANTI, 2011; MATTAPPALIL e MERGENHAGEN, 2014).

Os eventos neurotóxicos induzidos pelo uso deste fármaco incluem delírio e psicose, são normalmente inesperados e/ou imprevisíveis e são comumente confundidos com complicação ao quadro do paciente ou até mesmo um distúrbio subjacente. O mecanismo que podem levar a mudanças comportamentais agudas ainda não estão bem esclarecidas, mas pode haver uma correlação entre a deficiência de glutatona e a neurotoxicidade, deficiência esta normalmente encontrada em pacientes geriátricos e/ou infectados pelo HIV (BUHL *et al.*, 1989; SEKHAR *et al.*, 2011). Além disto, a DDS inibe a síntese de tetra-hidrobiopterina, um cofator na formação de dopamina e serotonina, o que pode contribuir para o surgimento destes eventos no SNC (HARUKI *et al.*, 2013; MATTAPPALIL e MERGENHAGEN, 2014).

Além disto, a neurotoxicidade induz alterações na homeostasia das células da glia, com conseqüente neuroinflamação. O funcionamento normal da relação neurônio-micróglia-astrócito é de extrema importância para a organização estrutural e funcional do cérebro. Neste sentido, entende-se que alterações nesta tríade estão relacionadas aos processos de envelhecimento natural do cérebro e até mesmo a processos neurodegenerativos (BARRES, 2008; CERBAI *et al.*, 2012). Além disto, a relação ente inflamação e envelhecimento é associada em complexas alterações celulares e moleculares que contribuem para o declínio das funções cognitivas. Neste contexto, o hipocampo é uma das estruturas mais sensíveis a estas reações e modificações eletrofisiológicas, estruturais e morfológicas que ocorrem desencadeadas pela inflamação (CERBAI *et al.*, 2012).

A neuroinflamação compreende respostas bioquímica e celular as injurias sofridas no sistema nervoso, estas respostas são mediadas por citocinas, quimiocinas, ERO e segundos mensageiros. Estes mediadores podem ser produzidos por células da glia (micróglia e astrócito), células endoteliais e até mesmo por células do sistema imunológico de origem periférica, e a resposta a este estímulo pode levar a danos tecidual e morte neuronal por mecanismos apoptóticos (DISABATO *et al.*, 2016). As células da glia reconhecem sinais bioquímicos liberados pelo neurônio através de receptores expressos em astrócitos e micróglia, sinalização esta que podem levar a fagocitose de células neuronais e de dendritos neuronais. (CERBAI *et al.*, 2012).

2.6 Hipocampo e processo de formação de memória

O processo fisiológico de envelhecimento provoca uma série de prejuízos celulares em todos os sistemas orgânicos e, o sistema nervoso central parece ser o mais afetado por estas mudanças, levando a prejuízo nas funções motoras, sensoriais e cognitivas ao longo do tempo (MATTSON e MAGNUS, 2006). Neste contexto, o hipocampo parece ser um dos órgãos mais sensíveis e estes eventos, e o desequilíbrio oxidativo ocasionado pelo acúmulo natural e progressivo neste órgão pode levar a um comprometimento cognitivo (MILLS *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2019).

O hipocampo está diretamente envolvido nos processos de aprendizagem e memória. No entanto, a extensão deste envolvimento e a forma como os circuitos hipocâmpais realizam o processamento da memória ainda não é um consenso (RENDEIRO *et al.*, 2009). Experimentos em roedores tem sido utilizado para a proposição de numerosas teorias sobre o processamento da memória no hipocampo devido a notável similaridade estrutural e funcional entre o hipocampo de humanos e de roedores (NISSINEN *et al.*, 2000). Neste contexto, tem sido amplamente descrito que os ratos mostram déficits relacionados à idade em tarefas de aprendizagem espacial avaliada através do labirinto aquático de Morris. Além disto, evidências demonstram que tarefas de memória espacial, mensuradas pelo labirinto aquático de Morris, são sensíveis a lesões no hipocampo (RENDEIRO *et al.*, 2009).

A formação hipocâmpal de mamíferos é um componente essencial ao sistema límbico e desempenha um papel fundamental nos processos de aprendizado e de memória (KIM e DIAMOND, 2002), esquematicamente pode ser dividido em dois aspectos, sendo eles de forma anatômica ou fisiológica. Anatomicamente, o hipocampo é dividido em quatro regiões, sendo elas CA1, CA2, CA3 e giro denteado (SCHARFMAN, 2007). Ao passo que, fisiologicamente pode ser dividido em hipocampo ventral e hipocampo dorsal. A porção ventral atua primariamente no processamento emocional, enquanto que porção dorsal em processos de memória e aprendizado (BANNERMAN *et al.*, 2004; FANSELOW e DONG, 2010).

Em um sentido mais amplo, a memória pode ser dividida em memória de curta duração, também denominada de memória de trabalho, e memória de longa duração. A memória de trabalho tem capacidade limitada e dura um curto período de tempo. Oposto a isto, a memória de longa duração pode armazenar grande quantidade de informação e durar por tempo indeterminado. A memória de longo prazo pode ser

subdividida em memória declarativa (episódica e sistêmica) e memória não declarativa ou implícita. A memória declarativa armazena fatos ou eventos que necessitam de uma lembrança consciente do evento. Oposto a isto, a memória não declarativa é adquirida por condicionamento clássico, por hábitos de aprendizagem ou por habilidade que podem ser recuperadas inconscientemente (SIANCAS e ERNESTO, 2016)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito do quelante de ferro, Deferoxamina, sobre alterações cognitivas oxidativas sistêmicas e no hipocampo induzidas pelo uso de Dapsona e/ou acúmulo de ferro.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar os efeitos do quelante de ferro (DFX) sobre os efeitos cognitivos de memória e aprendizado induzidos por DDS em modelo animal.

b) Avaliar os efeitos do quelante de ferro (DFX) sobre a formação de metemoglobina induzida por DDS em modelo animal.

c) Avaliar o efeito do quelante de ferro (DFX) sobre as alterações na homeostasia do ferro e níveis de LPO induzidos por DDS no sangue e hipocampo dos animais tratados.

d) Avaliar os efeitos do quelante de ferro (DFX) sobre as alterações na capacidade antioxidante total (TEAC) e níveis glutatona reduzida (GSH) induzidos por DDS no sangue e hipocampo dos animais tratados.

4 MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Animais e procedência

Neste estudo, foram utilizados 60 camundongos *Mus musculus*, adultos jovens machos, da linhagem Swiss, com massa corpórea variando de 38 a 50g ($44g \pm 4$), com 8 semanas de vida, provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC).

Os camundongos foram alojados no biotério da Faculdade de Farmácia (FACFAR) da Universidade Federal do Pará (UFPA) em gaiolas de polipropileno apresentando dimensões de 45x34x16cm, com cobertura de grade em inox, com a utilização de “cama” em maravalha de *Pinus*. Durante o período de experimento foi realizado a higienização destas gaiolas em dias alternados, fazendo-se a substituição da maravalha após este processo. Em cada gaiola foram acondicionados quatro animais, sendo estes 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 do experimento.

Todos os procedimentos experimentais usando animais foram projetados de forma a minimizar o sofrimento e o número de animais utilizados. Este estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e com o Decreto 6.899 de 15 de junho de 2009, assim como as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA). Foi previamente aprovado por esta comissão conforme o protocolo de nº 9032140818, conforme certificado nos anexos.

4.2 Doses e preparo de soluções

4.2.1 EXTRAPOLAÇÃO ALOMÉTRICA DE DOSE

Neste trabalho, para a determinação da dose de DDS utilizada no tratamento foi feito uso do método de extrapolação alométrica interespecífica. Método este que compara matematicamente animais de massa e espécie diferentes colocando-os no mesmo padrão (PACHALY, 2006; FREITAS e CARREGARO, 2013).

Para isto, consideramos a taxa metabólica basal do animal em estudo, este processo permite extrapolar matematicamente doses de um medicamento indicado para um outro animal vertebrado, de acordo com a taxa metabólica de cada espécie. Neste sentido, sabe-se que a relação entre a taxa metabólica e a massa corporal não é linear, e a proposição de um expoente de massa com valor 0,75 para expressar o metabolismo basal em relação a massa corporal, quando se compara animais interespecíficos. A fundamentação de uso deste expoente está nas taxas de consumo de oxigênio que quando correlacionadas com a massa corporal tende a fazer retas cuja a inclinação é 0,75 (PACHALY, 2006; FREITAS e CARREGARO, 2013). Diante disto, a dose recomendada para um camundongo de 30g (0,03kg) é de 0,30mg de DDS administrado diariamente, o que seria equivalente a uma dose 10mg/kg do animal, conforme demonstrado no cálculo a seguir.

<p>TMB do animal referência (TMB Ref.)</p> <p>$TMB\ Ref. = k \times m^{0,75}$</p> <p>$TMB\ Ref. = 70 \times 70^{0,75}$</p> <p>$TMB\ Ref. = 70 \times 24,20$</p> <p>$TMB\ Ref. = 1.694\ Kcal$</p>	<p>TMB do animal alvo (TMB Alvo)</p> <p>$TMB\ Alvo = k \times m^{0,75}$</p> <p>$TMB\ Alvo = 70 \times 0,030^{0,75}$</p> <p>$TMB\ Alvo = 70 \times 0,0720$</p> <p>$TMB\ Alvo = 5,046\ Kcal$</p>
<p>Dose do Animal Alvo = (Dose do animal Ref. ÷ TMB Ref.) x TMB Alvo</p> <p>Dose do Animal Alvo = (100 ÷ 1.694) x 5,046</p> <p>Dose do Animal Alvo = 0,059 x 5,046</p> <p>Dose do Animal Alvo = 0,30mg</p>	

Quadro 1: Demonstração de cálculo de extrapolação alométrica de dose da DDS

A dose a ser administrada será considerado a unidade de massa em miligramas (mg); K: constante, para mamíferos placentários equivale a 70 (neste caso, o mesmo valor para o homem e o camundongo); m Ref: para o animal de referência (homem), considera-se 70kg; m Alvo: para o animal alvo (camundongo), consideramos o peso de 30g (0,030kg); TMB: Taxa Metabólica Basal; TMB Ref.: Taxa Metabólica Basal do animal referência (homem); TMB Alvo: Taxa Metabólica Basal do animal alvo (camundongo).

4.2.2 SOLUÇÃO DE DAPSONA A 4MG/ML

A solução de Dapsona a 4mg/ml foi produzida conforme preconizado pela sociedade espanhola de farmácia hospitalar e Drugdexdrugevaluations. Micromedex® Healthcare Series, 2005.

Para preparar 100ml de solução de DDS 4mg/ml, foi feito uso de:

DDS 400mg
Ácido cítrico 500mg
Água destilada 25ml
Xarope simples qsp.100ml

4.2.3 SOLUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

Para preparar 100ml de solução de ácido cítrico, foi feito uso de:

Ácido cítrico 500mg
Água destilada 25ml
Xarope simples qsp.100ml

4.2.4 SOLUÇÃO DE DEFEROXAMINA 4MG/ML

O DFX foi diluído em água destilada e apresentou concentração final de 16mg/ml, foi produzido diariamente, minutos antes de sua utilização. Foi preparada conforme abaixo:

DFX160mg
Água destilada....qsp. 10ml

4.3 Grupos experimentais e regime de tratamentos

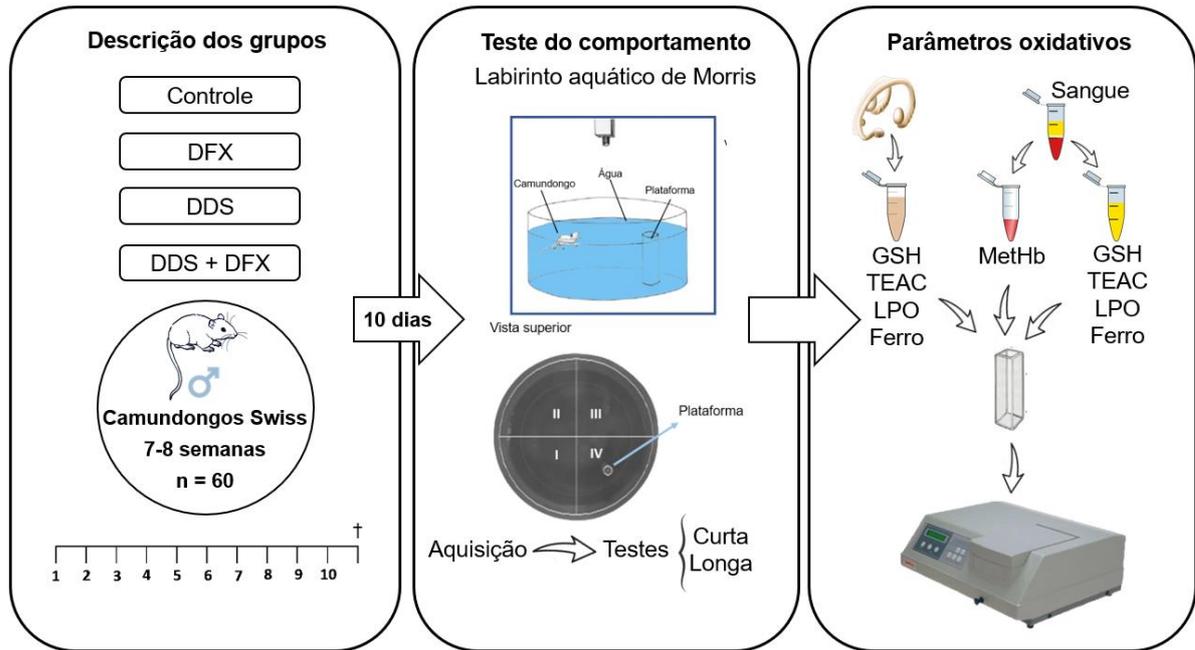


Figura 9 - Representação esquemática da grupos e de tratamento.

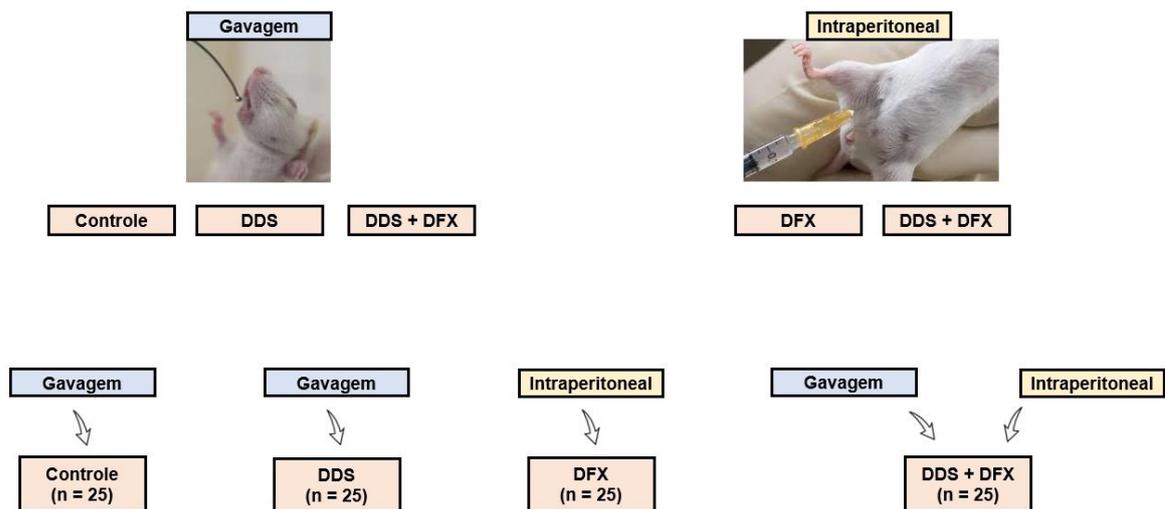


Figura 10 - Representação esquemática de grupos e vias de administração dos fármacos.

Nos animais do grupo Controle foi administrado apenas solução de ácido cítrico preparado conforme o descrito no tópico 4.2.3, por via oral (gavagem) e o volume administrado de 100µl, por um período de 10 dias de tratamento.

Nos animais do grupo DDS foi administrado via oral (gavagem) solução com DDS 4mg/ml preparada previamente, na dose de 10 mg/kg. Com volume administrado ajustado conforme o peso de cada animal, por um período de 10 dias de tratamento.

Nos animais dos grupos DFX foi administrado por via intraperitoneal solução de DFX 16mg/ml preparada minutos antes da administração, na dose de 40mg/kg. Com volume administrado ajustado conforme o peso de cada animal, por um período de 10 dias.

Nos animais dos grupos DDS + DFX foi administrado via oral (gavagem) solução com DDS 4mg/ml preparada previamente, na dose da dose de 10 mg/kg. E via intraperitoneal solução de DFX 16mg/ml preparada minutos antes da administração e na dose de 40mg/kg. Tendo sido ajustado o volume administrado conforme o peso de cada animal para as soluções de DDS e DFX, por um período de 10 dias.

Dias de tratamento	Grupos	Esquema de tratamento
10 dias	Controle 10d (N=15)	100µl Solução, via oral, por 10 dias.
	DDS 10d (N=15)	Sol. de DDS 4mg/ml, na dose de 10mg/kg, via oral, por 10 dias.
	DFX 10d (N=15)	Solução de DFX 16mg/ml, na dose de 40mg/kg via i.p., por 10 dias.
	DDS + DFX 10d (N=15)	Sol. de DDS 4mg/ml, na dose de 10mg/kg, via oral e Solução de DFX 16mg/ml na dose de 40mg/kg, via i.p., por 10 dias.

Quadro 2 - Esquemática de grupos e esquemas de tratamentos.

4.4 Teste do comportamento

Após 24h do término do tratamento farmacológico, pelo período 10 dias, os animais foram encaminhados para realização dos testes comportamentais. O ensaio

foi realizado em sala própria, com temperatura controlada (25°C) e atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação. Com o objetivo de evitar que as variações circadianas pudessem vir a interferir com os resultados experimentais.

4.4.1 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (MORRIS WATER MAZE)

O labirinto aquático de Morris (Morris Water Maze - MWM) é um teste de aprendizado espacial ou local para roedores que se baseia na navegação dos roedores em avaliação a partir de um local de partida ao redor do perímetro de uma arena de natação aberta para que este possa acessar uma plataforma submersa para fuga. A aprendizagem espacial é avaliada em função de tentativas repetidas e a memória de referência é determinada pela preferência dos animais na região onde se encontrava a plataforma. O MWM tem demonstrado ao longo do tempo ser um teste confiável e que apresenta forte relação com a plasticidade sináptica do hipocampo (VORHEES e WILLIAMS, 2006; VORHEES, C., 2010).

A arena (piscina) foi virtualmente dividida em quatro quadrantes, aqui esquematicamente denominados de I, II, III e IV, conforme demonstrado na figura esquemática (Figura 11), foi utilizado uma plataforma submersa em acrílico transparente de forma que está não fosse facilmente percebida pelo animal. Foi adicionado corante alimentício a água de forma a tornar o fundo da arena não visível ao animal em teste e desta forma contribuindo para que o animal não visualizasse a plataforma com facilidade. Todo o período de teste foi filmado com auxílio de câmera fixada ao teto e as imagens obtidos foram avaliadas com o auxílio do programa específico (Sistema ANY-maze). Os testes foram divididos esquematicamente em duas fases, sendo primeira com fase de treinamento e a segunda com a fase de teste propriamente dita, e esta última em teste de memória de curta e longa duração.

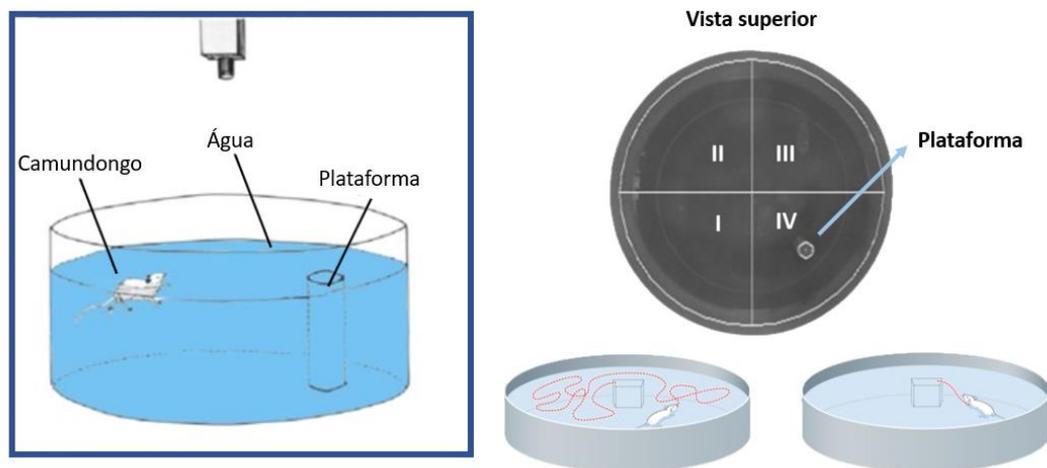


Figura 11 - Representação esquemática do teste Labirinto Aquático de Morris.

Durante a fase de treinamento o animal em teste foi inicialmente colocado no I quadrante para nadar e explorar livremente a arena por um período de até dois minutos ou até que este localizasse a plataforma submersa, após a localização da plataforma permitiu-se que o animal em testes permanecesse sobre esta por um período de vinte segundos. Após isto, o animal foi retirado da arena e mantido em repouso por um período de cinco minutos. Os animais que não localizaram a plataforma no período de dois minutos foram conduzidos até a mesma, em seguida permitiu-se que estes permanecessem sobre esta por vinte segundos.

Logo após o período de repouso de cinco minutos o animal em teste foi colocado no II quadrante para a realização de nado e exploração da arena assim como ocorrido quando colocado no I quadrante, mantendo-se os mesmos períodos para a exploração, de permanência sobre a plataforma e seguido do intervalo de repouso. Após isto, efetuou-se o mesmo procedimento colocando-se o animal no III e IV quadrante respectivamente. Em toda a fase de treinamento foi computado o tempo em que o animal levou para acessar e manter-se sobre a plataforma. Desta forma, chegou-se ao final da fase de treinamento.

Após decorridos quatro horas da fase de treinamento foi iniciado a fase de testes propriamente dito como a avaliação de memória de curta duração. E para isto realizamos a remoção da plataforma submersa da arena e o camundongo foi colocado no quadrante oposto (II quadrante) ao quadrante onde se localizava a plataforma (IV quadrante) para que o animal em teste pudesse explorar a arena em busca da plataforma por um período de sessenta segundos, após este período o animal foi

removido da arena. Nesta etapa foi avaliado o período de tempo em que o animal explora a área em que a plataforma estava localizada anteriormente.

O teste de memória de longa duração foi realizado vinte e quatro horas após a realização a fase de treinamento e ocorreu de forma semelhante ao teste de memória de curta duração onde a plataforma submersa foi removida da arena, o animal foi colocado no II quadrante e permaneceu na arena por um período de sessenta segundos na arena, período em que foi avaliado o comportamento do animal em teste.

4.5 Coleta de amostra

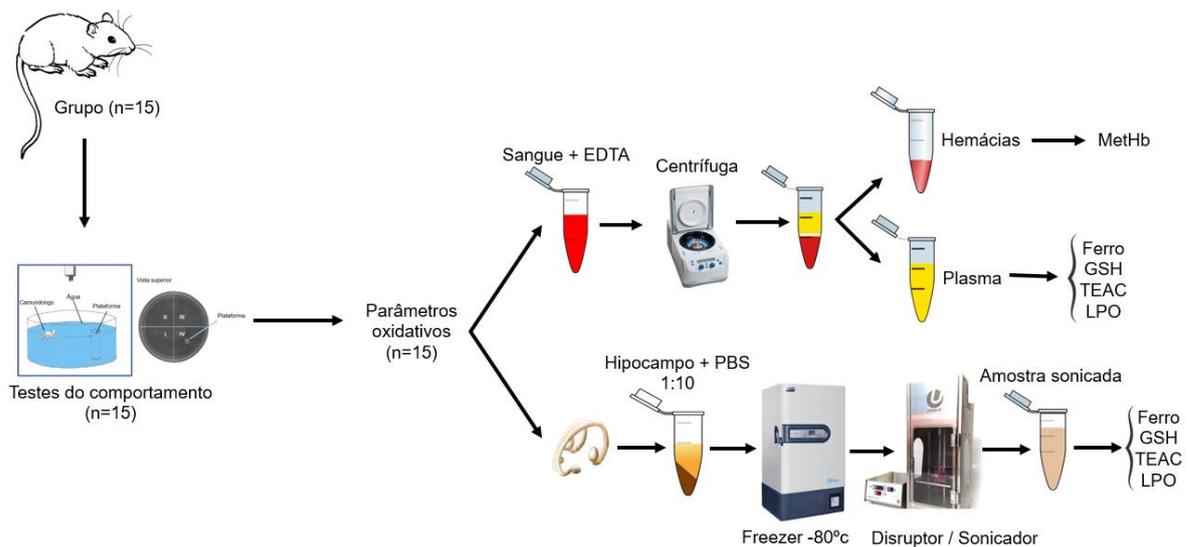


Figura 12 - Representação esquemática da coleta de material biológico por grupo experimental.

A coleta de material biológico ocorreu logo após o teste do comportamento, tendo sido coletado sangue e hipocampo, ambos destinados avaliação de parâmetros oxidativos. A coleta de material biológico foi precedida de procedimento anestésico com Quetamina e Xilazina.

4.5.1 COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE DE PARAMETROS OXIDATIVOS NO SANGUE E NO HIPOCAMPO.

Após o término do teste para avaliação do comportamento, o labirinto aquático de Morris, os animais foram submetidos a eutanásia por exsanguinação, sendo estes previamente anestesiados com Quetamina (90mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) seguido de punção cardíaca para a coleta de sangue total. As amostras de sangue foram centrifugadas para separação do plasma e do concentrado e hemácias, as hemácias foram utilizadas para avaliação dos níveis de MetHb, enquanto que o plasma foi utilizado para avaliação dos parâmetros oxidativos (Ferro, Glutathione reduzida, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica).

Em seguida, foi realizado uma craniotomia para a retirada do encéfalo e posterior dissecação do hipocampo. Após dissecado o órgão foi pesado e acondicionado em tubos do tipo eppendorf com tampão fosfato salino (PBS) na proporção de 1:10. Posteriormente foi realizado a disrupção com disruptor ultrassônico. Após este processo, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C para posterior análise.

4.5.2 DESCARTE DE MATERIAL BIOLÓGICO

Os animais eutanasiados foram acondicionados em sacos plásticos de material biológicos, em seguida congelados até o seu recolhimento e descarte pela empresa responsável pela coleta de resíduos de material biológico, conforme Plano de Gerenciamento de Resíduos da Saúde (PGRS) da Universidade Federal do Pará.

4.6 Análises parâmetros bioquímicos e oxidativos.

4.6.1 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE METEMOGLOBINA.

A técnica empregada foi criada por Evelyn e Malloy (1938) e posteriormente adaptada por de Hegesh *et al.* (1970), onde o percentual de MetHb é avaliado, observando-se a variação de absorvância causada pela adição do agente

neutralizante cianeto de potássio (KCN) em um hemolisado tamponado com ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) e outro tubo sem este reagente.

O tubo contendo hemolisado e $K_3Fe(CN)_6$ foi utilizado como padrão, empregado para converter todas as formas possíveis de Hb para MetHb. Valores inferiores a 2% foram considerados normais.

Inicialmente, foram adicionados 500 μ L da suspensão de hemácias a 50% em tubos de ensaio, seguido pela adição de 2,5 mL de água destilada e agitadas por inversão três vezes e mantidas em repouso por 3 minutos. Em seguida, foi adicionado ao tubo 1 mL de solução tampão-fosfato 0,5 mol/L e 3 gotas de t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100) [adquirido da Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, Mo)], e após isto, o tubo foi agitado no vórtex por 30 segundos. Deste tubo, foram transferidos 2.4mL para cubeta (A1) e 0.2mL para outra cubeta (A2), esta contendo 2,2mL do reativo ferricianeto-fosfato. Seguiu-se a leitura das amostras em $\lambda = 632\text{nm}$ em espectrofotômetro, para obtenção das absorvâncias de A1 e A2. Após as leituras, foi adicionado 100 μ L da solução neutralizada de cianeto de sódio a 10% nos tubos A1 e A2, e após 1 minuto, foi realizada nova leitura das absorvâncias para obtenção do A3 e A4 (Figura 13).

Após a leitura das absorvâncias, o cálculo do percentual de % MetHb foi feito pela seguinte equação.

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

Onde:

12: fator de correção;

A1: % de metemoglobina na amostra;

A2: % de cianometemoglobina da amostra;

A3: 100% de metemoglobina na amostra;

A4: 100 % de cianometemoglobina na amostra.

Proposto por Evelyn e Malloy (1938), adaptada por de Hegesh (1970).

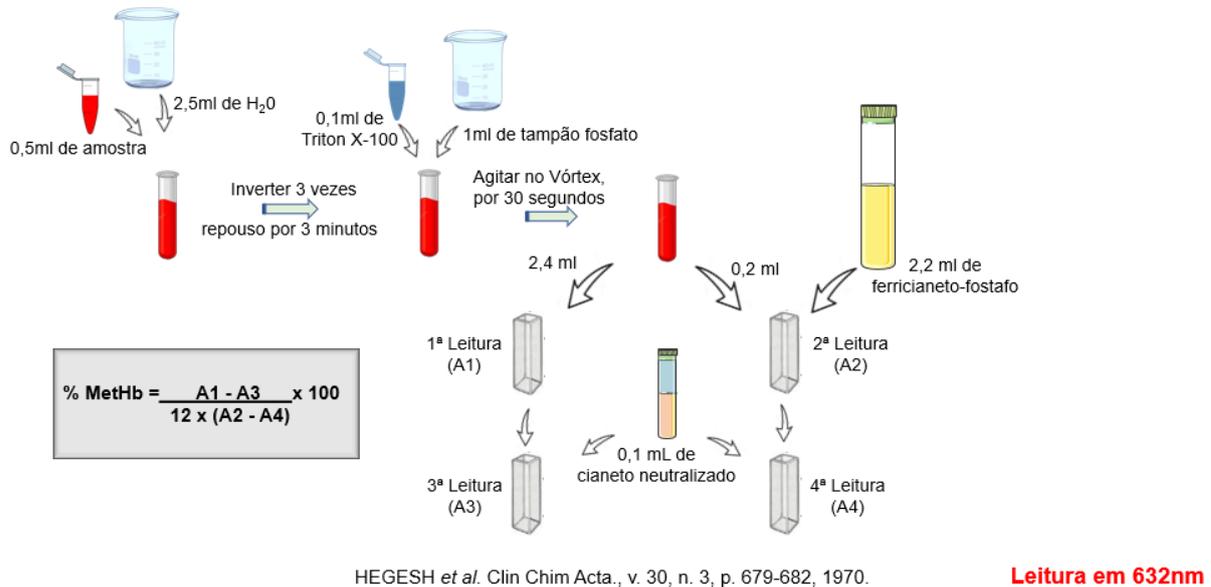
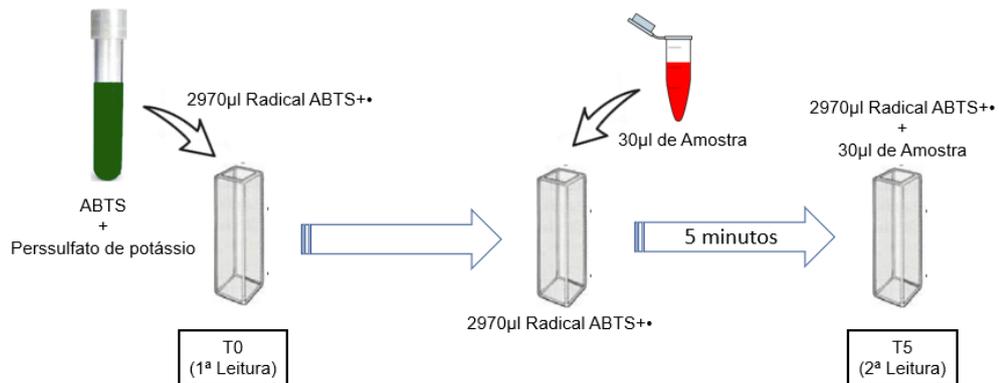


Figura 13 - Representação esquemática da determinação do percentual de Metemoglobina (MetHb).

4.6.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EQUIVALENTE AO TROLOX (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; SigmaAldrich 23881-3) é um potente antioxidante hidrossolúvel e análogo da vitamina E. Seguiu-se o método proposto por Miller *et al.* (1993) modificado por RE *et al.* (1999). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (SigmaAldrich A1888) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$; Sigma-Aldrich 60490), produzindo diretamente o cátion radical $ABTS^{+\bullet}$ (radical 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato], sal de diamônio), cromóforo de coloração verde/azul. 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 (Figura 14). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mL}$.

Proposto por Miller *et al.* (1993), modificado por Re *et al.* (1999).



RE *et al.* Free Rad Biol Med., v. 26, n. 9, p.1231-1237, 1999.

Leitura em 734nm

Figura 14 - Representação esquemática da determinação da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC).

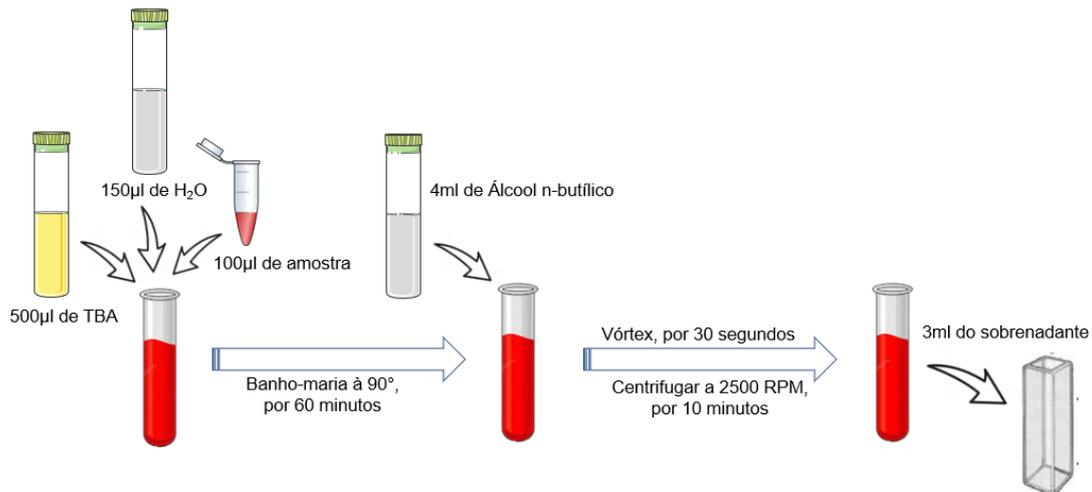
4.6.3 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, método para avaliar a peroxidação lipídica, foi realizada pelo método de Kohn e Liversedge (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 535nm. 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). A concentração elevada de TBARS tem sido utilizada como um indicador do estresse oxidativo.

O procedimento técnico do método consiste no preparo inicial do fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄ 75 mM, Synth, 35210) em água acidificada (pH 2,5). Esta solução é utilizada na preparação do TBA (10 nM). Adiciona-se 100 µl de amostra à 500 µl da solução de ácido tiobarbitúrico 10 nM. Em seguida leva-se ao banho-maria (94°C por 60 minutos); após a incubação deixou-se esfriar a temperatura ambiente

por 10 minutos; em seguida foi adicionado 4,0 ml de álcool 1-butílico, homogeneíza-se vigorosamente em vórtex e posteriormente submetido a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos; coleta-se 1,0 ml do sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535 nm (Figura 15). O padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano - Sigma-Aldrich, T9889), sendo os resultados foram expressos em $\mu\text{M/L}$.

Proposto por Khonn e Livesedge (1944), adaptado por Percário (1994).



PERCÁRIO *et al. NewsLab*, vol. 2, p. 46-50, 194.

Leitura em 535nm

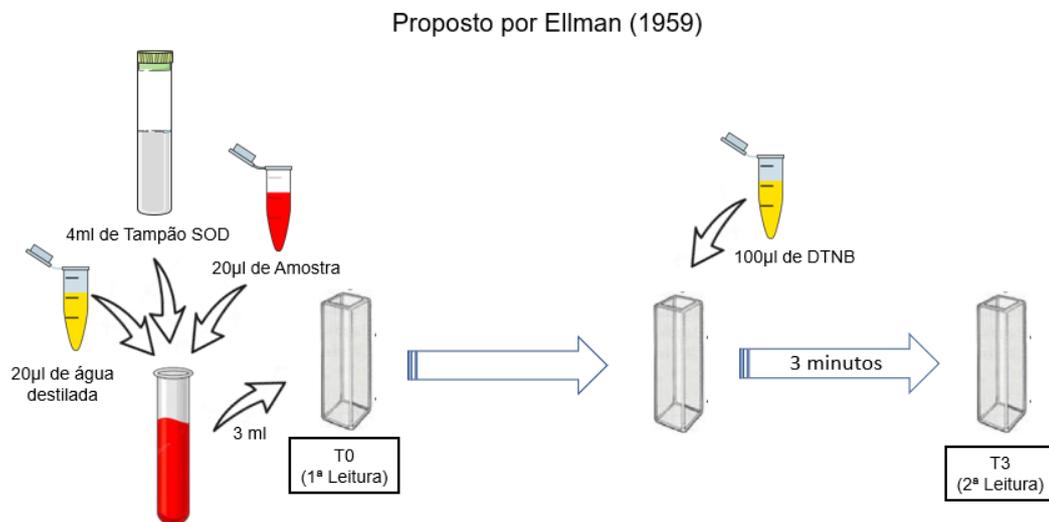
Figura 15 - Representação Esquemática da Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

4.6.4 DETERMINAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA

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.

As amostras foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 2% e o sobrenadante coletado para análise após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Inicialmente, foi retirada uma alíquota de 20 µl de cada amostra e transferindo para tubo de ensaio contendo 3ml tampão SOD e 20 µl de água destilada para a realização da 1ª leitura da amostra (T₀), em seguida foi adicionado 100 µl de DTNB e após 3

minutos realizou a 2ª leitura da amostra (T3). A diferença nas absorbâncias (T3 - T0) é proporcional à concentração de GSH, expressa em $\mu\text{M}/\text{ml}$ (Figura 16).



ELLMAN, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 82, p. 70-77, 1959.

Leitura em 412nm

Figura 16 - Representação esquemática de determinação da atividade da glutatona reduzida (GSH).

4.6.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FERRO

As concentrações de ferro nas amostras foram determinadas pelo método colorimétrico de Goodwin modificado (GOODWIN *et al.*, 1966), utilizando o kit Labtest®. Para isso, foram utilizados 50µl da amostra e as leituras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda 560nm. Os tubos utilizados na manipulação das amostras durante os procedimentos foram de plástico e descartável, para evitar a contaminação com traços de ferro. Na análise do ferro sérico, o ferro é liberado da transferrina em meio ácido tamponado e na presença de ácido tioglicólico é reduzido a Fe^{+2} . O íon reduzido liga-se ao reagente de cor (ferrozine), formando um complexo molecular de coloração rosa, cuja intensidade da cor produzida é diretamente proporcional à concentração de ferro na amostra. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{L}$ (Figura 17).

Método colorimétrico de Goodwin modificado

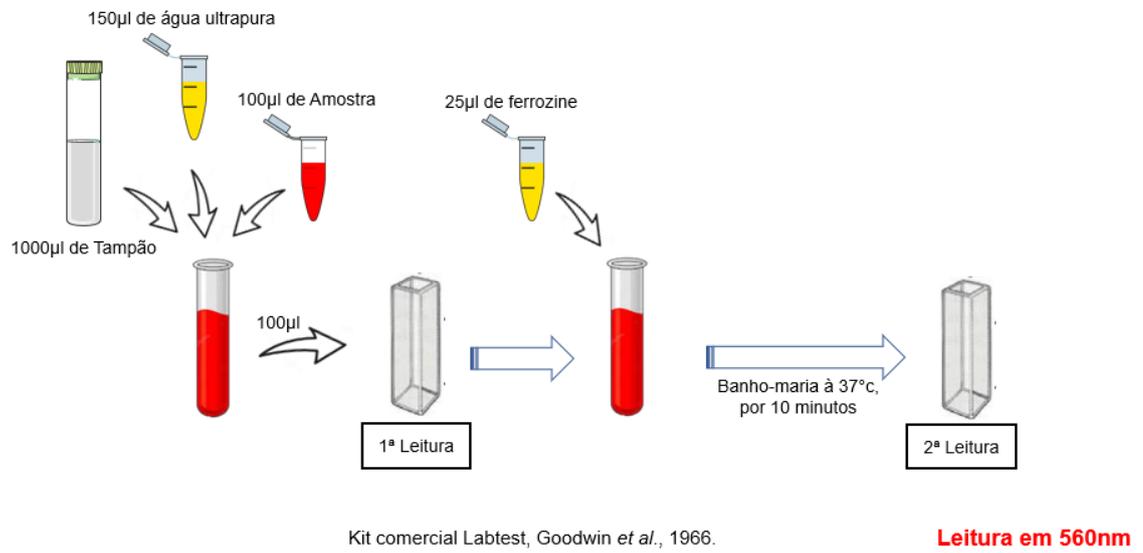


Figura 17 - Representação esquemática da determinação das concentrações de ferro.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em relação aos parâmetros bioquímicos e oxidativos os resultados obtidos foram submetidos a quatro análises diferentes, sendo a primeira a análise dos pontos discrepantes (*outliers*), tendo sido utilizado o cálculo do intervalo interquartílico. Seguido da análise do tipo de dispersão através do teste de Levene. Em seguida da análise multivariada, quando distribuição normal fizemos uso de ANOVA de uma via e se distribuição não normal utilizamos Kuskal Wallis e por último a análise Post-Hoc com o método Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

Em relação aos resultados obtidos no labirinto aquático de Morris, procedeu-se inicialmente com remoção dos pontos discrepantes, conforme descrito nos parâmetros bioquímicos e oxidativos, em seguida foi aplicado a análise do tipo de dispersão através do teste Kolmogorov-Smirnov, em seguida foi aplicado o ANOVA de uma via e como Post-Hoc foi utilizado a teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Metemoglobina e parâmetros oxidativos sanguíneos.

6.1.1 METEMOGLOBINA

A Figura 18 mostra o efeito sobre a formação de metemoglobina após 10 dias consecutivos de tratamento com DDS na presença ou não de DFX. Os resultados demonstram que o tratamento com DDS levou a um aumento no percentual de metemoglobina quando comparado ao controle ($p < 0,0001$), e o tratamento associado do quelante de ferro, DFX, com o DDS não foi capaz de alterar este aumento de metemoglobina induzida por DDS. Os animais controles e os tratados somente com DFX não apresentaram alteração nos percentuais de metemoglobina.

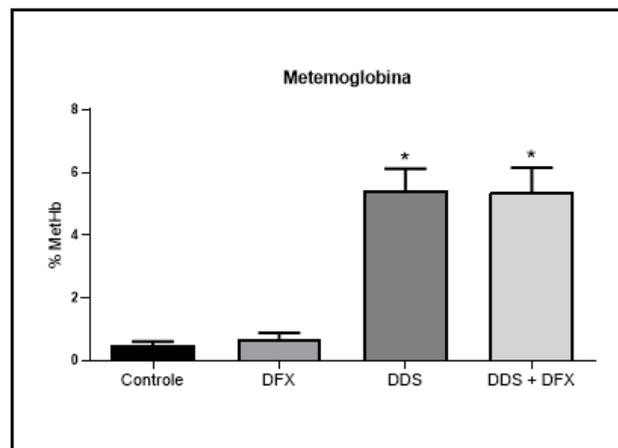


Figura 18 - Efeito do tratamento com DFX sobre o percentual de metemoglobina em animais tratados com DDS. Os dados expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Controle. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. %MetHb, Percentual de metemoglobina. DDS, Dapsona. DFX, Deferoxamina. DDS+DFX. Dapsona + Deferoxamina.

6.1.2 FERRO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A Figura 19 mostra o efeito dos tratamentos DDS e DDS+DFX sobre os níveis de ferro **(a)** e LPO **(b)** plasmático. Os resultados demonstrados na Figura 19 (a), mostraram que os animais tratados por 10 dias com DDS apresentaram aumento nos níveis de ferro plasmático quando comparado ao Grupo Controle ($p < 0,0001$). O Grupo tratado simultaneamente com DDS + DFX apresentou redução nos níveis de

Ferro plasmático comparado ao grupo DDS, similar aos animais Controles. Os grupos controle e tratado somente com DFX (Grupo DFX) não apresentaram alteração nos níveis de ferro plasmático.

A Figura 19 **(b)** mostra que os animais tratados com DDS (Grupo DDS) apresentaram aumento nos níveis de LPO comparado ao Grupo Controle ($p < 0,0001$). O grupo tratado com DDS + DFX apresentou redução nos níveis de LPO comparado ao Grupo DDS, com valores similares aos animais Controles. Os grupos controle e tratado somente com DFX não apresentaram alteração nos níveis de LPO plasmático.

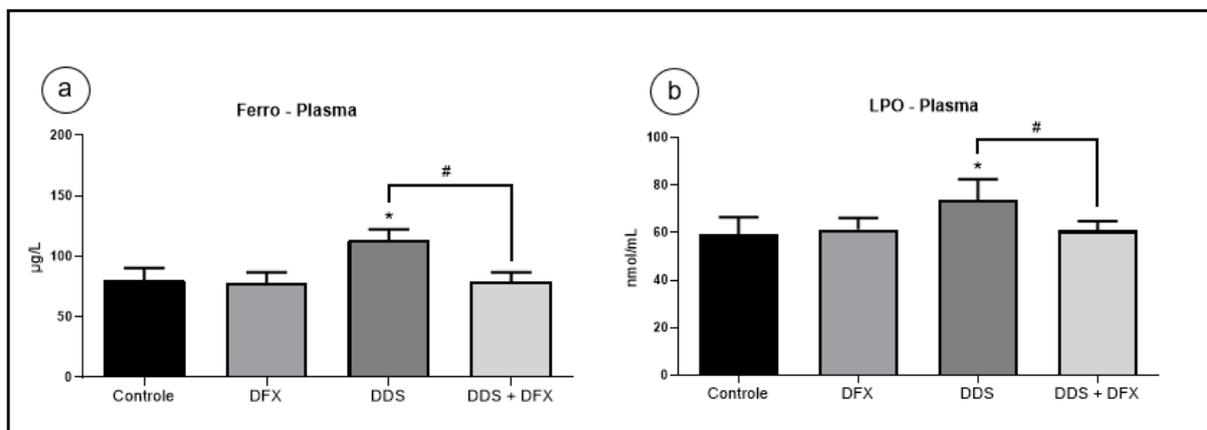


Figura 19 (a) Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de Ferro plasmático de animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de LPO no plasma de animais tratados com DDS. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Controle. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. LPO, Peroxidação lipídica. DDS, Dapsona. DFX, Deferoxamina. DDS+DFX. Dapsona e Deferoxamina.

6.1.3 NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES

A Figura 20 mostra o efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de GSH **(a)** e TEAC **(b)** no plasma. A Figura 20a mostra que os animais tratados por 10 dias com DDS apresentaram diminuição na concentração de GSH no plasma comparado aos animais Controle ($p < 0,0001$). O tratamento simultâneo de DDS + DFX elevou os níveis de GSH comparado ao Grupo DDS, retornando aos valores dos animais controles. O grupo tratado somente com DFX (Grupo DFX) não apresentou alteração nos níveis de GSH no plasma comparado ao Grupo Controle.

A Figura 20 **(b)** mostra que todos os animais tratados (Grupos: DDS, DDS+DFX ou somente DFX) não apresentaram diferença estatística na capacidade antioxidante total (TEAC) comparada ao Grupo Controle.

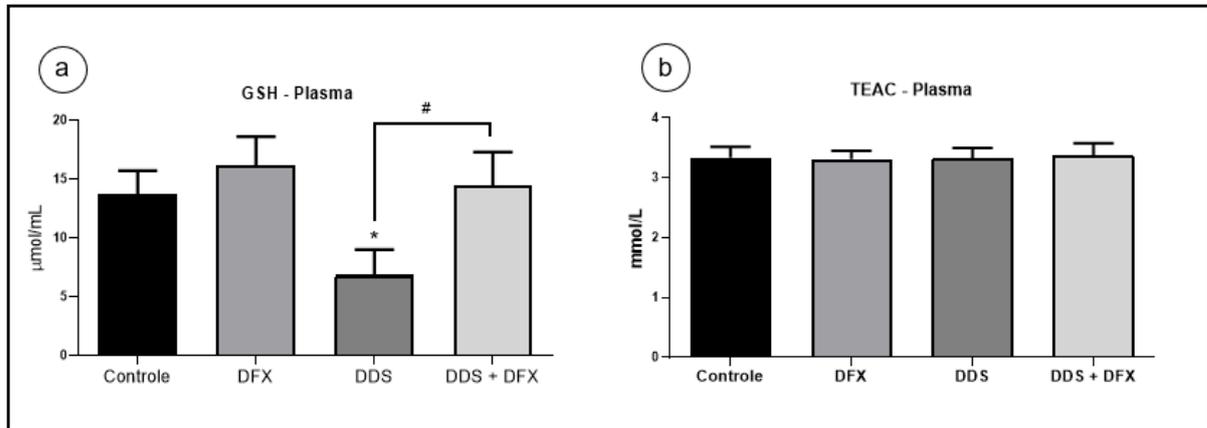


Figura 20 (a) Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis GSH no plasma de animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de TEAC no plasma de animais tratados com DDS. Os dados expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Controle. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. GSH, Glutathiona reduzida. TEAC, Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. DDS, Dapsona. DFX, Deferoxamina. DDS+DFX, Dapsona e Deferoxamina.

6.2 Parâmetros oxidativos no hipocampo

6.2.1 FERRO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A Figura 21 mostra o efeito dos tratamentos DDS e DDS+DFX sobre os níveis de ferro **(a)** e LPO **(b)** no Hipocampo. Na Figura 19 (a), pode-se observar que os animais tratados por 10 dias com DDS apresentaram aumento nos níveis de ferro no hipocampo quando comparado ao Grupo Controle (* $p < 0,0001$). O Grupo tratado com DDS + DFX apresentou redução nos níveis de Ferro no hipocampo comparado aos grupos controle e DDS. O grupo tratado somente com DFX (Grupo DFX) não apresentou alteração nos níveis de ferro no hipocampo comparado ao grupo controle.

A Figura 19 **(b)** mostra que os animais tratados com DDS (Grupo DDS) apresentaram aumento nos níveis de LPO no hipocampo comparado ao Grupo Controle (* $p < 0,0001$). O grupo tratado com DDS + DFX apresentou redução nos níveis de LPO comparado ao Grupo DDS, com valores similares aos animais

Controles. O grupo tratado somente com DFX não apresentou alteração nos níveis de LPO plasmático no hipocampo, similar ao grupo controle.

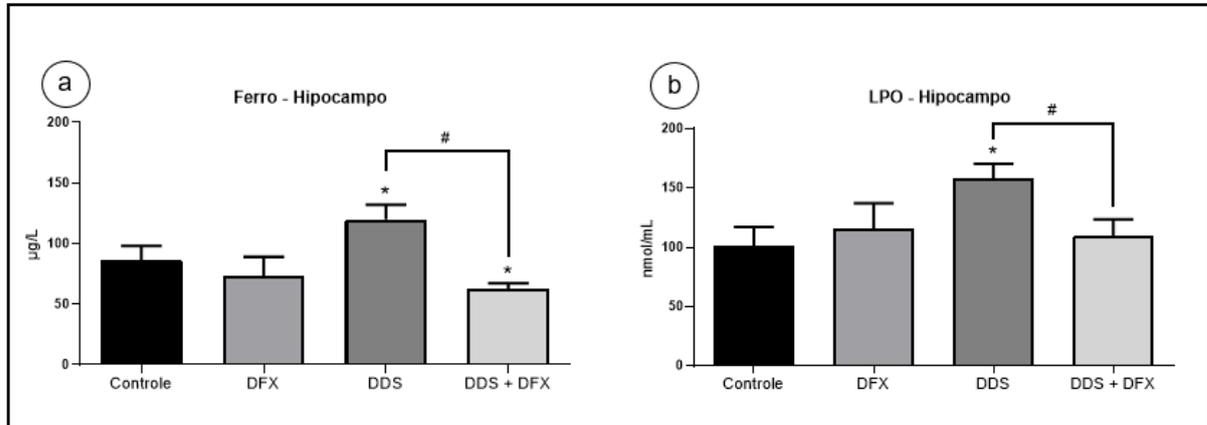


Figura 21 (a) Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de Ferro no hipocampo de animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de LPO no hipocampo de animais tratados com DDS. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Controle. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. LPO, Peroxidação lipídica. DDS, Dapsona. DFX, Deferoxamina. DDS+DFX. Dapsona e Deferoxamina.

6.2.2 NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES

A Figura 22 mostra o efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de GSH **(a)** e TEAC **(b)** no hipocampo. A Figura 22a mostra que os animais tratados por 10 dias com DDS apresentaram diminuição nos níveis de GSH no hipocampo comparado aos animais Controle (* $p < 0,0001$). O tratamento simultâneo de DDS + DFX elevou os níveis de GSH comparado ao Grupo DDS, retornando aos valores dos animais controles. O grupo tratado somente com DFX não apresentou alteração nos níveis de GSH no plasma comparado ao Grupo Controle.

A Figura 22 **(b)** mostra que os animais tratados com DDS apresentaram redução significativa na capacidade antioxidante no hipocampo quando comparada aos animais Controle (* $p = 0,0010$). O grupo DDS + DFX apresentou níveis de TEAC similar ao grupo controle, mostrando que o tratamento com DFX foi capaz de reverter a redução na capacidade antioxidante induzida pelo DDS, retornando aos valores dos animais controles. O grupo tratado somente com DFX não apresentou alteração nos níveis de GSH no plasma comparado ao Grupo Controle.

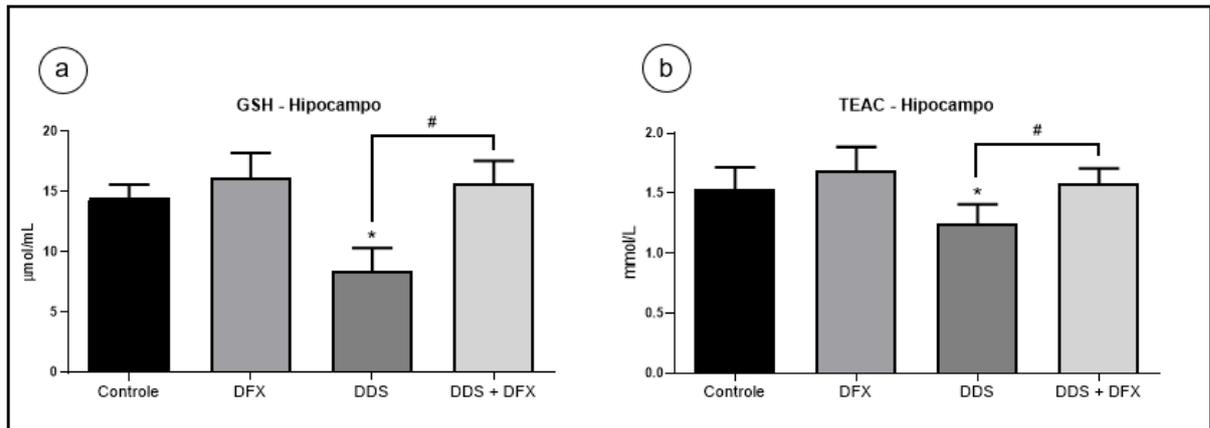


Figura 22 (a) Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis GSH no hipocampo de animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre os níveis de TEAC no hipocampo de animais tratados com DDS. Os dados expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Controle. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. GSH, Glutathiona reduzida. TEAC, Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. DDS, Dapsona. DFX, Deferoxamina. DDS+DFX, Dapsona e Deferoxamina.

6.3 Análise de parâmetros cognitivos em modelo de Labirinto aquático de Morris

6.3.1 AVALIAÇÃO DE APRENDIZADO (LATÊNCIA - FASE DE TREINO)

A Figura 23 mostra o efeito após 10 dias de tratamento com DDS e/ou DDS + DFX sobre o tempo de latência para acesso a plataforma submersa durante os quatro treinos no período de treinamento (aquisição). Este parâmetro tem sido utilizado para avaliar a capacidade em que os indivíduos expostos ao teste apresentam a capacidade em aprender e desenvolver o nado. Neste sentido, ficou evidente que o tratamento com DDS (Grupo DDS) não foi capaz de induzir um comprometimento motor que viesse a comprometer o nado, visto que não houve diferença estatística entre os grupos testados.

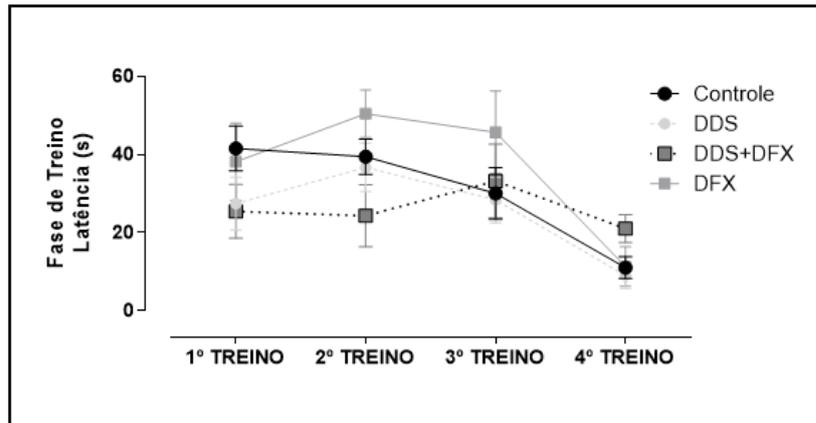


Figura 23 - Efeito do tratamento com DFX sobre a Latência em segundos durante a fase de treino em animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. Os dados expressos como média \pm desvio padrão. DDS, Grupo DDS. DFX, Grupo DFX. DDS+DFX. Grupo DDS + DFX.

6.3.2 MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO

A Figura 24 **(a)** mostra o tempo no quadrante alvo (quadrante VI), local onde continha a plataforma submersa durante a fase de aquisição de memória (treino), este parâmetro tem sido usado como padrão na identificação de processos de memória de curta duração onde um maior tempo neste quadrante tem sido correlacionado a uma boa condição de memória espacial, enquanto que uma redução do tempo neste quadrante é correlacionado a uma possível alteração no processo de formação de memória. Neste sentido, a Figura 24 **(a)** mostra o efeito do tratamento com DFX sobre o tempo no quadrante alvo (Quadrante VI), no teste de memória de curta duração, em que os animais tratados por 10 dias com DDS (Grupo DDS) apresentaram uma diminuição no tempo em que permaneceram no quadrante alvo comparado ao grupo controle ($*p \leq 0,05$). No entanto, os animais tratados com DDS e DFX simultaneamente apresentaram maior tempo de permanência no quadrante alvo comparado aos demais grupos. Neste contexto, ficou evidente uma redução significativa no processo de formação de memória de curta duração nos animais submetidos ao tratamento com DDS, e o tratamento com DFX foi capaz de reverter e/ou inibir as alterações induzidas pelo tratamento com DDS.

A Figura 24 **(b)** mostra a latência de 1ª entrada no quadrante alvo este parâmetro é considerado como padrão na identificação de alterações no processo de formação de memória de curta duração, assim como o tempo no quadrante alvo. Um tempo menor de acesso ao quadrante alvo indica um bom processo de formação de

memória enquanto um maior tempo indica alterações no processo de formação de memória. Neste contexto, a Figura 24 **(b)** mostra que os animais tratados com DDS apresentaram um tempo maior de acesso ao quadrante alvo quando comparado ao grupo Controle ($^*p \leq 0,05$), no teste de memória de curta duração. No entanto, o grupo tratado simultaneamente com DDS e DFX apresentou redução no tempo de acesso ao quadrante alvo ($^*p \leq 0,05$), retornando a valores similar ao grupo controle, demonstrando que o tratamento com DFX foi capaz de reverter e/ou inibir a redução significativa no processo de formação de memória de curta duração induzido pelo tratamento com DDS. Além disto, o grupo tratado somente com DFX (grupo DDS+DFX) não mostrou diferença estatística ao grupo controle.

A Figura 24 **(c)** mostra a velocidade média dos indivíduos submetidos ao teste durante o nado, onde este parâmetro pode ser utilizado para a avaliação de possíveis alterações motoras que possam dificultar ou inviabilizar o nado. Neste sentido, a Figura 24 **(c)** mostra que não houve diferença estatística entre os grupos avaliados, demonstrando que os tratamentos com DDS e/ou DDS+DFX não foram capazes de induzir alterações significativas que comprometessem a função motora dos animais.

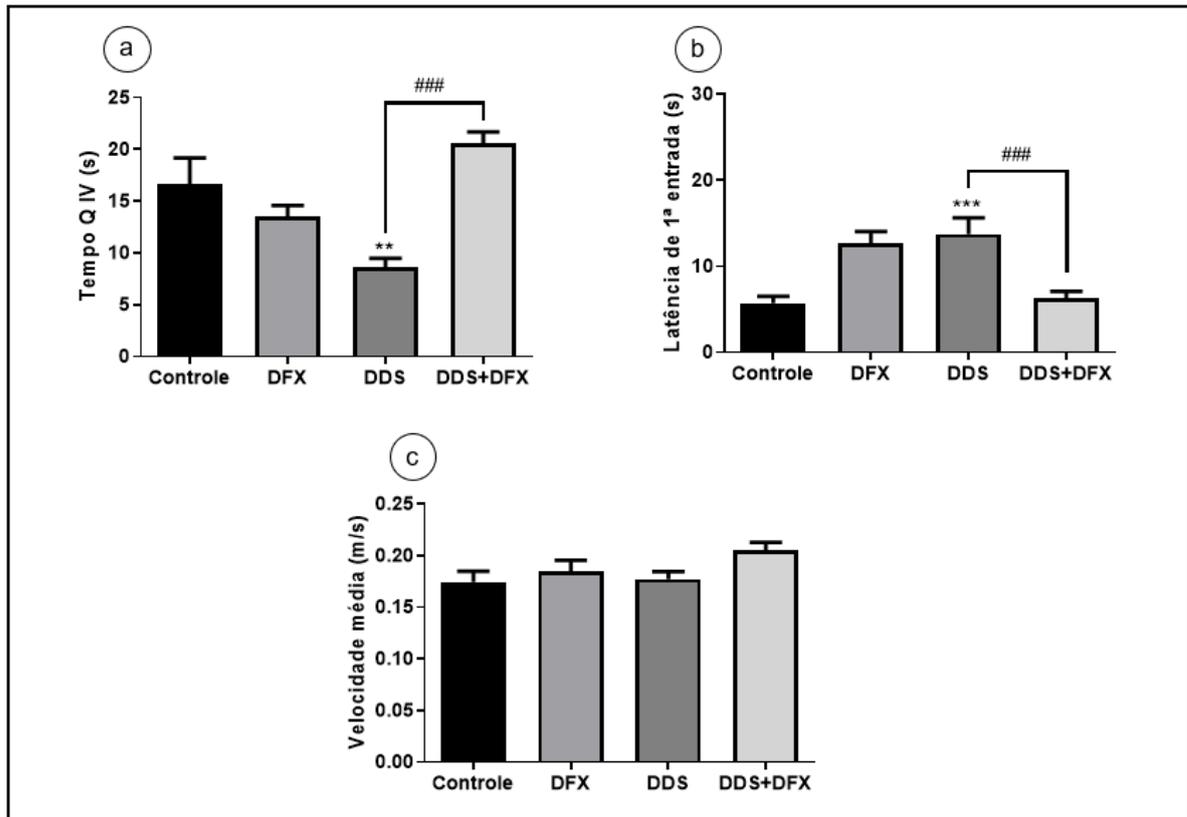


Figura 24 (a) Efeito do tratamento com DFX sobre o tempo no quadrante alvo (Q IV) de animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre a latência de primeira entrada no quadrante alvo de animais tratados com DDS. **(c)** Efeito do tratamento com DFX sobre a velocidade média de nado de animais tratados com DDS. Os dados expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Controle. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. DDS, Grupo DDS. DFX, Grupo DFX. DDS+DFX, Grupo DDS + DFX.

6.3.3 MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO

A Figura 25 **(a)** mostra o tempo no quadrante alvo (quadrante VI), local que contém uma plataforma submersa durante a fase de aquisição de memória (treino), este parâmetro tem sido usado como padrão na identificação de processos de memória de longa duração, no qual um maior tempo neste quadrante está correlacionado a uma boa condição de memória espacial, enquanto uma redução do tempo neste quadrante é correlacionada a uma possível alteração no processo de formação de memória. Neste sentido, a Figura 25 **(a)** que os animais tratados por 10 dias com DDS apresentaram diminuição no tempo em que permaneceram no quadrante alvo comparado ao grupo controle (* $p \leq 0,05$), enquanto que os animais que receberam tratamento simultâneo de DDS e DFX apresentaram tempo de permanência no quadrante alvo similar aos animais controles. Neste contexto, ficou

evidente uma alteração significativa no processo de formação de memória de longa duração nos indivíduos submetidos ao tratamento com DDS e que o tratamento com DFX reverteu esta alteração na memória de longa duração. Além disto, não houve diferença estatística em os grupos controle e tratamento somente com DFX, mostrando o DFX não leva a danos na memória de longa duração.

A Figura 25 **(b)** mostra a latência de 1ª entrada no quadrante alvo este parâmetro é considerado como padrão na identificação de alterações no processo de formação de memória, assim como o tempo no quadrante alvo. Um tempo menor de acesso ao quadrante alvo indica um bom processo de formação de memória e um maior tempo indica alterações no processo de formação de memória. Neste contexto, a Figura 25 **(b)** mostra que os animais tratados com DDS (Grupo DDS) apresentaram um tempo maior para acessar ao quadrante alvo comparado ao grupo Controle ($*p \leq 0,05$), no teste de memória de curta duração. Entretanto, o grupo tratado com DDS e DFX simultaneamente apresentou uma redução no tempo de acesso ao quadrante alvo ($^{\#}p \leq 0,05$), retornando aos valores dos animais controles, demonstrando assim que o tratamento com DFX foi capaz de reverter e/ou inibir os danos na memória de curta duração induzido pelo tratamento com DDS. Além disso, nota-se que não houve diferença estatística em os grupos controle e DFX, mostrando o DFX não leva a danos na memória de curta duração.

A Figura 25 **(c)** mostra a velocidade média dos indivíduos submetidos ao teste durante o nado, onde este parâmetro pode ser utilizado para a avaliação de possíveis alterações motoras que possam dificultar ou inviabilizar o nado. Neste sentido, a Figura 25 **(c)** mostra que não houve diferença estatística entre os grupos avaliados, demonstrando que os tratamentos com DDS e ou DFX não foram capazes de induzir alterações significativas que compromettesse a função motora dos animais.

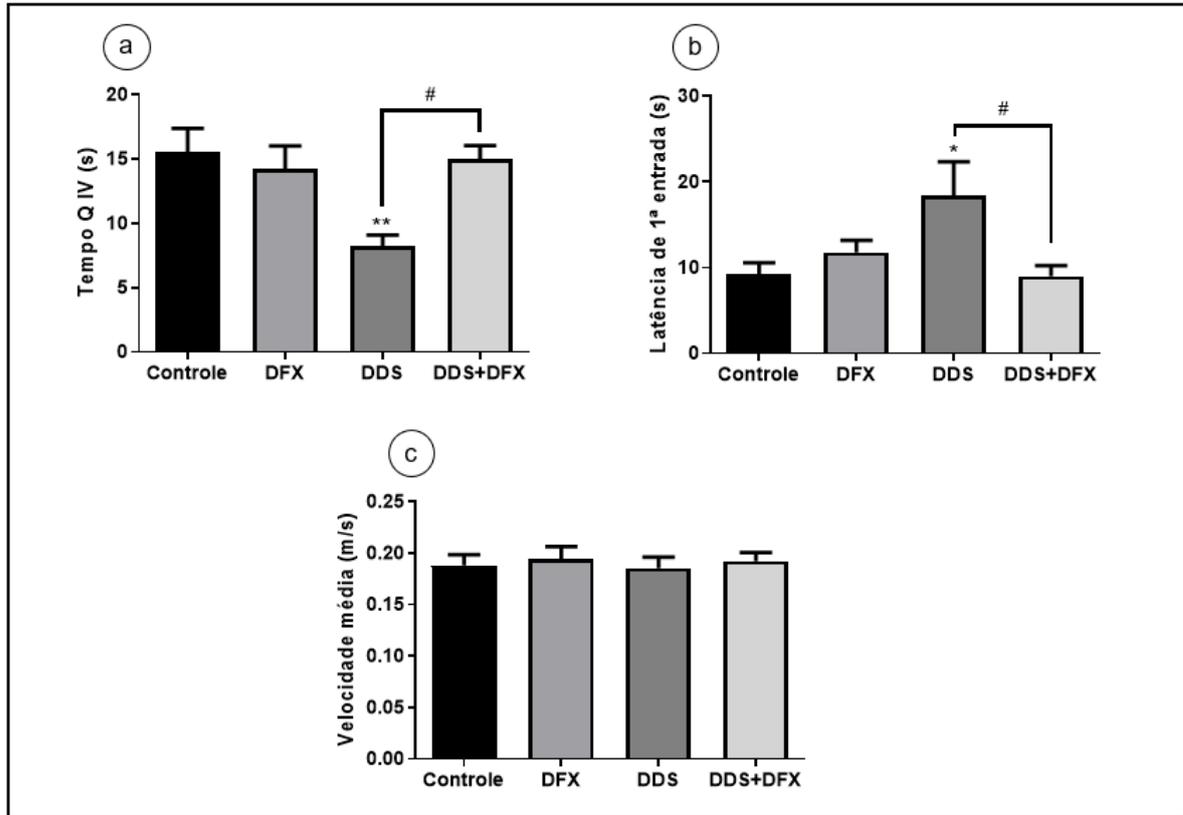


Figura 25 (a) Efeito do tratamento com DFX sobre o tempo no quadrante alvo (Q IV) de animais tratados por 10 dias consecutivos com DDS. **(b)** Efeito do tratamento com DFX sobre a latência de primeira entrada no quadrante alvo de animais tratados com DDS. **(c)** Efeito do tratamento com DFX sobre a velocidade média de nado de animais tratados com DDS. Os dados expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Controle. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. DDS, Grupo DDS. DFX, Grupo DFX. DDS+DFX, Grupo DDS + DFX.

7 DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste estudo, evidenciam que o regime de tratamento com doses diárias de DDS 10mg/kg diminuiu os níveis de GSH e de TEAC no hipocampo dos animais tratados com este fármaco. Todavia, este efeito foi reduzido e/ou revertido com a administração de DFX 40mg/kg. Além disso, o tratamento com DDS induziu aumento no acúmulo de ferro e da peroxidação lipídica no plasma e no hipocampo. Por outro lado, o tratamento com o quelante de ferro (DFX) foi capaz de inibir o acúmulo de ferro no hipocampo e do aumento dos níveis de ferro no plasma, assim como inibir o aumento na peroxidação lipídica (LPO) induzido pelo tratamento com DDS. Adicionalmente a isto, ficou evidenciado através dos resultados dos ensaios no MWM que o tratamento com DDS reduziu a memória espacial, de curto e de longo prazo, e que o tratamento com DFX foi capaz de evitar e/ou reverter os efeitos desencadeados pelo tratamento com DDS.

Os resultados apresentados permitem validar a metodologia aplicada neste estudo. Assim como, demonstraram evidências do potencial oxidativo da DDS semelhante ao que foi demonstrado em estudo clínico realizado por Schalcher *et al.* (2014) em outro trabalho deste grupo de pesquisa, e estes resultados se devem aos metabolitos hidroxilados da DDS (DDS-NOH e MADDS-NOH) que apresentam efeitos pró-oxidantes e que tem sido relacionados aos principais eventos adversos relacionados ao uso de DDS, especialmente a metemoglobinemia e a anemia hemolítica (RIEDER *et al.*, 1988; RIMOLI, 2000; SCHALCHER *et al.*, 2014).

A anemia hemolítica mediada por DDS está relacionada as alterações da membrana dos eritrócitos que levam à prematura precoce destas células, sejam estas de forma extravascular pela remoção no baço de células danificadas ou de forma intravascular pela fragilidade induzida pela DDS, estes efeitos hematotóxicos observados durante a terapia são ocasionados pelos metabolitos hidroxilados da DDS, sendo eles a DDS-NOH e MADDS-NOH, estes metabolitos são encontrados de forma mais acentuadas em paciente com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), estudos *in vitro* conduzidos por Ciccoli *et al.* (1999) e Reilly *et al.* (2000) demonstraram o efeito hematotóxico destes metabólitos, contudo a forma DDS-NOH é a mais relacionada à formação de MetHb e diminuição da concentração de GSH. Nesse sentido, a GSH apresenta um papel fundamental na regulação do equilíbrio redox do organismo e também do eritrócito, atuando na remoção de ERO.

Neste contexto, o papel crucial da G6PD nos eritrócitos é fornecer NADPH e manter um suprimento adequado de GSH. Visto que o NADPH atua junto a Glutathiona redutase (GR) na redução da glutathiona oxidada (GSSH) em GSH. Fator imprescindível na regulação dos efeitos oxidativos das espécies reativas de oxigênio (OLIVEIRA *et al.*, 2014; LEE e GEETHA, 2015). Na deficiência de G6PD os eritrócitos são mais facilmente expostos a um desafio oxidativo e os níveis de GSH sofrem depleção rapidamente, e com isto há uma menor defesa contra a ação das EROS (COLEMAN, 1993).

A ação metemoglobinizante da dapsona parece estar relacionada, à sua conversão metabólica a DDS-NOH e MADDS-NOH. Estes metabolitos são responsáveis pela formação de metemoglobina e pelo consumo da GSH, visto que está última é consumida durante a oxidação de dapsona nitroso (DDS-NO) a DDS-NOH, a dapsona hidroxilamina oxida a hemoglobina em metemoglobina e com isto o ciclo só é interrompido com a depleção de GSH e quando isto ocorre reduz a formação de metemoglobina (COLEMAN, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2014). De acordo com Bradshaw *et al.* (1997) estes mecanismos podem levar a anemia hemolítica.

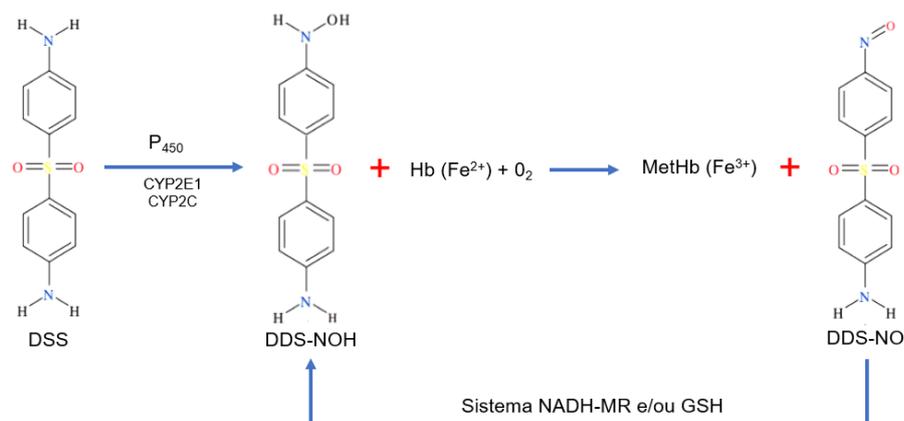


Figura 26 - Mecanismo de oxidação de hemoglobina por ação de dapsona hidroxilamina. DDS, Dapsona; DDS-NOH, Dapsona hidroxilamina; DDS-NO, Dapsona nitrosoareno; P₄₅₀, Citocromo P₄₅₀; NADH-MR, NADH-metemoglobina redutase. Fonte: adaptado de GILL *et al.*, 1995.

Em nosso modelo experimental, a administração de DDS foi capaz de induzir a formação de MetHb nos eritrócitos dos animais tratados com este fármaco durante 10 dias. Corroborando com os resultados encontrados no estudo clínico conduzido por Schalcher *et al.* (2014). Diante disto, ficou evidente as propriedades metemoglobinizantes da DDS, e que tais efeitos se devem as alterações no equilíbrio

redox, estas alterações podem promover complexas alterações dentre elas na homeostasia do ferro e na defesa antioxidante que podem levar toxicidade e inflamação. De maneira semelhante Coleman *et al.* (1996) e Albuquerque *et al.* (2015), em estudo *in vitro*, demonstraram a capacidade de DDS-NOH em induzir a formação de MetHb podendo alcançar valores superiores a 45%. Outro aspecto observado nestes estudos foi a redução de GSH em eritrócitos. Coleman (1995) relata que as alterações nestes biomarcadores são dose-dependente e que estes efeitos são encontrados na dose de 100mg/dia, que é comumente utilizada no tratamento da hanseníase.

No sistema nervoso central (SNC), a DDS pode provocar danos oxidativos em células e no tecido nervoso, visto que suas propriedades físico-químicas conferem à molécula um baixo peso molecular e alta lipossolubilidade, estas características proporcionam a DDS a capacidade de se difundir facilmente pelo SNC (GATTI *et al.*, 1997). No entanto, até o momento, contamos com poucos estudos em relação a estes possíveis danos no SNC. Entretanto Sadeghi *et al.* (2016) demonstraram associação entre o estresse oxidativo e o acúmulo de ferro no hipocampo, e esta sobrecarga de ferro apresenta uma forte correlação ao aumento na peroxidação lipídica que podem levar a ativação de vias apoptóticas.

O cérebro tem sido considerado um dos principais órgãos geradores de ERO. No entanto, é mais sensível a estas alterações oxidativas por possuir menor atividade de enzimas antioxidantes. Além disto, possui elevada quantidade de lipídios com ácidos graxos insaturados, estes são alvos das ERO formadas neste tecido e esta interação pode levar a um aumento na peroxidação lipídica. Em condições normais, o cérebro consegue equilibrar a geração de ERO com a defesa antioxidante. Contudo, em condições adversas pode ocorrer uma produção excessiva de ERO e/ou uma redução no sistema antioxidante, o que pode desencadear aumento na peroxidação de lipídios, e com isto causar neurodegeneração. Em função disto, algumas doenças neurodegenerativas apresentam forte correlação com a redução de glutathiona. Desta forma, apresentando um papel crítico na defesa antioxidante no SNC (AOYAMA *et al.*, 2011).

Outro aspecto de grande importância neste estudo foi a redução dos níveis de GSH nos animais tratados com Dapsona (Grupo DDS). No entanto, esta redução foi revertida nos grupos tratados com DDS+DFX (Grupo DDS+DFX). Neste contexto, Coleman *et al.* (1996) demonstraram que metabólitos hidroxilados da DDS foram

capazes de induzir a formação de metemoglobina em elevadas proporções (acima de 45%) e a redução de GSH em eritrócitos sadios. Burke *et al.* (2013) descreveram o efeito semelhante em paciente submetido a terapia com DDS, onde os efeitos desapareceram com a suspensão do tratamento. Situação semelhante também foi descrito por Valsan *et al.* (2018) quando dois pacientes em tratamento de trombocitopenia imune fizeram uso de DDS e apresentaram sintomas clínicos compatíveis com metemoglobinemia. Tais como, saturação de oxigênio com valores próximos a 80% e cianose, tendo estes sintomas desaparecidos com a suspensão do tratamento com a DDS.

A capacidade antioxidante total reflete de forma inespecífica os diversos mecanismos relacionados as vias antioxidantes, sejam estes endógenos ou exógenos. Neste contexto, a GSH é o antioxidante endógeno em maior concentração e o aumento no consumo deste no processo oxirredução da DDS-NO em DDS-NOH pode proporcionar uma redução na capacidade antioxidante total do sistema. Em nosso estudo, o tratamento com DDS induziu o consumo aumentado de GSH, e este mecanismo pode ter sido o responsável pela redução na capacidade antioxidante no hipocampo de animais tratados com DDS. No entanto, o tratamento com DFX foi capaz de inibir o consumo aumentado de GSH, fazendo com que a capacidade antioxidante fosse estatisticamente semelhante ao grupo controle. Adicionalmente a isto, foi observado que não houve redução da capacidade antioxidante no plasma, semelhante ao resultado encontrado no trabalho de Sakai (2018), em outro trabalho de nosso grupo, onde ficou demonstrado que 24 horas após a última administração de DDS os mecanismos de defesa antioxidante conseguem restabelecer a capacidade antioxidante apesar da redução nos níveis de GSH.

A homeostasia do ferro tem um papel imprescindível no equilíbrio de oxirredução, de modo que a alteração na homeostasia deste metal pode levar reações de produção de ERO, como o radical $\bullet\text{OH}$, que podem se propagar e levar por consequência a danos celulares e teciduais (EGAÑA *et al.*, 2003; SCHIFF *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2018). Desta forma, este estudo mostrou que o tratamento com DDS 10mg/kg aumentou as concentrações de ferro no hipocampo de camundongos tratados com este fármaco, resultado este que ratifica que as propriedades pró-oxidantes da DDS estão relacionadas a hemólise e que com isto promovem a liberação de heme e ferro livre no plasma, e este ferro livre pode catalisar reações

oxidativas e estas reações levam a danos teciduais (YAN *et al.*, 2018; MASALDAN *et al.*, 2019).

Ficou evidenciado também que os níveis de ferro e de peroxidação lipídica (LPO) estão aumentados no grupo tratado com DDS. Por outro lado, estes valores foram reduzidos no grupo tratado com DDS+DFX (Grupo DDS + DFX). Diante disto, ficou evidente que a alteração da homeostasia do ferro ocasionada pela hemólise e liberação do ferro livre em decorrência do tratamento com DDS, e este aumento de ferro livre pode catalisar e/ou favorecer a formação de ERO através da reação de Fenton e Waber-Weiss. Com isto, estas espécies reativas formadas, em especial hidroxila ($\bullet\text{OH}$), tendem a promover a peroxidação de lipídeos de membrana que podem levar a alteração na membrana e com isto levar a perda de função celular e/ou até mesmo a apoptose ou ferroptose.

Neste sentido, Ciccoli *et al.*, (1999) correlacionaram o dano provocado pelo aumento nos níveis de ferro e o aumento na formação de ERO ao potencial catalítico do ferro na geração de ERO e como consequência o estresse oxidativo que pode proporcionar danos em biomoléculas e desta forma levar a danos celulares e teciduais.

Nossos resultados corroborando com os resultados de Cook e Yu (1998) que demonstraram em trabalhos com ratos Fischer que o acúmulo de ferro nos tecidos, incluindo o cérebro, aumenta com a idade do animal o mesmo ocorre com a peroxidação lipídica, diante disto sugere-se que este acúmulo de ferro não ligado a transferrina apresenta uma forte correlação com o aumento na peroxidação lipídica. Knutson *et al.* (2000) demonstraram que a suplementação de ferro em ratos Sprague-Dawley levou a uma sobrecarga de ferro, e esta levou há um aumento significativo na peroxidação lipídica. Mimić-Oka *et al.* (2005) demonstraram em estudo clínico que a suplementação de ferro e a consequente saturação da transferrina e os altos níveis de ferro em função da suplementação podem agravar o estresse oxidativo e promover uma redução da capacidade antioxidante em pacientes realizando hemodiálise, onde a suplementação de ferro é amplamente recomendada.

Alcalde *et al.* (2018) demonstraram, em modelo murinho, que a sobrecarga de ferro induz ao declínio persistente de memória, reduz os níveis de antioxidantes aumenta o estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios. Além disto, reduz os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que desempenha um papel imprescindível na consolidação da memória. E que tais efeitos são revertidos com o

tratamento com quelante de ferro, a Deferiprona. Heldt *et al.* (2007) demonstraram que a depleção de BDNF no hipocampo reduz a capacidade de reconhecimento de objetos e aprendizado espacial.

Carboni *et al.* (2017) demonstraram que os animais suplementados com ferro após o nascimento apresentaram comprometimento na habilidade de aprendizado e no reconhecimento de objetos, e que animais tratados com quelante de ferro (deferiprona) após a suplementação de ferro apresentaram melhora significativa no desempenho das duas tarefas. De Lima *et al.* (2008) e De Lima *et al.*, (2007) demonstraram que a terapia com DFX foi capaz de reverter o comprometimento de memória de reconhecimento induzida pela sobrecarga de ferro. Assim como, uma melhora nos déficits cognitivos e no estresse oxidativo associados ao acúmulo de ferro no envelhecimento. Neste contexto, Ayton *et al.* (2018) demonstraram que o ferro pode facilitar a deposição de A β na doença de Alzheimer e acelerar o processo da doença.

Estudos clínicos conduzidos por Ayton *et al.* (2018) sugeriram que a elevação da taxa de ferritina pode ser um indicativo de aumento na concentração de ferro cerebral, demonstrando forte correlação com a deposição de proteína amiloide na doença de Alzheimer (DA). Neste contexto, o ferro férrico aumenta a agregação de proteína na placa A β . Atuando como um dos principais indutores da progressão da doença. Demonstrou a íntima correlação de níveis elevados de ferritina com a progressão acelerada da doença. No entanto, a ferritina é uma proteína de fase aguda que aumenta em condições inflamatórias, com isto o aumento na expressão desta proteína pode indicar inflamação ao invés de aumento na concentração de ferro. Em função disto, Plascencia-Villa e Perry (2018) demonstraram que a deposição de ferro no cérebro pode ter uma estreita correlação com a deposição de amiloide podendo ser usado como biomarcador alternativo para monitorar ou diagnosticar a DA, quando associados a técnicas de imagem cerebral e outros biomarcadores.

Número crescente de evidências científicas sugerem que a alteração da homeostasia do ferro pode contribuir para alterações neurodegenerativas, com isto o uso quelantes de ferro são capazes de reduzir a concentração de ferro em áreas que com concentrações de ferro livre, e que a terapia com estes fármacos pode prevenir ou retardar a progressão de doenças neurodegenerativas (DUSEK *et al.*, 2016). Neste sentido, o trabalho de Shachar *et al.*, (2004) demonstrou que o tratamento com quelante de ferro permeável a barreira hematoencefálica apresenta um efeito

neuroprotetor e que em função destas características pode ter aplicações clínicas nas doenças neurodegenerativas, onde se acredita que o acúmulo anormal de ferro no cérebro está associado a estes processos neurodegenerativos.

Adicionalmente a isto, foi realizado o labirinto aquático de Morris (MWM) para avaliar os efeitos mnemônicos induzidos pelo acúmulo de ferro, por este ser um método considerado padrão ouro na avaliação da aprendizagem e memória (espacial, de curto e de longo prazo) dependente do hipocampo, especialmente em camundongos (HELDT *et al.*, 2007; MORRIS *et al.*, 1982; SILVA *et al.*, 2015). Onde os animais foram submetidos a um ensaio de sondagem 4 e 24 horas após o último ensaio de aquisição. O teste MWM foi desenvolvido por Morris (1984) e aprimorado por Stewart e Morris (1993) para avaliar formas relacionadas de aprendizagem e memória. Neste teste, foi observado o tempo de acesso a plataforma submersa durante o período de treinamento (aquisição), que se correlaciona com o aprendizado, pois os animais devem apresentar redução no tempo de acesso a plataforma durante a fase de aquisição. O tempo gasto no quadrante alvo (IV) e o tempo de latência de chegada no quadrante alvo foram anotados como índice de recuperação (memória espacial / de curto e de longo prazo; BRANDEIS *et al.*, 1989; D'HOOGE e DE DEYN, 2001; SILVA *et al.*, 2015).

Os resultados dos ensaios de aquisição no teste MWM mostraram redução no tempo de acesso a plataforma submersa, sugerindo aumento na capacidade de aprendizagem dos animais testados. No ensaio da sonda de recuperação, após 4 e 24 horas, o tratamento com DDS exibiu redução da atividade mnemônica, indicada por um tempo mais curto gasto no quadrante alvo (Q IV) e maior tempo para chegar pela primeira vez no quadrante alvo (Q IV). Esses parâmetros servem como indicações de que o tratamento com DDS reduziu a memória espacial, de curto e de longo prazo. Além disto, ficou evidenciado que o tratamento com DFX foi capaz de evitar e/ou reverter os efeitos desencadeados pelo tratamento com DDS, visto que houve um aumento no tempo gasto no quadrante alvo (Q IV) e redução no tempo de chegada neste quadrante (BRANDEIS *et al.*, 1989; D'HOOGE e DE DEYN, 2001).

Em relação à memória espacial, nossos dados demonstraram que o tratamento com DDS reduziu a memória espacial em camundongos. Estudos anteriores relataram que as células locais do hipocampo são o principal substrato envolvido com as habilidades de memória espacial avaliadas por meio do teste MWM. Além disso, há

evidências que indicam a importância do hipocampo para a aquisição e recuperação de informações espaciais, bem como para consolidação / armazenamento (POUCET *et al.*, 2000; D'HOOGHE e DE DEYN, 2001). A redução de atividades mnemônicas (de curto e de longo prazo) induzida pelo tratamento com DDS pode ter sido desencadeado pelo aumento na concentração de ferro livre no hipocampo que levou a um aumento na peroxidação lipídica o que pode ter levado a danos no hipocampo, somando a isto, o tratamento o tratamento com DDS foi capaz de reduzir os níveis de GSH e da TEAC, tornando o hipocampo mais sensível aos danos visto que foi demonstrado uma redução nos seus mecanismos de defesa.

Nossos resultados fornecem novas evidências de que o tratamento que DDS pode induzir uma redução da aprendizagem e das atividades mnemônicas em camundongos, e que estes efeitos podem ser dose dependentes. Adicionalmente a isto, o tratamento com DFX foi capaz de reverter ou inibir os efeitos induzidos pelo tratamento com a DDS. Nossos resultados são semelhantes ao encontrado por LI *et al.* (2016) após a indução de alteração na homeostasia do ferro por indução cirúrgica no abdômen que provocou aumento na concentração de ferro no hipocampo, aumento da LPO e um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, levando a uma perda nas atividades mnemônicas observadas no MWM. Estes efeitos foram suprimidos com a administração de DFX após o procedimento cirúrgico. Sendo observado ainda que o tratamento com DFX melhorou as atividades mnemônicas.

Desse modo, o possível uso terapêutico de DFX depende das suas propriedades antioxidantes para prevenir a formação de ERO, e principalmente de suas propriedades quelantes, para remover as quantidades excessivas de ferro livre de regiões cerebrais mais sensíveis a esta sobrecarga, como o hipocampo. Desta forma, a DFX deve ser capaz de quelar o ferro livre no plasma sem ligar-se ao ferro ligado a transferrina e/ou no acúmulo deste metal nos tecidos, de modo a evitar que a sobrecarga de ferro livre possa se acumular em nos diversos órgãos e tecidos, em especial o hipocampo no sistema nervoso central. Por fim, acreditamos que a DFX pode ser uma alternativa terapêutica para evitar e progressão de danos induzidos pelo acúmulo de ferro no hipocampo e/ou na prevenção da neuropatia periférica induzida pelo *Mycobacterium leprae* e/ou pelo tratamento para o controle da infecção por este microrganismo.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo mostra as alterações oxidativas e cognitivas induzidas por dapsona que podem ser revertidas por quelante de ferro, como a DFX, em modelo animal. De acordo com nossos resultados, pode-se concluir que:

- O tratamento com DDS elevou o acúmulo de Ferro e o estresse oxidativo, avaliado pelos níveis de LPO, no Hipocampo e no sangue de animais tratados, assim como reduziu os níveis de fatores antioxidantes, como GSH e a capacidade antioxidante total no sistema nervoso. Além disso, o tratamento com DDS foi capaz de induzir danos cognitivos em animais, com comprometimento do aprendizado, memórias de curta e longa duração.

- Adicionalmente, o tratamento com DFX reduziu os efeitos oxidativos da DDS, levando a redução nos níveis de ferro e LPO no hipocampo e sangue de animais tratados com DDS, assim como reverteu a inibição de fatores antioxidantes como GSH e capacidade antioxidante total induzida por DDS, principalmente no sistema nervoso. Além disto, o tratamento com o quelante de ferro, a DFX foi capaz de reverter os danos cognitivos, em aprendizado e memórias de curta e longa duração, induzidos pelo DDS. Desta forma, pode-se inferir uma possível correlação entre o aumento na formação de ERO e acúmulo de Ferro no sistema nervoso, que podem estar associados a perda cognitiva em processos de memória ocasionada pelo uso de DDS. Com isso, estes dados, em conjunto, sugerem uma possível aplicação terapêutica da DFX no controle da progressão de doenças neurodegenerativas relacionadas ao acúmulo de ferro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, R. V. et al. In vitro protective effect and antioxidant mechanism of resveratrol induced by dapsone hydroxylamine in human cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1-25, 2015.

ALCALDE, L. A. et al. Iron chelator deferiprone rescues memory deficits, hippocampal BDNF levels and antioxidant defenses in an experimental model of memory impairment. **BioMetals**, v. 31, n. 6, p. 927-940, 2018.

ANNIGERI, S.; METGUD, S.; PATIL, J. Lepromatous leprosy of histoid type. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 70, 2007.

AOYAMA, K. et al. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. **Neuroscience**, v. 181, p. 206-215, 2011.

AYTON, S.; DIOUF, I.; BUSH, A. I. Evidence that iron accelerates Alzheimer's pathology: a CSF biomarker study. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 89, n. 5, p. 456-460, 2018.

BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus - Memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 273-283, 2004.

BARRES, B. A. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 430-440, 2008.

BARROS, P. D. et al. Development and evaluation of dapsone tablets coated for specific colon release. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 0, n. 0, p. 1-24, 17 jan. 2020.

BELAIDI, A. A.; BUSH, A. I. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 179-197, 2016.

BOSQUE, M. A.; DOMINGO, J. L.; CORBELLA, J. Assessment of the developmental toxicity of deferoxamine in mice. **Archives of Toxicology**, v. 69, n. 7, p. 467-471, 1995.

BRADSHAW, T. P. et al. Identification of free radicals produced in rat erythrocytes exposed to hemolytic concentrations of phenylhydroxylamine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 279-285, 1995.

BRADSHAW, T. P. et al. Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsone hydroxylamine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 7, p. 1183-1193, 1997.

BRANDEIS, R.; BRANDYS, Y.; YEHUDA, S. The Use of the Morris Water Maze in the Study of Memory and Learning. **International Journal of Neuroscience**, v. 48, n. 1-2, p. 29-69, 7 jan. 1989.

BUHL, R. et al. whether systemic glutathione immunodeficiency (HIV). p. 1294-1298, 1989.

BURKE, P.; JAHANGIR, K.; KOLBER, M. R. Dapsone-induced methemoglobinemia: Case of the blue lady. **Canadian Family Physician**, v. 59, n. 9, p. 958-961, 2013.

C VORHEES, M. W. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **National Institutes of Health**, v. 1, n. 2, p. 848-858, 2010.

CARBONI, E. et al. Deferiprone Rescues Behavioral Deficits Induced by Mild Iron Exposure in a Mouse Model of Alpha-Synuclein Aggregation. **NeuroMolecular Medicine**, v. 19, n. 2-3, p. 309-321, 2017.

CERBAI, F. et al. The Neuron-Astrocyte-Microglia Triad in Normal Brain Ageing and in a Model of Neuroinflammation in the Rat Hippocampus. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

CICCOLI, L. et al. Hemolytic drugs aniline and dapsone induce iron release in erythrocytes and increase the free iron pool in spleen and liver. **Toxicology Letters**, v. 110, n. 1-2, p. 57-66, 1999.

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

COLEMAN, M. D. Dapsone toxicity: Some current perspectives. **General Pharmacology**, v. 26, n. 7, p. 1461-1467, 1995.

COLEMAN, M. D. et al. Studies on the differential sensitivity between diabetic and non-diabetic human erythrocytes to monoacetyl dapsone hydroxylamine-mediated methaemoglobin formation in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 97-102, 1996.

COOK, C. I.; YU, B. P. Iron accumulation in aging: Modulation by dietary restriction. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 102, n. 1, p. 1-13, 1998.

D'HOOGE, R.; DE DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, n. 1, p. 60-90, 2001.

DE LIMA, M. N. M. et al. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 570, n. 1-3, p. 111-114, 2007.

DE LIMA, M. N. M. et al. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 7, p. 1052-1059, 2008.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 136-153, 2016.

DON, G. et al. Hemolysis and Anemia Induced by Dapsone Hydroxylamine. **Anemia**, n. May 2014, 2012.

DUSEK, P.; SCHNEIDER, S. A.; AASETH, J. Iron chelation in the treatment of neurodegenerative diseases. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 38, p. 81-92, 2016.

EGAÑA, J. T. et al. Iron-induced oxidative stress modify tau phosphorylation patterns in hippocampal cell cultures. **BioMetals**, v. 16, n. 1, p. 215-223, 2003.

ELLARD, G. A. et al. Dapsone Acetylation and the Treatment of Leprosy. **Nature**, v. 239, n. 5368, p. 159-160, set. 1972.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, maio 1959.

EVELYN, K.; MALLOY, H. Methemoglobin and Sulfhemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 126, p. 655-662, 1938.

FAA, G.; CRISPONI, G. Iron chelating agents in clinical practice. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 184, n. 1, p. 291-310, 1999.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.

FARHI, D. et al. Dapsone in dermatology. **EMC - Dermatologie-Cosmetologie**, v. 2, n. 2, p. 103-117, 2005.

FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V. Chelation in metal intoxication. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 7, p. 2745-2788, 2010.

FREITAS, G. C.; CARREGARO, A. B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciencia Rural**, v. 43, n. 2, p. 297-304, 2013.

GAASCH, J. A. et al. Brain iron toxicity: Differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 7, p. 1196-1208, 2007.

GAO, L. et al. Brain iron deposition analysis using susceptibility weighted imaging and its association with body iron level in patients with mild cognitive impairment. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 6, p. 8209-8215, 2017.

GATTI, G. et al. Penetration of dapsone into cerebrospinal fluid of patients with AIDS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 113-115, 1997.

GILL, H.; TINGLE, M.; PARK, B. N-Hydroxylation of dapsone by multiple enzymes of cytochrome P450: implications for inhibition of haemotoxicity. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, n. 6, p. 531-538, 1995.

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

GOULART, I. M. B. et al. 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.

GOZZELINO, R.; AROSIO, P. Iron homeostasis in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 2-14, 2016.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 175-178, out. 2008.

GRUNWALD, M. H.; AMICHAÏ, B. Dapsone - the treatment of infectious and inflammatory diseases in dermatology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 7, n. 3, p. 187-192, 1996.

HAN, M.; KIM, J. Effect of dietary iron loading on recognition memory in growing rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1-20, 2015.

HARUKI, H. et al. Tetrahydrobiopterin biosynthesis as an off-target of sulfa drugs. **Science**, v. 340, n. 6135, p. 987-991, 2013.

HEGESH, E. et al. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 30, n. 3, p. 679-682, 1970.

HELDT, S. A. et al. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 7, p. 656-670, 2007.

HENTZE, M. W. et al. Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. **Cell**, v. 142, n. 1, p. 24-38, 2010.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 453-462, 2002.

KNUTSON, M. D. et al. Both Iron Deficiency and Daily Iron Supplements Increase Lipid Peroxidation in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 3, p. 621-628, 2000.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. ON A NEW AEROBIC METABOLITE WHOSE PRODUCTION BY BRAIN IS INHIBITED BY APOMORPHINE, EMETINE, ERGOTAMINE, EPINEPHRINE, AND MENADIONE. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 82, n. 3, p. 292-300, 1944.

KOSKENKORVA-FRANK, T. S. et al. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1174-1194, 2013.

KRISHNAMURTHY, P.; XIE, T.; SCHUETZ, J. D. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 114, n. 3, p. 345-358, 2007.

KRUSZEWSKI, M. Labile iron pool: The main determinant of cellular response to oxidative stress. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1-2, p. 81-92, 2003.

LEE, J.-H.; LEE, M.-S. Brain Iron Accumulation in Atypical Parkinsonian Syndromes: in vivo MRI Evidences for Distinctive Patterns. **Frontiers in Neurology**, v. 10, p. 74, 12 fev. 2019.

LEE, S. M.; GEETHA, D. Dapsone induced hemolysis in a patient with ANCA associated glomerulonephritis and normal G6PD level and implications for clinical practice: case report and review of the literature. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 2013-2015, 2015.

LI, Y. et al. Deferoxamine regulates neuroinflammation and iron homeostasis in a mouse model of postoperative cognitive dysfunction. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, 2016.

MASALDAN, S. et al. Striking while the iron is hot: Iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 133, n. July 2018, p. 221-233, 2019.

MATTAPPALIL, A.; MERGENHAGEN, K. A. Neurotoxicity with antimicrobials in the elderly: A review. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 11, p. 1489- 1511.e4, 2014.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 278–294, 2006.

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, n. 3, p. 933S-940S, 2003.

MENG, F. X.; HOU, J. M.; SUN, T. S. Effect of oxidative stress induced by intracranial iron overload on central pain after spinal cord injury. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2017.

MILLER, N. J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993.

MILLS, E. et al. Mechanisms of brain iron transport: Insight into neurodegeneration and CNS disorders. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 51-64, 2010.

MIMIĆ-OKA, J. et al. Evaluation of oxidative stress after repeated intravenous iron supplementation. **Renal Failure**, v. 27, n. 3, p. 345-351, 2005.

MIRET, S.; SIMPSON, R. J.; MCKIE, A. T. Physiology and Molecular Biology of Dietary Iron Absorption. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 283-301, 2003.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984.

MORRIS, R. G. M. et al. **Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions** *Nature*, 1982.

NISSINEN, J. et al. A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. **Epilepsy Research**, v. 38, n. 2-3, p. 17-205, 2000.

NURCHI, V. M. et al. Chemical features of in use and in progress chelators for iron overload. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 38, p. 10-18, 2016.

OLIVEIRA, F. R. et al. Clinical applications and methemoglobinemia induced by dapsone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1770-1779, 2014.

PACHALY, J. R. Terapêutica Por Extrapolação Alométrica. **Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária**, p. 1215-1223, 2006.

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

PILONI, N. E. et al. Acute iron overload and oxidative stress in brain. **Toxicology**, v. 314, n. 1, p. 174-182, 2013.

PLASCENCIA-VILLA, G.; PERRY, G. Iron-ic facts about dementia. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 89, n. 5, p. 446-447, maio 2018.

POUCET, B.; SAVE, E.; LENCK-SANTINI, P. P. Sensory and memory properties of hippocampal place cells. **Reviews in the Neurosciences**, v. 11, n. 2-3, p. 95-111, 2000.

PUNTARULO, S. Iron, oxidative stress and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4- 5 SPEC. ISS., p. 299-312, 2005.

QIAN, Z. M.; SHEN, X. Brain iron transport and neurodegeneration. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, n. 3, p. 103-108, 2001.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REILLY, T. P. et al. A role for bioactivation and covalent binding within epidermal keratinocytes in sulfonamide-induced cutaneous drug reactions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 6, p. 1164-1173, 2000.

RENDEIRO, C. et al. The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: From behaviour to underlying hippocampal mechanisms. **Genes and Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 251-270, 2009.

RIEDER, M. J. et al. Synthesis and in vitro toxicity of hydroxylamine metabolites of sulfonamides. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 244, n. 2, p. 724-728, fev. 1988.

RIMOLI, L. F. Quantificação do estresse oxidativo no sangue de hansenianos sob efeito ou não de tratamento específico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 2, p. 137-138, 2000.

SADEGHI, A. et al. The effect of diabetes mellitus on apoptosis in hippocampus: Cellular and molecular aspects. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 2016- March, 2016.

SAKAI, JONI TETSUO & MONTERIO, M. C. Efeito protector do ácido alfa lipóico sobre a lesão hepática, induzida por dapsona em modelo animal. **Ppgcf-Ufpa**, 2018.

SALVADOR, G. A. Iron in neuronal function and dysfunction. **BioFactors**, v. 36, n. 2, p. 103-110, 2010.

SCHALCHER, T. R. et al. Clinical oxidative stress during leprosy multidrug therapy: Impact of dapsona oxidation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

SCHARFMAN, H. E. The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. **Progress in Brain Research**, v. 163, n. 07, p. 627-637, 2007.

SCHIFF, D. E.; ROBERTS, W. D.; SUE, Y. J. Methemoglobinemia associated with dapsona therapy in a child with pneumonia and chronic immune thrombocytopenic purpura. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 28, n. 6, p. 395-398, 2006.

SEKHAR, R. V. et al. Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 3, p. 847-853, 2011.

SHACHAR, D. BEN et al. Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 2, p. 254-263, 2004.

SHAYEGHI, M. et al. Identification of an intestinal heme transporter. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 789-801, 2005.

SIANCAS, TO A.; ERNESTO, E. Hippocampal function in memory processing and its deterioration in aging. **Revista Mexicana de Neurociencia**, v. 16, n. 4, p. 21-30, 2016.

SILVA, M. L. et al. *Petiveria alliacea* exerts mnemonic and learning effects on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, p. 124-129, 2015.

SINGH, Y. P. et al. A review on iron chelators as potential therapeutic agents for the treatment of Alzheimer’s and Parkinson’s diseases. **Molecular Diversity**, v. 23, n. 2, p. 509-526, 2019.

STEWART, C. A.; MORRIS, R. G. M. **The watermaze, in Behavioural neuroscience**. [s.l: s.n.].

URANGA, R. M.; SALVADOR, G. A. Unraveling the Burden of Iron in Neurodegeneration: Intersections with Amyloid Beta Peptide Pathology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

- 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. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 MAR, n. March, p. 1-12, 2014.
- VAGE, C. et al. Dapsone-induced hematologic toxicity: Comparison of the methemoglobin-forming ability of hydroxylamine metabolites of dapsone in rat and human blood. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 129, n. 2, p. 309-316, 1994.
- VALSAN, A. et al. Dapsone-induced methemoglobinemia: Two cases and a short review. **Journal of Applied Hematology**, v. 9, n. 1, p. 29, 2018.
- VEGGI, L. M. et al. Dapsone induces oxidative stress and impairs antioxidant defenses in rat liver. **Life Sciences**, v. 83, n. 5-6, p. 155-163, 2008.
- VERMYLEN, C. What is new in iron overload? **European Journal of Pediatrics**, v. 167, n. 4, p. 377-381, 2008.
- VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 848-858, 2006.
- WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemical Journal**, v. 434, n. 3, p. 365-381, 2011.
- WARD, R. J. et al. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 10, p. 1045-1060, 2014.
- WARD, R. J.; DEXTER, D. T.; CRICHTON, R. R. Neurodegenerative diseases and therapeutic strategies using iron chelators. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 31, p. 267-273, 2015.
- WEINREB, O. et al. Neuroprotective Multifunctional Iron Chelators: From Redox-Sensitive Process to Novel Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 6, p. 919-949, 15 set. 2010.
- WELCH, K. D. et al. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 7, p. 577-583, 2002.
- WHO. Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy. v. 1, p. 87, 2017.
- WOLVERTON, S. E. Monitoring for adverse effects from systemic drugs used in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 26, n. 5, p. 661-679, 1992.
- WOZEL, G.; BLASUM, C. Dapsone in dermatology and beyond. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 2, p. 103-124, 2014.
- YAN, F. et al. Iron deposition quantification: Applications in the brain and liver. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 48, n. 2, p. 301-317, 2018.

YANG, Y. et al. Deferoxamine compensates for decreases in B cell counts and reduces mortality in enterovirus 71-infected mice. **Marine Drugs**, v. 12, n. 7, p. 4086-4095, 2014.

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

A - Certificado da comissão de ética no uso de animais



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NEUROCOMPORTAMENTAIS, PARAMETROS DE ESTRESSE E NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR DAPSONA EM MODELO ANIMAL", protocolada sob o CEUA nº 9032140818 (ID 001012), sob a responsabilidade de **Marta Chagas Monteiro** e equipe; *Paulo Fernando Santos Mendes* - 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 01/11/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF NEUROCOMPORTAMENTAL AMENDMENTS, STRESS PARAMETERS AND DAPSONE INDUCED NEUROINFLAMATION IN ANIMAL MODEL", utilizing 125 Heterogenics mice (125 males), protocol number CEUA 9032140818 (ID 001012), under the responsibility of **Marta Chagas Monteiro** and team; *Paulo Fernando Santos Mendes* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 11/01/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2018** a **12/2018** Área: **Farmácia**

Origem: **Não se aplica**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **7 a 8 semanas**

N: **125**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **35 a 40 g**

Local do experimento: **Blotério da Faculdade de Farmácia**

Belém, 03 de novembro de 2018

M^a Vivina B. Monteiro

Profa. Dra. **María Vivina Barros Monteiro**
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Vanessa Jola de Mello

Profa. Dra. **Vanessa Jola de Mello**
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará