



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
OXIDATIVOS EM PACIENTES COM HANSENÍASE SUBMETIDOS À
POLIQUIMIOTERAPIA**

Caroline Azulay Rodrigues

BELÉM
2020



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
OXIDATIVOS EM PACIENTES COM HANSENÍASE SUBMETIDOS À
POLIQUIMIOTERAPIA**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará (PPGCF-UFPA) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área: Fármacos e medicamentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marta Chagas Monteiro

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Heitmann
Mares Azevedo Ribeiro

BELEM
2020

CAROLINE AZULAY RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
OXIDATIVOS EM PACIENTES COM HANSENÍASE SUBMETIDOS À
POLIQUIMIOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro – Orientadora
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – ICS-UFPA

Prof. Dr. Jose Luiz Fernandes Vieira - Examinador
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – ICS-UFPA

Prof. Dr. André Salim Khayat - Examinador
Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas da UFPA

Prof. Dr. Rafael Monteiro Fernandes - Suplente
Centro Universitário Leonardo da Vinci - Uniasselvi

BELÉM - PA

2020

DEDICATÓRIA

À minha avó Maria Célia de Azevedo Rodrigues, por me ensinar a ver a vida de maneira leve e divertida, apesar de todas as dificuldades do dia a dia, nunca faltaram motivos para ser feliz.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida e por permitir que eu realize mais um sonho.

À Universidade Federal do Pará (UFPA) por me oportunizar um aperfeiçoamento gratuito e de excelência.

À minha orientadora Dra. Marta Chagas Monteiro e ao Laboratório de Ensaios *in vitro*, Imunologia e Microbiologia, pela acolhida nesses 7 anos. Fiz inúmeros amigos de trabalho ao longo desse tempo, se eu esquecer alguém me perdoem, mas todos vocês que passaram no LABEIM nesse período fizeram parte da minha história. E essa história começa com essas pessoas: Mariely Pêsoa, Roseane, Kely Lima, Letícia Gaspar, Ana Lígia, Magda, Thaiana, Norma, Camila, Sávio, Joni e Rafael Quadros, Josi e Juliana.

Aos meus pais, Daya Azulay e Wendel Rodrigues, por todo o suporte emocional e financeiro para que hoje eu pudesse realizar mais um sonho. Amo vocês e obrigada por acreditarem e viverem cada aventura por mim.

Ao meu noivo, Rafael. Obrigada por ser meu ponto de equilíbrio e por desejar tornar os meus sonhos, nossos sonhos. Amo você.

Aos meus sogros e padrinhos, Oswaldo e Jane. Obrigada por todos os conselhos de vida e profissionais. Lembro quando eu conheci vocês, naquele círio de 2017 nunca iria imaginar que hoje vocês realmente iam se tornar a minha família. E que família que temos, não podemos esquecer do BigBig, Brutus, Porco, Coelho, Jujuba e Buh.

Ao Railson, só posso descrever assim “O amigo ama em todos os momentos; é um irmão na adversidade.” Provérbios 17:17

Ao Laboratório de Dermato-Imunologia (LDI), por terem me acolhido nesses dois anos e me mostrando que a Hanseníase é muito mais do que podemos ler em qualquer artigo. Obrigada Professor Dr. Cláudio Salgado, Professor Dr. Moises Silva, Angélica Gobbo, Raquel Bouth, Sâmela Miranda e Letícia Souza.

E no fim dessa jornada, conheci uma nova família, com amigos que jamais pensei ter ou viver histórias que nunca imaginei. Essa família é a Drogasil Batista Campos 4 – Shopping Pátio Belém. Meu agradecimento vai para toda esse

equipe que me moldou e me fizeram ser a farmacêutica que sou hoje. Michelle, Cássia, Suzana, Laura, Ana Carolina, Hewellen, Marcelle, Ana Flávia, Karen, Karla, Anderson, Siany e Alex. Vocês sempre serão lembrados na minha vida.

Aos pacientes portadores de hanseníase, esse trabalho é para vocês e por vocês.

Ao CNPQ por ter financiado este trabalho

EPÍGRAFE

*“Você é mais corajoso que acredita, mais forte do que aparenta e mais esperto
que pensa.”*

(Alan Alexander Milne, 1924.)

RESUMO

A hanseníase é uma doença dermatoneurológica causada especialmente pela infecção por *Mycobacterium leprae* e possui alta infectividade e baixa patogenicidade. O tratamento preconizado pela OMS consiste na poliquimioterapia (PQT), composta por Rifampicina, Clofazimina e Dapsona. Dentre os fármacos da PQT, a Dapsona é a principal responsável pelas reações adversas (RAMs) como anemia hemolítica, formação de metemoglobina, hemólise com a presença de corpúsculos de Heinz, entre outras. Essas RAMs estão principalmente associadas com a presença do grupo funcional hidroxilamina no metabólito da DDS, com isso a uma diminuição da concentração dos antioxidantes endógenos e alterações na bioquímica hepática e lipídica, por um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, ocasionando um quadro de estresse oxidativo. A avaliação destas possíveis alterações, foram realizadas através da análise hematológica por hemograma, %de metemoglobina, dosagem dos níveis de peroxidação lipídica, glutathiona, colesterol, triglicerídeos, fosfatase alcalina e transaminases ALT/AST. Os resultados mostram que a PQT foi capaz de gerar anemia nos pacientes a partir do segundo trimestre de tratamento, a PQT também foi capaz de induzir a formação de metemoglobina, sendo este efeito dose dependente. Quando aos parâmetros oxidativos, a PQT foi capaz de provocar peroxidação lipídica e reduzir os níveis de glutathiona, induzindo um estado de estresse oxidativo. Este efeito pode ser visto na bioquímica hepática, onde observou-se um desbalanço entre os marcadores hepáticos como ALT, AST e fosfatase alcalina, sugerindo dano hepático. Os marcadores lipídicos também sofreram alterações no segundo trimestre do tratamento com a PQT. Além disso, a PQT é capaz de modular a resposta imune dos pacientes diminuindo os níveis de IL-6, TNF- α e IL-17 e elevando os níveis de IL-10 e TGF- β . Pode concluir-se que a PQT, a partir do segundo trimestre, leva ao surgimento de anemia, metemoglobinemia, dano hepático, estresse oxidativo e modula o sistema imune dos pacientes com hanseníase.

Palavras – Chave: hanseníase, poliquimioterapia, estresse oxidativo, alterações hematológicas, colesterol, dano hepático.

ABSTRACT

RODRIGUES, C. A. Evaluation of hematological, biochemical and oxidative parameters in patients with hanseníase submitted to polychimiotherapy.

Masters dissertation, Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2020.

Leprosy is a dermatoneurologic disease caused especially by *Mycobacterium leprae* infection and has high infectivity and low pathogenicity. The treatment recommended by the WHO consists of multidrug chemotherapy (MDT), composed of Rifampicin, Clofazimine and Dapsone. Among Drugs of MDT, Dapsone is the main responsible for adverse reactions (ADRs) such as hemolytic anemia, methemoglobin formation, hemolysis with the presence of Heinz corpuscles, among others. These ADRs are mainly associated with the presence of the hydroxylamine functional group in the DDS metabolite, leading to a decrease in the concentration of endogenous antioxidants and alterations in the hepatic and lipid biochemistry, due to an increase in the generation of reactive oxygen species, oxidative stress. The evaluation of these possible alterations were made through hematological analysis by hemogram, %methemoglobin, dosage of levels of lipid peroxidation, glutathione, cholesterol, triglycerides, alkaline phosphatase and ALT / AST transaminases. The results show that MDT was able to generate anemia in patients from the second trimester of treatment, MDT was also able to induce the formation of methemoglobin, being this effect dose dependent. When oxidative parameters were found, MDT was able to cause lipid peroxidation and reduce glutathione levels, inducing a state of oxidative stress. This effect can be seen in hepatic biochemistry, where there was an imbalance between liver markers such as ALT, AST and alkaline phosphatase, suggesting liver damage. Lipid markers also changed in the second trimester of MDT treatment. In addition, MDT is able to modulate the immune response of patients through the increase IL-6, TNF- α and IL-17 levels and reduces il-10 and TGF- β levels. It can be concluded that MDT, from the second trimester, leads to the emergence of anemia, metemoglobinemia, liver damage, oxidative stress and modulates the immune system of leprosy patients. It can be concluded that MDT, from the second trimester, leads to the onset of anemia, methemoglobinemia, liver damage and oxidative stress.

Keywords: leprosy, polychemotherapy, oxidative stress, hematological changes, cholesterol, liver damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática das alterações fisiopatológicas da hanseníase.	4
Figura 2:	Representação das diversas classificações clínicas da hanseníase.	5
Figura 3:	Representação do esquema terapêutico.	6
Figura 4:	Estrutura química da Dapsona.	7
Figura 5:	Mecanismo de ação da Dapsona no interior de microrganismos.	7
Figura 6:	Proposta de mecanismos de bioativação e detoxificação de dapsona.	8
Figura 7:	Reações de Haber Weiss e Fenton.	10
Figura 8:	A Hb consiste em um grupo prostético, heme, e o protéico, representado pelas cadeias de globina α e β .	12
Figura 9:	Transferência de cargas entre Fe^{2+} e moléculas de O_2 observados no processo de ligação oxidação de grupo heme.	13
Figura 10:	A via de Embden-Meyerhof e das pentoses-fosfato, responsáveis pela produção de NADH e NADPH, respectivamente. Substratos importantes no processo de redução da Metemoglobina.	14
Figura 11:	Mecanismo de proteção do sistema antioxidante dos eritrócitos a partir da produção de espécies reativas de oxigênio e produção de metemoglobina.	17
Figura 12:	Resumo metodológico	20
Figura 13:	Percentual de MetHb em suspensão de eritrócitos de indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase e em uso da PQT.	27
Figura 14:	Avaliação de parâmetros oxidativos GSH no plasma (A), GSH nos eritrócitos (B) e Peroxidação Lipídica (C), em indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase e em uso da PQT.	28
Figura 15:	Avaliação de parâmetros bioquímicos: triglicerídeos (A), Colesterol Total (B) Fosfatase Alcalina (C), Ferro Sérico (D) e Relação AST/ALT (E) em indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase e em uso da PQT.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Características demográficas, laboratoriais e funcionais dos participantes do estudo.	23
Tabela 2:	Parâmetros hematológicos dos indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase e em uso da PQT.	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH	Radical hidroxila
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
B	Boderline
CAT	Catalse
DD	Dimorfa
DDS	Dapsona
DDS-NOH	Dapsona hidroxilamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT	Dimorfa tuberculóide
DV	Dimorfa virchowiana
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSH-PX	Glutaciona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
I	Inderminada
IFN- γ	Interferon gama
MADDS-NOH	Monoacetil dapsona hidroxilamina
MB	Multibacilar
MDA	Malondialdeído
MetHb	Metemoglobina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
O ₂	Oxigênio
O ₂ •-	Radical superóxido
PABA	Ácido 4-aminobenzóico
PAMP	Ácido para-aminobenzóico
PB	Paucibacilar
PQT	Poliquimioterapia
RAM	Reações adversas ao medicamento
RNA	Ácido ribonucleico
RO ⁻	Radical Alcoxila
ROO ⁻	Radical Peroxila
SH	Grupo Sulfidrila
SOD	Superóxido dismutase
T	Tuberculóide
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TLR	Receptores do tipo toll
TT	Tuberculóide
V	Virchowiano
VV	Virchowiana

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Hanseníase	1
1.2 Fisiopatologia da Hanseníase	1
1.3 Classificação Clínica	4
1.4 Diagnóstico clínico e exames complementares da hanseníase	5
1.5 Poliquimioterapia.....	6
1.5.1 Dapsona	7
2. 7 Biomarcadores de Estresse Oxidativo	9
2.7.1 Estresse Oxidativo	9
2.7.2 Metabolismo do Eritrócito e Antioxidantes	10
4 OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo Geral	18
4.2 Objetivos específicos:	18
5 MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 Indivíduos e Tamanho Amostral.....	19
.....	20
5.2 Local de pesquisa	21
5.3 Obtenção e preparo das amostras.....	21
5.4 Teste Qualitativo de Brewer (G6PD).....	21
5.5 Determinação do percentual de Metemoglobina.....	22
5.6 Quantificação de Ferro Sérico.....	22
5.7 Quantificação dos Marcadores Hepáticos.....	22
5.8 Determinação de Glutathiona Reduzida	22
5.9 Peroxidação Lipídica.....	23
5.10 Análise hematológica	23
5.10 Análise de Citocinas.....	23
5.11 Análise Estatística.....	24
6 RESULTADOS.....	25
6.1 Características demográficas, laboratoriais e funcionais dos participantes do estudo.....	25
6.2 Perfil Hematológico.....	26
6.3 Determinação do Percentual de Metemoglobina (%MetHb)	26

6.4 Parâmetros de Estresse Oxidativo.....	27
6.5 Perfil Bioquímico	28
6.5 Perfil de Citocinas	30
7 DISCUSSÃO	32
8 REFERÊNCIAS.....	39
ANEXOS	51
ANEXO 1: Parecer de Autorização para Desenvolvimento da Pesquisa Emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.....	51
ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado com os participantes do estudo.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase

A hanseníase é uma doença dermatoneurológica causada especialmente pela infecção por *Mycobacterium leprae*, que tem predileção por nervos periféricos, que levam a manifestações cutâneas e/ou espessamento de troncos nervosos periféricos. As alterações são majoritariamente observadas na face, orelhas, membros inferiores e superiores, caracterizadas por redução da sensibilidade tátil, térmica e dolorosa (Britton e Lockwood, 2004).

Esta doença é considerada um problema de saúde global, e em 2017, foram relatados 214.783 casos novos da doença no mundo. De acordo com a OMS, estima-se que a cada 2.8 habitantes em cada 100 mil habitantes contraem a doença por dia (Who, 2018). O Brasil é o segundo país com o maior número casos novos, com 25.218 casos. Neste contexto, somente no ano de 2017, os estados brasileiros da Amazônia Legal apresentaram os maiores índices de registros de casos novos da doença, entre os quais o Pará, Tocantins, Maranhão e Mato Grosso se destacam. Dados do Sistema de Informação de Agravos de notificação do Ministério da Saúde evidenciam que o Maranhão foi líder de notificações no país, visto que foram registrados 3.298 casos e em segundo lugar o estado do Pará com 2.527 casos (Brasil, 2018).

1.2 Fisiopatologia da Hanseníase

Durante a infecção pelo *Mycobacterium leprae*, macrófagos e células de Schwann são os principais alvos desta bactéria, embora os macrófagos sejam as principais células envolvidas no reconhecimento de micobactérias. O bacilo pode entrar no corpo humano através da pele e principalmente pelo trato respiratório (Bhat e Prakash, 2012). Após a sua entrada, o bacilo é inicialmente reconhecido por vários receptores do sistema imune inato, conhecidos como PAPMs (*Pathogen-associated molecular patterns*), principalmente os TLRs (*Toll like receptors*). Os TLRs são os principais receptores de transmembrana que estão associados ao reconhecimento de micobactérias (Medzhitov, 2001; Beutler, 2004; Takeda e Akira, 2004). Os TLRs envolvidos no reconhecimento do *Mycobacterium leprae* são TLR 1, 4, 6, 8, e 9. Estes receptores são expressos em monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos, epitélio,

endotélio, fibroblastos e células de Schwann (Bulut *et al.*, 2001; Bafica *et al.*, 2005; D'avila *et al.*, 2008). Além disso, outros receptores também são capazes de reconhecer o *Mycobacterium leprae*, como NOD2, Dectin-1 e de manose. (Tailleux *et al.*, 2008; Misch *et al.*, 2010; Bhat e Prakash, 2012).

Na hanseníase, o principal mecanismo imune inato contra a infecção microbiana é o sistema macrofágico (Figura 1). Depois do reconhecimento do bacilo pelos TLRs presentes em macrófagos, estas células fagocitam e são estimulados, levando a ativação do fator nuclear Kappa B (NFκB) que levam a transcrição de várias citocinas e quimiocinas, principalmente a interleucina 12 (IL-12). Essas citocinas e quimiocinas subsequentemente recrutam e ativam células T para o local inflamatório. Nesse sentido, a IL-12 estimula as células T a produzirem Interferon-gama (IFN-γ) e também desempenham papel fundamental para potencializar a função microbiana do macrófago e a explosão respiratória “*respiratory burst*” da célula (Abdel-Hafez, 2009). A explosão respiratória é gerada pela NADPH oxidase durante fosforilação oxidativa mitocondrial. Este processo leva à produção de várias moléculas de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como o radical superóxido (O₂⁻), radicais hidroxila (•OH) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A superprodução de EROS tem efeito duplo no hospedeiro, visto que pode levar à morte dos patógenos, mas também pode levar a danos em macromoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Valko *et al.*, 2007; Suzuki, 2011; Suzuki *et al.*, 2012; Lushchak, 2014).

As células de Schwann também são importantes no contexto da infecção pelo *M. leprae*, para isso, o bacilo infecta essa célula levando a lesões no nervo, desmielinização e conseqüente incapacidade, assim uma redução da densidade de mielina. (Misch *et al.*, 2010; Bhat e Prakash, 2012).

Outro mecanismo imune importante na hanseníase é a imunidade adaptiva que está diretamente correlacionada com as manifestações clínicas da doença: Paucibacilar e Multibacilar. Na Paucibacilar, principalmente a forma tuberculóide, predomina intensa resposta imune mediada por linfócitos T, enquanto que na forma multibacilar, principalmente a virchoviana, é frequente a resposta imune humoral (Alcáis *et al.*, 2000; Britton e Lockwood, 2004).

Nesse sentido, as células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas apresentam o antígeno do micobactéria para

T-helper 0 (LTh0), ocorrendo diferenciação para as células CD4 T-helper 1 (Th1) ou CD4 T-helper 2 (Th2). Esses polos Th1/Th2 determinam o espectro clínico da hanseníase. A este respeito, o paciente Paucibacilar desenvolve uma resposta imunitária mediada por Th1, enquanto os multibacilares desenvolvem uma resposta Th2 (Frieden *et al.*, 2003).

Na Paucibacilar, a resposta Th1 é caracterizada por granulomas com a proliferação limitada de micobactérias (Frieden *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2008), na ausência de granuloma ocorre disseminação do bacilo (Wang *et al.*, 2013) . O polo Th1 induz intensa produção de citocinas que desencadeiam a imunidade mediada por células, como IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-15, IL-18 e IL-12 (Arao *et al.*, 2014), que são importantes para a erradicação de patógenos intracelulares. Além disso, a IL-2 também contribui para a defesa do hospedeiro, induzindo a expansão clonal de células T ativadas. Outra citocina importante é a IL-12, que está associada à prevalência de linfócitos T CD8+ nesses pacientes (Khanolkar-Young *et al.*, 1994; Flynn e Chan, 2001; Schon *et al.*, 2004).

Pacientes multibacilares desenvolvem uma resposta Th2 que é essencial para a produção de anticorpos. Esta resposta imune combate parasitas extracelulares e está associada com asma e outros processos alérgicos. Além disso, nesta resposta há uma intensa produção de citocina, como TGF- β , IL-4, IL-5 e IL-7. Vários estudos demonstraram que o bacilo induz a produção de IL-10, suprimindo diretamente as respostas imunes do hospedeiro, inibindo a proliferação de células T e a liberação de citocinas antimicobacterianas, como IFN e IL-22 (Modlin, 1994; Ouyang *et al.*, 2011).

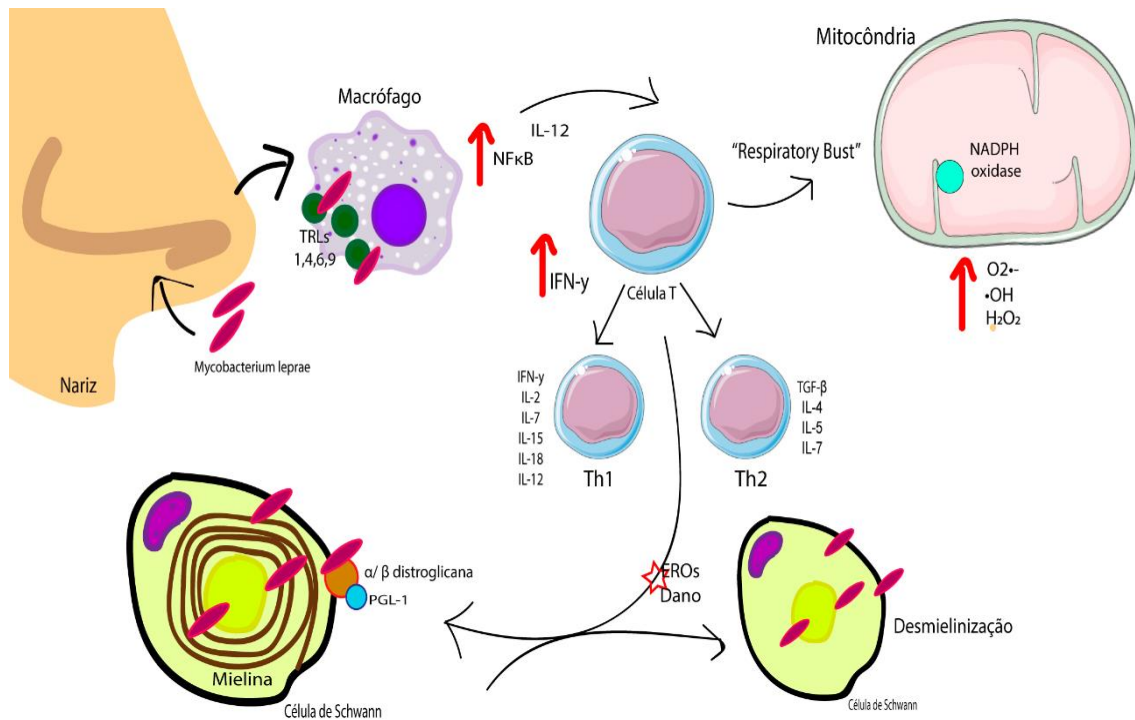


Figura 1: Representação esquemática das alterações fisiopatológicas da hanseníase. Fonte: autor, 2020.

1.3 Classificação Clínica

As características imunológicas estão correlacionadas com o estado histológico e clínico, sendo assim constituem a base para a classificação desta doença (Figura 2). A classificação de Madri (1953) adota critérios de polaridade, baseados nos aspectos clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, consideram-se dois pólos estáveis e opostos, tuberculóide (T) e virchowiano (V); e dois grupos instáveis, a forma indeterminada (I) e a forma borderline (B), que caminham para um dos pólos, na evolução natural da doença.

Posteriormente a classificação de Ridley e Jopling, utilizada apenas para fins científicos, leva em consideração a imunidade dentro de espectro de resistência do paciente e não inclui a forma indeterminada no espectro. São descritos novos subgrupos, a forma tuberculóide (TT), os casos borderline ou diformos são subdivididos em diformo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo virchowiano (DV) e virchowiano (VV) (Ridley e Jopling, 1966).

Para atividades operacionais, a classificação da OMS é a utilizada e baseia-se o número de lesões na pele. Pacientes com 1 a 5 lesões são classificados como paucibacilares (PB) e aqueles com 6 ou mais lesões são agrupados como tipo multibacilar (MB) (Lockwood e Saunderson, 2012).

Madrid 1953	Ridley-Jopling 1966	WHO 1981
Virchowiano	Virchowiano	Multibacilar
Boderline	Boderline virchowiano	
Indeterminada	Boderline	
Tuberculóide	Boderline tuberculóide	
	Tuberculóide	Paucibacilar

Figura 2: Representação das diversas classificações clínicas da hanseníase. Fonte: do autor.

1.4 Diagnóstico clínico e exames complementares da hanseníase

O diagnóstico da hanseníase é baseado nos sinais e sintomas clínicos da doença. Os sinais para hanseníase são: lesão de pele com anestesia ou hiporestesia e espessamento de nervos periféricos. Na avaliação dermatoneurológica são checados a sensibilidade térmica, tátil e dolorosa nas lesões de pele, identificação de neurites, comprometimento de troncos nervosos e grau de incapacidade física (Gupta, 2015). No exame dermatológico é avaliado a presença de lesões, sua simetria, localização, número e bordas. As lesões mais comuns são: manchas hipocrômicas e/ou eritematosas, nódulos e infiltrações difusas. A identificação de lesões neurológicas é realizada pela avaliação dos olhos, nariz, mãos e pés, além da palpação dos troncos nervosos periféricos e avaliação da força muscular (Lastória e Abreu, 2014b; Gupta, 2015).

Após o exame clínico, é realizado a baciloscopia dos lóbulos auriculares e/ou cotovelo e lesão, exame complementar que auxilia no diagnóstico da hanseníase. É considerado um procedimento de fácil execução e de baixo custo, segundo o Ministério da Saúde pode ser realizado quando existe dúvida na classificação operacional para a terapia com a PQT; diagnóstico diferencial com outras dermatoses e em casos de suspeita de recidiva. Após a coleta do raspado de tecido dérmico a coloração é feita pelo método de Ziehl-Nielson e o resultado é fornecido por IB (Índice Baciloscópico), uma escada logarítmica com variação entre 0 e 6 proposta por Ridley em 1966, sendo importante lembrar que um resultado negativo na baciloscopia não exclui o diagnóstico da hanseníase (Ridley e Hilson, 1967).

Quando existem lesões, o exame histopatológico é solicitado e baseia-se na análise das biópsias de lesões de pele ou nervos corados pela hematoxilina-eosina, onde observa-se uma impregnação no bacilo pelo corante eosina, dando a ele uma coloração avermelhada nos cortes de parafina. Neste exame, se busca a presença de granulomas, bacilos, infiltrado celular e espessamento de tecidos (Ridley, 1955). O exame histopatológico é considerado como teste padrão ouro para o diagnóstico da hanseníase (Lastória e Abreu, 2014a).

1.5 Poliquimioterapia (PQT)

O tratamento da hanseníase no Brasil segue a portaria nº 3125 do Ministério da Saúde, no qual o tratamento ocorre de acordo com a classificação operacional PB e MB. Para os pacientes com a forma PB, a PQT é composta apenas por Rifampicina e Dapsona. Já o tratamento para os pacientes MB é composto por Rifampicina, Dapsona e Clofazimina (Figura 3) (Lastória e Abreu, 2014a; Penna *et al.*, 2017; Hungria *et al.*, 2018). A dose, nos dois tipos de PQT dependem da faixa etária e o esquema terapêutico compreende doses diárias e as doses mensais supervisionadas, esse último ocorre no local onde o paciente faz o acompanhamento em frente à uma enfermeira. O tempo de tratamento é longo, para a forma PB possui duração de 6 meses e para a forma multibacilar 12 meses. A PQT leva à destruição do bacilo e os pacientes tratados podem se considerar curados da doença quando terminam todo o regime terapêutico (Schulz *et al.*, 2000; Penna *et al.*, 2017; Hungria *et al.*, 2018).

Formas Clínicas	Medicamento			Duração do Tratamento
	Dapsona (DDS)	Rifampicina (RFM)	Clofazimina (CFZ)	
PB	100mg/dia	600mg 1x ao mês Supervisionada	-	6 meses
MB	100mg/dia	600mg 1x ao mês Supervisionada	300mg 1x ao mês Supervisionada 50mg/dia	12 meses

Figura 3: Representação do esquema terapêutico. Fonte: do autor.

1.5.1 Dapsona

A Dapsona (DDS) foi sintetizada por Fromm e Wittmann (1908) (Figura 4), primeiramente para o tratamento de tuberculose. Depois de quase 40 anos, foi utilizada pela primeira vez para o tratamento da hanseníase na Nigéria.

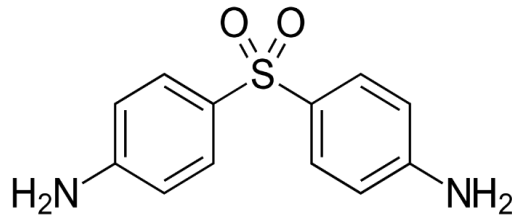


Figura 4: Estrutura química da Dapsona

A DDS é um fármaco bacteriostático e com uma baixa ação bactericida. O seu mecanismo de ação ocorre devido a sua interação no sítio ativo da enzima diidropteroato sintetase, que acarreta na inibição da síntese de ácido fólico, um evento essencial para a síntese de purinas e consequente formação de RNA e DNA das bactérias (Figura 5) (Wozel, Gottfried e Blasum, Christian, 2014).

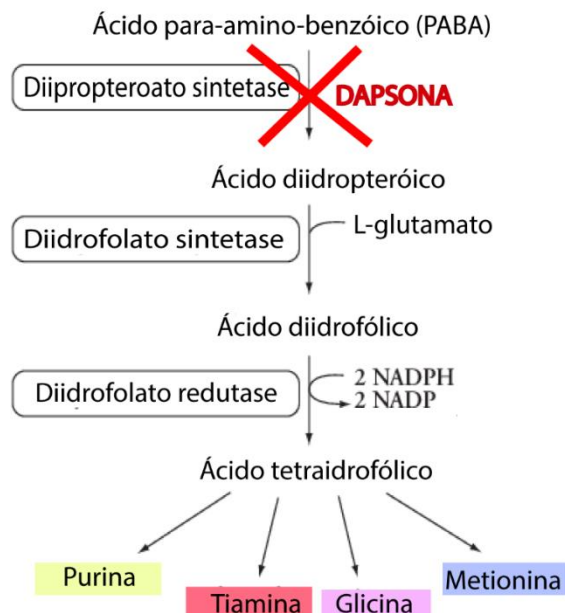


Figura 5: Mecanismo de ação da Dapsona no interior de microrganismos. Adaptado de Farhi et al., 2005

Sua absorção é quase completa pelo trato gastrointestinal (80-85%) e difunde-se por todos os tecidos, concentrando-se preferencialmente na pele,

músculos, fígado e rins (Moraes *et al.*, 2012; Wozel, G. e Blasum, C., 2014), permanecendo nesses órgãos até 3 semanas após a interrupção do tratamento. Cerca de 70% deste fármaco se liga às proteínas plasmáticas, com concentração plasmática variando entre 0,4 a 1,2 mg/L, após 24 h da ingestão de 100 mg da droga (Zuidema *et al.*, 1986). O pico plasmático é alcançado entre 2 a 8 h, após a ingestão de uma dose de 50 – 300 mg, para isso são necessários em torno de 7 a 10 dias após o início da terapia com a DDS para que o estado de equilíbrio seja alcançado (Wozel, G. e Blasum, C., 2014).

O processo de biotransformação da DDS ocorre no fígado, tendo como principal via a N-acetilação realizada pela enzima N-acetil-transferase e N-hidroxilação através da via citocromo P450, pelas isoformas CYP2C9, CYP3A, CYP2E1 e CYP2C19 (Figura 6) (Oliveira *et al.*, 2014). A N-hidroxilação é responsável pela produção de metabólitos hidroxilados, como a DDS-NOH e Monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH), considerados responsáveis pelas reações adversas mais comuns causados pelo uso deste fármaco (Vage *et al.*, 1994; Moraes *et al.*, 2012).

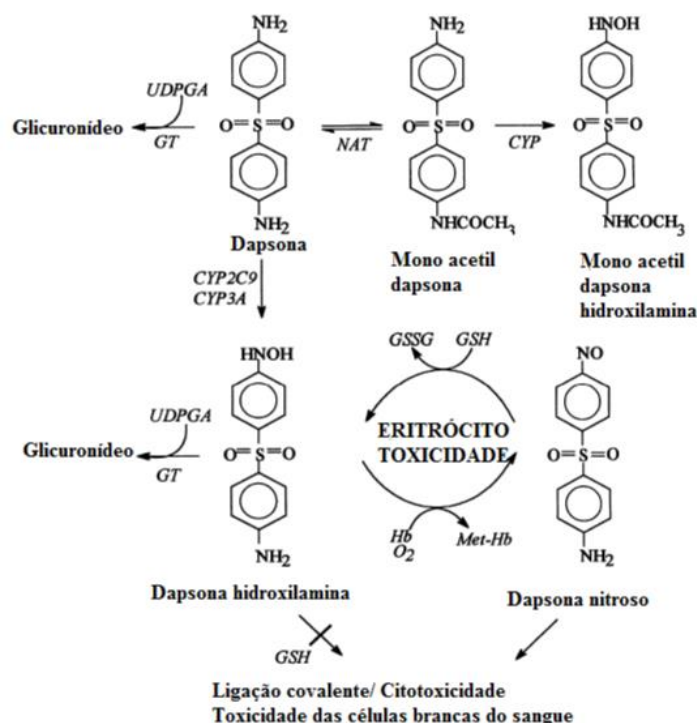


Figura 6: Proposta de mecanismos de bioativação e detoxificação de dapsona. CYP:Citocromo P-450; Hb:hemoglobina; GSH: glutationa reduzida; GSSG: glutationa oxidada; NAT: N-acetil-transferase; GT: glucuronil-transferase; UDPGA: ácido uridina difosfato glucurônico; Met-Hb: Metemoglobina; O₂ :oxigênio. Fonte: Adaptado de GILL et al.1995.

Os efeitos adversos mais comuns na terapia com esta sulfona são alterações hematológicas, principalmente metemoglobinemia e a hemólise. Podem ocorrer, nas doses terapêuticas e possui uma característica dose dependente (Mayo *et al.*, 1987; Coleman, 1995; Reilly *et al.*, 1999), sendo pacientes com deficiência enzimática da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) são mais suscetíveis (Ghatak *et al.*, 2013).

A anemia hemolítica e a metemoglobinemia, pelo uso da DDS, estão associadas a uma desnaturação oxidativa na membrana dos eritrócitos, que aumenta sua rigidez, favorecendo a recaptção esplênica e acelerando os processos de hemólise celular (Coleman *et al.*, 1994). Os danos à membrana celular culminam nos eventos de peroxidação lipídica. O ferro livre é fator desencadeante de reações de oxidação cujos resultados se refletem na alteração do citoesqueleto e na exposição da porção lipídica intracelular e na consequente oxidação de ácidos graxos pelo peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, os produtos da oxidação do ferro acumulam-se na membrana eritrocitária e ativam macrófagos (Kanas e Acker, 2010), concluindo o processo de remoção precoce dos eritrócitos.

2. 7 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

2.7.1 Estresse Oxidativo

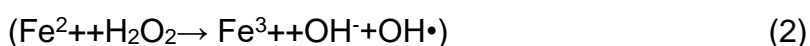
O estresse oxidativo é o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e agentes antioxidantes com a potencialidade de exercer efeitos deletérios. A variação nessa homeostasia celular é ocasionada pelo aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), acarretando em oxidação de proteínas e lipídeos (Birben *et al.*, 2012; Di Meo *et al.*, 2016).

Os oxidantes podem ser agrupados em espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), sendo ambas essenciais para o metabolismo humano e produzidas constantemente pelo organismo em diferentes condições fisiológicas (Di Meo *et al.*, 2016). As espécies reativas incluem os radicais livres, definidos como átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, sendo que essa característica lhes confere alta reatividade. Ou ainda podem ser espécies

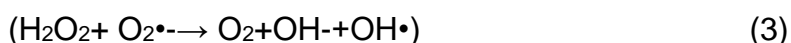
reativas não radicalares que, embora sem elétrons desemparelhados, possuem reatividade significativa agindo como oxidantes (Phaniendra *et al.*, 2015).

Em sistemas biológicos, as EROs representam a classe mais importante das espécies reativas (Ung *et al.*, 2017). Elas são o radical hidroxila (OH•), radical ânion superóxido (O₂⁻), peroxila (ROO⁻), alcoxila (RO⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo esse último não radicalar. Esses radicais podem ser formados através de reações como a de Fenton e de Haber-Weiss, mediadas por íons metálicos (Koppenol, 2001), como exemplificado abaixo:

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



Reações de Haber Weiss e Fenton. Na reação de Haber Weiss o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) reage com o radical superóxido (O₂⁻) na presença de metal de transição e dá origem ao radical hidroxila (OH•), hidroxila (OH⁻) e oxigênio molecular (O₂); na reação de Fenton o peróxido de hidrogênio na presença de ferro no estado férrico (Fe³⁺) dá origem ao radical hidroxila.

2.7.2 Metabolismo do Eritrócito e Antioxidantes

O eritrócito é uma das células mais especializadas do organismo humano, sendo responsável pelo transporte de oxigênio aos tecidos. Para o melhor desempenho desta importante função, a forma madura dos eritrócitos é anucleada, o que lhe traz inúmeras vantagens, como a sua passagem por capilares menores do que o seu diâmetro (7-8 micrômetros), no baço e na microcirculação em geral (Araújo *et al.*, 2014; Cluitmans *et al.*, 2016).

A membrana eritrocitária é constituída de uma bicamada lipídica com 42% de lipídios, 52% de proteínas e 7% de carboidratos. Entre os lipídios, o colesterol e os fosfolipídios estão organizados em bicamada, em quantidades quase equimolares (Murador e Deffune, 2007; Cluitmans *et al.*, 2016). Os tipos predominantes de fosfolipídios são a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilserina, na face interna da membrana; a fosfatidilcolina e a esfingomiéline, mais abundantes na face externa da membrana (LEHNINGER *et al.* 1995). A distribuição dos lipídios está relacionada com a curvatura da membrana (Sanchez-Gallego *et al.*, 2010).

A estrutura lipídica da membrana é mantida por um sistema de transporte ativo através dos fosfolipídeos da membrana. A lipase transporta ativamente os aminofosfolipídeos de fora para dentro, enquanto que a scramblase, quando ativada, move qualquer fosfolipídeo em todas as direções (Stuart e Nagel, 2004). Em geral, substâncias de baixa polaridade atravessam livremente a membrana do eritrócito, enquanto moléculas polares dependem de transporte através de sítios especializados (Lana *et al.*, 2013).

Quanto as proteínas, a membrana eritrocitária é composta por proteínas estruturalmente classificadas em integrais ou transmembrana e periféricas ou extra-membrana. Essas proteínas compõem o citoesqueleto, organela responsável pela forma bicôncava normal ou anormal dos eritrócitos, e representa 60% da massa proteica da membrana (Mohandas e Gallagher, 2008).

Dentre as proteínas citoplasmáticas, a Hb é a proteína transportadora de oxigênio, que constitui 95% do total protéico citosólico do eritrócito (Senchenkova *et al.*, 2017). Além da Hb, o citosol do eritrócito maduro apresenta enzimas importantes na produção de energia a partir da glicólise. Com isso, para manter a Hb em condições funcionais, a energia necessária para o processo provém do ATP, e de coenzimas como NADH e NADPH, que mantem seu estado funcional e volume celular por 80 a 120 dias, frente a exposições repetidas a lesões mecânicas e/ou metabólicas (Wiback e Palsson, 2002).

A Hb é a proteína presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos e apresenta como principal função o transporte de O₂ por todo o organismo. A sua estrutura é de uma proteína esférica, globular, formada por quatro subunidades, compostas de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, sendo um par denominado de cadeias do tipo alfa (alfa- α ou zeta- ζ) e o outro de cadeias do tipo não-alfa (beta- β , delta- σ , gama- γ ou epsilon- ϵ). Cada cadeia polipeptídica é composta por uma sequência de aminoácidos, tendo as cadeias alfa 141 aminoácidos (aa) e as cadeias não-alfa, 146 aa. As combinações entre as diversas cadeias de proteínas dão origem às diferentes Hbs presentes nos eritrócitos desde o período embrionário até a fase adulta, produzidas no decorrer das distintas etapas do desenvolvimento humano (Galiza Neto e Pitombeira, 2003; Schechter, 2008).

O grupo prostético presente nas cadeias de globina é representado pelo heme, anel porfirínico tetrapirrólico, cujo núcleo contém ferro sob a forma de Fe^{2+} . Este metal se liga covalentemente aos quatro anéis pirrólicos unidos em anel planar por quatro pontes de meteno ($=\text{CH}-$), sendo que o átomo de Fe^{2+} é responsável pela ligação com o O_2 (Figura 8). Como cada molécula de Hb possui quatro grupos heme, a mesma é capaz de se combinar a quatro moléculas de O_2 (Galiza Neto e Pitombeira, 2003; Schechter, 2008).

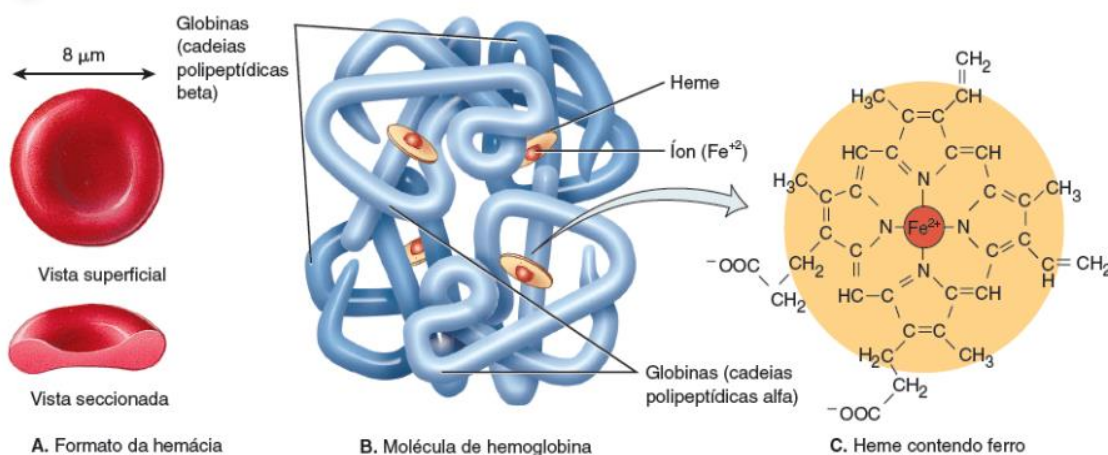


Figura 8: A Hb (A) consiste em um grupo prostético (B), heme e o protéico, representado pelas cadeias de globina α e β (C). Fonte: Tortora (2019)

No adulto, as Hbs constituem arranjos tetraméricos de cadeias alfa com beta ($\alpha_2\beta_2 = \text{Hb A1}$), alfa com delta ($\alpha_2\delta_2 = \text{Hb A2}$) e alfa com gama ($\alpha_2\gamma_2 = \text{Hb F}$). Ao nascimento, ainda predomina a hemoglobina Fetal (Hb F), que diminui gradativamente até aproximadamente a vigésima oitava semana de vida, quando as concentrações das Hbs chegam às proporções do adulto, de 96 a 98% para Hb A1; de 2,0 a 3,7% para Hb A2 e de até 1% para Hb F (Stamatoyannopoulos, 1992). Devido a sua estrutura tetramérica, a Hb pode interagir com outras moléculas, possibilitando interações fundamentais para o seu funcionamento, tais como, o processo de oxigenação que ocorre a partir da avidéz das duas cadeias β pelo O_2 que se movimentam juntas para facilitar a combinação entre eles (Yu *et al.*, 2006).

Contudo, para que ocorra a liberação deste gás nos tecidos é necessária a atuação do 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG) que proporciona a redução da afinidade da Hb pelo O_2 proporcionando a liberação deste para os tecidos (Versmold e Riegel, 1974; Haymond *et al.*, 2005). Além disso, a molécula de O_2 se liga mais rapidamente se outras moléculas de O_2 já estiverem ligadas, o que

é denominado “ligação cooperativa”. Este fenômeno permite que a Hb maximize tanto a quantidade de O₂ transportada sob a PO₂ dos pulmões quanto a quantidade de O₂ liberada sob PO₂ típica dos tecidos periféricos (Reilly *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 1999; Skold *et al.*, 2011).

De acordo com Shikama (1998), a conversão da Hb a sua forma oxigenada está associada a um arranjo eletrônico, uma vez que ocorre transferência de carga (doação π) do Fe²⁺ para O₂, e uma coordenação (doação σ) do O₂ para o Fe²⁺, ocasionando assim uma forte ligação covalente entre o ferro e o O₂ (Figura 9). Logo, após esta oxidação o íon Fe²⁺ do grupo heme não pode mais combinar-se com O₂, pois esta molécula não apresenta nenhuma afinidade pelo Fe³⁺, sendo assim observada a formação da MetHb.

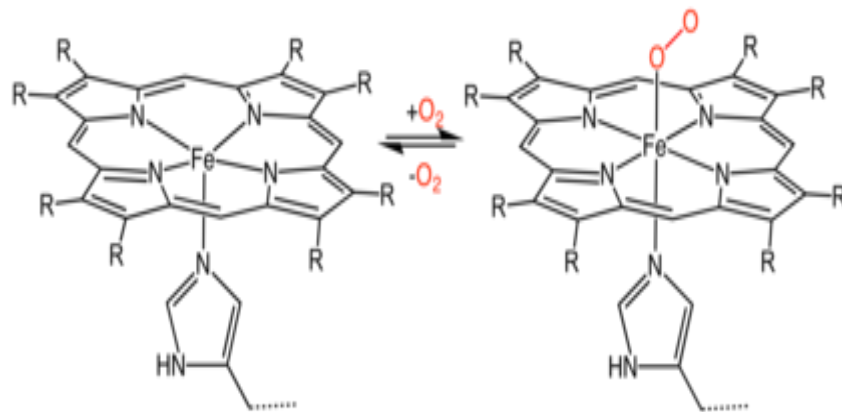


Figura 9: Transferência de cargas entre Fe²⁺ e moléculas de O₂ observados no processo de ligação oxidação de grupo heme. Fonte: Shikama (1998).

Denomina-se metemoglobinemia o estado clínico onde mais de 1% da hemoglobina do eritrócito tem o íon Fe²⁺ convertido para a forma Fe³⁺, a qual não é capaz de ligar-se reversivelmente ao oxigênio (Hegesh *et al.*, 1970; Zhang *et al.*, 2018). Esta síndrome pode ser induzida pela exposição a agentes químicos diversos, tais como DDS, sulfonamidas, anestésicos locais e o azul de metileno em altas doses. Estes agentes podem ocasionar significativa carência do suprimento de O₂ nos tecidos provocando importantes manifestações clínicas, como: dispnéia, náuseas e taquicardia quando os níveis são de até 30% de MetHb. No entanto, podem levar a letargia e perda de consciência em níveis de aproximadamente 50% de MetHb; arritmias cardíacas, falência circulatória e depressão neurológica com valores entre 50 a 70% de MetHb, e níveis acima de 70% geralmente levam à morte (Coleman, 1995; Wright *et al.*, 1999).

A redução da MetHb ocorre por dois principais mecanismos; pela via do sistema NADPH-dependente e NADH-dependente (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida), representadas pela NADPH-metemoglobina redutase e NADH-citocromo b5 redutase (chamada também como NADH-metemoglobina redutase), respectivamente. A NADPH-metemoglobina redutase é capaz de reduzir a MetHb formada sob condições normais, já sob condições de elevada oxidação da Hb a responsável pela redução e NADH-citocromo b5 redutase (Wright *et al.*, 1999; Skold *et al.*, 2011). A fonte de NADH necessária para a redução da MetHb provém da glicólise anaeróbia de Ebdem-Meyerhof, a partir da reação da oxidação da glicose que gera ATP e NADH, por outro lado o substrato NADPH é proveniente da via das pentoses a partir da ativação da G6PD (Figura 10) (Rogers *et al.*, 2009).

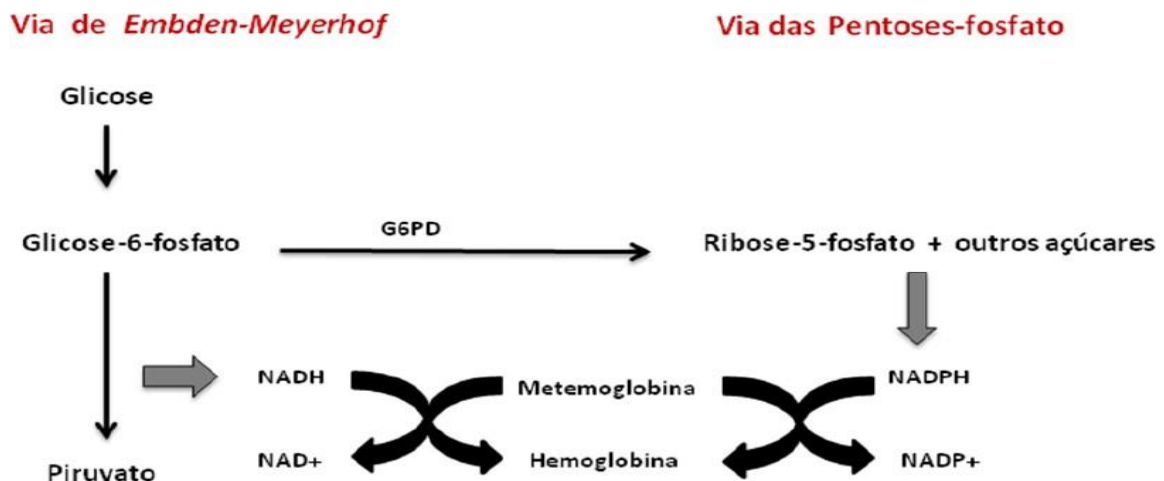


Figura 10: A via de *Embden-Meyerhof* e das pentoses-fosfato, responsáveis pela produção de NADH e NADPH, respectivamente. Substratos importantes no processo de redução da Metemoglobina. Fonte: Percy e Lappin (2008).

O eritrócito humano maduro não possui estrutura mitocondrial ou nuclear para o metabolismo de aminoácidos e lipídios, toda a sua energia resulta do catabolismo da glicose (Zhang *et al.*, 2011). Esta energia é necessária para manter o ferro no seu estado bivalente, altos níveis de potássio, baixos níveis de cálcio e sódio no interior da célula, os grupamentos sulfidrilas das enzimas eritrocitárias, Hb e membrana na forma reduzida e a forma bicôncava da célula (Horowitz e Greenamyre, 2010; Sousa *et al.*, 2015). A entrada de glicose nos eritrócitos ocorre por difusão facilitada, através de uma proteína transportadora

de glicose ou glicose permease, não insulino-dependente (Van Wijk e Van Solinge, 2005).

A geração de energia a partir de um substrato, como a glicose, é realizada por um grande número de enzimas e por três vias metabólicas essenciais para a função do eritrócito, entre elas: a via glicolítica Embden-Meyerhof que é a principal via de síntese de ATP no eritrócito, a via da hexose monofosfato (também chamada Shunt das pentoses) e a via da metahemoglobina redutase (Kresge *et al.*, 2005; Komati Reddy *et al.*, 2015).

Além disso, o eritrócito dispõe de defesas antioxidantes especializadas para manter a Hb no seu estado funcional transportando grande quantidade de O₂ de forma segura para a sua integridade, por meio de um complexo sistema de detoxificação, que previne o acúmulo de radicais livres. Essas defesas antioxidantes protegem as células de quatro formas possíveis como: 1) impedindo a formação de radicais livres; 2) interceptando os radicais livres formados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas; 3) reparando as lesões causadas pelos radicais e 4) proporcionando uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais, com o aumento das enzimas antioxidantes (Lenfant *et al.*, 2005; Gueye *et al.*, 2010; Senchenkova *et al.*, 2017; Revin *et al.*, 2019).

A manutenção dos mecanismos antioxidantes é de extrema importância nos eritrócitos que, ao contrário da maioria das células, não têm capacidade de sintetizar novos lipídios e proteínas para substituir os que foram oxidados (Birben *et al.*, 2012). O efeito cumulativo da lesão oxidativa é responsável pelo processo normal de envelhecimento e destruição dos eritrócitos (Senchenkova *et al.*, 2017). Sendo assim, para combater a agressão oxidativa no eritrócito, o organismo se defende com defesas antioxidantes, as quais são classificadas em defesa antioxidante enzimática e não enzimática (Pandey e Rizvi, 2010; Senchenkova *et al.*, 2017).

O sistema enzimático do eritrócito é dividido em: 1) A meta-Hb redutase NADH dependente converte aproximadamente 67% a Hb oxidada em deoxiHb, através do uso de dois carreadores de elétrons, o citocromo b5 e o NADH; 2) A Superóxido dismutase (SOD) Cu-Zn dependente converte O₂^{•-}, formado na auto-oxidação da Hb, a H₂O₂, o qual tem reatividade limitada; 3) A Catalase (CAT) é uma enzima citoplasmática que apresenta quatro subunidades, cada uma

contendo um grupamento Fe^{3+} , ligado ao seu sítio ativo, esta enzima decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2 e realiza a oxidação de doadores de H^+ , como metanol, ácido fórmico e formóis, com o consumo de peróxidos (atividade peroxidáica); 4) A Glutathione peroxidase (GSH-Px) é uma enzima mitocondrial e citoplasmática que detoxifica o H_2O_2 e remove hidropéroxidos lipídicos formados na membrana, utilizando a GSH como cofator; 5) A glutathione redutase (GR) NADPH dependente é uma enzima citoplasmática que reduz a GSSG em GSH (Figura 11) (Tomaiuolo, 2014; Cluitmans *et al.*, 2016; Orbach *et al.*, 2017).

A defesa antioxidante não enzimática é composta por GSH, NADPH, NADH e por alguns antioxidantes provenientes da dieta, como: o α -tocoferol (vitamina E) que é um dos antioxidantes mais importantes residentes na membrana, que funciona como um finalizador de reações em cadeia, interrompendo a propagação dos radicais livres. Assim como, o β -caroteno (pró-vitamina A) e o ácido ascórbico (vitamina C) que apesar de se encontrarem em níveis baixos dentro do eritrócito (0,043 moles/l) são um dos antioxidantes extracelulares mais importantes ao trabalhar sinergicamente com o tocoferol (Sarkar *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2013).

O principal tampão redox do eritrócito é a GSH, um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, glutamato e cisteína, sendo esse último aminoácido portador do grupo sulfidríla (SH), grupo empregado nas reações de óxido-redução nas quais a molécula participa. A função da GSH é manter componentes diversos da célula em estado reduzido, especialmente proteínas e íons Fe^{2+} de grupos heme. O mecanismo redox de remoção de H_2O_2 envolve a oxidação da GSH, gerando o dímero denominado GSSG. Entretanto, para que ocorra a regeneração da GSSG por redução é necessário que a GR utilize NADPH como fonte de elétrons (Zager e Burkhart, 1998; Schulz *et al.*, 2000; Flohe *et al.*, 2003).

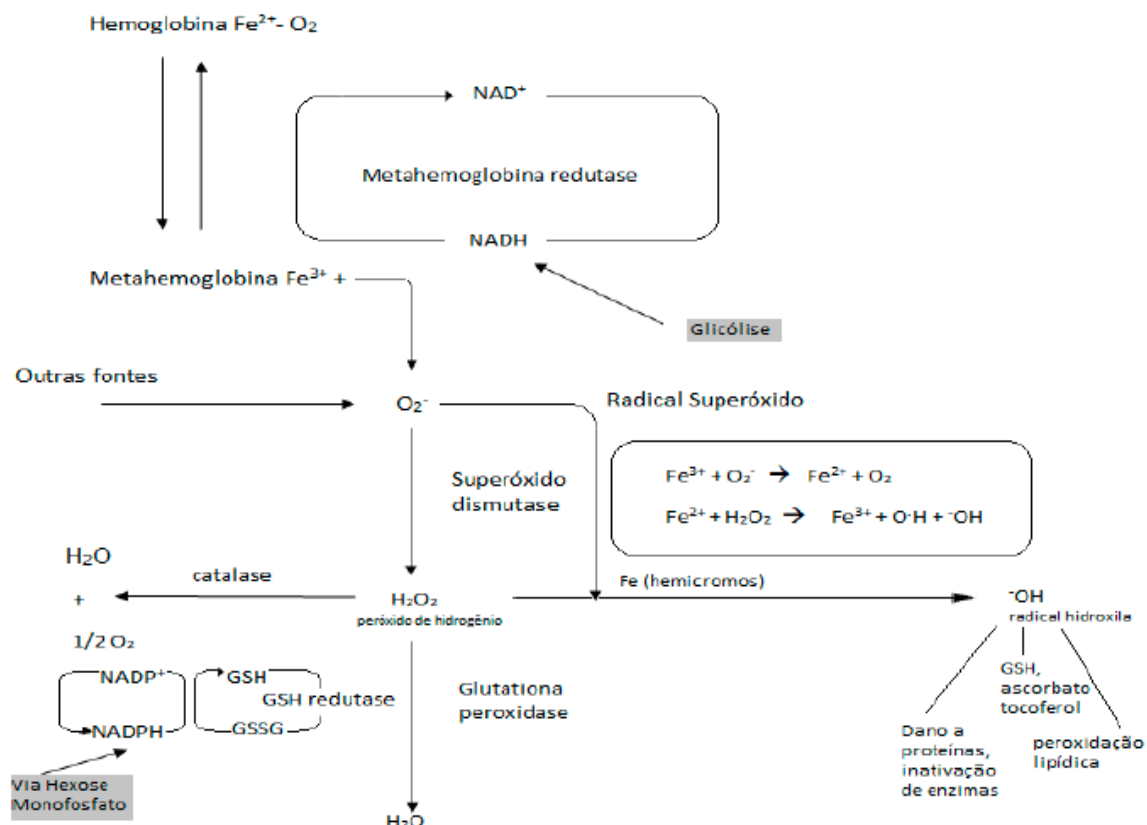


Figura 11: Mecanismo de proteção do sistema antioxidante dos eritrócitos a partir da produção de espécies reativas de oxigênio e produção de metemoglobina. Fonte: HARRIS (1991)

Nesse contexto, considerando os efeitos oxidativos ocasionados pela PQT, especialmente pelo metabólito DDS-NOH, gerando um desequilíbrio do sistema antioxidante do organismo e alterações hematológicas, no número das populações celulares e na morfologia, visamos neste estudo verificar e correlacionar a presença e a intensidade do estresse oxidativo nos pacientes submetidos à PQT, os dados obtidos poderão auxiliar no surgimento de estudos sobre possíveis terapias adjuvantes, para reestabelecer o equilíbrio redox do organismo e proteger o tecido sanguíneo de possíveis alterações, reduzindo os efeitos adversos e com isso diminuindo a taxa de abandono à medicação.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de resposta hematológica, oxidativa, bioquímica e imunológica provocada pela poliquimioterapia em pacientes com hanseníase.

4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar parâmetros hematológicos dos pacientes com hanseníase antes e durante o uso de PQT;
- Quantificar metemoglobina nas amostras sanguíneas dos pacientes com hanseníase antes e durante o uso de PQT;
- Avaliar parâmetros antioxidantes e pró-oxidantes, como GSH e os níveis de peroxidação lipídica dos pacientes com hanseníase antes e durante o uso de PQT;
- Avaliar marcadores bioquímicos no plasma, tais como marcadores de dano hepático e lipídico dos pacientes com hanseníase antes e durante o uso de PQT.
- Avaliar perfil de resposta imunológica dos pacientes com hanseníase antes e durante o uso de PQT;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Indivíduos e Tamanho Amostral

Foram avaliados no período de Setembro/2018 a Nov/2019, 60 pacientes diagnosticados com hanseníase na Unidade de Referência Especializada Dr. Marcello Candia em Marituba – Pará. O tamanho amostral foi calculado com base na taxa de detecção de hanseníase no Estado do Pará, que é de 12,93% (SINAN, 2017), segundo Fórmula de cálculo descrita por SANTOS (2018), utilizando Nível de Confiança de 95%. Os voluntários foram esclarecidos quanto ao objetivo do estudo e finalidade dos resultados, obedecendo aos Aspectos Éticos e Legais da Resolução CNS 466/12. Todos os participantes deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (ANEXO 1). Para realização desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará e está de acordo com as diretrizes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. A aprovação foi registrada sob o parecer nº 157.263 e CAAE 07763212.7.0000.0018 (ANEXO 2).

No presente estudo, o delineamento experimental (Figura 12) consistiu em dois grupos: grupo controle, constituído de voluntários saudáveis e com idade entre 20 a 45 anos que não possuem outras infecções e o grupo de pacientes, que foram acompanhados durante o período de tratamento e subdivididos em: i) grupo D0, etapa em que receberam o diagnóstico de hanseníase e que ainda não começam a PQT; ii) D3-D6, correspondem ao terceiro e sexto mês de PQT; iii) D7-D9, correspondem ao sétimo e nono mês de PQT e iv) D9-12, correspondem ao último trimestre do tratamento.

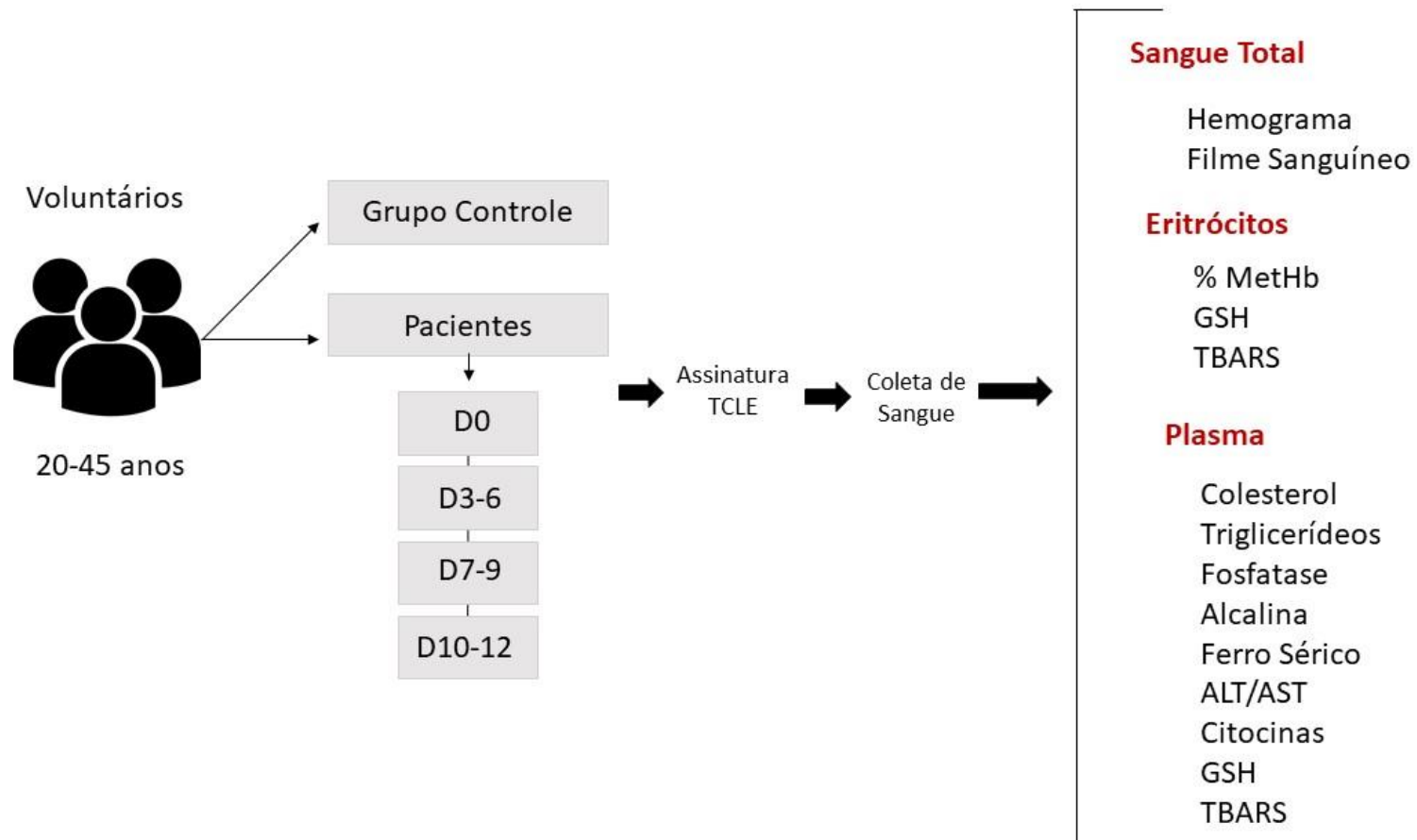


Figura 12: Resumo metodológico.

5.2 Local de pesquisa

A coleta das amostras de sangue dos pacientes com hanseníase foi realizada na Unidade de Referência Dr. Marcelo Cândia, situada no município de Marituba (PA), uma instituição que oferece assistência ambulatorial aos portadores de hanseníase e oferece treinamento para os profissionais de saúde no controle da doença no estado.

5.3 Obtenção e preparo das amostras

Foi realizada punção venosa para coleta de 10 mL de sangue. Após a coleta, 8 mL do material foi conservado em heparina e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos: a porção de plasma foi armazenada em microtubos para os testes de peroxidação lipídica e nitritos e os eritrócitos foram lavados com solução de NaCl a 0,9% por três vezes, com rotação de 3000 rpm por 5 minutos. Ao final do processo foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 50% para cada material colhido. Do material colhido por punção venosa, 2 mL foram conservados em EDTA dissódico para análises hematológicas.

5.4 Teste Qualitativo de Brewer (G6PD)

Foi realizada a verificação qualitativa da enzima por teste colorimétrico, baseado na oxidação da hemoglobina pelo nitrito de sódio e a reconversão enzimática desta na presença de azul de metileno, por transferência de hidrogênio de NADPH para a metemoglobina, facilitando a sua redução (Brewer *et al.*, 1962). Para isto, preparou-se uma solução de 5mL de glicose, nitrito de sódio e azul de metileno. A esta solução adicionou-se 1mL de sangue total. Dois tubos controles foram utilizados um com apenas sangue, glicose e azul de metileno (controle negativo) e outro com sangue, glicose e nitrito de sódio (controle positivo), ambos foram incubados por 3 horas à 37°C em banho maria. Após o período de incubação, retirou-se 20µL do tubo e este foi transferido para um tubo contendo 1mL de água destilada. A leitura foi baseada na comparação da coloração exibida pela amostra com as amostras dos tubos controle. A cor vermelho vivo indicou normalidade e a cor castanho escuro, deficiência enzimática.

5.5 Determinação do percentual de Metemoglobina

A metodologia utilizada foi adaptada de Hegesh *et al.* (1970). O ensaio consistiu na leitura das absorbâncias de oximetahemoglobina e MetHb naturalmente presentes nos eritrócitos quando expostos ao ferricianeto de potássio, um agente metemoglobinizante, e após a utilização de um agente neutralizador. Foram utilizados 400µL da suspensão de eritrócitos, onde foi adicionado Triton X, H₂O destilada gelada e tampão fosfato. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 630nm.

5.6 Quantificação de Ferro Sérico

A quantificação do ferro sérico foi realizada pela metodologia Labtest Ferrozine®, onde os íons férrico são dissociados da transferrina por ação de um tampão de pH ácido e reduzidos à íons ferroso por ação da hidroxilamina. Após a adição do Ferrozine® formou-se um complexo magenta brilhante cuja absorbância, foi medida em 580nm, sendo proporcional a quantidade de ferro presente na amostra.

5.7 Quantificação dos Marcadores Hepáticos

A determinação das enzimas Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) foram realizadas através dos kits comerciais da Bioliquid, métodos realizados por meio cinético UV e absorbância lida em 340nm.

A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, formando o glutarato e o piruvato. O AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, formando o glutarato e o oxalacetato. Já a FA hidrolisa o substrato de timolftaleína monofosfato, formando timolftaleína e o fosfato inorgânico.

Como parâmetro clínico de avaliação da lesão das vias e fluxo biliar, foi determinado a concentração sérica de fosfatase alcalina em U/L. Empregamos o kit comercial Fosfatase Alcalina Bioclin. O volume de soro utilizado foi de 10µL.

5.8 Determinação de Glutathiona Reduzida

Os valores de glutathiona reduzida (GSH) foram determinados nos eritrócitos de acordo com o método de Ellman (1959). As suspensões de

eritrócitos foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 2% e o sobrenadante, contendo a GSH, foi clareado por centrifugação a 7000 rpm por 5 min, em seguida adicionar-se-á o ácido 5,5'- ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) com uma concentração de 0,47mM, culminando na formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), que é proporcional a concentração de ácido tiol solúvel, principalmente a GSH. O experimento foi feito a 25°C e os valores de absorvância serão obtidos a $\lambda=412$ nm em espectrofotômetro contra um reagente branco. As concentrações nas suspensões de eritrócitos foram calculadas a partir de uma curva-padrão de absorção versus a concentração de GSH nas células, expressa em $\mu\text{M/mL}$.

5.9 Peroxidação Lipídica

A peroxidação Lipídica foi avaliada a partir da quantificação do Malondialdeído (MDA), um peróxido lipídico utilizado como um indicador do estresse oxidativo. A determinação foi realizada segundo o método descrito por Ondei *et al.* (2013). Esta técnica baseia-se na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, formando o complexo MDA-TBA de cor rósea, com absorvância em 535 nm.

5.10 Análise hematológica

As amostras foram analisadas por meio de metodologia semi automatizada, utilizando o contador ABX micros 60, nas quais foram avaliados os seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM (Volume Corpuscular Média), CHCM (Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média), RDW (Redcell Volume DistributionWidth), leucócitos totais e plaquetas. Para a visualização de possíveis alterações celulares, como poiquilocitose, o filme sanguíneo foi realizado em todas as amostras, utilizando a coloração panótica e, posteriormente submetido à microscopia óptica como método para a visualização dos elementos celulares.

5.10 Dosagem de Citocinas

As concentrações plasmáticas de IL-17a (PeproTech, EUA) e IL-6, IL-10, IL-4, TGF- β e TNF- α (todas da eBioscience, EUA), foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) no leitor de microplacas (EzReader, EUA). Os

limites de detecção de cada citocina foram: TNF- α , 4-500 pg / mL; IL-6, 2-200 pg / mL; IL-10, 2-300 pg / mL; IL-17a, 6-1000 pg / mL; IL-4, 2 - 400 pg / mL; TGF- β , 20-1000 pg / mL.

5.11 Análise Estatística

Após tabulação dos resultados obtidos nas diversas avaliações, os valores obtidos foram inseridos no software GraphPad Prism 7.0 (Graphpad Software 7, INC). A verificação da normalidade de distribuição dos dados foi testada pelo método de Shapiro Wilk ($p > 0.05$). Para as variáveis que apresentaram normalidade foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via com critério de correção a posteriori de Bonferroni, com nível de significância de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos textualmente e em gráficos com média e erro padrão (média \pm erro padrão).

6 RESULTADOS

6.1 Características demográficas, laboratoriais e funcionais dos participantes do estudo.

O estudo correspondeu a 60 pacientes e 10 indivíduos saudáveis, no qual 100% dos casos foram classificados como MB. A maioria dos pacientes é do sexo feminino (59%) com idade variando de 31 a 45 anos, 75% apresentaram índice bacteriológico (IB) positivo variando de 1 a 4, 49% possuem grau de incapacidade 2 e 86% não possuem deficiência de G6PD. Todos os voluntários saudáveis não apresentaram IB e grau de incapacidade (Tabela 1).

Tabela 1: Características demográficas, laboratoriais e funcionais dos participantes do estudo.

Variáveis	D0 (n:15)	D3-6 (n:15)	D7-9 (n:15)	D10-12 (n:15)	Controles (n:10)
Gênero (%)					
Feminino	59%	59%	59%	59%	60%
Masculino	41%	41%	41%	41%	40%
Idade					
20-30	28%	28%	28%	28%	90%
31-45	72%	72%	72%	72%	10%
Índice Bacteriológico					
0	26%	*	*	*	100%
1-2	49%	*	*	*	-
3-4+	25%	*	*	*	-
Grau de Incapacidades					
0	24%	*	*	*	-
1	27%	*	*	*	-
2+	49%	*	*	*	-
Forma clínica					
Paucibacilar	-	-	-	-	-
Multibacilar	100%	100%	100%	100%	-
Deficiência de G6PD					
Negativo	86%	86%	86%	86%	100%
Positivo	14%	14%	14%	14%	-

LEGENDA: * Não foi possível ter acesso aos resultados; - Não existem outros dados

6.2 Perfil Hematológico

O perfil hematológico dos pacientes em tratamento para hanseníase fornece dados que podem justificar possíveis intervenções na PQT, visto que são relatados pela literatura quadros de anemia decorrentes de tratamento terapêutico com drogas oxidantes, como por exemplo a Dapsona.

Na tabela 2 é possível observar que todos os pacientes com hanseníase em uso de PQT apresentaram diminuição significativa nos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito em relação ao controle. Além disso, os pacientes que estavam entre a 7ª Dose (D7) e 12ª Dose (D12) apresentaram diminuição do número de plaquetas em relação em relação aos grupos Controle, D0.

Tabela 2: Parâmetros hematológicos dos indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase e em uso da PQT.

Parâmetro	controle	D0	D3-6	D7-9	D10-12
Hemácias (millions mm ⁻³)	4.57±0.98	5.02±0.61	3.74±0.57 ⁺	3.77±0.49 ⁺	3.56±0.56 ⁺
Hemoglobina (g dl ⁻¹)	14.53±1.37	14.27±0.54	11.89±1.51 ^{**}	11.13±1.05 ^{**}	11.40±1.17 ^{**}
Hematócrito (%)	43.37±2.48	48.12±3.41	36.74±4.11 ⁺	36.4±2.38 ⁺	34.87±3.10 ^{**}
Plaquetas (U mm ⁻³)	241±1.41	209±26.06	173±23.67	309±1,73 ⁺	256±21.92

Os resultados realizados em triplicatas. One-way ANOVA e teste post-hoc Bonferroni, utilizando como base de comparação o grupo controle e os pacientes que ainda não receberam PQT (D0), p <0,05. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão *Diferença estatística em relação ao grupo controle; + Diferença estatística em relação ao grupo D0;

6.3 Determinação do Percentual de Metemoglobina (%MetHb)

A determinação do percentual de metemoglobina (Figura 13) avalia a proporção entre os estados de oxidação/redução do ferro contido no grupamento heme. Notou-se que os pacientes diagnosticados com hanseníase, mas ainda sem PQT (D0 - 3,313± 0,4048; p<0.05) apresentam aumento do % MetHb em relação ao grupo controle (1,393± 0,31) (valor de referência: <2%). No entanto, a PQT potencializou a formação de MetHb a partir da 3ª Dose até a 12ª Dose (D3-6 – 4,622±0,2535; D7-9 – 7,94±0,8485; D10-12 – 12,3±1,556) quando comparado ao grupo controle e hanseníase sem tratamento, chegando a um percentual aproximado de 14% de metemoglobina. Esse comportamento pode sugerir um efeito dose-dependente.

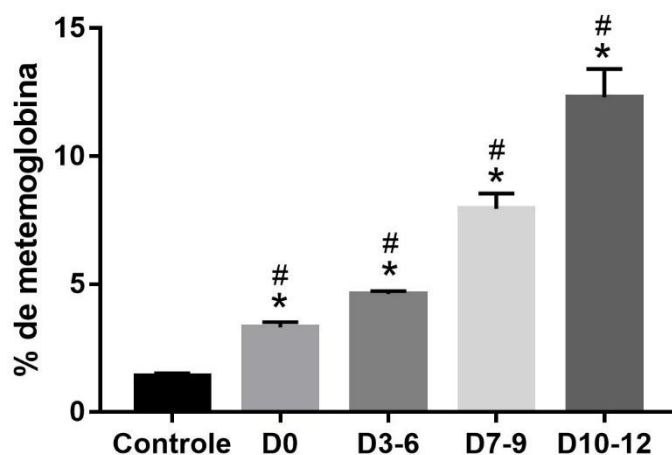


Figura 13: Percentual de MetHb em suspensão de eritrócitos de indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase e em uso da PQT. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. One-way ANOVA e teste post-hoc de bonferroni, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação ao grupo controle; # Diferença estatística em relação ao grupo D0;

6.4 Parâmetros de Estresse Oxidativo

Em relação a produção de antioxidantes, os níveis de GSH no plasma (Figura 14 A) não sofreram alterações dos pacientes sem tratamento (D0 - $3,185 \pm 0,857$) e nos tratados até o terceiro trimestre de PQT (D3-6 - $3,983 \pm 1,023$; D7-9 - $5,193 \pm 0,534$) quando comparados ao grupo controle ($4,317 \pm 1,372$), apenas no último trimestre de tratamento (D10-12 - $12,57 \pm 1,665$; $p < 0,05$), houve um aumento dos níveis de GSH quando comparado aos demais grupos.

Já no eritrócito (figura 14 B), os níveis de GSH estavam reduzidos no segundo (D3-6 - $1,148 \pm 0,5191$; $p < 0,05$) e terceiro trimestres de PQT (D7-9 - $1,025 \pm 0,179$; $p < 0,05$) comparados ao controle ($2,495 \pm 0,444$) e ao último trimestre (D10-12 - $2,467 \pm 0,386$), não havendo diferença em relação aos pacientes não tratados (D0 - $1,76 \pm 0,265$).

Na avaliação da peroxidação lipídica, os níveis de TBARS no plasma (Figura 14 C) se encontram elevados nos pacientes diagnosticados com hanseníase sem tratamento (D0 - $22,31 \pm 3,816$; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($9,306 \pm 1,081$). Entretanto, a partir do primeiro trimestre de tratamento,

os níveis de peroxidação lipídica estavam extremamente elevados (D3-6 - $69,08 \pm 7,493$; D7-9 - $67,28 \pm 6,088$; D10-12 - $63,7 \pm 2,488$; $p < 0,05$), permanecendo no pico oxidativo até o final do tratamento.

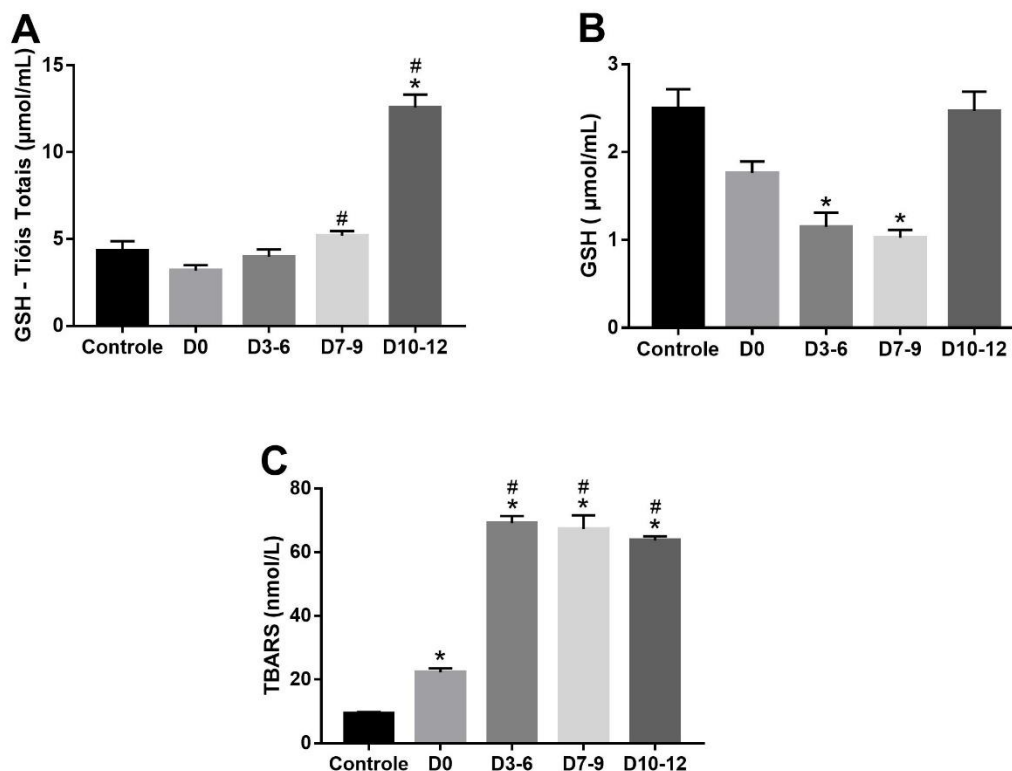


Figura 14 – Avaliação de parâmetros oxidativos GSH no plasma (A), GSH nos eritrócitos (B) e Peroxidação Lipídica (C), em indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase e em uso da PQT. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. One-way ANOVA e teste post-hoc de bonferroni, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação ao grupo controle; # Diferença estatística em relação ao grupo D0;

6.5 Perfil Bioquímico

Nos níveis de triglicerídeos (Figura 15 A), encontrou-se uma redução no segundo trimestre da PQT (D3-6 - $81,7 \pm 14,94$; $p < 0,05$) em relação aos grupos controle ($111,9 \pm 12,58$) e aos pacientes não tratados (D0 - $110,4 \pm 25,58$) não havendo diferença em relação aos demais grupos (D7-9 - $94,31 \pm 9,583$; D10-12 - $87,3 \pm 18,14$). Observou-se uma redução dos níveis de colesterol total (Figura 15 B) no segundo (D3-6 - $187,7 \pm 41,52$; $p < 0,05$) e terceiro trimestre (D7-9 - $184,5 \pm 33,99$; $p < 0,05$) da PQT quando comparado ao grupo controle ($260,8 \pm 20,83$), não havendo diferença em relação aos demais grupos (D0 - $206,2 \pm 43,49$; D10-12 - $242,9 \pm 36,77$).

Os níveis de fosfatase alcalina (Figura 15 C) aumentaram nos pacientes diagnosticados com hanseníase (D0 - $76,69 \pm 15,52$; $p < 0,05$) quando comparados ao controle ($49,77 \pm 5,113$), reduzindo a partir do segundo trimestre de tratamento (D3-6 - $52,41 \pm 8,24$) e se mantendo nos valores normais até o final do tratamento (D7-9 - $48,28 \pm 2,926$; D10-12 - $54,28 \pm 8,654$) comparado ao controle. Outro parâmetro alterado foi o nível sérico de Ferro (Figura 15 D) que estava elevado nos dois últimos trimestres do tratamento com a PQT (D7-9 - $130,5 \pm 26,16$; D10-12 - $159,8 \pm 30,47$; $p < 0,05$), em relação aos demais grupos avaliados (Controle - $75,54 \pm 10,03$; D0 - $72,31 \pm 14,22$; D3-6 - $84,12 \pm 9,328$).

Já na relação AST/ALT (Figura 15 E), observa-se um aumento no último trimestre de tratamento com PQT (D10-12 - $2,015 \pm 0,584$; $p < 0,05$) em relação ao grupo Controle ($1,098 \pm 0,449$), ao grupo D0 ($1,09 \pm 0,402$) e ao segundo trimestre de tratamento (D3-6 - $1,113 \pm 0,416$), não havendo diferença entre o terceiro trimestre (D7-9 - $1,479 \pm 0,414$) e os demais grupos.

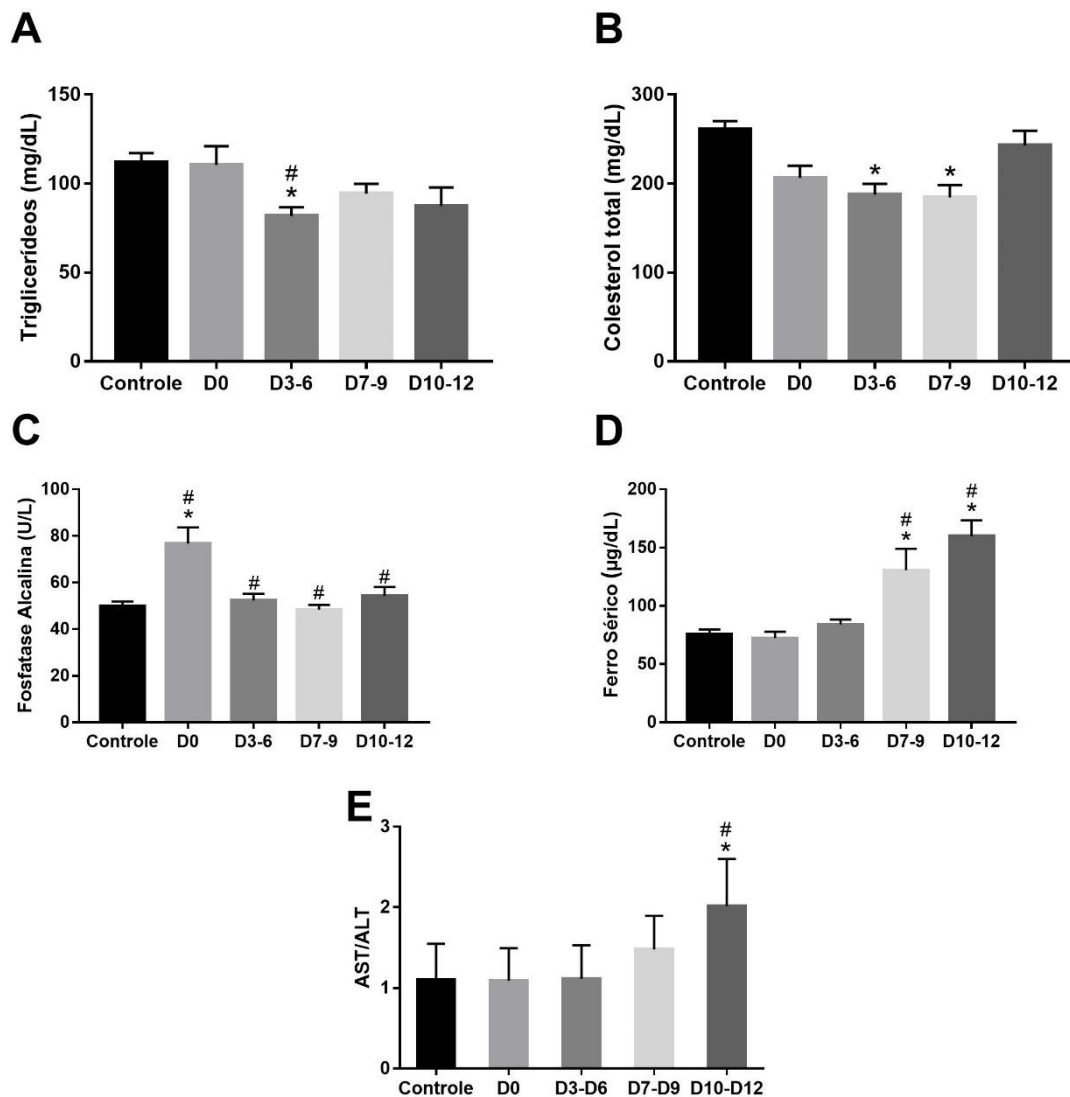


Figura 15 - Avaliação de parâmetros bioquímicos: triglicerídeos (A) Colesterol Total (B) Fosfatase Alcalina (C), Ferro Sérico (D) e Relação AST/ALT (E) em indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase e em uso da PQT. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. One-way ANOVA e teste post-hoc de Bonferroni, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação ao grupo controle; # Diferença estatística em relação ao grupo D0;

6.5 Perfil de Citocinas

Os Pacientes com hanseníase apresentaram altos níveis de IL-6 (D0- $31,06 \pm 8,13$; Controle- $9,04 \pm 2,01$), IL-17 (D0- $56,14 \pm 10,33$; Controle- $23,21 \pm 7,38$), TNF- α (D0- $16,78 \pm 4,32$; Controle- $5,47 \pm 1,29$) e IL-4 (D0- $21,74 \pm 5,26$; Controle- $16,01 \pm 3,57$) comparado ao grupo controle (Figura 16 A,B,C,E). Em contrapartida, foi observado baixos níveis de IL-10 e TGF- β (D0- $105,11 \pm 32,40$;

Controle- $371,2 \pm 14,78$) (Figura 16 D-F) quando comparado ao grupo controle (indivíduos saudáveis). No entanto, o tratamento com PQT nos pacientes com hanseníase, foi capaz de reduzir significativamente as citocinas com perfil inflamatório (Th1) e anti-inflamatório, como IL-4 ($14,82 \pm 16,53$), chegando a níveis basais (IL-6- $11,6 \pm 13,12$; IL-17- $25,13 \pm 36,8$; TNF- α – $5,73 \pm 6$). No entanto, o tratamento elevou a produção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 ($10,18 \pm 11$); TGF- β - $393,35 \pm 164,65$) comparado aos pacientes com hanseníase sem tratamento, retornando aos níveis basais.

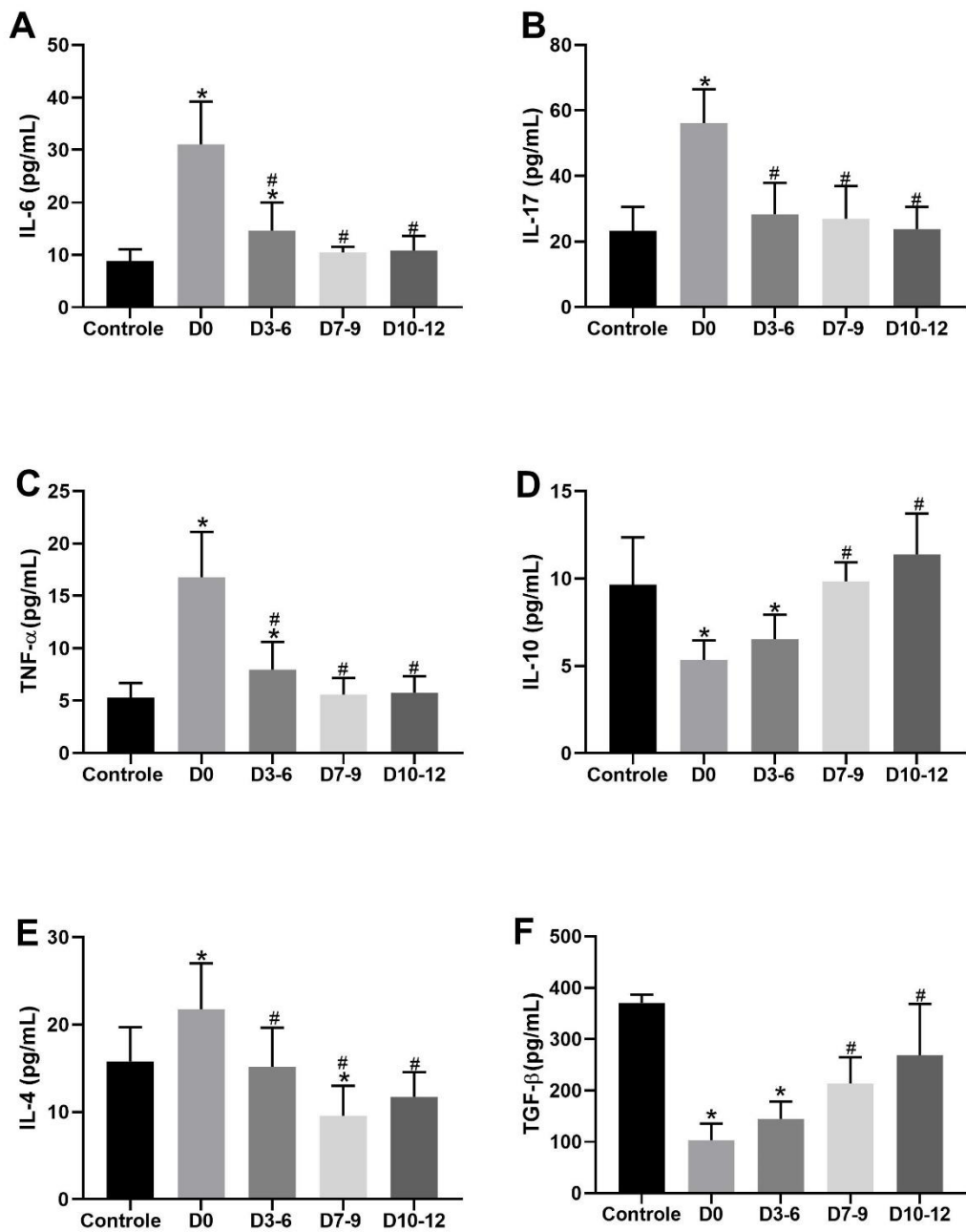


Figura 16 – Níveis séricos de citocinas: (A) IL-6, (B) IL-17, (C) TNF- α , (D) IL-10, (E) IL-4, (F) TGF- β em indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase e em uso com a PQT. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão, sendo os resultados realizados em triplicatas. One-way ANOVA e teste post-hoc de Bonferroni, $p < 0,05$. * Diferença estatística em relação ao grupo controle; # Diferença estatística em relação ao grupo D0.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado os parâmetros hematológicos, estresse oxidativo e o perfil imunológico de pacientes recém diagnosticados com hanseníase e durante o tratamento da PQT. A infecção por *M.leprae* gerou um aumento do percentual de metemoglobina e fosfatase alcalina. Além disso, aumento da secreção de citocinas pro-inflamatórias tais como IL-6, IL-17 e TNF- α e reduziu IL-10 e TGF- β . Em contrapartida, durante o uso da PQT, observou-se diminuição dos números de hemácias, hemoglobina e aumento do percentual de metemoglobina, com isto aumento do nível de ferro sérico. Além disso, foi observado a redução do perfil inflamatório e aumento de citocinas reguladoras. Também foi visto um aumento da peroxidação lipídica, redução dos níveis de GSH, sugerindo um estado de estresse oxidativo, com alterações dos marcadores bioquímicos lipídicos e hepáticos.

A idade com maior prevalência dos pacientes com hanseníase foi na faixa etária de 31 a 45 anos (72%), corroborando com estudos que demonstraram que apesar de ser uma doença que se manifesta em todas as idades (De Wit *et al.*, 1996; Hall e Salipante, 2010), é na população adulta e em plena capacidade produtiva, que existe a maior predominância. Em relação a distribuição de casos por sexo, predominou maior incidência no sexo feminino. Segundo a OMS, na maior parte do mundo os homens são mais afetados do que as mulheres, geralmente seguindo a proporção 2:1 (World Health Organization, 2017).

Quanto o número de pacientes que já apresentaram grau de incapacidade no momento do diagnóstico, 49% apresentaram o grau mais grave, o Grau II, isto é indicativo de um diagnóstico tardio (Brasil, 2018) Quando não diagnosticada precocemente tem potencial de gerar incapacidades físicas e deformidades irreversíveis, o que pode afastar o paciente da atividade produtiva

e gerando um elevado custo social e para a família (Lana *et al.*, 2013; Sales *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2014; Lastória e Abreu, 2014b). Observou-se que a classificação operacional de todos os pacientes, foi a multibacilar, o que chama atenção por dois motivos, por ser a forma mais grave, com maior possibilidade de sequelas e o outro por ser transmissível.

Entretanto quando descoberta de maneira precoce e com intervenção medicamentosa com a PQT, terapia combinada que reduz a carga bacteriana logo após o início do tratamento, leva a incidência de deformidades a níveis muito baixos (Romero-Montoya *et al.*, 2017), porém a administração da PQT está relacionada a várias reações adversas pelo seu uso (Guragain *et al.*, 2017).

Dentre elas, a anemia caracterizada pela deficiência na concentração de hemoglobina, número de hemácias e hematócrito (Sztiller *et al.*, 2006). Esse comportamento pode ser visto neste estudo, onde os pacientes submetidos à PQT a partir do segundo trimestre de tratamento, apresentam redução em todos os três parâmetros hematológicos (Kaluarachchi *et al.*, 2001), sugerindo-se a presença de anemia hemolítica, pela formação de metemoglobina vista em todos os meses de tratamento, além da redução dos níveis de colesterol que podem estar associadas a uma possível atividade eritropoiética (Shalev *et al.*, 2007; Fessler *et al.*, 2013), também relacionado a quadros de anemia hemolítica (Atac *et al.*, 2003).

A metemoglobina é a forma oxidada da hemoglobina Fe^{3+} , esta não possui a capacidade de ligar-se ao oxigênio, provocando a interrupção da capacidade de transporte de oxigênio (Traeger-Synodinos *et al.*, 2001), desta forma, as alterações como cianose, com um quadro característico de baixa saturação de oxigênio no sangue e descoloração azulada ou púrpura da pele (Da-Silva *et al.*, 2003).

O ferro férrico proveniente da Metemoglobina participa da reação de Fenton, uma reação rápida, originando o ferro ferroso, este reage com o H_2O_2 , formando o radical $OH\cdot$. Esse radical inicia a peroxidação lipídica, onde tanto o Fe^{3+} e o Fe^{2+} catalisam hidroperóxidos lipídicos, respectivamente em radicais alcóxi ($LO\cdot$) e radicais peróxi ($LOO\cdot$), que levam a lesão hepática e alterações hematológicas (Gutteridge, 1986; Faivre *et al.*, 1998; Woollard *et al.*, 2009; Rifkind *et al.*, 2015). Esse dano também pode ocorrer devido a degradação ou diminuição da disponibilidade da proteína ferritina, responsável em armazenar o

ferro em seu núcleo, inibindo assim a reatividade do ferro e o seu acúmulo nos tecidos (Kohgo *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2016).

Essas alterações estão relacionadas a fármaco Dapsona, constituinte da PQT, que devido a capacidade do seu metabólito DDS-NOH de desnaturar por vias oxidativas a membrana dos eritrócitos (Mcmillan *et al.*, 1995; Bolchoz *et al.*, 2002), acelerando o processo de hemólise. Além disso, acredita-se que as EROs estejam envolvidas nos processos que levam a anemia hemolítica. Estudos de Bordin *et al.* (2010) indicam que a DDS-NOH induz alterações progressivas nos eritrócitos estando intimamente ligada a um quadro de anemia, iniciando pelo domínio citosólico das proteínas de membrana dos eritrócitos, a banda 3, que leva a formação de MetHb e o comprometimento da atividade da proteína tirosina quinase e das fosfatases (Anemia Hemolítica), com formação de agregados da banda 3 na membrana eritrocitária.

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

Este mecanismo também foi sugerido por Reilly *et al.* (1999) que demonstraram que o potencial de induzir MetHb nos eritrócitos *in vitro* está relacionado ao ciclo de oxidação-redução com a oxihemoglobina e com moléculas O₂, produzindo MetHb e EROs, respectivamente. Entretanto, este efeito hematotóxico da DDS-NOH não ocorre somente na deficiência de G6PD, como pode observar-se neste estudo onde apenas 14% dos pacientes possuem a deficiência, ou em situações de depleção da atividade antioxidante de GSH, que é uma das principais causas da formação de MetHb pela DDS-NOH.

Os danos oxidativos ocasionados pela PQT também foram encontrados através da dosagem de marcadores pró-oxidantes como TBARS, onde indiretamente pode-se dosar o malondialdeído, produto final estável do processo de peroxidação lipídica e considerado um importante mediador de danos nos

tecidos. Outros estudos, que também avaliaram o período de tratamento, observaram um aumento da peroxidação lipídica nos pacientes com hanseníase e submetidos à PQT (Bhadwat e Borade, 2000; Reddy *et al.*, 2003; Jyothi *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2015). Em trabalhos já foi observado que o tratamento com DDS-NOH em eritrócitos aumentou os níveis de MDA, sugerindo que este metabólito é o responsável pelo estresse oxidativo nas hemácias (Edwards e Fuller, 1996; Albuquerque *et al.*, 2015).

A fim de verificar a responsividade do sistema antioxidante frente a oxidação constante dos fármacos da PQT, realizou-se a dosagem da GSH, antioxidante conhecido por ser a primeira linha de defesa do eritrócito na reciclagem contra agentes oxidantes (Pang e Panee, 2014; Maurya *et al.*, 2015). Foi observado uma redução dos níveis de GSH no eritrócito e um aumento dos níveis plasmáticos. Sugere-se que isto ocorra devido a capacidade da GSH reduzir o nitrobenzeno (Becker e Sternson, 1980) transformando-o em uma molécula de DDS (Lee *et al.*, 2013), esta por sua vez metabolizada no fígado tornando o metabólito DDS-NOH (Coleman *et al.*, 1989), dando assim continuidade ao processo contínuo de oxidação, de forma que este processo se repita até que os níveis de GSH estejam esgotados (Rebecca, 2000).

Outro fator que pode estar envolvido na redução dos níveis de GSH nos eritrócitos, é a redução dos níveis de triglicerídeos e aumento do colesterol, um importante componente estrutural da membrana plasmática (Chabanel *et al.*, 1983; Mohandas e Gallagher, 2008), responsável pela regulação da bicamada lipídica (Chabanel *et al.*, 1983) e por estar envolvido na incorporação de antioxidantes na membrana do eritrócito (Lopez-Revuelta *et al.*, 2006; Sanchez-Gallego *et al.*, 2010). Essa alteração ainda pode estar envolvida com o próprio *M. leprae*, que utiliza o colesterol como fonte de carbono para o seu metabolismo (Salgado *et al.*, 2018).

Com o intuito de avaliar possíveis danos hepáticos devido este órgão ser responsável por processos de metabolização (Li *et al.*, 2015), que incluem os fármacos da PQT, gerando uma produção de EROS (Chen *et al.*, 2016; Vespasiani-Gentilucci *et al.*, 2018) observou-se um aumento da relação das aminotransferases (ALT/AST) no último trimestre de tratamento, sugerindo dano, este que pode estar envolvido pelo aumento do quadro de estresse oxidativo (Cichoż-Lach e Michalak, 2014; Zhang *et al.*, 2018). Além disso, existem

alterações relacionadas apenas a hanseníase, como o aumento dos níveis da enzima fosfatase alcalina, sua elevação sérica está correlacionada com a presença de doenças e alterações no fígado, o envolvimento hepático é observado nos estágios iniciais da doença, uma vez que a forma virchowiana, classificada operacionalmente como MB, possui acometimento hepático e esplênico. (Gordin *et al.*, 1997; Kriakov *et al.*, 2003; Tural Önür *et al.*, 2016).

Biomarcadores tais como as citocinas também são usados para monitorar a resposta imune em pacientes com hanseníase antes e durante o tratamento com a PQT. Embora diversos estudos apontem que o perfil Th1 é presente em PB e Th2 pacientes MB, muitos pacientes mostram ter o perfil misto imunologicamente dinâmico, que vai além da polarização de Th1 e Th2, com a diferenciação em outras subpopulações de linfócito T tais como Th9, Th22, Th17 e Treg (células T reguladoras) (Walker e Lockwood, 2006; Santos *et al.* 2017; Sousa, Sotto e Quaresma, 2017). Linfócitos Th17 produzem TNF- α , IL-6, IL-4, IL-17 e iNOS com aumento de EROs resultando na destruição do bacilo. A citocina IL-17 a exemplo tem um importante papel na resposta frente à patógenos intracelulares além de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas resultando na ativação e recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio inflamatório (Saini, Ramesh, Nath, 2013; Aarão *et al.* 2016). Contudo, o aumento exacerbado de IL-17 está associado ao processo de desmielinização, levando conseqüentemente dano tecidual (Aarão, *et al.* 2016).

Além de IL-17 foi observado aumento das citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6 e TNF- α em pacientes recém diagnosticados com hanseníase. No entanto, após os três primeiros meses de uso da PQT os níveis da IL-6 reduziram. Este resultado também foi observado por Cassier-Costa (2017), em que pacientes LL sem tratamento apresentaram aumento de IL-6 e após o uso da PQT foi observado baixos níveis desta citocina. A PQT a qual é composta por clofazimina e dapsona poderiam ser as responsáveis pela redução das citocinas pró-inflamatórias como já observado anteriormente por Moubasher *et al.* (1998).

Durante o tratamento da PQT também foi observado o aumento de citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10 e TGF- β , chegando a níveis semelhantes aos indivíduos saudáveis. Estas citocinas são responsáveis por suprimir a ativação de macrófagos e inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Komai *et al.* 2018). De acordo com Cassier-Costa (2017), o

aumento de IL-10 bem como IL-13 após o tratamento com a PQT pode sugerir efetividade do tratamento. Além disso, o aumento de IL-10 associado a baixa carga bacteriana é considerado um importante marcador para diferenciar pacientes infectados de não infectados e entre pacientes de contatos domésticos (Moubasher et al. 1998; Cassier-Costa, 2017).

8 CONCLUSÃO

- A infecção com o *Mycobacterium leprae* induziu a um leve aumento no percentual de metemoglobina e nos níveis de MDA, mas elevou de forma expressiva a enzima fosfatase alcalina.
- O tratamento com a PQT levou a um quadro de anemia hemolítica e metemoglobinemia, gerando um estresse oxidativo que pode estar associado ao acúmulo de ferro, com aumento da peroxidação lipídica e redução nos níveis de GSH.
- A PQT pode levar a alterações na função hepática, por aumentar a relação ALT/AST, gerando eventualmente dano hepático.
Percebe-se que a partir do segundo trimestre (D3-6) de tratamento com a PQT ocorreu alterações hematológicas, bioquímicas e oxidativas, fato que pode justificar a elevada taxa de abandono do tratamento ou mudança no esquema terapêutico.
- Em relação a resposta imune, a infecção com o bacilo elevou a resposta inflamatória no paciente, enquanto o tratamento com a PQT induziu uma resposta imunossupressora periférica nos pacientes com hanseníase com aumento de IL-10 e TGF- β , levando a diminuição nos níveis de citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-17) e anti-inflamatória (IL-4).

REFERÊNCIAS

- AARAO, T. L. et al. Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. **Microb Pathog**, v. 77, p. 66-72, 2014.
- AARÃO, T. L. d. S.; DE SOUSA, J. R.; BOTELHO, B. S.; FUZIL, H. T. et al. Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy. **Microbial Pathogenesis**, 90, p. 64-68, 2016/01/01/ 2016.
- 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. e0134768, 2015.
- ALCAIS, A. et al. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAM1 gene in Vietnamese leprosy sibships. **J Infect Dis**, v. 181, n. 1, p. 302-8, 2000.
- ARAÚJO, A. E. R. D. A. E. et al. Neural complications and physical disabilities in leprosy in a capital of northeastern Brazil with high endemicity. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, p. 899-910, 2014.
- ATAC, B. et al. Anemia and hypocholesterolemia. **Heart Dis**, v. 5, n. 1, p. 65-71, 2003.
- BAFICA, A. et al. Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. **J Clin Invest**, v. 115, n. 6, p. 1601-6, 2005.
- BECKER, A. R.; STERNSON, L. A. Nonenzymatic reduction of nitrosobenzene to phenylhydroxylamine by NAD(P)H. **Bioorganic Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 305-312, 1980.
- BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 257-63, 2004.
- BHADWAT, V. R.; BORADE, V. B. Increased lipid peroxidation in lepromatous leprosy. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 66, n. 3, p. 121-5, 2000.
- BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2012, p. 181089, 2012.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- BOLCHOZ, L. J. et al. Primaquine-induced hemolytic anemia: effect of 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline on rat erythrocyte sulfhydryl status, membrane lipids, cytoskeletal proteins, and morphology. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 303, n. 1, p. 141-8, 2002.

BORDIN, L. et al. Dapsone hydroxylamine induces premature removal of human erythrocytes by membrane reorganization and antibody binding. **British journal of pharmacology**, v. 161, n. 5, p. 1186-1199, 2010.

BRADSHAW, T. P. et al. Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsone hydroxylamine. **Free Radic Biol Med**, v. 22, n. 7, p. 1183-93, 1997.

BRASIL. Sistema de Informação de Agravos de notificação **Ministério da Saúde** 2018.

BREWER, G. J.; TARLOV, A. R.; ALVING, A. S. The methemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. A simplified procedure for detecting a specific hypersusceptibility to drug hemolysis. **Jama**, v. 180, p. 386-8, 1962.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-19, 2004.

BULUT, Y. et al. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. **J Immunol**, v. 167, n. 2, p. 987-94, 2001.

CASSIRER-COSTA, F.; MEDEIROS, N. I.; CHAVES, A. T.; LYON, S. *et al.* Cytokines as biomarkers to monitoring the impact of multidrug therapy in immune response of leprosy patients. **Cytokine**, 97, p. 42-48, 2017/09/01/ 2017.

CHABANEL, A. et al. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. **Biophysical journal**, v. 44, n. 2, p. 171-176, 1983.

CHEN, S. et al. Metabolic Syndrome and Serum Liver Enzymes in the General Chinese Population. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 2, p. 223-223, 2016.

CHUNG, T. W.; YU, J. J.; LIU, D. Z. Reducing lipid peroxidation stress of erythrocyte membrane by alpha-tocopherol nicotinate plays an important role in improving blood rheological properties in type 2 diabetic patients with retinopathy. **Diabet Med**, v. 15, n. 5, p. 380-5, 1998.

CICHOŹ-LACH, H.; MICHALAK, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 25, p. 8082-8091, 2014.

CLUITMANS, J. C. A. et al. Red Blood Cell Homeostasis: Pharmacological Interventions to Explore Biochemical, Morphological and Mechanical Properties. v. 3, n. 10, 2016.

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

COLEMAN, M. D.; BRECKENRIDGE, A. M.; PARK, B. K. Bioactivation of dapsone to a cytotoxic metabolite by human hepatic microsomal enzymes. **British journal of clinical pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 389-395, 1989.

COLEMAN, M. D.; SIMPSON, J.; JACOBUS, D. P. Reduction of dapsone hydroxylamine to dapsone during methaemoglobin formation in human erythrocytes in vitro. IV: Implications for the development of agranulocytosis. **Biochem Pharmacol**, v. 48, n. 7, p. 1349-54, 1994.

DA-SILVA, S. S.; SAJAN, I. S.; UNDERWOOD, J. P., 3RD. Congenital methemoglobinemia: a rare cause of cyanosis in the newborn--a case report. **Pediatrics**, v. 112, n. 2, p. e158-61, 2003.

D'AVILA, H. et al. Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 12, p. 2589-604, 2008.

DE SOUSA, J. R.; SOTTO, M. N.; SIMÕES QUARESMA, J. A. Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. **Front. Immunol.**, 8, n. 1635, 2017- November-28 2017.

DE WIT, M. Y. L.; VAN BEERS, S. M.; KLATSER, P. R. The epidemiology of mycobacterium leprae: Recent insight. **FEMS Microbiology Letters**, v. 136, n. 3, p. 221-230, 1996.

DI MEO, S. et al. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions %J Oxidative Medicine and Cellular Longevity. v. 2016, p. 44, 2016.

EDWARDS, C. J.; FULLER, J. Oxidative Stress in Erythrocytes. **Comparative Haematology International**, v. 6, n. 1, p. 24-31, 1996.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-7, 1959.

FAIVRE, B. et al. Hemoglobin autooxidation/oxidation mechanisms and methemoglobin prevention or reduction processes in the bloodstream. Literature review and outline of autooxidation reaction. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**, v. 26, n. 1, p. 17-26, 1998.

FERNANDES, K. S. et al. Antioxidant effect of 4-nerolidylcatechol and \pm -tocopherol in erythrocyte ghost membranes and phospholipid bilayers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 780-788, 2013.

FESSLER, M. B. et al. Relationship between serum cholesterol and indices of erythrocytes and platelets in the US population. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 11, p. 3177-3188, 2013.

FLOHE, L. et al. Thiol-dependent peroxidases care little about homology-based assignments of function. **Redox Rep**, v. 8, n. 5, p. 256-64, 2003.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 93-129, 2001.

FRIEDEN, T. R. et al. Tuberculosis. **Lancet**, v. 362, n. 9387, p. 887-99, 2003.

FROMM, E.; WITTMANN, J. Derivate des p-Nitrothiophenols. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 41, n. 2, p. 2264-2273, 1908.

GALIZA NETO, G. C. D.; PITOMBEIRA, M. D. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 51-56, 2003.

GHATAK, T.; PODDAR, B.; BARONIA, A. K. Dapsone Induced Methemoglobinemia and Hemolysis in a G6PD Deficient Girl, Possibly Aggravated by Aggressive Methylene Blue Therapy. **Indian journal of dermatology**, v. 58, n. 5, p. 410-410, 2013.

GORDIN, F. M. et al. Early manifestations of disseminated Mycobacterium avium complex disease: a prospective evaluation. **J Infect Dis**, v. 176, n. 1, p. 126-32, 1997.

GUEYE, P. M. et al. Extracellular haemoglobin, oxidative stress and quality of red blood cells relative to perioperative blood salvage. **Clin Chem Lab Med**, v. 48, n. 5, p. 677-83, 2010.

GUPTA, S. K. Histoid leprosy: review of the literature. **Int J Dermatol**, v. 54, n. 11, p. 1283-8, 2015.

GURAGAIN, S.; UPADHAYAY, N.; BHATTARAI, B. M. Adverse reactions in leprosy patients who underwent dapsone multidrug therapy: a retrospective study. **Clinical pharmacology : advances and applications**, v. 9, p. 73-78, 2017.

GUTTERIDGE, J. M. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. **FEBS Lett**, v. 201, n. 2, p. 291-5, 1986.

HALL, B. G.; SALIPANTE, S. J. Molecular epidemiology of Mycobacterium leprae as determined by structure-neighbor clustering. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1997-2008, 2010.

HAYMOND, S. et al. Laboratory Assessment of Oxygenation in Methemoglobinemia. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 434, 2005.

HEGESH, E. et al. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. **Clin Chim Acta**, v. 30, n. 3, p. 679-82, 1970.

HERNANDEZ, C. et al. Tuberculosis in the age of biologic therapy. **J Am Acad Dermatol**, v. 59, n. 3, p. 363-80; quiz 382-4, 2008.

HOROWITZ, M. P.; GREENAMYRE, J. T. Mitochondrial iron metabolism and its role in neurodegeneration. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 20 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S551-S568, 2010.

HUNGRIA, E. M. et al. Mycobacterium leprae-Specific Antibodies in Multibacillary Leprosy Patients Decrease During and After Treatment With Either the Regular 12 Doses Multidrug Therapy (MDT) or the Uniform 6 Doses MDT. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 915, 2018.

International Congress of Leprosy, Madrid. Report of the committee on classification. **Int J Lepr**, v. 21, 1953.

JYOTHI, P. et al. A study of oxidative stress in paucibacillary and multibacillary leprosy. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 74, n. 1, p. 80, 2008.

KALUARACHCHI, S. I.; FERNANDOPULLE, B. M.; GUNAWARDANE, B. P. Hepatic and haematological adverse reactions associated with the use of multidrug therapy in leprosy--a five year retrospective study. **Indian J Lepr**, v. 73, n. 2, p. 121-9, 2001.

KANIAS, T.; ACKER, J. P. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation. **The FEBS Journal**, v. 277, n. 2, p. 343-356, 2010.

KHANOLKAR-YOUNG, S. et al. Nerve and skin damage in leprosy is associated with increased intralesional heat shock protein. **Clinical and experimental immunology**, v. 96, n. 2, p. 208-213, 1994.

KOHGO, Y. et al. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. **International journal of hematology**, v. 88, n. 1, p. 7-15, 2008.

KOMAI, T.; INOUE, M.; OKAMURA, T.; MORITA, K. *et al.* Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10 Synergistically Regulate Humoral Immunity via Modulating Metabolic Signals. **Front. Immunol.**, 9, n. 1364, 2018-June-14 2018. Original Research.

KOMATI REDDY, G.; LINDNER, S. N.; WENDISCH, V. F. Metabolic Engineering of an ATP-Neutral Embden-Meyerhof-Parnas Pathway in *Corynebacterium glutamicum*: Growth Restoration by an Adaptive Point Mutation in NADH Dehydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 1996, 2015.

KOPPENOL, W. H. The Haber-Weiss cycle--70 years later. **Redox Rep**, v. 6, n. 4, p. 229-34, 2001.

KRESGE, N.; SIMONI, R. D.; HILL, R. L. Otto Fritz Meyerhof and the Elucidation of the Glycolytic Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. e3-e3, 2005.

KRIAKOV, J.; LEE, S.; JACOBS, W. R., JR. Identification of a regulated alkaline phosphatase, a cell surface-associated lipoprotein, in *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol**, v. 185, n. 16, p. 4983-91, 2003.

LANA, F. C. F. et al. Deformities due to Leprosy in Children under Fifteen Years Old as an Indicator of Quality of the Leprosy Control Programme in Brazilian Municipalities. **Journal of tropical medicine**, v. 2013, p. 812793-812793, 2013.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. D. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 389-401, 2014a.

LASTORIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205-218, 2014b.

LEE, C. H. et al. Two cases of methemoglobinemia induced by the exposure to nitrobenzene and aniline. **Annals of occupational and environmental medicine**, v. 25, n. 1, p. 31-31, 2013.

LENFANT, F. et al. Effects of an oxidative stress on human hemoglobin: a multiwavelength visible spectrometry study. **Biomed Pharmacother**, v. 59, n. 5, p. 230-2, 2005.

LI, H. et al. Vitamin C in mouse and human red blood cells: an HPLC assay. **Analytical biochemistry**, v. 426, n. 2, p. 109-117, 2012.

LI, S. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 11, p. 26087-26124, 2015.

LOCKWOOD, D. N.; SAUNDERSON, P. R. Nerve damage in leprosy: a continuing challenge to scientists, clinicians and service providers. **International Health**, v. 4, n. 2, p. 77-85, 2012.

LOPEZ-REVUELTA, A. et al. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chem Biol Interact**, v. 161, n. 1, p. 79-91, 2006.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact**, v. 224, p. 164-75, 2014.

MAURYA, P. K.; KUMAR, P.; CHANDRA, P. Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age. **World journal of methodology**, v. 5, n. 4, p. 216-222, 2015.

MAYO, W. et al. Intraoperative cyanosis: a case of dapsone-induced methaemoglobinaemia. **Can J Anaesth**, v. 34, n. 1, p. 79-82, 1987.

MCMILLAN, D. C. et al. Dapsone-induced hemolytic anemia: effect of dapsone hydroxylamine on sulfhydryl status, membrane skeletal proteins and morphology

of human and rat erythrocytes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 274, n. 1, p. 540-7, 1995.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 2, p. 135-45, 2001.

MISCH, E. A. et al. Leprosy and the human genome. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 4, p. 589-620, 2010.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **J Invest Dermatol**, v. 102, n. 6, p. 828-32, 1994.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3939, 2008.

MORAES, N. V. D. et al. L-arginine, a nitric oxide precursor, reduces dapsone-induced methemoglobinemia in rats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 87-94, 2012.

MOUBASHER, A. E.-D. A.; KAMEL; NEVEEN, A.; ZEDAN, H. et al. Cytokines in leprosy, II. Effect of treatment on serum cytokines in leprosy. **International Journal of Dermatology**, 37, n. 10, p. 741-746, 1998/10/01 1998.

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

OLIVEIRA, F. M. D. et al. Estresse oxidativo e micronutrientes na hanseníase. **Revista de Nutrição**, v. 28, p. 349-357, 2015.

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

ONDEI, L. D. S. et al. Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia heterozygotes. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 6, p. 409-413, 2013.

ORBACH, A. et al. Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 183-187, 2017.

OUYANG, W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 71-109, 2011.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 3, n. 1, p. 2-12, 2010.

PANG, X.; PANEE, J. Roles of glutathione in antioxidant defense, inflammation, and neuron differentiation in the thalamus of HIV-1 transgenic rats. **Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 413-423, 2014.

PENNA, G. O. et al. Uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil (U-MDT/CT-BR): Results of an open label, randomized and controlled clinical trial, among multibacillary patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005725, 2017.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian journal of clinical biochemistry : IJCB**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

REBECCA, C. E. M. J. G. J. R. F. Glutathione depletion in a liver microsomal assay as an in vitro biomarker for reactive metabolite formation. **Biomarkers**, v. 5, n. 4, p. 285-94, 2000.

REDDY, Y. N. et al. Oxidative stress and anti-oxidant status in leprosy patients. **Indian J Lepr**, v. 75, n. 4, p. 307-16, 2003.

REILLY, T. P.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Methemoglobin formation by hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone: implications for differences in adverse drug reactions. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 288, n. 3, p. 951-9, 1999.

REVIN, V. V. et al. The Influence of Oxidative Stress and Natural Antioxidants on Morphometric Parameters of Red Blood Cells, the Hemoglobin Oxygen Binding Capacity, and the Activity of Antioxidant Enzymes %J BioMed Research International. v. 2019, p. 12, 2019.

RIDLEY, D. S. The bacteriological interpretation of skin smears and biopsies in leprosy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 49, n. 5, p. 449-52, 1955.

RIDLEY, D. S.; HILSON, G. R. A logarithmic index of bacilli in biopsies. I. Method. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 35, n. 2, p. 184-6, 1967.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, 1966.

RIFKIND, J. M.; MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 500-500, 2015.

ROGERS, S. C. et al. Hypoxia limits antioxidant capacity in red blood cells by altering glycolytic pathway dominance. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 9, p. 3159-3170, 2009.

ROMERO-MONTOYA, M.; BELTRAN-ALZATE, J. C.; CARDONA-CASTRO, N. Evaluation and Monitoring of Mycobacterium leprae Transmission in Household Contacts of Patients with Hansen's Disease in Colombia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005325, 2017.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 7, n. 7, p. e2338, 2013.

SALES, A. M. et al. Progression of leprosy disability after discharge: is multidrug therapy enough? **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 18, n. 9, p. 1145-1153, 2013.

SALGADO, C. G. et al. miRNome Expression Analysis Reveals New Players on Leprosy Immune Physiopathology. v. 9, n. 463, 2018.

SANCHEZ-GALLEGO, J. I. et al. Membrane cholesterol contents modify the protective effects of quercetin and rutin on integrity and cellular viability in oxidized erythrocytes. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 10, p. 1444-54, 2010.

SANTOS, M. B.; DE OLIVEIRA, D. T.; CAZZANIGA, R. A.; VARJÃO, C. S. et al. Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. **Scand J Immunol**, 86, n. 1, p. 40-49, Jul 2017.

SARKAR, A.; BISHAYEE, A.; CHATTERJEE, M. Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepatocarcinogenesis. **Cancer Biochem Biophys**, v. 15, n. 2, p. 111-25, 1995.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.

SCHON, T. et al. Nitrotyrosine localization to dermal nerves in borderline leprosy. **Br J Dermatol**, v. 150, n. 3, p. 570-4, 2004.

SCHULZ, J. B. et al. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 16, p. 4904-11, 2000.

SENCHEKOVÁ, E. Y. et al. Experimental oxidative stress-induced death of erythrocytes. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1_supplement, p. lb761-lb761, 2017.

SHALEV, H. et al. Hypocholesterolemia in chronic anemias with increased erythropoietic activity. **Am J Hematol**, v. 82, n. 3, p. 199-202, 2007.

SHIKAMA, K. The Molecular Mechanism of Autoxidation for Myoglobin and Hemoglobin: A Venerable Puzzle. **Chem Rev**, v. 98, n. 4, p. 1357-1374, 1998.

SKOLD, A.; COSCO, D. L.; KLEIN, R. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management. **South Med J**, v. 104, n. 11, p. 757-61, 2011.

SOUSA, L. et al. Effects of Iron Overload on the Activity of Na,K-ATPase and Lipid Profile of the Human Erythrocyte Membrane. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132852, 2015.

STAMATOYANNOPOULOS, J. A. Future prospects for treatment of hemoglobinopathies. **The Western journal of medicine**, v. 157, n. 6, p. 631-636, 1992.

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

SUZUKI, K. et al. Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives. **J Dermatol**, v. 39, n. 2, p. 121-9, 2012.

SUZUKI, K. [Leprosy is not a "genetic disease"]. **Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi**, v. 80, n. 2, p. 244, 2011.

SZTILLER, M. et al. The influence of ferrylhemoglobin and methemoglobin on the human erythrocyte membrane. **Redox Rep**, v. 11, n. 6, p. 263-71, 2006.

TAILLEUX, L. et al. Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis* and infected human dendritic cells and macrophages. **PloS one**, v. 3, n. 1, p. e1403-e1403, 2008.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 3-9, 2004.

TOMAIUOLO, G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. **Biomicrofluidics**, v. 8, n. 5, p. 051501, 2014.

TRAEGER-SYNODINOS, J. et al. Erythroid marrow activity and functional anemia in patients with the rare interaction of a single functional α -globin and beta-globin gene. **Haematologica**, v. 86, n. 4, p. 363-7, 2001.

TURAL ÖNÜR, S. et al. Serum alkaline phosphatase may play a role in the differential diagnosis of sarcoidosis and tuberculosis? **European Respiratory Journal**, v. 48, n. suppl 60, p. PA3722, 2016.

UNG, L. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species: a review of their role in ocular disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 131, n. 24, p. 2865-2883, 2017.

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.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN WIJK, R.; VAN SOLINGE, W. W. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. **Blood**, v. 106, n. 13, p. 4034, 2005.

VERSMOLD, H.; RIEGEL, K. P. THE EFFECT OF METHEMOGLOBIN ON THE EQUILIBRIUM BETWEEN OXYGEN AND THE HEMOGLOBINS F & A1 AT DIFFERENT CONCENTRATIONS OF 2,3-DIPHOSPHOGLYCERATE. **Pediatric Research**, v. 8, p. 140, 1974.

VESPASIANI-GENTILUCCI, U. et al. Low Alanine Aminotransferase Levels in the Elderly Population: Frailty, Disability, Sarcopenia, and Reduced Survival. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 73, n. 7, p. 925-930, 2018.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. The clinical and immunological features of leprosy. **British medical bulletin**, 77-78, p. 103-121, 2006 2006.

WALKER, T. et al. Dissociation between iron accumulation and ferritin upregulation in the aged substantia nigra: attenuation by dietary restriction. **Aging (Albany NY)**, v. 8, n. 10, p. 2488-2508, 2016.

WANG, H. et al. An in vitro model of Mycobacterium leprae induced granuloma formation. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 279, 2013.

WHO. Weekly Epidemiological Record, 31 August 2018. v. 93, n. 35, p. 444-456, 2018.

WIBACK, S. J.; PALSSON, B. O. Extreme Pathway Analysis of Human Red Blood Cell Metabolism. **Biophysical Journal**, v. 83, n. 2, p. 808-818, 2002.

WOOLLARD, K. J. et al. Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 19, p. 13110-13118, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, R. O. f. S.-E. A. **Global Leprosy Strategy 2016–2020. Accelerating towards a leprosy-free world. Monitoring and Evaluation Guide**. New Delhi: World Health Organization. Regional Office for South-East Asia, 2017-03 2017.

WOZEL, G.; BLASUM, C. Dapsone in dermatology and beyond. **Arch Dermatol Res**, v. 306, n. 2, p. 103-24, 2014.

WOZEL, G.; BLASUM, C. Dapsone in dermatology and beyond. **Archives of dermatological research**, v. 306, n. 2, p. 103-124, 2014.

WRIGHT, R. O.; LEWANDER, W. J.; WOOLF, A. D. Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management. **Ann Emerg Med**, v. 34, n. 5, p. 646-56, 1999.

YU, B.; LIU, Z.; CHANG, T. M. Polyhemoglobin with different percentage of tetrameric hemoglobin and effects on vasoactivity and electrocardiogram. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**, v. 34, n. 2, p. 159-73, 2006.

ZAGER, R. A.; BURKHART, K. M. Differential effects of glutathione and cysteine on Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and myoglobin-induced proximal tubular cell attack. **Kidney Int**, v. 53, n. 6, p. 1661-72, 1998.

ZHANG, C. et al. Molecular Mechanisms Involved in Oxidative Stress-Associated Liver Injury Induced by Chinese Herbal Medicine: An Experimental Evidence-Based Literature Review and Network Pharmacology Study. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 9, 2018.

ZHANG, Z. W. et al. Red blood cell extrudes nucleus and mitochondria against oxidative stress. **IUBMB Life**, v. 63, n. 7, p. 560-5, 2011.

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

ANEXOS

ANEXO 1: Parecer de Autorização para Desenvolvimento da Pesquisa Emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.

UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E OXIDATIVOS EM PACIENTES COM HANSENÍASE SUBMETIDOS À POLIQUIMIOTERAPIA

Pesquisador: Marta Chagas Monteiro

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 88556818.0.0000.0018

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - ICS/ UFPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.827.228

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 17 de Agosto de 2018

Assinado por:
Maria de Nazaré Alves Lima
(Coordenador)

ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado com os participantes do estudo.



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Concordo em participar da pesquisa “**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E OXIDATIVOS EM PACIENTES COM HANSENÍASE SUBMETIDOS A POLIQUIMIOTERAPIA**” cujos objetivos são:

• Avaliar parâmetros hematológicos e oxidativos em pacientes com hanseníase em uso de PQT.

• Verificar se existe relação entre a administração da Dapsona e o aparecimento de estresse oxidativo, através da determinação da concentração sanguínea de enzimas sanguíneas e avaliação de dano celular.

• Avaliar como a administração deste fármaco pode provocar danos as hemácias

Ressalto que estou ciente de que terei:

o A garantia de receber esclarecimento a qualquer dúvida a respeito da pesquisa;

o A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento da pesquisa;

o A segurança de que não haverá divulgação personalizada das informações;

o As informações sobre o resultado do estudo.

Eu, _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Belém, ____ de _____ de 20__

Assinatura do Paciente ou Responsável Legal

Identificação do Projeto:

1 – **Pesquisador Responsável:** Marta Chagas Monteiro

2 – **Instituição/Departamento:** Universidade Federal do Pará (UFPA)

3 – **Telefone para contato:** (91) 982433787

4 – **Local da coleta de dados:** URE Marcello Cândia

5 – **Participantes da Pesquisa:** Pacientes em tratamento para hanseníase e indivíduos saudáveis que não fizeram uso de poliquimioterapia.

6- Objetivo do Estudo: O presente estudo visa avaliar parâmetros hematológicos e oxidativos em pacientes com hanseníase.

7 – Procedimentos: Será analisado o prontuário do paciente antes do início da coleta, para verificar critérios de exclusão. A coleta do material sanguíneo, será realizado com uma seringa de 10mL com heparina, após assepsia do local com álcool 70° e quando terminada a coleta, será colocado um curativo.

8 – Riscos: Existe risco moral de exposição dos seus dados da pesquisa para a comunidade. Para que esse risco seja evitado, será mantida sob sigilo absoluto a sua identidade, e somente eu pesquisadora terei conhecimento sobre as informações coletadas.

Risco na coleta de sangue inclui: desconforto no local da coleta. Todo o material usado neste estudo será novo, estéril e descartado em lixo hospitalar após o uso, para evitar qualquer possibilidade contaminação para você.

9- Benefícios: Este estudo poderá não trazer um benefício direto aos indivíduos da pesquisa, mas trará maior conhecimento para os pesquisadores e profissionais da saúde sobre a intensidade dos efeitos adversos gerados pela poliquimioterapia, contribuindo futuramente para melhorias no manejo destas reações e busca de terapias adjuvantes que possam diminuir a intensidade da mesma.

10- Desistência: Os voluntários podem desistir de participar deste estudo à qualquer momento. Não acarretando nenhum prejuízo ao indivíduo. Sendo este TCLE passível de ser retirado, quando solicitado pelo participante da pesquisa.

11- Sigilo: Os dados não serão divulgados de maneira alguma.

12- Direito a uma via do termo: O pesquisador responsável por este estudo tem por obrigação fornecer uma via deste documento ao indivíduo participante. Onde ao aceitar participar desta pesquisa, você receberá uma via deste documento, assinada pelo pesquisador e por você (ou seu responsável legal) além de rubricada em todas as páginas por ambos (pesquisador e participante)

13– Dispensa de despesas: Os indivíduos participantes deste estudo, em hipótese alguma terão qualquer custo financeiro. Onde asseguramos a garantia de ressarcimento de quaisquer gastos decorrentes da sua participação nesta pesquisa.

14- Seguridade de integridade: Qualquer inesperado dano ao paciente, comprovadamente relacionado à este estudo, o reparo será de responsabilidade dos pesquisadores envolvidos. Onde o participante da pesquisa receberá assistência integral e imediata, de forma gratuita (pelo patrocinador), pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa.

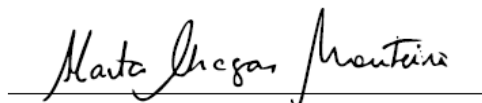
15- Indenização: O participante da pesquisa tem direito à indenização em caso de danos decorrentes do estudo.

16- Nomes dos Pesquisadores:

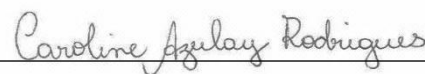
Marta Chagas Monteiro

Caroline Azulay Rodrigues

Belém, ___ de _____ de 20__



Professora do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêutica (PPGCF-UFPA)



Mestranda do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFPA).

Prezado voluntário, caso haja descumprimento de qualquer um dos itens citados acima, ou caso você se sinta prejudicado nesta pesquisa, por qualquer natureza. Por favor, entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/ICS - Sala 13 - Campus Universitário, nº 01, Guamá. CEP: 66.075-110 - Belém-Pará. Tel: 3201-7735 E-mail: cepccs@ufpa.br

