



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

**O EFEITO DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO E O QUELANTE DE
FERRO, DEFEROXAMINA, SOBRE AS ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS E OXIDATIVAS INDUZIDAS PELA DÁPSONA
EM MODELO ANIMAL.**

Rana Karen Mesquita Da Silva

**Belém- PA
2023**



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

**O EFEITO DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO E O QUELANTE DE
FERRO, DEFEROXAMINA, SOBRE AS ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS E OXIDATIVAS INDUZIDAS PELA DAPSONA
EM MODELO ANIMAL.**

Rana Karen Mesquita Da Silva

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

Área de concentração: fármacos e medicamentos

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

Orientadora: Dr.^a Marta Chagas Monteiro

Coorientador: Dr.^o Antonio Rafael Quadros

BELÉM- PA

2023

RANA KAREN MESQUITA DA SILVA

EFEITOS DO ACIDO ALFA LIPÓICO E O QUELANTE DE FERRO, A DEFEROXAMINA, SOBRE AS ALTERAÇÕES BIOQUIMICA E OXIDATIVAS INDUZIDAS PELA DAPSONA, EM MODELO ANIMAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 25/08/2023

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Marta Chagas Monteiro, PPGCF/UFPA (Orientadora)

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

Prof. Dr. Cristine Bastos do Amarante, MPEG/COCTE

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

D111e da Silva, Rana Karen Mesquita.
O EFEITO DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO E O QUELANTE
DE FERRO, DEFEROXAMINA, SOBRE AS ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS E OXIDATIVAS INDUZIDAS PELA
DAPSONA EM MODELO ANIMAL. / Rana Karen Mesquita
da Silva. — 2023.
60 f. : il.

Orientador(a): Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro
Coorientador(a): Prof. Dr. Antonio Rafael Quadros
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2023.

1. ácido alfa lipoico. 2. deferoxamina. 3. dapsona. 4.
estresse oxidativo. 5. ferro. I. Título.

CDD 610

DEDICATORIA

A minha família e amigos, que me acompanharam nesta jornada e foram muitas vezes minha fonte de motivação, em especial dedico essa dissertação ao meu afilhado JOÃO PAULO e a minha sobrinha VERÔNICA.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda providencia divina!

A minha família, em especial minha MÃE e minha IRMÃ, são meus pilares de sustentação;

Aos meus amigos que são extensão da minha familia, agradeço pelo apoio e incentivo nos momentos de maiores dificuldades enfrentados no decorrer deste ciclo;

A professora Dra. Marta Chagas Monteiro pela orientação, pela confiança e principalmente pela oportunidade de acesso ao LABEIM, o que me permitiu a realização deste projeto. Ao professor Antonio Rafael Quadros, por ter aceito a coorientação desse projeto, agradeço por todo auxilio e contribuição a este trabalho;

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêutica pelo suporte técnico-científico no decorrer deste projeto. Aos amigos do LABEIM por todo o auxílio na execução da fase experimental;

Aos amigos Kelly Davis, Kaio Murilo, Caio Demetrius, Thais Torres, Pamela Seabra, Iago Castro, Lucia Carla, por todo incentivo, pela amizade, pela parceria, por tantos momentos que vivenciamos juntos e que sem duvida nenhuma foram de grande importancia nessa trajetoria.

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

“ É justo que muito custe o que muito vale!”

Santa Teresa De Jesus

RESUMO

SILVA, M. K. R. O efeito do ácido alfa lipóico e o quelante de ferro, deferoxamina, sobre as alterações bioquímicas e induzidas pela dapsona, em modelo animal. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2023.

A dapsona (DDS) é um antibiótico que atua inibindo a síntese do folato, apresentando boa ação bacteriostática. Porém, pode acarretar eventos adversos severos como distúrbios, metemoglobinemia e hemólise. Estes distúrbios hematológicos levam a alteração da homeostasia do ferro e com isto aumenta a formação de ERO's que podem levar a um dano celular e tecidual. Neste contexto, fizemos uso concomitante do ácido alfa lipóico e o quelante de ferro, a deferoxamina (DFX), para avaliar seus efeitos na formação de ERO desencadeadas pelo aumento do estresse oxidativo e do ferro que foram induzidos pelo uso da dapsona. Para isto, foi induzido o processo de estresse oxidativo e também a alteração a homeostasia do ferro, em camundongos Swiss, fazendo-se uso de DDS, seguido de administração de ALA e DFX como tratamento. Após isto, foi realizado a dosagem de parâmetros de estresse oxidativo no tecido e no plasma, além da dosagem dos níveis de ferro. Nossos resultados mostraram que a DDS levou a um aumento de metemoglobina e também nos níveis de ferro, havendo a diminuição desses valores quando utilizado o tratamento proposto com ALA e DFX. GSH ocorreu o aumento nos seus níveis e TEAC houve redução em alguns órgãos específicos, ambos também receberam o tratamento com ALA e DFX, mas somente o DFX de forma mais eficaz restabeleceu os níveis principalmente de GSH, no TEAC os tratamentos utilizados de forma individual apresentaram maior benefício revertendo a inibição da capacidade total. Já na avaliação da peroxidação lipídica, os animais apresentaram aumento do MDA por uso de DDS, quando relacionamos com os tratamentos utilizados o ALA foi capaz de inibir de forma significativa a peroxidação lipídica induzida por DDS. Estes resultados sugerem que o uso do ácido alfa lipóico e quelantes de ferro podem ser uma alternativa para reduzir os efeitos do aumento do estresse oxidativo e de acúmulo de ferro no organismo, apresentando maior eficácia quando utilizados de forma individual.

Palavra-chave: ácido alfa lipóico, deferoxamina, dapsona, estresse oxidativo, ferro

ABSTRACT

SILVA, M. K. R. The effect of alpha lipoic acid and the iron chelator, deferoxamine, on biochemical and dapson-induced changes in an animal model. Dissertation (Master's) - Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2023.

Dapsone (DDS) is an antibiotic that acts by inhibiting folate synthesis, with good bacteriostatic action. However, it can cause severe adverse events such as disturbances, methemoglobinemia and hemolysis. These hematological disorders lead to alteration of iron homeostasis and with this increases the formation of ROS that can lead to cell and tissue damage. In this context, we made concomitant use of alpha lipoic acid and the iron chelator, deferoxamine (DFX), to evaluate their effects on the formation of ROS triggered by the increase in oxidative stress and iron that were induced by the use of dapson. For this, the process of oxidative stress and also the alteration of iron homeostasis were induced in Swiss mice, using DDS, followed by administration of ALA and DFX as treatment. After this, parameters of oxidative stress in tissues and plasma were measured, in addition to iron levels. Our results showed that DDS led to an increase in methemoglobin and also in iron levels, with a decrease in these values when using the proposed treatment with ALA and DFX. There was an increase in GSH levels and TEAC there was a reduction in some specific organs, both also received treatments with ALA and DFX, but only DFX more effectively restored the levels mainly of GSH, in TEAC the treatments used individually showed greater benefit by reversing total capacity inhibition. In the evaluation of lipid peroxidation, the animals showed an increase in MDA after the use of DDS, when related to the treatments used, ALA was able to significantly inhibit the lipid peroxidation induced by DDS. These results suggest that the use of alpha lipoic acid and iron chelators may be an alternative to reduce the effects of increased oxidative stress and iron accumulation in the body, with greater efficiency when used individually.

Keywords: alpha lipoic acid, deferoxamine, dapson, oxidative stress, iron

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo antimicrobiano da Dapsona.

Figura 2 Estrutura química da dapsona.

Figura 3 Rota metabólica da dapsona. MADDS= monoacetil dapsona. DDS-NOH= hidroxalamina dapsona.

Figura 4 Sistema de defesa antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio.

Figura 5 Agente quelante deferoxamina e estrutura dos correspondente complexos de ferro.

Figura 6 Mecanismo de ação deferoxamina.

Figura 7 Estrutura química do ácido alfa lipóico e de sua forma reduzida, o ácido dihidrolipoico..

Figura 8 Representação esquemática da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Figura 9 Representação esquemática da determinação da glutatona reduzida (GSH)

Figura 10 Efeito do pós-tratamento com ALA e/ou DFX na formação de metemoglobina induzida por DDS.

Figura 11 Determinação de Óxido nítrico (NO) em animais tratados com DDS e pós tratamento com ALA e/ou DFX.

Figura 12 Efeito do ALA e/ou DFX sobre os níveis de GSH induzido por DDS nos órgãos.

Figura 13 Efeito do pós-tratamento com ALA e DFX sobre os níveis de TEAC induzidos por DDS nos órgãos.

Figura 14 Efeito do pós-tratamento com ALA e DFX sobre os níveis de MDA induzidos por DDS nos órgãos.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	4
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	6
2.1 Dapsona.....	6
2.2 Farmacocinetica da dapsona.....	8
2.3 efeitos hematologicos.....	10
2.4 O METABOLISMO DO FERRO (HOMEOSTASIA DO FERRO).....	13
2.5 DEFEROXAMINA.....	14
2.6 ÁCIDO ALFA LIPÓICO.....	16
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivos gerais.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS:.....	23
4.1 Animais e procedência.....	23
4.2 Doses e preparo de soluções.....	25
4.2.1 EXTRAPOLAÇÃO ALOMÉTRICA DE DOSE.....	25
4.3 AMOSTRAS.....	29
4.3.1 coleta de amostras.....	29
4.4 Dosagens de substancias reativas.....	29
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA.....	30
4.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EQUIVALENTE AO TROLOX (TEAC).....	32
4.7 DETERMINAÇÃO DO FERRO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	33
4.8 DESCARTE DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5. Resultados.....	35
5.1 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ALA E/OU DFX NA FORMAÇÃO DE METEHOglobina E FERRO SANGUÍNEO INDUZIDO POR DAPSONA.....	35

5.2 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ALA E/OU DFX NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO INDUZIDO POR DAPSONA EM DIFERENTES ÓRGÃOS.....	36
5.3 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ALA E/OU DFX NA PRODUÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) INDUZIDA POR DAPSONA EM DIFERENTES ÓRGÃOS.....	37
5.4 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ALA E/OU DFX NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EQUIVALENTE AO TROLOX INDUZIDA POR DAPSONA EM DIFERENTES ÓRGÃOS.	38
5.5 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ALA E/OU DFX NA PEROXIDAÇÃO LIPIDICA (MDA) INDUZIDA POR DAPSONA EM DIFERENTES ÓRGÃOS.	39
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO.....	46
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47
ANEXOS	48

1. INTRODUÇÃO

A produção e a utilização de farmacos para o tratamento de diversas patologias tem um crescimento significativo em todo mundo, representando uma elevada parcela dos gastos publicos (OMS). No entanto, além dos efeitos benéficos desses farmacos, a maioria apresenta efeitos adversos de grande impacto na saúde dos pacientes. Nesse sentido, a 4,4'-diaminodifenilsulfon, denominada dapsona (DDS) é um medicamento de grande importancia na área clinica. Hoje utilizado em diversas patologias, dentre a mais conhecida, destaca-se a hanseníase (COLEMAN, JACOBUS, 1993; VEGGI et al., 2008). Por possuir importantes atividades farmacologicas como ação bacteriostica e anti-inflamatória, é um medicamento que demonstra bastante eficacia quando utilizado na poliquimioterapia da hanseaniase. Muitos estudos estão sendo desenvolvidos para desvendar a atividade anti-inflamatoria da dapsona, utilizando diferentes tipos experimentais e variados metodos mostrando eficacia em outras patologias como por exemplo, dermatoses (GRUNWALD & AMICHAÏ, 1996; ZHU & STILLER, 2001; WOZEL, 2010). Além disso, é utilizado em doenças como: tuberculose, malária e pneumonia por *Pneumocystis carinii* e encefalites por *Toxoplasma gondii* em pacientes com síndrome da imunodeficiência e também de origem autoimune, como a artrite reumatoide.

No entanto, a dapsona pode ocasionar vários efeitos adversos, tais como: metemoglobinemia, anemia hemolítica, “síndrome da sulfona”, eventos adversos neurologicos e psiquiatricos, gastrointestinais e renais(Coleman, 1995; Landers et al., 1996; Queiroz et al., 1997; Ward, McCarty, 1998; Salamat, Watson, 2003). Esses eventos adversos estão associados aos produtos do metabolismo da dapsona, dapsona hidroxilamina (DDS-NOH) e monoacetildapsona-hidroxilamina, que são considerados agentes pró-oxidantes e responsáveis por reações adversas na terapia com a DDS, principalmente pela formação de metemoglobinemia, reação relacionada com os metabolitos dapsona-hidroxilamina (DDS-NOH) e monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH)(VEGGI et al., 2008). A DDS induz o estresse oxidativo por meio do desequilíbrio nas reações de oxirredução e desregulação no metabolismo do ferro, levando ao aumento na formação espécies reativas de oxigênio (ERO) e por consequência, ocasionando alterações na

homeostase do hospedeiro (ERO, ELLARD et al., 1972; VAGE et al., 1994; BRADSHAW et al., 1997; SCHIFF et al., 2006). A dapsona também por conta desse desequilíbrio propicia um acúmulo de ferro no organismo, gerando danos também neurológicos (SALONEN et al., 1992).

Por esse motivo, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa *in vitro* e em modelo animal, mostraram que antioxidantes como o ácido α -lipóico (ALA) e Resveratrol podem proteger e/ou amenizar os efeitos adversos da DDS, prevenindo assim o estresse oxidativo durante o tratamento da hanseníase (PESSÔA,

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. DAPSONA

A 4,4'-diaminodifenilsulfona (DDS), conhecida como dapsona, é um farmaco utilizado no esquema da poliquimioterapia da hanseníase, ela tem sido utilizada nesse tratamento desde de 1940 (Wolf et al.2002), desde de então tem estado entre os medicamentos de primeira linha usados no tratamento multidroga recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Por possuir características farmacológicas como: efeito antibacteriano, antiprotozoario e antiinflamatórios, a DDS vem sendo utilizada de forma eficaz em uma gama de distúrbios dermatológicos e sistêmicos, principalmente caracterizados por acúmulo e infiltração neutrofílica e eosinófila (Molinelli et al.2019). Os efeitos antibacterianos da dapsona são semelhantes ao mecanismo de ação das sulfonamidas competindo com o ácido para-aminobenzoico pelo sítio ativo da dihidropteroato sintetase pela inibição da síntese do ácido diidrofólico (Coleman 1993), por ser um derivado sintético da anilina é estruturalmente a mais simples entre as sulfonas, apresenta um grupo funcional sulfonil: um átomo de enxofre ligando-se a dois átomos de carbono sendo que a estrutura química do grupo sulfonil é essencial para sua atividade farmacológica (Ford,2000; Paniker e Levine, 2001), e também pode ser o grupo responsável pelo aumento da metemoglobinemia (Schalcher, 2014).

Apesar de demonstrar eficácia terapêutica quando usada em diversas patologias, a dapsona apresenta efeitos colaterais bastante elucidados e descritos na literatura, isso pode estar diretamente relacionado aos casos de abandono do tratamento pelos pacientes e justificam também as estatísticas relacionadas a resistência medicamentosa. Esses efeitos colaterais relacionados a dapsona podem se manifestar de forma rara como é o caso da síndrome da dapsona e manifestar de forma mais contínua quando o farmaco atinge alguns diretamente os glóbulos vermelhos e brancos, resultando em efeitos colaterais hematológicos como a metemoglobinemia e hemólise, resultado do grande impacto que este farmaco tem sobre os glóbulos vermelhos. (Cucinelli et al.1972; Degowin et al. 1966)

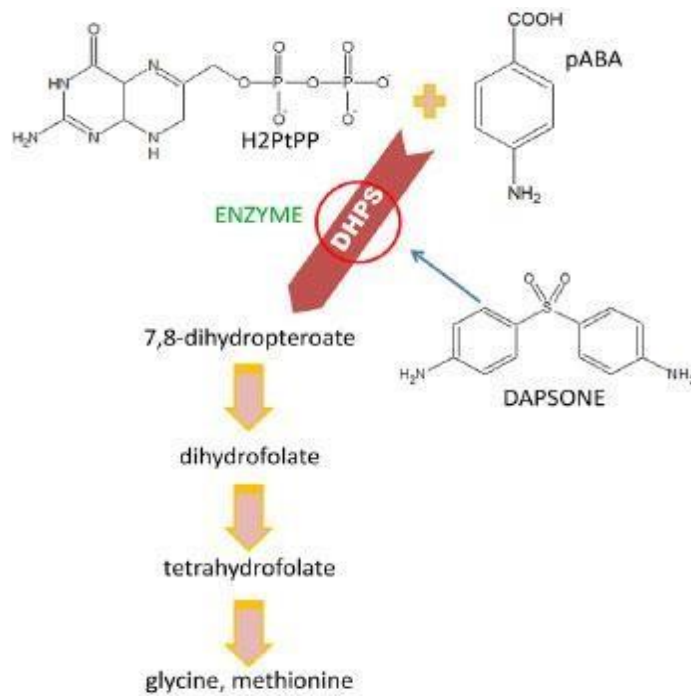


Figura 1- Mecanismo antimicrobiano da dapsona. DDS. - Fonte: Oliveira *et al.*, 2014.

A estrutura molecular da dapsona é uma amina aromática, considerada a mais simples das sulfonas, as quais partilham em sua estrutura um átomo de enxofre ligado a dois átomos de carbono. Visualmente é um pó cristalino branco, inodoro, os tratamentos das doenças acima referidas, incluindo as do foro dermatológico, é realizado pela administração de comprimidos, uma vez que a dapsona e seus derivados apesar de possuírem elevada solubilidade em álcool, acetona e solução aquosa de HCl, são praticamente insolúveis em água e óleos. O farmaco escurece quando exposto a luz, mas sua estrutura química permanece inalterada. Após sua administração em via oral, é quase completamente absorvida no intestino.(AHMAD, ROGERS, 1980; ZUIDEMA, HILBERS-MODDERMAN, MERKUS, 1986).

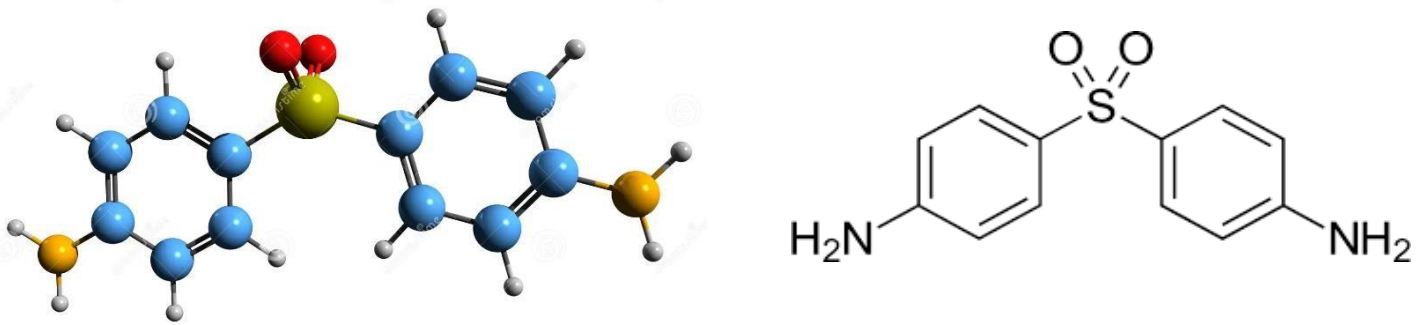


Figura 2 - Estrutura química da Dapsona - Fonte: Adapto de Wozel e Blasum, 2014

2.2 FARMACOCINETICA DA DAPSONA

Após a administração oral, a DDS dapsona é quase completamente absorvida pelo trato gastrointestinal com biodisponibilidade entre 80 a 85%, atinge pico máximos de concentração de 2 a 8 horas após a ingestão, a meia vida plasmática pode variar de 24 a 36 horas e os níveis séricos se estabilizam de 7 a 10 dias após o início do tratamento. A dapsona se liga facilmente as proteínas plasmáticas, podendo alcançar valores superiores a 70% (Zuidema et al., 1986; Wozel e Blasum, 2014). Sua distribuição ocorre por todos os órgãos e tecidos, concentrando-se preferencialmente na pele, músculos, fígado, rins barreira hematoencefálica, placenta, podendo ser excretado no leite materno (Peters HJ, 1975a ; EdsteinMD et al., 1986; Venkatesan, 1989; Gatti et al., 1997). Cerca de 70-85% do que absorvido é excretado pela urina na forma de glucoronídeos e somente cerca de 10% é excretado através da bile. (ZHU e STILLER, 2001; WOZEL e BLASUM, 2014; SCHALCHER et al.,2014; OLIVEIRA et al., 2014). Em contra partida em tratamentos prolongados, o fármaco pode ser encontrado nos fluidos biológicos por um período de 35 dias após sua administração. A explicação para o longo tempo de meia-vida desse fármaco, seja acirculação êntero-hepática e a extensa ligação às proteínas plasmáticas (Wozel e Blasum, 2014).

Apos a absorção no trato gastrointestinal, a dapsona é transportada através da circulação portal para o fígado, na qual é metabolizada por dois mecanismos distintos: N- acetilação e N-hidroxilação. Na N-acetilação, a enzima N-acetiltransferase (NAT) biotransforma a DDS formando monoacetildapsona

(MADDS), um metabólito pouco reativo que após conjugação é facilmente eliminado (ZUIDEMA et al. 1986). Já na N- hidroxilação a DDS e a MADDS são metabolizadas pelo citocromo P450, isoenzimas CYP2E1 e CYP2C (WINTER et al. 2000), formando dapsona hidroxilamina (DDS-NOH) e monoacetildapsona-hidroxilamina (MADDS-NOH) (MITRA et al. 1995). A N-hidroxilação acontece no fígado pelo sistema oxidase de função mista do retículo endoplasmático na presença de oxigênio e NADPH, mas também pode ocorrer na fração microssomal dos tecidos entero-hepáticos (Uehleke, 1971). A N-hidroxilação da dapsona e de seu derivado acetilado foi atribuída à família 3A de isoenzimas do citocromo P-450 (3A4 e 3A5) e tem sido proposta como um marcador para este grupo de enzimas (Watkins PB, 1994). Contudo, estudos utilizando microssomos de fígado humano indicam que outras enzimas também são capazes de metabolizar a droga e estão envolvidos na formação de dapsona hidroxilamina (Vage & Svensson 1994; Gill et al. 1995), especialmente CYP2E1, mas também CYP2C9 (Mitra et al., 1995).

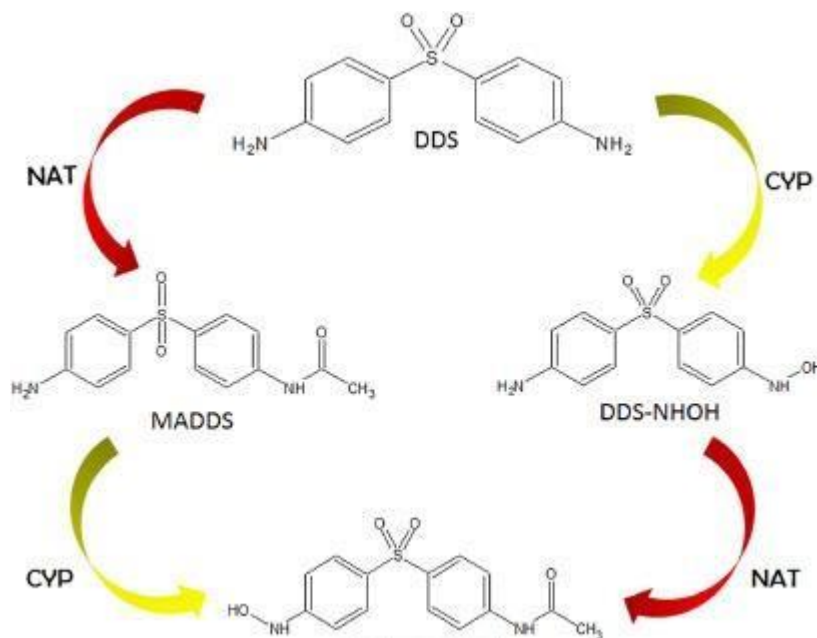


Figura 3- Rota metabólica da dapsona. MADDS = monoacetil dapsona. DDS-NOH = hidroxilamina dapsona (fonte: Oliveira *et al*, 2014)

2.3 EFEITOS HEMATOLOGICOS

Os principais efeitos colaterais descritos sobre a dapsona esta relacionado principalmente com a parte hemotologica, consequência da sua grande ação sobre os globulos vermelhos e brancos. Nesse sentido, a maioria dos pacientes tratados com dapsona apresentam algum grau de hemólise e metemoglobinemia (Zone, 2001). A hemólise com formação de “corpúsculos de Heinz” é o segundo efeito colateral mais importante da dapsona (DeGowin, 1967; Graham, 1975).

A anemia hemolítica e a metemoglobinemia, pelo uso da DDS, estão associadas a uma agressão oxidativa na membrana dos eritrócitos, que aumenta sua rigidez, favorecendo a recaptação esplênica e acelerando os processos hemolíticos (COLLEMAN, 1993). Como relatado, o metabólito hidroxilamina da droga é principal responsável por essas anomalias hematológicas, visto que pode, atuar em lipídeos de membrana e induzir a quebra de hidroperóxidos lipídicos , levando à formação de aldeídos, incluindo o MDA, capaz de se ligar a fosfolípideos e proteínas, formando agregados de alto peso molecular, muitas vezes observados nas membranas dos eritrócitos, principalmente em indivíduos deficientes em glicose-6-fosfatodesidrogenase (G6PD); (COLLEMAN, 1995). Com isso, a peroxidação lipídica induzida por agentes oxidantes gera dois importantes biomarcadores do estresse oxidativo, o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE) a partir de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da bicamada lipídica da membrana (Poli, 2008; Swathi, 2015; Chacko, 2016). Além disso, o MDA leva a mutações em células de mamíferos e bactérias e também é carcinogênico em ratos, enquanto o 4-HNE é fracamente mutagênico, no entanto é um dos principais produtos tóxicos da peroxidação lipídica (Bhat, 2015).

Para equilibrar esta liberação de espécies reativas e reduzir o dano oxidativo, o organismo possui sistemas de defesa antioxidante (Lushchak, 2014), que podem ser endógenos ou exógenos. Os sistemas endógenos podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, que são críticos para a manutenção do equilíbrio redox, tanto em

condições fisiológicas, quanto em patológicas (Limón-Pacheco, 2009). Como exemplo de sistemas enzimáticos, incluem-se principalmente a superóxido dismutase (SOD), uma enzima que elimina os radicais superóxido (Abdel-Hafez *et al.*,2009), a catalase (CAT), enzima que decompõe H₂O₂ (Valko 2007) e sistemas da glutaciona, composto por glutaciona reduzida (GSH) glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), glutaciona S-transferase (GST), sistema tioredoxinas (TrX), entre outros, como mostrado na figura abaixo

Figura 4: Sistema de defesas antioxidantes celulares e espécies reativas de oxigênio

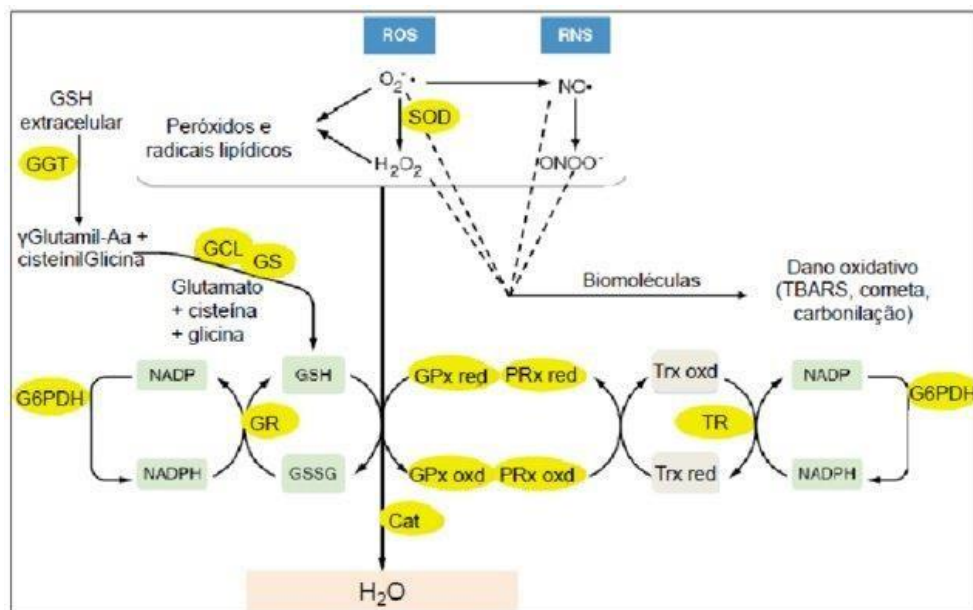


Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e antioxidantes.

Espécies Reativas de Oxigênio, de Nitrogênio e Referências antioxidantes		
ERO	<p>Radicalares: Radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical alcóxil ($\text{RO}\cdot$), radical peridroxil ($\text{HO}_2\cdot$).</p> <p>Não-radicalares: Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO) e peróxidos orgânicos (ROOH).</p>	<p>Prasad,2008 Rahfiludin, 2016</p>

ERN	Óxido Nitrico (NO), peroxinitrito(ONOO ⁻), ácido peroxinitroso (ONOOH), ânion nitroxil (NO ⁻) e dióxido de nitrogênio (NO ₂) .	Coleman, 1993 Udeh, 2001
ANTIOXIDANTES	<p>Enzimáticos: radical superóxido (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona S-transferase (GST).</p> <p>Não-enzimáticos: Vitaminas C e E, Carotenóides, antioxidantes tióis (glutatona, tioredoxinas e ácido lipóico), Flavonóides e Melatonina.</p>	Valko,2007 Veggi,2008 Blanco, 2017

Para reduzir as agressões oxidativas, o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida), que é uma molécula altamente redutora e extremamente importante para os eritrócitos, consegue manter a forma reduzida da GSH, visto que é o cofator da enzima glutatona-redutase que transforma glutatona oxidada (GSSG) em GSH (Mehta *et al.*, 2000). Por não possuírem mitocôndrias ou outras organelas, a única fonte de suprimento de NADPH do eritrócito é pela ação catalítica da G6PD através da via das pentoses-fosfato. Este processo favorece a defesa antioxidante dos eritrócitos pela ação da GSH que é capaz de detoxificar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), bem como manter resíduos de cisteína da Hb no estado reduzido (Figura 5; Salvemini *et al.*, 1999). O estresse oxidativo pode levar a oxidação da Hb, com formação de MetHb. Em situações normais, há uma proporção muito pequena de MetHb em relação a Hb total (<2%), principalmente pela ação da MetHb redutase em eritrócitos (Hare, *et al.* 2013). O aumento de MetHb no sangue causa uma síndrome clínica chamada Methba (Udeh 2001; Percy, 2008). Com isso, a MetHb pode ser induzida por agentes químicos, como DDS, sulfonamidas, benzocaina, primaquina, levando a várias manifestações clínicas, como dispnéia, náuseas e taquicardia (Coleman 1993, Coleman, 1995). Além disso, o processo oxidativo também pode levar a desnaturação da Hb e precipitação de polipeptídios insolúveis na forma de

agregados, chamados de corpos de Heinz (Winterbourn, 1990). A metahemoglobinemia normalmente bem tolerada em baixa a moderada dose, mas pode se tornar um sério problema em dosagens acima de 200mg/dia de dapsona (Coleman, 1993). O metabólito hidroxilamina reage com a hemoglobina, na presença de oxigênio, levando a formação de metemoglobina. Quando NADPH está disponível, o metabólito hidroxilamina pode ser regenerado, conduzindo a formação de mais metahemoglobina (Zuidema et al., 1986). Sob condições normais, a metahemoglobina é reduzida por NADPH dependente de meta-hemoglobina redutase. Poucos pacientes com deficiência de meta-hemoglobina redutase desenvolvem meta-hemoglobinemia marcante com baixa dose terapêutica de dapsona (Beiguelman et al., 1974). A maioria dos casos significativos tem ocorrido a partir de superdosagens (Ward & McCarthy, 1998), onde os pacientes tornam-se sintomáticos com níveis de metahemoglobina acima de 35%, uma vez que a mesma não transporta oxigênio de forma eficiente. Em doses padrão (100mg/dia), estes níveis estão abaixo de 15%. Ademais, a dapsona pode alterar a homeostase do ferro, tendo em vista que este metal pode levar a processos oxidativos. Estudos feitos por SANTOS (2019) do nosso grupo de pesquisa demonstrou o acúmulo de ferro no hipocampo de animais tratados com dapsona.

2.4 O METABOLISMO DO FERRO (HOMEOSTASIA DO FERRO)

O ferro é um importante oligoelemento do corpo humano é obtido através da dieta alimentar ou da reciclagem de hemácias senescentes (GROTTO, 2008). Esse elemento está envolvido em processos biológicos fundamentais no cérebro, incluindo transporte de oxigênio, síntese de DNA, RNA e proteínas, respiração mitocondrial, síntese de mielina e de neurotransmissores como a dopamina. Desta forma, a homeostase de ferro é necessária para manter a função cerebral fisiológica, enquanto a disfunção desta homeostase pode causar neurotoxicidade (Crichton, 2013; Meng et al., 2017). Além disso, o ferro utilizado pelo organismo O ponto crítico para homeostase do ferro é a sua absorção no duodeno através da dieta alimentar, onde a desregulação nesse mecanismo pode levar a deficiência ou a sobrecarga deste mineral. Posterior a isto, o mecanismo de regulação ocorre com a descamação da mucosa e da pele, durante a

menstruação ou outras perdas de sanguíneas. A maior parte do ferro encontra-se na hemoglobina dos eritrócitos e nas mioglobinas, enquanto o excesso armazena-se no fígado e nos macrófagos do sistema imune (SALVADOR, 2010; URANGA e SALVADOR, 2018).

O ferro é o metal em maior abundância no homem, pode ser encontrado em sua forma oxidada (Fe^{3+}) e em sua forma reduzida (Fe^{2+}), o Fe^{2+} rapidamente oxidado a Fe^{3+} em soluções aquosas, o estado Fe^{3+} insolúvel em pH neutro. O ferro é transportado e armazenado por proteínas específicas como a transferrina, lactoferrina, ferritina e proteína heme (WEINBERG, 1990; PUNTARULO, 2005). Este metal está distribuído por todos os sistemas biológicos onde atuam como cofator catalisando diversos processos biológicos imprescindíveis para a manutenção da vida. Neste contexto, pode apresentar funções essenciais (respiração celular, replicação de DNA e divisão celular) ou especializadas (transporte de oxigênio e neurotransmissão; MILLS *et al.*, 2010; PILONI *et al.*, 2013; WARD *et al.*, 2015; DUSEK *et al.*, 2016; URANGA e SALVADOR, 2018; MASALDAN *et al.*, 2019). O ferro pode atuar como um agente oxidante e desencadear a oxidação de biomoléculas levando a danos teciduais e perda de função. Neste sentido, o ponto crítico para homeostase do ferro é a sua absorção no duodeno, através da dieta alimentar, onde a desregulação nesse mecanismo pode levar a deficiência ou a sobrecarga de ferro. (SALVADOR, 2010; URANGA e SALVADOR, 2018; MASALDAN *et al.*, 2019).

2.5 DEFEROXAMINA

A Deferoxamina (DFX) é um quelante de ferro utilizado para tratar excesso desse metal, clinicamente aprovado e eficaz de forma notável na redução do nível sérico de ferritina e ferro hepático, DFX foi o primeiro agente de terapia de quelação do ferro e tem sido usado extensamente em hematologia há mais de 40 anos. O fato deste ligando apresentar hexadenticidade, fornecida por três grupos quelantes hidroxamato (-CONHOH), justifica a sua elevada capacidade para complexar e sequestrar o ferro. Apesar de ter capacidade de absorção oral, o DFX não é farmacocineticamente recomendado por conta da sua baixa absorção por essa via. A

administração mais recomendada é por via intravenosa ou intramuscular para ser eficaz e benéfica (UYGUN, 2013; KUO,2014).

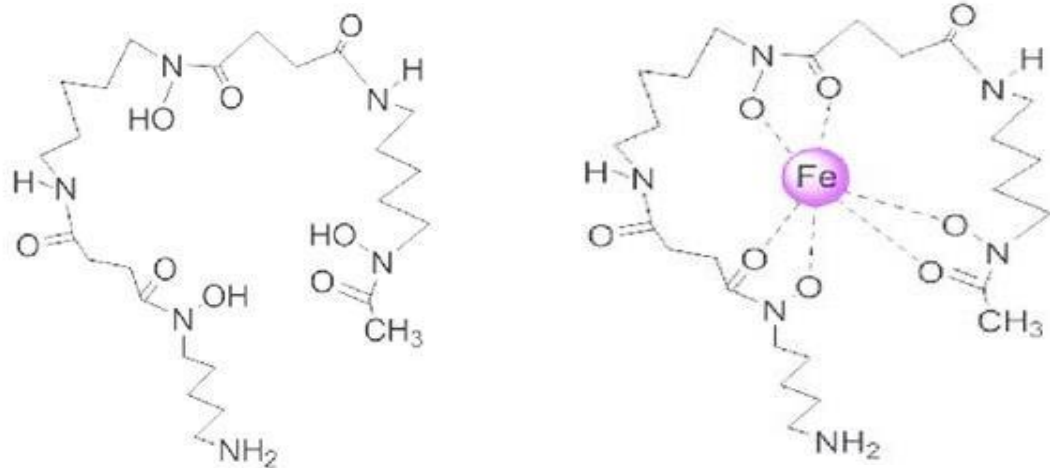


Figura 5: Estrutura do agente quelante deferoxamina e estrutura dos correspondente complexos de Ferro. (Adaptado: SANTOS, 2015)

É um fármaco eficaz e apresenta eventos adversos que incluem toxicidade oftálmica, auditiva, aumento de suscetibilidade as infecções bacterianas e fúngicas, reações alérgicas e cutâneas, náuseas e vômitos e em raros casos podendo apresentar efeitos adversos nos pulmões, rins e sistema nervoso (BOSQUE et al., 1995; FLORA e PACHAURI, 2010). A DFX realiza a quelação de Ferro na sua forma livre, presente no soro, e também do Ferro armazenado na ferritina e na hemossiderina, não reagindo com o Ferro ligado à transferrina, à hemoglobina ou dos citocromos. (DESFERAL bula, 2016).

A deferoxamina liga-se ao ferro não ligado a transferrina ou ao ferro encontrado na ferritina, formando uma molécula que é posteriormente excretada pelos rins. A DFX também promove a degradação da ferritina nos lisossomos. (ENTEZARI, 2022)

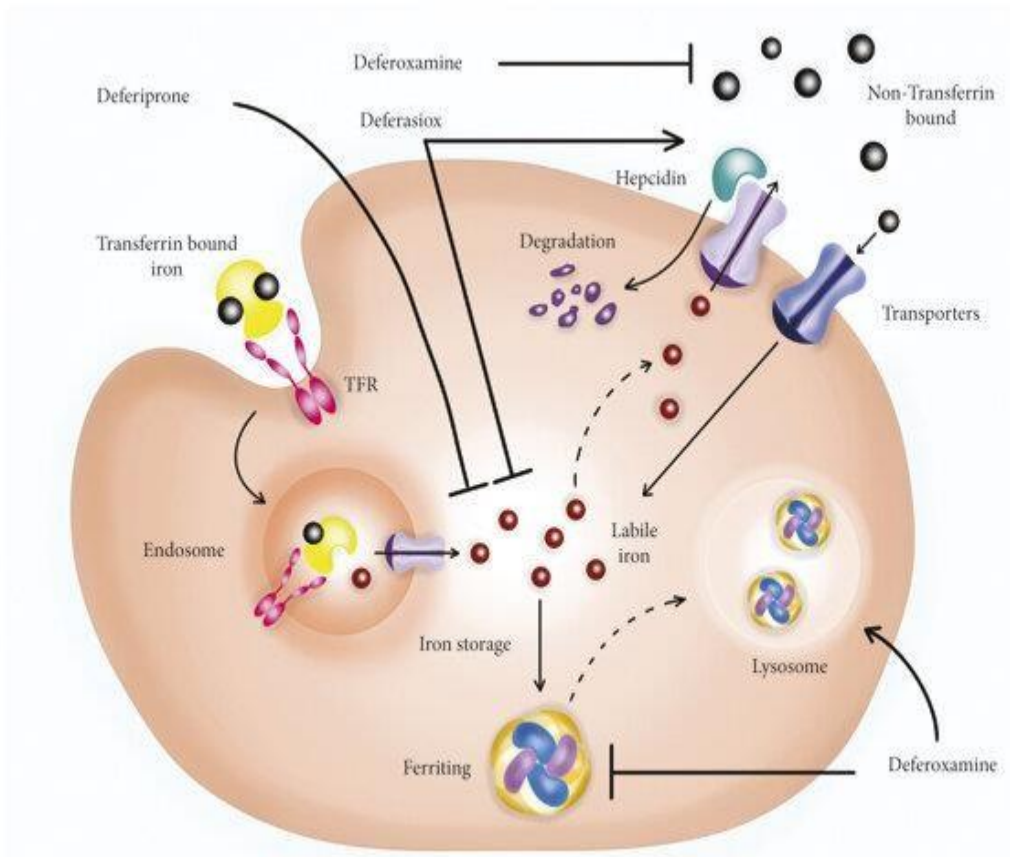


Figura 6: Mecanismo de ação da deferoxamina (ENTEZARI, 2022)

2.6 ÁCIDO ALFA LIPÓICO

O ácido α -lipóico (ácido 1,2-ditolano-3-pentanóico- ALA), também conhecido como ácido tióico, é um ácido graxo que contém um anel tiolano com uma ponte dissulfeto entre os carbonos 6 e 8 (Figura 7).



Figura 7: Estrutura química do ácido α -lipóico (ALA) e de sua forma reduzida, o ácido dihidrolipóico (ADHL). Fonte: Bilaska; Wlodek, 2005.

O ácido alfa-lipóico (α -LA) é um conhecido ácido graxo utilizado como suplemento em diversas condições de saúde e doenças, como neuropatias periféricas e distúrbios neurodegenerativos. O ALA é um composto naturalmente encontrado em praticamente todas as espécies vegetais e animais, em células procariontes e eucariontes (PACKER et al. 2001). A sua síntese em animais e vegetais ocorre devido o ALA estar covalentemente ligado ao grupo amino de lisinas residuais e atuar como cofator em de enzimas mitocondriais, catalisando descarboxilação oxidativa do piruvato, α -cetogluturato e cadeias ramificadas de α -cetoácidos formados durante a transaminação da leucina, isoleucina e valina (BILSKS e WLODEK, 2005; PACKER et al. 2001).

O ALA apresenta características hidrossolúveis e lipossolúveis, influenciando o metabolismo celular na eliminação de resíduos tóxicos. Este composto auxilia na recuperação de lesões, na quelação de metais de transição e na inibição da ativação do fatorNF κ -B (Fator Nuclear Kappa Beta), conseqüentemente, inibindo a resposta inflamatória (MOINI et al. 2002). Além disso, diversos estudos mostram que o ALA e ADHL são considerados potentes agentes antioxidantes, uma vez que podem capturar diversas ERO, incluindo radicais superóxido, radicais hidroxila, ácido hipocloroso, radicais peroxila e oxigênio singleto, além disso, podem reciclar a GSH, o α -tocoferol e o ácido ascórbio (WOLLIN e JONES, 2003). Além disso, estudos in vitro mostram que o ALA diminui a suscetibilidade plasmática à oxidação (MARANGON et al., 1999), protegendo eritrócitos humanos da hemólise induzida por radicais peroxil (CONSTANTINESCU et al. 1994), e aumento da síntese de GSH em eritrócitos humanos isolados (HAN et al. 1997). Colemane Walker (2000) mostraram que o ALA quando incubado com eritrócitos de humanos diabéticos e não diabéticos in vitro, provocou uma redução acentuada da MetHb induzida por MADDS-NOH. Outros estudos mostram que o ALA pode reverter ou prevenir algumas das características da doença de Alzheimer em modelo in vivo e in vitro (PEREZ eCASTANEDA, 2006) e melhorar o estado antioxidante cerebral (MOINI et al. 2002; BILSKA e

WLODEK, 2005; PEREZ e CASTANEDA, 2006).

Os principais mecanismos de ação ALA e ADHL sugeridos são: aumento da produção de acetilcolina ativando acetilcolinesterase, aumento da absorção de glicose fornecendo assim mais acetilCo-A para produção de acetilcolina, quelação de metais de transição inibindo assim a formação de ERO e produtos de peroxidação lipídica, induzindo a produção de enzimas envolvidas na síntese de glutathione e outras enzimas antioxidantes protetoras (PACKER et al. 1999). Assim, atuando no reparo de moléculas danificadas pelo estresse oxidativo e ainda formam um par redox ADHL/ALA com potencial de redução mais negativo ($E_0' = -0,32 \text{ V}$) que os pares glutathione reduzida/glutathione oxidada (GSH/GSSG) e cisteína/cistina (CSH/CSSC) ($E_0' = -0,24$ e $-0,22 \text{ V}$, respectivamente). Devido a seu potencial redox, o DHALA é capaz de reduzir a GSSG a GSH e a CSSC a CSH. No caso da GSH em particular, o par redox ADHL/ALA pode funcionar como um sistema de reciclagem alternativo a atividade da glutathione redutase, sem gasto de NADPH (PACKER et al. 1999). O ácido alfa lipóico tem sido largamente utilizado em produtos farmacêuticos e nutracêuticos, justamente por apresentar propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (IKUTA et al. 2017; BITTNER et al. 2017).

A atividade química de ALA é devido principalmente ao anel ditiolano, cuja presença dos átomos de enxofre confere uma alta densidade eletrônica à molécula de ALA. Estes efeitos, aliado às características hidrofílica e lipofílica da molécula (DINICOLA et al. 2017b), assim como seu status de agente mais eficiente dentre todos os antioxidantes (TIBULLO et al. 2017), sustentam estudos realizados com modelos de suplementação em doenças metabólicas e neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. ALA é classificado como um antioxidante neuroprotetor ideal devido sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e seu perfil de captação uniforme por todo o sistema nervoso central e periférico (ZHAO et al. 2015; MARBOOB et al. 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos dos tratamentos com o ácido α -lipóico em associação ou não com a deferoxamina (DFX), sobre as alterações dos processos bioquímicos e oxidativos induzidos pela dapsona em modelo animal.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os níveis de ferro no sangue, no fígado, baço, rins, pulmão e pâncreas nos animais tratados com dapsona, na presença ou ausência do antioxidante e DFX;
- Avaliar os parâmetros do estresse oxidativo, como o malondialdeído, óxido Nítrico e a glutathiona reduzida e a capacidade antioxidante total no fígado, baço, rins, pulmão e pâncreas nos animais tratados com dapsona, na presença ou ausência do antioxidante e DFX.

4. MATERIAIS E METODOS

4.1 ANIMAIS E PROCEDÊNCIA

Os animais foram obtidos após apreciação e aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFPA). Os animais utilizados na presente estudo foram manipulados segundo a legislação nacional em vigor de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) e a Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal CONCEA (CONCEA, 2013).

Neste estudo, foram utilizados 60 camundongos *Mus musculus*, adultos jovens machos, da linhagem Swiss, com massa corpórea variando de 35 a 40g, com 8 semanas de vida, provenientes do Biotério da universidade federal do Pará. Os camundongos foram alojados no biotério da Faculdade de Farmácia (FACFAR) da Universidade Federal do Pará (UFPA) em gaiolas de polipropileno apresentando dimensões de 45x34x16cm, com cobertura de grade em inox, com a utilização de “cama” em maravalha de Pinus. Durante o período de experimento foi realizada a higienização destas gaiolas em dias alternados, fazendo-se a substituição da maravalha após este processo. Em cada gaiola foram acondicionados quatro animais, sendo estes mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e em cicloalternado de 12 horas de claro/escuro. Água e comida foram fornecidas ad libitum durante o período do experimento. Todos os procedimentos experimentais usando animais foram projetados de forma a minimizar o sofrimento e o número de animais utilizados. Este estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e com o Decreto 6.899 de 15 de junho de 2009, assim como as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA).

Todos os animais experimentais foram mortos pelo método recomendado para a

Ordem Rodentia - Roedores e pequenos mamíferos - que é o da exsanguinação por punção cardíaca após anestesia geral de acordo com a Resolução Normativa nº 6, de 10 de julho de 2012 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal(CONCEA).

4.2.1 Extrapolação alométrica de dose

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

Para isto, consideramos a taxa metabólica basal do animal em estudo, este processo permite extrapolar matematicamente doses de um medicamento indicado para um outro animal vertebrado, de acordo com a taxa metabólica de cada espécie. Neste sentido, sabe-se que a relação entre a taxa metabólica e a massa corporal não é linear, e a proposição de um expoente de massa com valor 0,75 para expressar o metabolismo basal em relação a massa corporal, quando se compara animais interespecíficos. A fundamentação de uso deste expoente está nas taxas de consumo de oxigênio que quando correlacionadas com a massa corporal tende a fazer retas cuja a inclinação é 0,75 (PACHALY, 2006; FREITAS e CARREGARO, 2013). Diante disto, a dose recomendada para um camundongo de 30g (0,03kg) é de 0,30mg de DDS administrado diariamente, o que seria equivalente a uma dose 30mg/kg do animal.

A dapsona foi diluída em óleo de girassol a 10% e administrada por via oral (gavagem) na dose de 40mg/kg. A Solução de DFX foi diluída também em óleo de girassol a 10% e apresenta concentração final de 16mg/ml, administrada via i.p na dose de 40mg/kg. Por outro lado, o ácido α -lipóico foi dissolvido em óleo de girassol a 10% e administrado por via oral (gavagem), nas concentrações de 25mg/kg.

Grupos	Terapias	Tempo de tratamento
CONTROLE SALINA	100µL de solução salina via oral (gavagem) n° 5 animais	5 DIAS
CONTROLE DDS (Dapsona+oleo de girassol10%)	100µL de DDS em uma solução de 40mg/kg de DDS diluído em oleo de girassol 10% por via oral (gavagem)n°5 animais	5 DIAS
CONTROLE ALA 25 (ALA 25+Oleo de girassol10%)	100µL de solução de 25mg/kg de ALA diluído em oleo de girassol 10%, que administrado gavagem. N° 5 Animais	5 DIAS
CONTROLE DFX 40 (Oleo de girassol 10%+ DFX40)	Solução de DFX 16mg/ml,na dose de 40mg/kg via i.p. n= 5 animais	10 DIAS

<p>DDS+ ALA 25</p>	<p>100µL de DDS em uma solução de 40mg/kg de DDS diluído em óleo de girassol por via oral (gavagem), durante 5 dias consecutivos. 100µL de solução de 25mg/kg de ALA diluído em óleo de girassol 10%, administrado por gavagem durante 5 dias.</p> <p>Nº 5 animais</p>	<p>10 DIAS</p>
<p>DDS + DFX 40</p>	<p>100µL de DDS em uma solução de 40mg/kg de DDS diluído em óleo de girassol 10% por via oral (gavagem), durante 5 dias consecutivos. Após será administrado solução de DFX 16mg/ml, na dose de 40mg/kg via i.p.</p> <p>n= 5 animais</p>	<p>10 DIAS</p>

DDS + ALA 25 + DFX 40	100µL de DDS em uma solução de 40mg/kg de DDS diluído em óleo de girassol 10% por via oral durante 5 dias consecutivos. Após, foi administrado 100µL de solução de 25mg/kg de ALA, gavagem, solução de DFX 16mg/ml, na dose de 40mg/kg via i.p N= 5 animais	10 DIAS
------------------------------	--	---------

4.3. AMOSTRAS

4.3.1 . coleta de amostras

Após 24h do término do tratamento farmacológico com DDS, ALA e DFX e dos grupos controles, os animais foram anestesiados com quetamina (1,5 µL/g de peso corporal) e xilazina (0,5 µL/g de peso corporal), submetidos à eutanásia por exsanguinação para a coleta de sangue total por punção cardíaca.

Em seguida, foi realizada a abertura para a retirada dos órgãos (fígado,baço e rins). Cada órgão coletado foi pesado e colocado em tubos falcon com PBS na proporção de 1:10 e sonicados. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas(3000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C para posterior análise. A partir das amostras de sangue foram avaliados os níveis de MetHb e realizado o hemograma dos animais.

4.4. DOSAGEM DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

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

□ 2003). □

A concentração elevada de TBARS tem sido utilizada como um indicador

do estresse oxidativo. O procedimento técnico do método consiste no preparo inicial do fosfatomonobásico de potássio (KH_2PO_4 75 mM, Synth, 35210) em água acidificada (pH 2,5). Esta solução é utilizada na preparação do TBA (10 nM). Adiciona-se 100 l

de amostra à 500 l da solução de ácido tiobarbitúrico 10 nM. Em seguida leva-se ao banho-maria (94°C por 60 min); após a incubação deixa-se esfriar a temperatura ambiente por 15 minutos; adiciona-se 2,0 ml de álcool 1-butílico, homogeneiza-se vigorosamente em vortex e posteriormente submete-se a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos; coleta-se 1,0 ml do sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535 nm. O padrão MDA (1,1,3,3-tetrahidroxipropano-Sigma-Aldrich, T9889) foi utilizado para a realização da curva padrão, sendo os resultados expressos em μM).

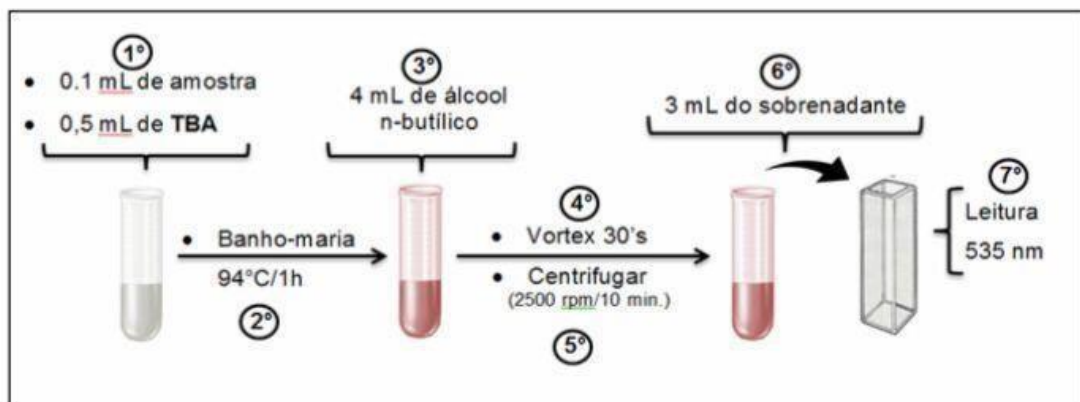


Figura 8: Representação esquemática da dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

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

(VASCONCELOS et al. 2007). As amostras foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 2% e o sobrenadante coletado para análise após centrifugação a 3000 rpm por 5 min. Inicialmente, foi retirada uma alíquota de 20 μ L de cada amostra e colocada em tubo de ensaio contendo 4 mL de tampão PBS/EDTA e 20 μ L de água destilada para a realização da 1ª leitura da amostra (T0), em seguida, será adicionado 100 μ L de DTNB e após 3 minutos, realizada a 2ª leitura da amostra (T3). A diferença nas absorbâncias (T3 - T0) é proporcional à concentração de GSH, expressa em

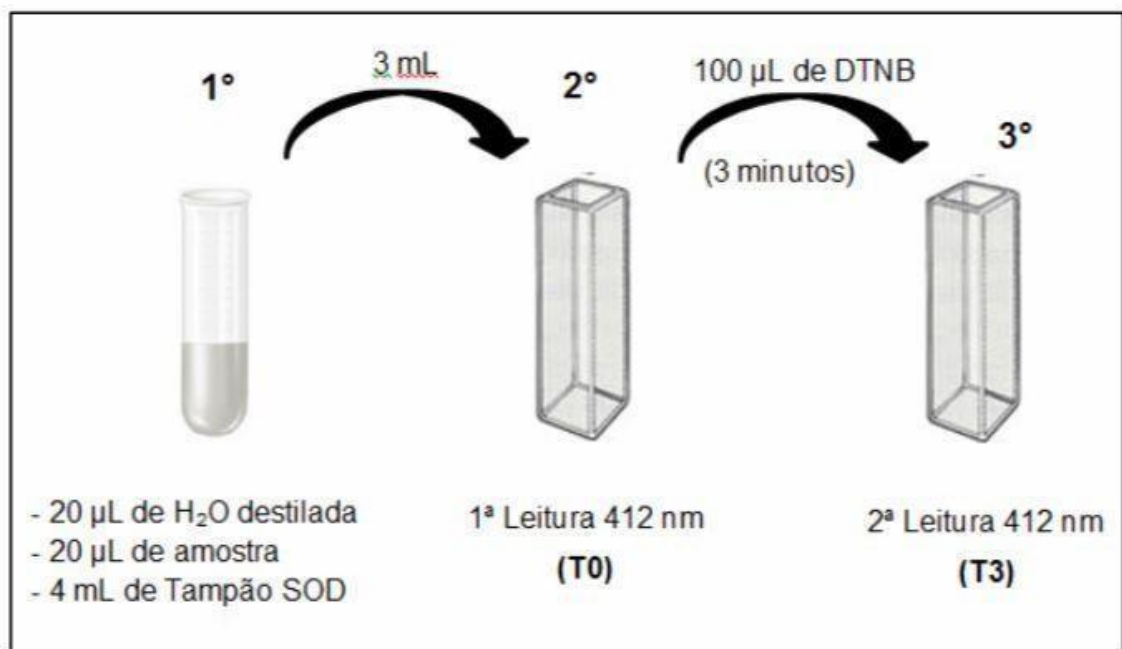


Figura 9: Representação esquemática da determinação da glutatona reduzida (GSH).

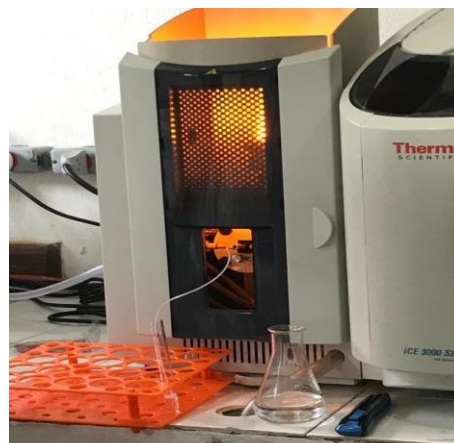
4.6. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TEAC)

A determinação da capacidade antioxidante total será realizada através da técnica da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). O Trolox (ácido 6- hidroxil- 2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico; Sigma Aldrich 23881-3) é um potente antioxidante análogo hidrossolúvel da vitamina E. Seguiremos o método proposto por Miller et al (1993) modificado por Re et al (1999). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (Sigma-Aldrich A1888) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$; Sigma-Aldrich 60490), produzindo diretamente o cátion radical $ABTS^{+\bullet}$ (radical 2,2-azinobis [3- etilbenzotiazolína-6-sulfonato], sal de diamônio), cromóforo de coloração verde/azul (VASCONCELOS et al. 2007). A adição de antioxidantes presentes na amostra a este cátion radical pré-formado o reduz novamente a ABTS, em escala dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante 5 minutos.

4.7. DETERMINAÇÃO DO FERRO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.

A determinação foi realizada em espectrômetro de absorção atômica de chama (marca Thermo, modelo ICE3500). Análise quantitativa elemental da concentração de metais ou traços de metais presentes em amostras em solução, que se baseia na absorção de radiação por átomos livres no estado gasoso, que inicialmente se encontram no estado fundamental.

O espectrometro de absorção atômica é um equipamento que permite a análise quantitativa de elementos metálicos em soluções líquidas, gasosas e sólidas. Os componentes básicos de um espectrometro incluem fonte de radiação, sistema de atomização, conjunto monocromador, a atomização pode ser feita em chama, em tubo aquecido acoplado e gerador de hidretos, através da geração de vapor a frio, e eletrotermicamente em forno de grafite.



4.8. DESCARTE DE MATERIAL BIOLÓGICO

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

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise estatística, onde cada parâmetro foi analisado inicialmente em relação aos possíveis pontos discrepantes (outliers), sendo utilizado o cálculo do intervalo interquartil. Para cada parâmetro analisado foi realizada Análise Variância (ANOVA). Seguida do teste de Tukey para a comparação de pares 46 de médias. Para verificação de possível correlação entre parâmetros, será realizado teste de correlação de Pearson. Os resultados devem ser considerados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ALA E/OU DFX NA FORMAÇÃO DE METEHOglobINA E FERRO SANGUINEO INDUZIDO POR DAPSONA

A Figura 10 mostra o efeito do pós-tratamento com ALA e/ou DFX na formação de metemoglobina e níveis de Ferro no sangue de animais tratados com DDS. Os resultados demonstram que o tratamento com DDS levou a um aumento no percentual de metemoglobina quando comparado ao controle girassol (* $p < 0,05$), e os tratamentos com ALA, DFX e ALA+ DFX foram capazes de reverter este aumento de metemoglobina induzida por DDS, retornando aos níveis controles (Figura 10A). Os animais controles não apresentaram alteração significativa nos percentuais de metemoglobina. A Figura 10B mostra os níveis de ferro no sangue dos animais tratados com DDS e pós-tratados com ALA, DFX e ALA+ DFX. Os resultados demonstram que o tratamento com DDS foi capaz de elevar os níveis de Ferro no sangue comparado ao Grupo Controle (* $p < 0,0001$), e os pós-tratamentos com ALA ou DFX não alteraram esta elevação de Ferro sanguínea induzida por DDS. Entretanto, os animais pós-tratados com ALA + DFX apresentaram redução dos níveis de Ferro induzido por DDS (# $p < 0,05$), retornando aos níveis controles.

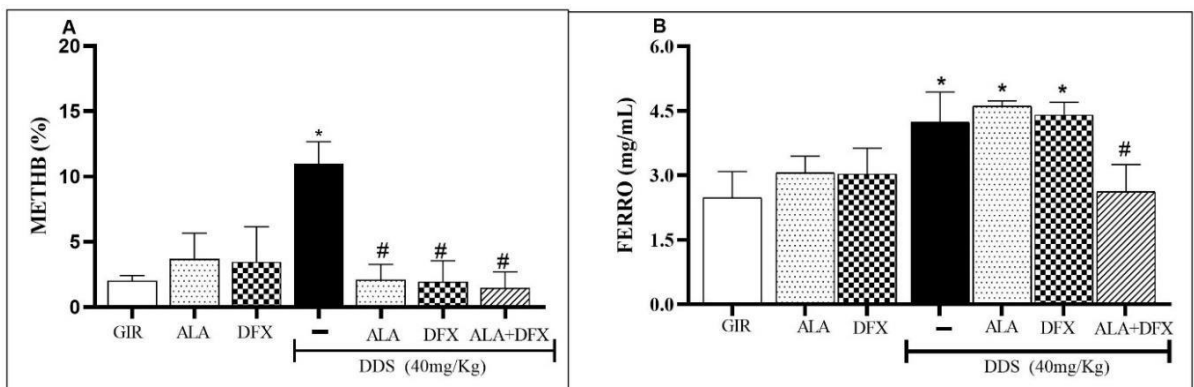


Figura 10 - Efeito do pós-tratamento com ALA e/ou DFX na formação de metemoglobina induzida por DDS. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Controle GIRASSOL. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. %MetHb,

Percentual de metemoglobina.

5.2 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ALA E/OU DFX NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO INDUZIDO POR DAPSONA EM DIFERENTES ÓRGÃOS.

A **figura 11** mostra o efeito do pós-tratamento com ALA e/ou DFX nos níveis de NO nos diferentes órgãos de animais tratados com DDS. O tratamento com DDS elevou os níveis de NO no fígado, rins e pâncreas comparado ao grupo controle girassol. No entanto, os pós-tratamentos com DFX (DFX ou ALA+DFX) foram capazes de reverter o aumento de NO induzido por DDS no fígado, rins e pâncreas, entretanto o tratamento com DFX estimulou acentuadamente a produção de NO no baço dos animais tratados com DDS. De maneira geral, o pós-tratamento com ALA não alterou os níveis de NO comparado aos animais tratados com DDS na maioria dos órgãos avaliados (Fig 11, A-D), com exceção do pâncreas (Fig 11E).

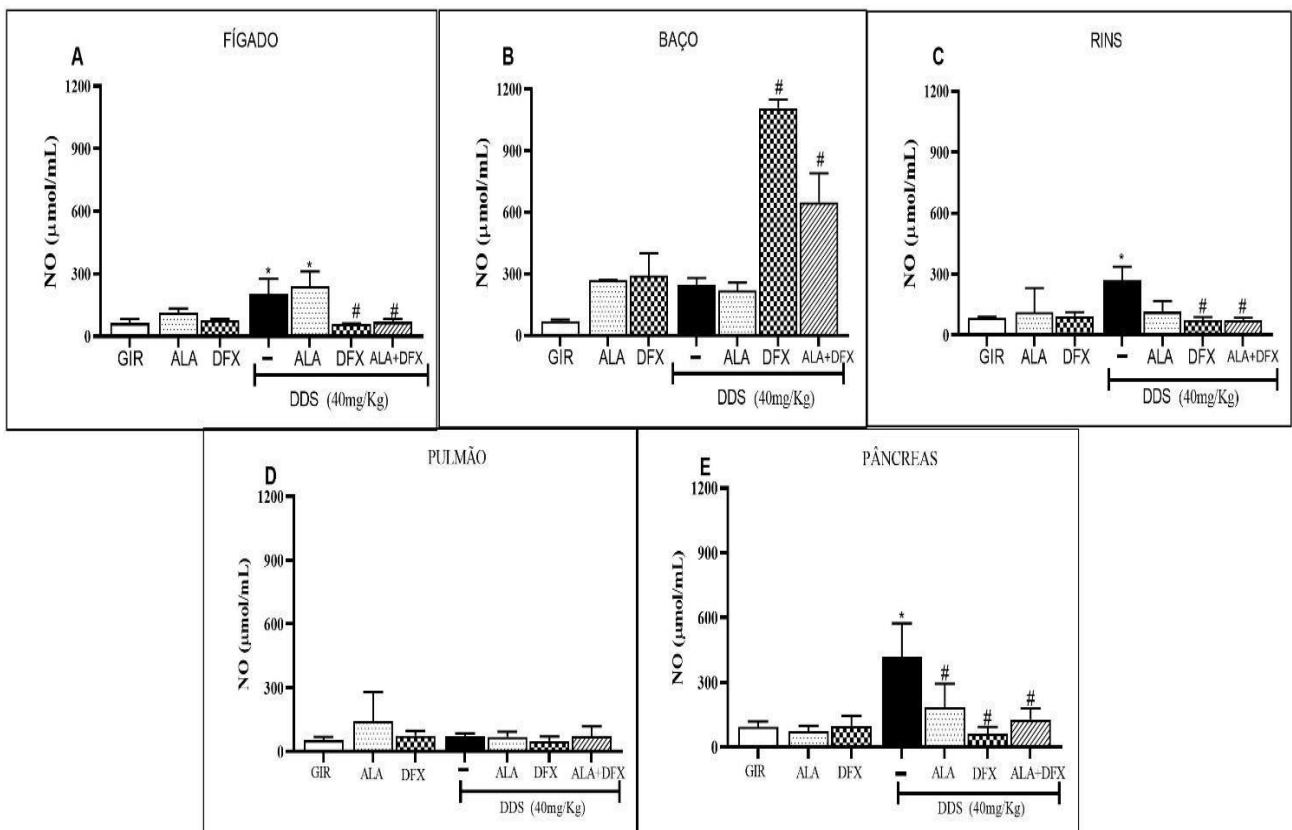


Figura 11: Determinação de óxido nítrico (NO) em animais tratados com DDS e pós-tratados com ALA e/ou DFX no fígado (A), baço (B), rins (C), pulmão (D) e pâncreas (E). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo GIRASSOL. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. DDS, Dapsona. ALA, Acido alfa lipoico, DFX, Deferoxamina.

5.3. EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ALA E/OU DFX NA PRODUÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) INDUZIDA POR DAPSONA EM DIFERENTES ÓRGÃOS.

Em relação aos parâmetros antioxidantes, a figura 12 mostra o efeito do pós-tratamento com ALA e/ou DFX nos níveis de GSH nos diferentes órgãos de animais tratados com DDS. Os resultados demonstram que os animais tratados com DDS apresentaram aumento nos níveis de GSH em todos os órgãos avaliados em relação ao grupo girassol. O pós-tratamento com ALA diminuiu os níveis de GSH induzidos pelo DDS nos rins e pulmão, mas acentuou a produção de GSH no pâncreas. Em contrapartida, o pós-tratamento com o DFX isolado foi capaz de inibir os níveis de GSH induzida pela DDS na maioria dos órgãos (fígado, baço, rins e pulmão), enquanto o DFX associado a ALA inibiu a produção de GSH no fígado, baço, rins, mas potencializou no pulmão. De forma geral, o tratamento com DFX foi mais efetivo em regular os níveis de GSH retornando aos níveis basais (grupo girassol).

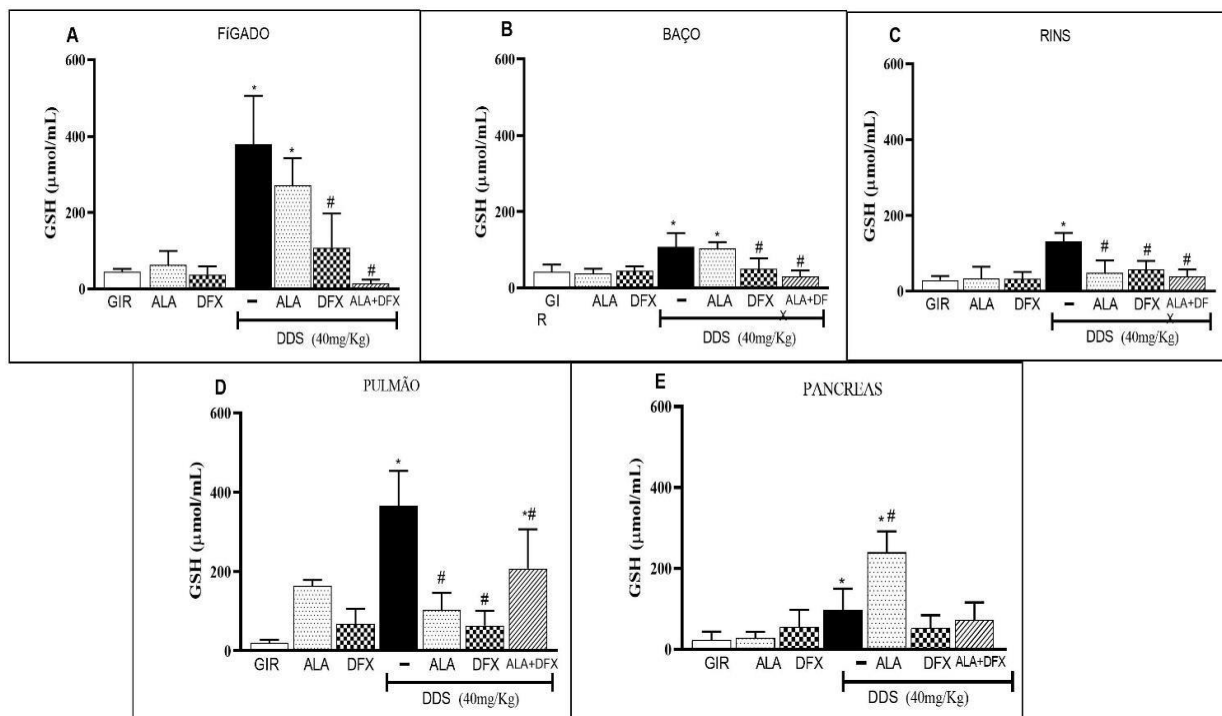


Figura 12: Efeito do ALA e/ou DFX sobre os níveis de GSH induzido por DDS nos órgãos: fígado (A), baço (B), rins (C), pulmão (D) e pâncreas (E). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo GIRASSOL. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. ALA: Ácido α -lipóico; DDS: Dapsona; DFX: Deferoxamina.

5.4 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ALA E/OU DFX NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EQUIVALENTE AO TROLOX INDUZIDA POR DAPSONA EM DIFERENTES ÓRGÃOS.

A figura 13 mostra o efeito do pós-tratamento com ALA e/ou DFX nos níveis de TEAC nos diferentes órgãos de animais tratados com DDS. Os resultados demonstraram que o tratamento com DDS levou a uma redução nos níveis de TEAC no baço, pulmão e pâncreas em relação aos animais tratados com o veículo (Grupo Girassol). Em relação aos pós-tratamentos, os animais pós-tratados com ALA ou DFX isolados foram capazes de reverter a inibição da capacidade antioxidante total induzida por DDS no baço e pâncreas, em contrapartida o pós-tratamento com ALA + DFX somente reverteu a ação oxidativa do DDS sobre o consumo de antioxidantes totais no baço. No fígado e rins, não houve alteração nos níveis de TEAC em nenhum dos grupos tratados em relação ao grupo GIRASSOL.

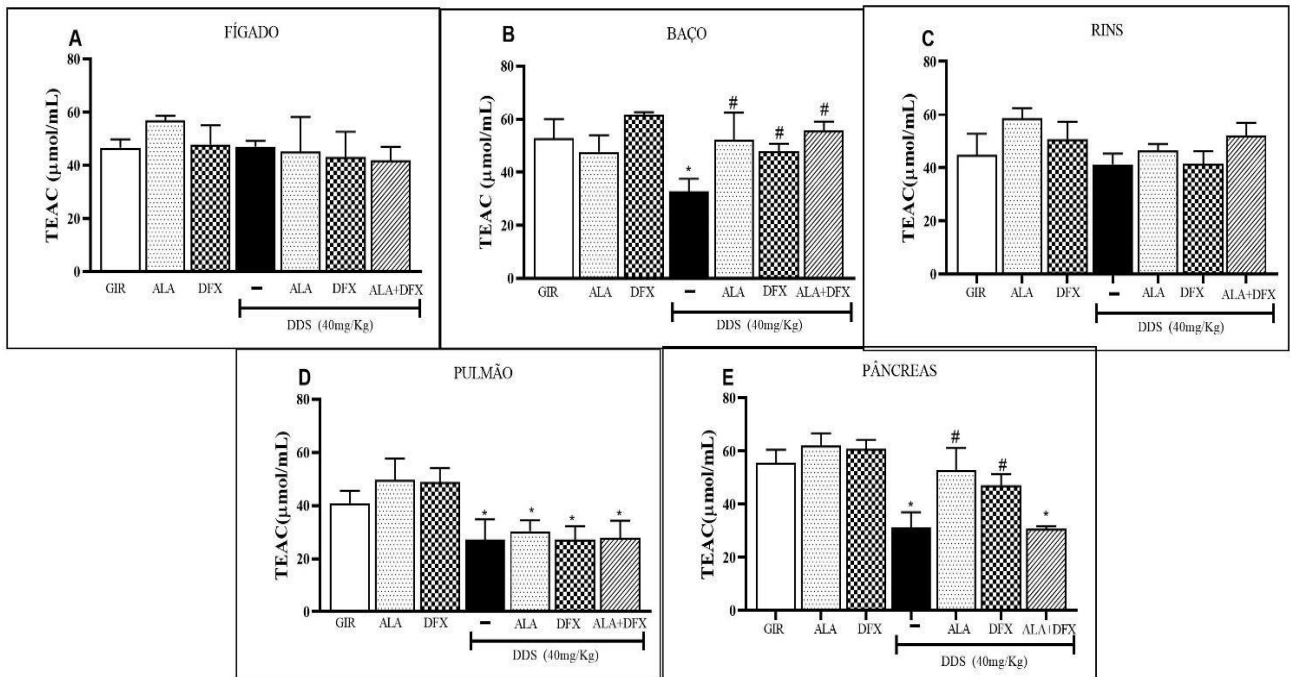


Figura 13: Efeito do pós-tratamento com ALA e DFX sobre os níveis de TEAC induzido por DDS nos órgãos: fígado (A), baço (B), rins (C), pulmão (D) e pâncreas (E). Os dados foram expressos como

média \pm desvio padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo GIRASSOL. # $p \leq 0,05$ comparado ao Grupo DDS. GSH, TEAC, Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. DDS, Dapsona. ALA. Acido alfa lipoico, DFX, Deferoxamina. DDS+DFX. Dapsona e Deferoxamina.

5.5 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ALA E/OU DFX NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (MDA) INDUZIDA POR DAPSONA EM DIFERENTES ÓRGÃOS.

A figura 14 mostra o efeito do pós-tratamento com ALA e/ou DFX nos níveis de MDA nos diferentes órgãos de animais tratados com DDS. A avaliação da peroxidação lipídica está associada aos danos em lipídios ocasionados pelo desequilíbrio oxidativo em células e tecidos, a qual foi expressa pelos níveis MDA conforme Figura 14 abaixo. Os animais tratados com DDS apresentaram aumento nos níveis MDA na maioria dos órgãos avaliados, com exceção do pulmão, em relação aos animais do grupo girassol (controle veículo), mostrando que a DDS levou ao estresse oxidativo, conforme relatado em trabalhos anteriores (SAKAY, 2018). Em relação os pós-tratamentos, o pós-tratamento com ALA foi capaz de inibir de forma significativa a peroxidação lipídica induzida pelo DDS nos órgãos. O pós-tratamento com DFX inibiu os níveis de MDA no fígado, rins e pâncreas, mas potencializou no baço e pulmão. O pós-tratamento com ALA+ DFX diminuiu os níveis de MDA induzido por DDS no fígado, rins e pâncreas, entretanto acentuou no baço. Esses dados mostram que o tratamento com o antioxidante ALA isolado mostrou melhor eficácia comparados aos demais tratamentos.

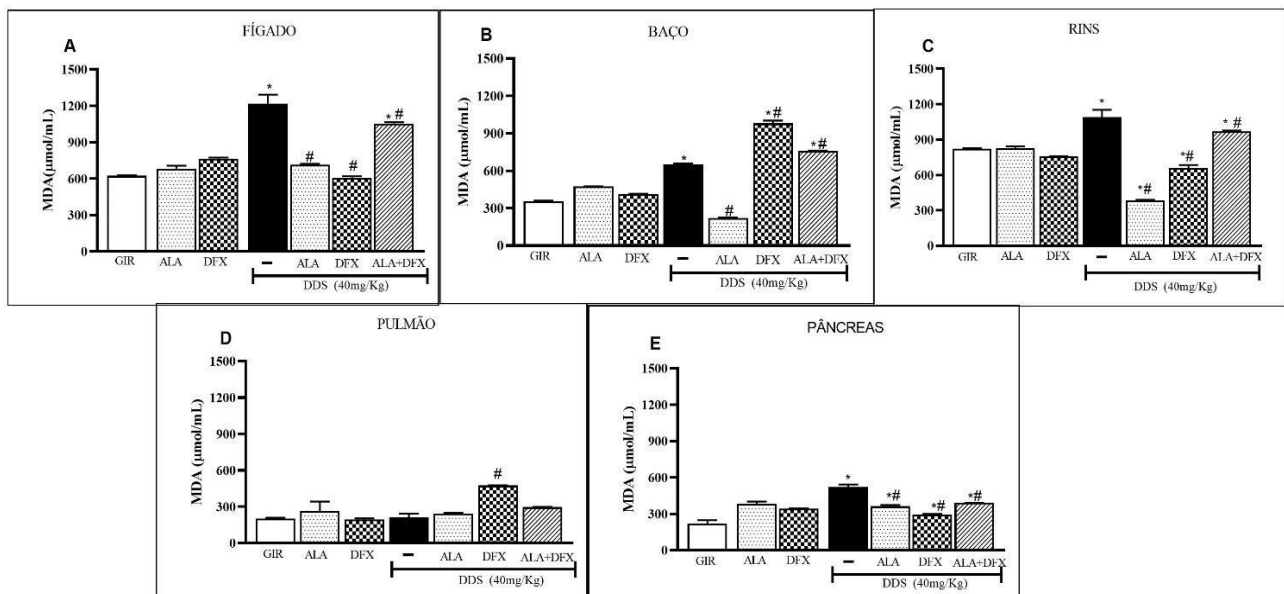


Figura 14 : Efeito do pós-tratamento com ALA e DFX sobre os níveis de MDA induzido por DDS nos órgãos: fígado (A), baço (B), rins (C), pulmão (D) e pâncreas (E). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo GIRASSOL; * $p \leq 0,05$ comparado ao DDS sem tratamento. ALA: Ácido α -lipóico; DDS: Dapsona; DFX: Deferoxamina.

6. DISCUSSÃO

A produção dos radicais livres e de outras substâncias altamente reativas em decorrência do metabolismo do oxigênio são contrabalanceadas por muitos mecanismos de defesa antioxidante, que são capazes de limitar os níveis destes radicais livres, bem como impedir a indução de danos celulares (HALLIWELL, 2007). Os dados apresentados, evidenciam que o tratamento com doses diárias de DDS 40mg/kg, levou a um aumento considerável de metemoglobina quando comparado ao grupo controle girassol, havendo também uma elevação nos níveis de ferro. Os valores de GSH e de TEAC tiveram aumento de redução de suas capacidades nos animais tratados com este fármaco. Todavia, este efeito foi reduzido e/ou revertido com a administração de ALA, DFX, ALA+DFX.

Os dados apresentados, neste estudo, mostram que a administração da Dapsona (40mg/kg) por gavagem foi capaz de induzir a formação de metemoglobina nas hemácias dos camundongos tratados durante 5 dias com dapsona e eutanasiados após 24h do término do tratamento, efeito esse já descritos na literatura associados aos metabolitos DDS-NOH e MADDS-NOH (CARAZZA, 1995). Schalcher et al (2014), evidenciou em seus estudos pertencentes a este grupo de pesquisa, o potencial oxidativo da dapsona. Isso mostra que a DDS tem propriedades metemoglobinizantes, causados por alterações no equilíbrio redox, promovendo o estresse oxidativo e produção de ERO. Coleman et al. (1996) observaram que o metabolito DDS-NOH foi capaz de induzir a formação de MetHb em altas concentrações (acima de 45%). Pessoa (2014) em seus estudos *in vitro* evidenciaram esse aumento de metemoglobina em pacientes fazendo uso da poliquimioterapia para o tratamento da hanseníase. Em contrapartida, neste estudo esse efeito foi revertido e/ou reduzido nos grupos administrados com ALA, DFX e ALA+DFX. Os resultados mostraram que as concentrações de ALA (25mg/kg) foi capaz de prevenir ou reverter a formação da MetHb induzida por DDS, em 24h após o tratamento. Esses dados

sugerem que o ALA tem elevada capacidade antioxidante e pode atuar sobre a MetHb, reduzindo-a à Hb ou criando um microambiente capaz de prevenir sua oxidação. Os resultados estão de acordo com os obtidos por Coleman e Walker (2000) que mostraram que o ALA quando incubado com eritrócitos de humanos diabéticos e não diabéticos in vitro, provocou uma redução acentuada da MetHb induzida por MADDN-NOH.

Ciccoli et al (1999) demonstra em seus estudos que animais tratados com dapsona apresentam além do aumento de MetHb, uma liberação contínua de ferro dos eritrócitos. Com isso, explicamos os níveis ferro elevados nos animais tratados com DDS demonstrados na figura B

Com isso, nossos resultados demonstraram que os grupos tratados com DDS e pós-tratados com ALA, conseguiram reverter o acúmulo de ferro no fígado dos animais. Nosso estudo mostrou que o tratamento com DDS 40mg/kg apresentou aumento nas concentrações de GSH, em 24h após os tratamentos. A glutathione (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina; cisteína e ácido glutâmico. Quando oxidada na reação, há interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, formando GSSG. A queda nos níveis endógenos de GSH podem prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. As células íntegras mantêm uma razão elevada de GSH/GSSG para garantir a disponibilidade de GSH. Por tanto, é necessária a constante regeneração de GSH, a qual se dará por meio da ação da enzima GR (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2004). Após exposição da GSH às espécies reativas, ocorre sua oxidação a GSSG, via glutathione oxidase (GSH-Ox), gerando H₂O₂. A GPx catalisa a redução do H₂O₂ e o excesso de GSSG resulta em um ambiente oxidante, favorecendo a formação de pontes dissulfeto (-SS) em proteínas, alterando sua conformação e, eventualmente, alterando suas funções. Entretanto, esta oxidação pode ser revertida pela ação antioxidante da GSH. A GR não age diretamente na remoção dos radicais livres, porém é responsável pela recuperação da GSH na presença de NADPH, tal recuperação tem como objetivo impedir a paralisação do ciclo de GSH-GPx-GR (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2004). Em condições de excesso de agentes oxidantes ou deficiência do sistema antioxidante, há o desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, caracterizando o estresse oxidativo (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2004). Que foi observado nesse estudo durante a utilização da dapsona, no entanto, o tratamento

com o ALA na (25mg/kg) foi capaz de reduzir e/ou diminuir os níveis de GSH após tratamento com DDS de forma mais evidente nos rins e pulmão. De acordo com Han et al. (2007) e Mignini et al. (2012) a capacidade antioxidante de ALA depende fundamentalmente da indução da regeneração de GSH em nível celular e que é provavelmente devido a uma resposta celular adaptativa induzida por uma melhor atividade da cisteína. Em estudos in vitro com eritrócitos humanos isolados, ALA diminuiu a susceptibilidade à oxidação (Marangon et al., 1999), protegendo contra a hemólise de eritrócitos humanos induzidos por radicais peróxido (Constantinescu et al., 1994) e aumentou a síntese de GSH (Han et al., 1997). O tratamento com DFX foi capaz de inibir os níveis de GSH em praticamente todos os órgãos, fazendo com que a capacidade antioxidante fosse estatisticamente semelhante ao grupo controle girassol.

As características antioxidantes dos nossos dados mostraram que o tratamento com DDS 40mg/kg levou a uma redução da capacidade antioxidante total (TEAC) dos camundongos. Esses resultados sugerem que a DDS e seus metabólitos podem atravessar a membrana plasmática das hemácias e reduzir o status antioxidante dessas células, tendo como consequência a elevação de MetHb, hemólise, heme livre e liberação de ferro e estresse oxidativo. Por isso, a administração de DDS em camundongos produz liberação contínua de ferro dos eritrócitos, afetando a homeostase plasmática, o estado redox e outros tecidos. Esses achados corroboram com Ferrali et al. (1997), que mostraram que o metabólito DDS-NOH induz a liberação de ferro em eritrócitos com consequente formação de MetHb, sugerindo a importância da liberação deste metal nos mecanismos que levam a danos nos eritrócitos e em tecido. Em relação ao pós tratamento, observamos que o uso individual de ALA e DFX foram capazes de reverter a inibição da capacidade antioxidante total induzida por DDS no baço e pâncreas, com isso é possível que antioxidantes, como o ALA, podem ter efeitos benéficos no combate à liberação de ferro e as alterações oxidativas provocadas por DDS e seus metabólitos. Confirmado nosso estudo mostrou que, o tratamento com o ALA na concentração utilizada (25mg/kg) foi capaz de reverter a capacidade de antioxidantes totais (TEAC) sugerindo que o ALA pode atravessar a membrana do eritrócito atuando também no seu citoplasma, aumentando a capacidade antioxidante e/ou induzindo a síntese de outros

antioxidantes, como a GSH. Lexis (2006) mostrou que a suplementação dietética com ALA (1,6 g / kg de dieta), associada ao α -tocoferol (1000 UI / kg de dieta) aumentou a defesa antioxidante dos eritrócitos, reduziu a nefrotoxicidade em ratos tratados com ciclosporina e aumentou a atividade de CAT. Outro mecanismo antioxidantes do ALA deve estar baseado nas características moleculares, cujo isômero R, reconhecidamente de melhor perfil farmacocinético de absorção (GLEITER et al. 1996; HERMANN et al. 1996; BREITHAUPT-GROGLER et al. 1999) Em contrapartida, o pós-tratamento com ALA + DFX somente reverteu a ação oxidativa do DDS sobre o consumo de antioxidantes totais no baço. No fígado e rins, não houve alteração nos níveis de TEAC em nenhum dos grupos tratados em relação ao grupo girassol.

Na avaliação da peroxidação lipídica, observou-se um aumento da concentração dessas substâncias nos camundongos tratados com DDS 40mg/kg, indicando aumento de MDA induzido pela DDS. Portanto, a DDS ou seus metabólitos podem alterar o equilíbrio redox no plasma, promovendo estresse oxidativo e produção de MDA. Veggi et al. (2008), avaliou os efeitos da administração de DDS e DDS-NOH (30 mg/kg, duas vezes ao dia, por 4 dias) em ratos machos e fêmeas no estresse oxidativo hepático através da avaliação do conteúdo hepático de GSH e GSSG, peroxidação lipídica e expressão/atividade das principais enzimas antioxidantes: GPX, SOD, CAT e GST. Os resultados revelaram um aumento na razão de GSSG/GSH e na peroxidação lipídica, em ratos machos, mas não em fêmeas tratados com DDS, uma vez que a N-hidroxilação de DDS ocorre principalmente em machos. A atividade de todas as enzimas antioxidantes foi significativamente prejudicada pelo tratamento DDS. Essas evidências indicam que o DDS induz estresse oxidativo no fígado de ratos e que a N-hidroxilação do DDS, que leva à formação de DDS-NHOH, é o provável causador desse processo, com prejuízo na atividade dos sistemas antioxidantes enzimáticos, levando ao agravamento do estresse oxidativo.

Corroborando com esses estudos, Schalcher et al. (2013) mostraram que pacientes com hanseníase em uso de PQT apresentaram aumento de metemoglobina e MDA. Os animais tratados com DDS apresentaram aumento nos níveis MDA na maioria dos órgãos avaliados, com exceção do pulmão, em

relação aos animais do grupo girassol, mostrando que a DDS levou ao estresse oxidativo, conforme relatado em trabalhos anteriores (SAKAY, 2018). O pós-tratamento com ALA foi capaz de inibir de forma significativa a peroxidação lipídica induzida pelo DDS nos órgãos. Em estudo in vivo, o tratamento com 5 mg/kg de sulfato ferroso durante 50 dias resultou em uma sobrecarga de ferro no plasma e aumento nos níveis de MDA em ratos. No entanto, o pós-tratamento com ALA nesses animais, levou a redução de 47% nos níveis de ferro sérico, assim como diminuiu o nível de MDA no cérebro e plasma em 42% e 74%, respectivamente. O ALA também diminuiu o efeito das ERO induzidos pelo ferro, aumentando a integridade da membrana dos eritrócitos por diminuição da fragilidade osmótica, levando a diminuição de hemólise. Esses dados sugerem que ALA pode ser um antioxidante benéfico, diminuindo os danos causados pelo estresse oxidativo e da sobrecarga de ferro (ALI et al. 2015).

O pós-tratamento com DFX inibiu os níveis de MDA no fígado, rins e pâncreas, mas potencializou no baço e pulmão. O pós-tratamento com ALA+ DFX diminuiu os níveis de MDA induzido por DDS no fígado, rins e pâncreas, entretanto acentuou no baço. Esses dados mostram que o tratamento com o antioxidante ALA isolado mostrou melhor eficácia comparados aos demais tratamentos, isso se deve a sua capacidade de restabelecer o equilíbrio redox, aumentando a capacidade antioxidante total e reduzindo o MDA.

LI et al. (2016) após a indução de alteração na homeostasia do ferro por cirurgia no abdômen, os autores observaram que houve um aumento na concentração de ferro mais especificamente no hipocampo. Estes efeitos foram suprimidos com a administração de DFX após o procedimento cirúrgico, sugerindo que o uso do DFX foi capaz de diminuir o acúmulo de Ferro nesse tecido. Do mesmo modo, trabalhos já realizados por nosso grupo de pesquisa, envolvendo o sistema nervoso central, fornecem evidências de que o tratamento com DDS pode induzir uma redução da aprendizagem e das atividades mnemônicas em camundongos, justamente por conta dessa alteração da homeostasia, e que estes efeitos podem ser dose dependentes.(MENDES, 2020). Adicionalmente, o tratamento com DFX foi capaz de reverter ou inibir os efeitos induzidos pelo tratamento com a DDS. A alteração dessa homeostasia do ferro, causada pelo DDS, pode contribuir para alterações neurodegenerativas, com isto

o uso quelantes de ferro são capazes de reduzir a concentração desse metal. (DUSEK et al., 2016). Ficou evidente que a DFX tem grande importancia para promover o equilibrio dessa homeostase ocasionada pela hemólise e liberaçãõ do ferro livre em decorrência do tratamento com DDS, e este aumento de ferro livre pode catalisar e/ou favorecer a formaçãõ de ERO através da reaçãõ de Fenton e Waber-Weiss. Com isto, estas espécies reativas formadas, em especial hidroxila ($\bullet\text{OH}$), tendem a promover a peroxidaçãõ de lipídeos de membrana que podem levar a alteraçãõ na membrana e com isto levar a perda de funçãõ celular e/ou até mesmo levar a apoptose ou ferroptose.

O uso terapêutico de DFX depende das suas propriedades antioxidantes para prevenir a formaçãõ de ERO, e principalmente de suas propriedades quelantes, para remover as quantidades excessivas de ferro livre no plasma sem ligar-se ao ferro ligado a transferrina e/ou no acúmulo deste metal nos tecidos, de modo a evitar que a sobrecarga de ferro livre possa se acumular em nos diversos órgãos e tecidos (MENDES, 2020).

Desta forma, sugere-se que o ALA e o DFX são alternativas terapêuticas útil e promissora para o tratamento de MetHba, hemólise, estresse oxidativo e para evitar a progressãõ de danos induzidos pelo acúmulo de ferro no organismo em indivíduos que fazem uso crônico de DDS, diminuindo sua toxicidade e facilitando a adesãõ ao tratamento de doenças como a hanseníase.

7. CONCLUSÃO

A partir deste modelo experimental, podemos concluir que:

- O tratamento com DDS induziu a formação de MetHb dos camundongos, e o pós-tratamento com ALA, DFX ou ALA+DFX preveniu ou reverteu a oxidação da hemoglobina induzida pela DDS;
- O tratamento com DDS foi capaz de elevar os níveis de ferro no sangue, no entanto, somente o tratamento em associação ALA+ DFX foi capaz de diminuir esse níveis retornando aos níveis basais;
- O tratamento com DDS apresentou aumento nos níveis de GSH em todos os órgãos avaliados, no entanto o tratamento com DFX foi o mais eficaz em regular para níveis basais a concentração de GSH na maioria dos órgãos;
- O tratamento com DDS reduziu a capacidade antioxidante (TEAC), e os tratamentos com ALA ou DFX foram capazes de elevar ou restabelecer os níveis de TEAC;
- O DDS induziu aumento de MDA na maioria dos órgãos avaliados, e o tratamento com o ALA foi o mais eficaz em diminuir a peroxidação lipídica nos órgãos.

Desta forma, estes dados mostram que os tratamentos com ALA ou DFX isoladamente foram os mais eficazes em inibir o estresse oxidativo ocasionada pelo uso de DDS, sugerindo maior benefício para o organismo quando comparado ao uso concomitante de ALA+DFX. Com isso, estes dados, em conjunto, sugerem uma possível aplicação terapêutica do Ácido Alfa Lipoico ou Deferoxamina no controle da progressão de doenças ou toxicidade de fármacos que induzam a formação de ERO e ao acúmulo de ferro no organismo, como por exemplo dapsona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, R. V. ET AL. IN VITRO PROTECTIVE EFFECT AND ANTIOXIDANT MECHANISM OF RESVERATROL INDUCED BY DAPSONE HYDROXYLAMINE IN HUMAN CELLS. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, p. 1-25, 2015.

ALCALDE, L. A. ET AL. IRON CHELATOR DEFERIPRONE RESCUES MEMORY DEFICITS, HIPPOCAMPAL BDNF LEVELS AND ANTIOXIDANT DEFENSES IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF MEMORY IMPAIRMENT. *BIOMETALS*, v. 31, n. 6, p. 927-940, 2018.

ANNIGERI, S.; METGUD, S.; PATIL, J. LEPROMATOUS LEPROSY OF HISTOID TYPE. *INDIAN JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY*, v. 25, n. 1, p. 70, 2007.

AOYAMA, K. ET AL. CAFFEINE AND URIC ACID MEDIATE GLUTATHIONE SYNTHESIS FOR NEUROPROTECTION. *NEUROSCIENCE*, v. 181, p. 206-215, 2011.

AYTON, S.; DIOUF, I.; BUSH, A. I. EVIDENCE THAT IRON ACCELERATES ALZHEIMER'S PATHOLOGY: A CSF BIOMARKER STUDY. *JOURNAL OF NEUROLOGY, NEUROSURGERY, AND PSYCHIATRY*, v. 89, n. 5, p. 456-460, 2018.

BANNERMAN, D. M. ET AL. REGIONAL DISSOCIATIONS WITHIN THE HIPPOCAMPUS - MEMORY AND ANXIETY. *NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS*, v. 28, n. 3, p. 273-283, 2004.

BARRES, B. A. THE MYSTERY AND MAGIC OF GLIA: A PERSPECTIVE ON THEIR ROLES IN HEALTH AND DISEASE. *NEURON*, v. 60, n. 3, p. 430-440, 2008.

BARROS, P. D. ET AL. DEVELOPMENT AND EVALUATION OF DAPSONE TABLETS COATED FOR SPECIFIC COLON RELEASE. *DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY*, v. 0, n. 0, p. 1-24, 17 JAN. 2020.

BELAIDI, A. A.; BUSH, A. I. IRON NEUROCHEMISTRY IN ALZHEIMER'S DISEASE AND PARKINSON'S DISEASE: TARGETS FOR THERAPEUTICS. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY*, v. 139, p. 179-197, 2016.

BUHL, R. ET AL. WHETHER SYSTEMIC GLUTATHIONE IMMUNODEFICIENCY (HIV). P. 1294-1298, 1989.

BURKE, P.; JAHANGIR, K.; KOLBER, M. R. DAPSONE-INDUCED METHEMOGLOBINEMIA: CASE OF THE BLUE LADY. *CANADIAN FAMILY PHYSICIAN*, v. 59, n. 9, p. 958-961, 2013.

C VORHEES, M. W. MORRIS WATER MAZE: PROCEDURES FOR ASSESSING SPATIAL AND RELATED FORMS OF LEARNING AND MEMORY. *NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH*, v. 1, n. 2, p. 848-858, 2010.

CARBONI, E. ET AL. DEFERIPRONE RESCUES BEHAVIORAL DEFICITS INDUCED BY MILD IRON EXPOSURE IN A MOUSE MODEL OF ALPHA-SYNUCLEIN AGGREGATION. *NEUROMOLECULAR MEDICINE*, v. 19, n. 2-3, p. 309-321, 2017.

CERBAI, F. ET AL. THE NEURON-ASTROCYTE-MICROGLIA TRIAD IN NORMAL BRAIN AGEING AND IN A MODEL OF NEUROINFLAMMATION IN THE RAT HIPPOCAMPUS. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 2012.

CICCOLI, L. ET AL. HEMOLYTIC DRUGS ANILINE AND DAPSONE INDUCE IRON RELEASE IN ERYTHROCYTES AND INCREASE THE FREE IRON POOL IN SPLEEN AND LIVER. *TOXICOLOGY LETTERS*, v. 110, n. 1-2, p. 57-66, 1999.

COLEMAN, M. D. DAPSONE: MODES OF ACTION, TOXICITY AND POSSIBLE STRATEGIES FOR INCREASING PATIENT TOLERANCE. *BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY*, v. 129, n. 5, p. 507-513, 1993.

COLEMAN, M. D. DAPSONE TOXICITY: SOME CURRENT PERSPECTIVES. *GENERAL PHARMACOLOGY*, v. 26, n. 7, p. 1461-1467, 1995.

COLEMAN, M. D. ET AL. STUDIES ON THE DIFFERENTIAL SENSITIVITY BETWEEN DIABETIC AND NON-DIABETIC HUMAN ERYTHROCYTES TO MONOACETYL DAPSONE HYDROXYLAMINE-

MEDIATED METHAEMOGLOBIN FORMATION IN VITRO. ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY, v. 1, n. 2, p. 97-102, 1996.

COOK, C. I.; YU, B. P. IRON ACCUMULATION IN AGING: MODULATION BY DIETARY RESTRICTION. MECHANISMS OF AGEING AND DEVELOPMENT, v. 102, n. 1, p. 1-13, 1998.

D'HOOGE, R.; DE DEYN, P. P. APPLICATIONS OF THE MORRIS WATER MAZE IN THE STUDY OF LEARNING AND MEMORY. BRAIN RESEARCH REVIEWS, v. 36, n. 1, p. 60-90, 2001.

DE LIMA, M. N. M. ET AL. DESFEROXAMINE REVERSES NEONATAL IRON-INDUCED RECOGNITION MEMORY IMPAIRMENT IN RATS. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, v. 570, n. 1-3, p. 111-114, 2007.

DE LIMA, M. N. M. ET AL. REVERSION OF AGE-RELATED RECOGNITION MEMORY IMPAIRMENT BY IRON CHELATION IN RATS. NEUROBIOLOGY OF AGING, v. 29, n. 7, p. 1052-1059, 2008.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. NEUROINFLAMMATION: THE DEVIL IS IN THE DETAILS. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, v. 139, p. 136-153, 2016.

DON, G. ET AL. HEMOLYSIS AND ANEMIA INDUCED BY DAPSONE HYDROXYLAMINE. ANEMIA, n. MAY 2014, 2012.

BOSQUE, M. A.; DOMINGO, J. L.; CORBELLA, J. ASSESSMENT OF THE DEVELOPMENTAL TOXICITY OF DEFEROXAMINE IN MICE. ARCHIVES OF TOXICOLOGY, v. 69, n. 7, p. 467-471, 1995.

BRADSHAW, T. P. ET AL. IDENTIFICATION OF FREE RADICALS PRODUCED IN RAT ERYTHROCYTES EXPOSED TO HEMOLYTIC CONCENTRATIONS OF PHENYLHYDROXYLAMINE. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, v. 18, n. 2, p. 279-285, 1995.

BRADSHAW, T. P. ET AL. FORMATION OF FREE RADICALS AND PROTEIN MIXED DISULFIDES IN RAT RED CELLS EXPOSED TO DAPSONE HYDROXYLAMINE. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, v. 22, n. 7, p. 1183-1193, 1997.

BRANDEIS, R.; BRANDYS, Y.; YEHUDA, S. THE USE OF THE MORRIS WATER MAZE IN THE STUDY OF MEMORY AND LEARNING. INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROSCIENCE, v. 48, n. 1-2, p. 29-69, 7 JAN. 1989.

DUSEK, P.; SCHNEIDER, S. A.; AASETH, J. IRON CHELATION IN THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES. JOURNAL OF TRACE ELEMENTS IN MEDICINE AND BIOLOGY, v. 38, p. 81-92, 2016.

EGAÑA, J. T. ET AL. IRON-INDUCED OXIDATIVE STRESS MODIFY TAU PHOSPHORYLATION PATTERNS IN HIPPOCAMPAL CELL CULTURES. BIOMETALS, v. 16, n. 1, p. 215-223, 2003.

ELLARD, G. A. ET AL. DAPSONE ACETYLATION AND THE TREATMENT OF LEPROSY. NATURE, v. 239, n. 5368, p. 159-160, SET. 1972.

ELLMAN, G. L. TISSUE SULFHYDRYL GROUPS. ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, v. 82, n. 1, p. 70-77, MAIO 1959.

EVELYN, K.; MALLOY, H. METHEMOGLOBIN AND SULFHEMOGLOBIN. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, v. 126, p. 655-662, 1938.

FAA, G.; CRISPONI, G. IRON CHELATING AGENTS IN CLINICAL PRACTICE. COORDINATION CHEMISTRY REVIEWS, v. 184, n. 1, p. 291-310, 1999.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. ARE THE DORSAL AND VENTRAL HIPPOCAMPUS FUNCTIONALLY DISTINCT STRUCTURES? NEURON, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.

FARHI, D. ET AL. DAPSONE IN DERMATOLOGY. EMC - DERMATOLOGIE-COSMETOLOGIE, v. 2, n. 2, p. 103-117, 2005.

FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V. CHELATION IN METAL INTOXICATION. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL RESEARCH AND PUBLIC HEALTH, v. 7, n. 7, p. 2745-2788, 2010.

GAO, L. ET AL. BRAIN IRON DEPOSITION ANALYSIS USING SUSCEPTIBILITY WEIGHTED IMAGING AND ITS ASSOCIATION WITH BODY IRON LEVEL IN PATIENTS WITH MILD COGNITIVE IMPAIRMENT. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, v. 16, n. 6, p. 8209-8215, 2017.

GATTI, G. ET AL. PENETRATION OF DAPSONE INTO CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH AIDS. *JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY*, v. 40, n. 1, p. 113-115, 1997.

GILL, H.; TINGLE, M.; PARK, B. N-HYDROXYLATION OF DAPSONE BY MULTIPLE ENZYMES OF CYTOCHROME P450: IMPLICATIONS FOR INHIBITION OF HAEMOTOXICITY. *BRITISH JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY*, v. 40, n. 6, p. 531-538, 1995.

GOODWIN, J. F.; MURPHY, B.; GUILLEMETTE, M. DIRECT MEASUREMENT OF SERUM IRON AND BINDING CAPACITY. *CLINICAL CHEMISTRY*, v. 12, n. 2, p. 47-57, 1966.

GOULART, I. M. B. ET AL. EFEITOS ADVERSOS DA POLIQUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM HANSENÍASE: UM LEVANTAMENTO DE CINCO ANOS EM UM CENTRO DE SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. *REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL*, v. 35, n. 5, p. 453-460, 2002.

GOZZELINO, R.; AROSIO, P. IRON HOMEOSTASIS IN HEALTH AND DISEASE. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, v. 17, n. 1, p. 2-14, 2016.

GROTTO, H. Z. W. METABOLISMO DO FERRO: UMA REVISÃO SOBRE OS PRINCIPAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS EM SUA HOMEOSTASE. *REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA*, v. 30, n. 5, p. 175-178, OUT. 2008.

GRUNWALD, M. H.; AMICHAÏ, B. DAPSONE - THE TREATMENT OF INFECTIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES IN DERMATOLOGY. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS*, v. 7, n. 3, p. 187-192, 1996.

HAN, M.; KIM, J. EFFECT OF DIETARY IRON LOADING ON RECOGNITION MEMORY IN GROWING RATS. *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, p. 1-20, 2015.

HARUKI, H. ET AL. TETRAHYDROBIOPTERIN BIOSYNTHESIS AS AN OFF-TARGET OF SULFA DRUGS. *SCIENCE*, v. 340, n. 6135, p. 987-991, 2013.

HEGESH, E. ET AL. A SENSITIVE MICROMETHOD FOR THE DETERMINATION OF METHEMOGLOBIN IN BLOOD. *CLINICA CHIMICA ACTA*, V. 30, N. 3, P. 679-682, 1970.

HELDT, S. A. ET AL. HIPPOCAMPUS-SPECIFIC DELETION OF BDNF IN ADULT MICE IMPAIRS SPATIAL MEMORY AND EXTINCTION OF AVERSIVE MEMORIES. *MOLECULAR PSYCHIATRY*, V. 12, N. 7, P. 656-670, 2007.

HENTZE, M. W. ET AL. TWO TO TANGO: REGULATION OF MAMMALIAN IRON METABOLISM. *CELL*, V. 142, N. 1, P. 24-38, 2010.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. THE STRESSED HIPPOCAMPUS, SYNAPTIC PLASTICITY AND LOST MEMORIES. *NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE*, V. 3, N. 6, P. 453-462, 2002.

KNUTSON, M. D. ET AL. BOTH IRON DEFICIENCY AND DAILY IRON SUPPLEMENTS INCREASE LIPID PEROXIDATION IN RATS. *THE JOURNAL OF NUTRITION*, V. 130, N. 3, P. 621-628, 2000.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. ON A NEW AEROBIC METABOLITE WHOSE PRODUCTION BY BRAIN IS INHIBITED BY APOMORPHINE, EMETINE, ERGOTAMINE, EPINEPHRINE, AND MENADIONE. *J PHARMACOL EXP THER*, V. 82, N. 3, P. 292-300, 1944.

KOSKENKORVA-FRANK, T. S. ET AL. THE COMPLEX INTERPLAY OF IRON METABOLISM, REACTIVE OXYGEN SPECIES, AND REACTIVE NITROGEN SPECIES: INSIGHTS INTO THE POTENTIAL OF VARIOUS IRON THERAPIES TO INDUCE OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS. *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*, V. 65, P. 1174-1194, 2013.

KRISHNAMURTHY, P.; XIE, T.; SCHUETZ, J. D. THE ROLE OF TRANSPORTERS IN CELLULAR HEME AND PORPHYRIN HOMEOSTASIS. *PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS*, V. 114, N. 3, P. 345-358, 2007.

MASALDAN, S. ET AL. STRIKING WHILE THE IRON IS HOT: IRON METABOLISM AND FERROPTOSIS IN NEURODEGENERATION. *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*, V. 133, N. JULY 2018, P. 221-233, 2019.

MATTAPPALIL, A.; MERGENHAGEN, K. A. NEUROTOXICITY WITH ANTIMICROBIALS IN THE ELDERLY: A REVIEW. *CLINICAL THERAPEUTICS*, v. 36, n. 11, p. 1489- 1511.E4, 2014.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. AGEING AND NEURONAL VULNERABILITY. *NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE*, v. 7, n. 4, p. 278–294, 2006.

MAYNE, S. T. ANTIOXIDANT NUTRIENTS AND CHRONIC DISEASE: USE OF BIOMARKERS OF EXPOSURE AND OXIDATIVE STRESS STATUS IN EPIDEMIOLOGIC RESEARCH. *THE JOURNAL OF NUTRITION*, v. 133, n. 3, p. 933S-940S, 2003.

MENG, F. X.; HOU, J. M.; SUN, T. S. EFFECT OF OXIDATIVE STRESS INDUCED BY INTRACRANIAL IRON OVERLOAD ON CENTRAL PAIN AFTER SPINAL CORD INJURY. *JOURNAL OF ORTHOPAEDIC SURGERY AND RESEARCH*, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2017.

MILLER, N. J. ET AL. A NOVEL METHOD FOR MEASURING ANTIOXIDANT CAPACITY AND ITS APPLICATION TO MONITORING THE ANTIOXIDANT STATUS IN PREMATURE NEONATES. *CLINICAL SCIENCE*, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993.

MILLS, E. ET AL. MECHANISMS OF BRAIN IRON TRANSPORT: INSIGHT INTO NEURODEGENERATION AND CNS DISORDERS. *FUTURE MEDICINAL CHEMISTRY*, v. 2, n. 1, p. 51-64, 2010.

MIMIĆ-OKA, J. ET AL. EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS AFTER REPEATED INTRAVENOUS IRON SUPPLEMENTATION. *RENAL FAILURE*, v. 27, n. 3, p. 345-351, 2005.

MIRET, S.; SIMPSON, R. J.; MCKIE, A. T. P HYSIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY OF DIETARY IRON ABSORPTION. *ANNUAL REVIEW OF NUTRITION*, v. 23, n. 1, p. 283-301, 2003.

MORRIS, R. DEVELOPMENTS OF A WATER-MAZE PROCEDURE FOR STUDYING SPATIAL LEARNING IN THE RAT. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS*, v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984.